



Producció de proteïnes recombinants mitjançant la tecnologia Zera® en diferents sistemes eucariotes: desenvolupament d'estratègies de processament.

Roser Pallissé Bergwerf

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Producció de proteïnes recombinants mitjançant la tecnologia Zera® en diferents sistemes eucariotes: desenvolupament d'estratègies de processament.

ROSER PALLISSÉ BERGWERF

2011



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT de BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOTECNOLOGIA, BIENNI 2005-2007



Producció de proteïnes recombinants mitjançant la tecnologia Zera® en diferents sistemes eucariotes: desenvolupament d'estratègies de processament.

Memòria presentada per **Roser Pallissé i Bergwerf** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

la Directora de tesi

l'autora

la tutora

Dra. Blanca Llompart i Royo

Roser Pallissé i Bergwerf

Dra. Dolors Serra i Cucurull

Barcelona, 2011

Dedicat als meus pares i germanes

ACN	ACetoNitril
APS	PerSulfat Amònic
BEVS	<i>Baculovirus Expression Vector System</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CaMV 35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus constitutive promoter</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CP	Cos Proteic
CPD	<i>Cysteine Protease Domain</i>
CV	<i>Column Volume</i>
DAPI	<i>4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole</i>
DIC	<i>Differential Interference Contrast microscopy</i>
DMSO	DiMetil SulfÒxid
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
dNTP	<i>deoxyNucleotide TriPhosphate</i>
DO	Densitat Òptica
DOC	<i>Sodium Deoxycholate</i>
DOPE	<i>DiOleOyl PhosphatidylEthanolamine</i>
DOSPA	<i>2,3-DioleylOxy-N-[2(Spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-Propanaminium trifluoroAcetate</i>
DsRED	<i>Discosoma sp. RED protein</i>
DTT	<i>DithioThreiTol</i>
ECFP	<i>Enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraAcetic acid</i>
EK	<i>Enterokinase</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERAD	<i>ER-Associated protein Degradation</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FXa	<i>Factor Xa protease</i>
GD4K-2NA	<i>Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-2-naphthylamide</i>
GST	<i>Glutathione-S-Transferase</i>
HBS	<i>Hypotonic Buffer Saline</i>
hGH	<i>human Growth Hormone</i>
HPI	Hores Post-Infeció
HPT	Hores Post-Transfecció
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase linked antibody</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
IMPACT™	<i>Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag</i>
InsP6	Inositol hexakisfosfat
IPTG	<i>IsoPropylThioGalactoside</i>
LB	medi <i>Luria-Bertani</i>
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MESNA	<i>Sodium 2-MercaptoEthaneSulfonate</i>
Mxe GyrA	<i>Micobacterium xenopi Gyrase A intein</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
NDSB 195	<i>Non-Detergent SulfoBetaine 195</i>
Ni-NTA	<i>Nickel- NitriloTriAcetic acid</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

Abreviatures i Símbols

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R8	Domini repetitiu de la γ -zeïna 8(PPPVHL)
RE/ER	Reticle Endoplasmàtic
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear.
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Temperatura ambient
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda 9 cell line</i>
SPM	<i>Self-Processing Module</i>
<i>Ssp DnaB</i>	<i>Synechocystis sp. DNA b helicase intein</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like MOdifier</i>
TAE	<i>Tris-Acetate-EDTA</i>
TCEP	<i>Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine Hydrochloride</i>
TEMED	N,N,N',N'-TETraMetilEtilenDiamina
TEV	<i>Tobacco Etch potyVirus</i>
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus</i>
TSP	<i>Total Soluble Protein</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indotil-b-D-Galactopiranòsid

SÍMBOLS

δ	Densitat	g/mL
p	Percentatge	%
c	Concentració	μ M, mM
m	Massa	μ g, mg, Kg, T
M	Pes molecular	kDa
\varnothing	Diàmetre	cm, mm
T^a	Temperatura	$^{\circ}$ C
t	Temps	s, min, h
U	Unitats d'activitat enzimàtica	μ mol \cdot min $^{-1}$
V	Volum	μ L, mL, L
v/v	Volum per volum	%
p/v	Pes per volum	-
λ	Longitud d'ona	nm

Resum	1
1. Introducció	7
1.1 Impacte de la Biotecnologia i les seves aplicacions industrials	9
1.2 L'origen del sector biofarmacèutic	10
1.3 Situació actual del sector biofarmacèutic	11
1.4 Hostes cel·lulars productors de proteïnes recombinants	12
1.4.1 Producció en bacteris	15
1.4.2 Producció en llevats	16
1.4.3 Producció en fongs filamentosos	17
1.4.4 Producció en cèl·lules d'insecte	18
1.4.5 Producció en cèl·lules de mamífer	21
1.4.6 Producció en animals transgènics	22
1.4.7 Producció en sistemes vegetals	24
1.5 Tecnologies per a la producció de proteïnes recombinants.....	27
1.5.1 Secreció de proteïnes recombinants	29
1.5.2 Direcció de l'expressió a compartiments subcel·lulars	29
1.5.2.1 Tecnologia Zera [®] - ERA Biotech S.A.....	30
1.5.3 Elements de fusió: producció de proteïnes de fusió recombinants	35
1.6 Estratègies de processament de proteïnes de fusió.....	37
1.6.1 Factor Xa.....	38
1.6.2 Enteroquinasa	39
1.6.3 Trombina	39
1.6.4 Proteasa TEV	39
1.6.5 Enzims desumolitzants	40
1.6.6 Autoprocessament controlable d'elements de fusió.....	41
2. Plantejament i objectius del treball	47
3. Materials i mètodes	51
3.1 Tècniques de DNA recombinant.....	53
3.1.1 Plasmidis i oligonucleòtids.....	53
3.1.2 Amplificació del DNA per reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	56
3.1.3 Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR en plasmidis.....	58
3.1.4 Clonatge per digestió amb enzims de restricció.....	58
3.1.5 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa.....	58
3.1.6 Lligació.....	58

3.1.7 Preparació i transformació de cèl·lules competents d' <i>Escherichia coli</i>	59
3.1.8 Extracció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians.	60
3.1.9 Seqüenciació de DNA	61
3.2 Sistemes d'expressió	61
3.2.1 Cèl·lules de mamífer CHO-K1	61
3.2.1.1 Manteniment de cèl·lules CHO	61
3.2.1.2 Crioconservació de stocks cel·lulars	62
3.2.1.3 Transfecció transitòria de cèl·lules CHO	62
3.2.2 Cèl·lules d'insecte Sf9, Sf21 i High-Five™	62
3.2.2.1 Manteniment de les cèl·lules d'insecte	63
3.2.2.2 Crioconservació de stocks cel·lulars	63
3.2.2.3 Obtenció del baculovirus recombinant.....	64
3.2.2.4 Amplificació del baculovirus recombinant	65
3.2.2.5 Titulació de la concentració vírica del baculovirus recombinant.....	66
3.2.2.6 Infecció de cèl·lules d'insecte amb baculovirus recombinant	68
3.2.3 Plantes de tabac <i>Nicotiana benthamiana</i>	69
3.2.3.1 Preparació d' <i>Agrobacterium thumefaciens</i> recombinant	69
3.2.3.2 Transformació transitòria de <i>Nicotiana benthamiana</i> per agroinfiltració.....	70
3.3 Tècniques d'anàlisi i manipulació de proteïnes	74
3.3.1 Tècniques generals	74
3.3.1.1 Electroforesi en condicions desnaturalitzants.	74
3.3.1.2 Tinció de gels de poliacrilamida	75
3.3.1.3 Western Blot.....	76
3.3.1.4 Immunodetecció de proteïnes	77
3.3.1.5 Quantificació de proteïnes.....	78
3.3.1.5.1 Determinació de la quantitat de proteïna total pel mètode Bradford.	78
3.3.1.5.2 Quantificació per densitometria	79
3.3.1.5.3 ELISA	80
3.3.2 Tècniques específiques d'anàlisi i manipulació de proteïnes.....	82
3.3.2.1 Extracció total de proteïnes intracel·lulars.....	82
A. Extracció de proteïnes a partir de cèl·lules de mamífer i de cèl·lules d'insecte ...	83
B. Extracció de proteïnes a partir de plantes de tabac.....	83
3.3.2.2 Immunofluorescència	84
A. Sobre cèl·lules de mamífer CHO.	84

B. Sobre cèl·lules d'insecte.....	85
3.3.2.3 Fraccionament subcel·lular mitjançant gradients de densitat.	86
A. Gradient de densitat aplicat a extractes de cèl·lules CHO transfectades.	86
B. Gradient de densitat aplicat a extractes de cèl·lules d'insecte Sf9.....	87
C. Gradient de densitat aplicat a extractes de plantes de tabac.	88
3.3.2.4 Aïllament i obtenció de cossos proteics per centrifugació a partir d'homogenats cel·lulars.....	88
A. Recuperació de cossos proteics a partir d' cèl·lules CHO.....	89
B. Recuperació de cossos proteics a partir de cèl·lules d'insecte.	90
C. Recuperació de cossos proteics a partir de biomassa transgènica de tabac.....	90
3.3.2.5 Solubilització de cossos proteics heteròlegs.	91
A. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de cèl·lules CHO.....	92
B. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de cèl·lules d'insecte	92
C. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de plantes de tabac.....	93
3.3.2.6 Inducció de l'autoprocessament mitjançant inteïnes induïbles.....	93
3.3.2.6.1 Inteïna SspDnaB.....	93
3.3.2.6.2 Inteïna MxeGyrA	93
3.3.2.7 Digestió de proteïnes de fusió Zera [®] amb Enteroquinasa comercial.	94
3.3.3 Detecció de l'activitat enteroquinasa (EK).....	95
3.3.4 Purificació de proteïnes de fusió Zera [®] per cromatografia d'afinitat IMAC.....	96
3.3.5 Purificació de l'hormona de creixement humana per RP-FPLC.....	96
3.3.6 Determinació de l'activitat de l'hormona de creixement humana.	97
3.3.7 Tècniques de validació del producte recombinant.....	99
3.3.7.1 Seqüenciació de l'extrem N-terminal per degradació d'Edman	99
3.3.7.2 Determinació de la massa molecular per Espectrometria de Masses MALDI-TOF MS.....	100
4. Resultats.....	101
CAPÍTOL 1: Producció d'Enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera[®].....	103
CAPÍTOL 2: Aplicació de sistemes basats en l'autoprocessament de proteïnes de fusió Zera[®].....	129
CAPÍTOL 3: Anàlisi comparatiu de diferents sistemes de processament de proteïnes de fusió Zera[®].....	173
5. Discussió.....	187
6. Conclusions.....	215
7. Bibliografia.....	219

Resum

ERA Biotech S.A. és una empresa que desenvolupa la seva pròpia tecnologia per a la producció de proteïnes i pèptids d'alt valor afegit. El mètode de producció i acumulació de proteïna recombinant es basa en el mecanisme natural d'acumulació de proteïnes de reserva de blat de moro (zeïnes) en orgànuls densos derivats de reticle endoplasmàtic anomenats cossos proteics. La tecnologia Zera[®] empra el domini ric en prolina de l'extrem N-terminal de la γ -zeïna per induir la formació *de novo* de cossos proteics heteròlegs en teixits i cèl·lules eucariotes. L'elevada densitat que presenten aquests orgànuls permet una recuperació i enriquiment de la proteïna de fusió d'interès, mitjançant tècniques d'homogeneïtzació i fraccionament cel·lular.

Originàriament dissenyats per permetre la purificació per afinitat del proteïna d'interès, els elements de fusió també poden ajudar a mantenir l'estabilitat, el plegament i la solubilitat del producte. Malgrat tot, per a algunes aplicacions posteriors es requereix la producció de la proteïna nativa, amb el qual són necessàries etapes de proteòlisi mitjançant endoproteases específiques. En un context industrial l'addició d'una proteasa exògena suposa l'etapa més costosa en el procés de producció. A més, les condicions de processament poden arribar a interferir amb l'activitat biològica del component purificat. Un dels objectius principals de moltes empreses dedicades a la producció de proteïnes recombinants, tracta de cercar alternatives al processament convencional per addició de proteases exògenes.

L'objectiu general d'aquest treball s'ha centrat en el desenvolupament i aplicació de dues estratègies de processament aplicades a proteïnes recombinants de fusió produïdes mitjançant la tecnologia Zera[®], en diferents sistemes d'expressió.

La primera aproximació ha consistit en la producció d'enteroquinasa bovina (EK), endoproteasa específica, mitjançant la tecnologia Zera[®]. La producció d'enteroquinasa pròpia evitaria l'adquisició comercial de la mateixa, amb el qual es reduirien els costos globals de producció. S'han dissenyat diferents construccions amb el domini catalític de l'enteroquinasa fusionat al domini Zera[®] per tal de permetre la seva acumulació en cossos proteics heteròlegs. Degut a la conformació catalítica que adopta, observarem que el seu extrem N-terminal havia de romandre lliure per tal de mantenir la seva activitat proteolítica. La fusió del domini Zera[®] al extrem C-terminal d'EK va resultar incompatible amb la viabilitat de les cèl·lules de mamífer o del teixit foliar de tabac, indicant cert grau de citotoxicitat promogut per la proteasa activa. D'altra banda, el bloqueig de l'extrem N-terminal d'EK mitjançant la fusió del domini Zera[®], requeria d'una etapa prèvia de processament per tal d'activar la proteasa *in vitro*. Els baixos nivells d'expressió assolits en cèl·lules de mamífer, juntament amb la baixa idoneïtat de l'estratègia, varen motivar l'exploració d'altres alternatives de processament.

La segona aproximació descrita en aquest treball es basa en l'estudi de l'autoprocessament de proteïnes de fusió mitjançant inteïnes.

Les inteïnes són elements proteics naturals capaços de promoure l'*splicing* de proteïnes a través d'una sèrie de reaccions que permeten la seva auto-excissió i la unió dels fragments que les flanquegen o exteïnes. Certes modificacions genètiques en residus clau de la seqüència de les inteïnes, han permès modular la seva activitat per permetre l'autoprocessament *in vitro* de forma controlable. S'ha estudiat l'aplicació de dos tipus diferents d'intèines induïbles per al processament de proteïnes de fusió Zera[®], en cèl·lules de mamífer, en cèl·lules d'insecte, i en planta de tabac.

El rendiment global del procés de producció de rhGH (com a proteïna model), fou analitzat i comparat emprant dos sistemes de processament diferents sobre la proteïna de fusió Zera[®] expressada en planta de tabac: el mediat per la inteïna MxeGyrA, i el de la proteasa comercial enteroquinasa. Tot i que els costos globals de producció de rhGH resultaren similars per ambdós processos, el rendiment de producció fou notòriament major en el procés emprant la inteïna. L'èxit de l'aplicació de les inteïnes a la tecnologia Zera[®], ha comportat un avenç en el procés de *downstream*, facilitant de manera significativa la recuperació de la proteïna nativa d'interès.

ERA Biotech S.A. is a biotechnology company whose technology permits high-level production of recombinant proteins and peptides through application of the Zera[®] assembler peptide. The Zera[®] domain originates from a maize storage protein (gamma-zein), which naturally accumulates in maize grains in the form of dense protein bodies to elevated levels. The Zera[®] assembler peptide when fused to a protein of interest triggers the formation *in vivo* of protein bodies in eukaryotic cells, effectively converting the cells into dense storage organelles. Due to its physicochemical properties, the downstream steps and recovery of the recombinant proteins are extremely efficient.

For some applications in the biopharmaceutical industry, fusion or affinity tags need to be cleaved off by site-specific endoproteases in order to recover the native target protein. At a manufacturing scale, the removal of the fusion tag is the most costly step in protein production (cost and specificity/efficiency issues), and can interfere with the biological activity of the purified component. Therefore novel cleavage options which permit specific, efficient and scalable protein production processes are required.

In the present study we describe two different cleavage strategies that have been adopted for Zera[®] fusion proteins expressed in different host expression systems.

The first approach was to produce a conventional site-specific endoprotease in house through Zera[®] technology. Different constructs were designed for the easy and active production of bovine enterokinase (EK) catalytic subunit in mammalian cells and transgenic tobacco plants. Active conformation of this protease was adopted when the N-terminus of the protein was free of any fusion tag, however, proteolytic activity of this protease resulted in cytotoxicity in both host cell systems tested. The fusion of the Zera[®] domain in the N-terminus of EK and its expression in mammalian cells resulted in the formation *de novo* of protein bodies accumulating the target fusion protein. Isolation of protein bodies and subsequent downstream steps for protein recovery were designed and set up for this new host system. For the EK activation, a cleavage step by another endoprotease was included, but the low expression levels achieved for this fusion protein, resulted in non-conclusive data from the activity test. Considering the biochemical properties of this protease its recombinant production for large scale manufacturing results technically cost-unfriendly, so alternative cleavage methods were explored.

The second approach described in the present work, consisted in the use and application of self-cleavable elements for the specific cleavage of Zera[®] fusion proteins. Inteins are naturally occurring protein elements capable of post-translational self-excision from a precursor protein through a process known as protein splicing. MxeGyrA and SspDnaB mini-inteins have been engineered to yield a controllable N-terminal and C-terminal autocleavage induced under certain controlled conditions. Both inteins have shown activity when fused to Zera[®] and to a protein of interest in mammalian cells (CHO), insect cells (Sf9) and transgenic tobacco plants. The success of the intein application to the Zera[®] technology has evolved into a faster and more user friendly downstream step leading to the recovery of a native protein of interest.

1. Introducció

1.1 Impacte de la Biotecnologia i les seves aplicacions industrials.

Fa prop de 40 anys des de la descoberta i desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant, i des d'aleshores, la producció de proteïnes heteròlogues d'alt valor afegit ha sofert un creixement exponencial amb concordança a l'expansió de la indústria biotecnològica (Andersen i Krummen, 2002).

Un procés biotecnològic implica la utilització de sistemes biològics, organismes vius o els seus derivats per a la creació o modificació de productes amb finalitats específiques d'interès industrial. De les aplicacions principals que se'n deriven inclouen àmbits industrials de gran influència com el sanitari, el diagnòstic farmacèutic, el veterinari, el tèxtil, el sector de la cosmètica i nutrició, o la biorremediació ambiental. Actualment la distribució per sectors de les principals empreses biotecnològiques a Europa segueix un patró similar al representat a la figura 1.1. Com es pot observar, la seva activitat industrial es troba majoritàriament vinculada al sector sanitari i farmacèutic, on també s'hi inclouen la salut animal i la veterinària. Dins de l'àmbit relacionat amb la salut humana, els productes basats en recombinants són utilitzats per a finalitats com el tractament de ferides, antimicrobians, vacunes, al·lèrgens, per a tractaments oncològics, de malalties auto-immunes o de trastorns en el sistema nerviós central, hormones i enzims de substitució.

La secció de serveis, a la qual hi pertanyen àmbits industrials com la cosmètica, la nutrició, els biomaterials o la indústria tèxtil, suposa el segon sector biotecnològic amb activitat industrial més important. Mentre que el sector més minoritari correspon al de l'agricultura biotecnològica i al dels tractaments de biorremediació ambiental.

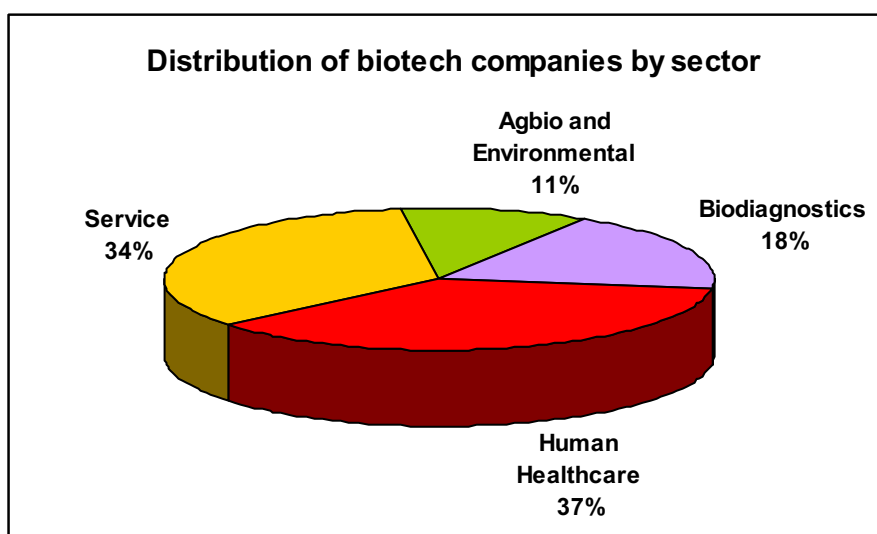


Figura 1.1. Distribució per diagrama de sectors de les empreses biotecnològiques d'Europa a l'any 2006. Adaptat de la font *EuropaBio 2006*.

1.2 L'origen del sector biofarmacèutic

Al llarg de les últimes dècades, la indústria farmacèutica ha experimentat una important transformació en els processos de desenvolupament de nous fàrmacs, impulsada pels recents avenços biotecnològics.

Essencialment, l'èxit del progrés de la biotecnologia farmacèutica rau en una sèrie de canvis de definició d'alguns elements claus de la farmacologia. Així, per exemple, la percepció de la paraula fàrmac va passar de ser definida com a molècula petita i senzilla obtinguda per síntesi química, a incloure macromolècules més complexes amb acció específica, millorant l'eficàcia i reduint els efectes secundaris (Elbehri, 2005). D'altra banda, el material d'origen biològic torna a ser considerat com a font principal de productes terapèutics, de manera que aquests compostos, qualificats des dels anys 80 com a biofarmacèutics, poden incloure proteïnes, àcids nucleics, virus, sèrums terapèutics, vacunes o components de la sang (Elbehri, 2005 i Walsh, 2005).

La insulina extreta de pàncrees porcí va ser la primera proteïna amb finalitats terapèutiques que als anys 20 va permetre el tractament de la diabetis humana. Fins al moment, el contingut proteic de la majoria de remeis terapèutics d'origen biològic havia estat severament malmès degut als mètodes agressius d'extracció de fonts majoritàriament vegetals (Houdebine, 2009).

Un dels primers avenços en el camp biofarmacèutic va fer-se realitat amb el desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant. Aquest esdeveniment va donar el tret de sortida a la utilització d'organismes vius per a la producció de rèpliques de proteïnes terapèutiques humanes.

La insulina i l'hormona de creixement humanes van ser les primeres proteïnes terapèutiques que al llarg dels anys 80 varen ser produïdes en bacteris recombinants, concretament a *Escherichia coli*. Fins al moment, l'extracció d'ambdues proteïnes a partir de teixit animal no havia arribat a ser limitant, però l'eficiència i la qualitat de la proteïna recombinant resultava clarament millorada (Houdebine, 2009).

En els darrers temps, la indústria biofarmacèutica no només s'ha centrat en la producció de grans quantitats de rèpliques de proteïnes humanes, sinó que també ha evolucionat cap al disseny i producció de proteïnes que han estat modificades genèticament per al tractament específic de malalties com el càncer, o malalties infeccioses o cardiovasculars (Elbehri, 2005). L'emergència de tècniques com la mutagènesi dirigida, juntament amb l'augment de coneixements sobre l'estructura proteica i la seva relació amb la funció, són els que han facilitat el disseny d'aquestes proteïnes modificades (Walsh, 2005).

1.3 Situació actual del sector biofarmacèutic

Actualment, el desenvolupament de productes biofarmacèutics és el sector que presenta el creixement més ràpid dins de la indústria farmacèutica. L'any 2006 es va estimar que prop de 2.500 fàrmacs d'origen biotecnològic es trobaven en fase de descobriment i recerca, mentre que 900 d'ells es trobaven en fases preclíniques, i més de 1.600 en fases clíniques (Karg i Kallio, 2009).

Avui dia, els productes biofarmacèutics representen més del 10% del mercat farmacèutic. De fet, aquests també formen part de prop del 20% dels medicaments aprovats en els últims anys, i del 40% dels fàrmacs que estan en tràmit de ser aprovats (Karg i Kallio, 2009). A la figura 1.2 hi trobem representat el creixement en el nombre de fàrmacs i vacunes biotecnològiques aprovades en els últims anys.

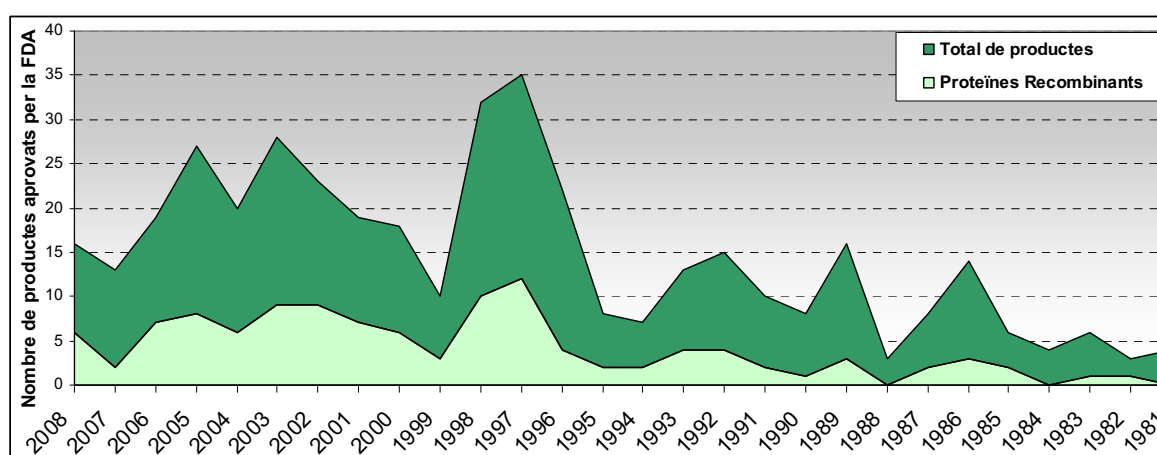


Figura 1.2. Evolució del nombre de productes biofarmacèutics aprovats per la FDA. (Adaptat de Langer, 2009b)

Entre els productes biotecnològics amb més quota de mercat trobem hormones com l'eritropoetina, l'hormona de creixement, la insulina, i altres proteïnes usades per al tractament de càncer i de malalties inflamatòries. Tot i així, els productes proteics que conformen el grup econòmic més important per a la indústria biofarmacèutica són indubtablement els anticossos monoclonals recombinants. Actualment, els anticossos monoclonals representen un component dominant en el mercat biofarmacèutic, on en representen prop del 20% dels productes d'origen biològic (Langer, 2009). L'any 2007 el volum de vendes d'anticossos monoclonals va arribar als 14 bilions de dòlars, amb un creixement interanual del 22% (Aggarwal, 2008), i totes les previsions indiquen que el volum de mercat creixerà prop de 38 milions d'euros anuals fins el 2013 (Fig. 1.3; Karg i Kallio, 2009).

Al mercat actual ja hi ha disponibles prop de 30 anticossos monoclonals recombinants aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*), la majoria dels quals són indicats per al tractament de càncer i malalties inflamatòries.

Tot i així, les altes dosis que són requerides per a certs tractaments terapèutics amb anticossos monoclonals, obliguen a que els processos de producció siguin escalables, eficients i

cost-efectius (Langer, 2009a). La gran demanda d'alguns d'aquests compostos recombinants no està totalment coberta degut a una saturació en la capacitat de producció d'aquests productes mitjançant les tecnologies de bioproducció disponibles.

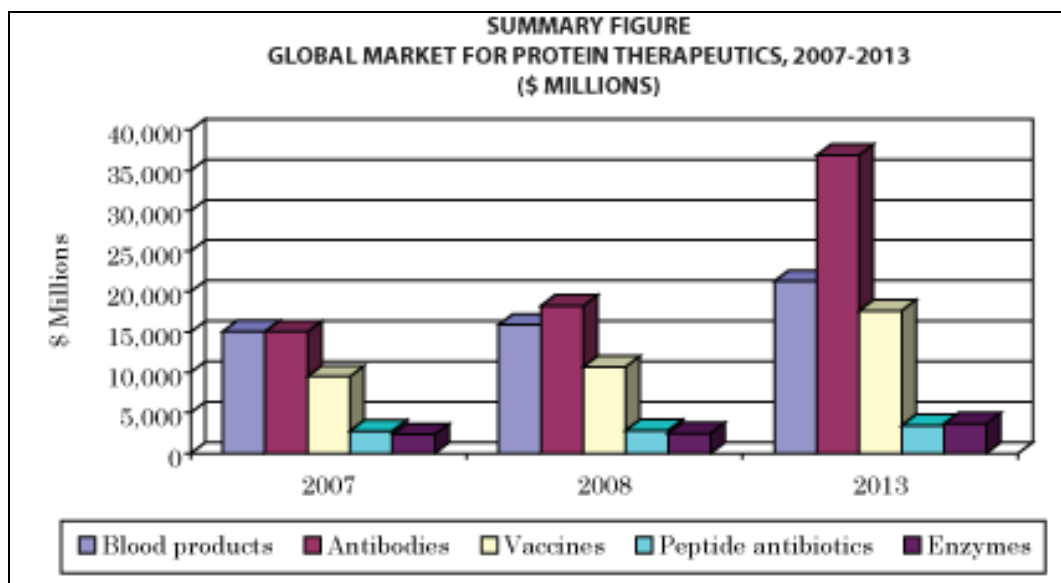


Figura 1.3. Distribució i tendència del mercat global de proteïnes terapèutiques durant els anys 2007 al 2013. Font: BCC research report BIO 2009..

Davant aquesta situació actual i de la previsió de les futures necessitats creixents de mercat, es fa necessària una adaptació de la capacitat global de producció. L'any 2003 la capacitat global de utilització de la indústria biofarmacèutica suposava el 76% i, tot i que aquests valors cada cop es van adaptant a la demanda del mercat, és un indicador evident de la gran expansió que està experimentant la indústria biofarmacèutica (Langer, 2009a).

La cerca de noves estratègies biotecnològiques i la optimització dels sistemes actuals d'expressió que permetin abastir la demanda global d'aquests compostos biofarmacèutics representen un dels reptes més importants per a la biotecnologia del segle XXI.

1.4 Hostes cel·lulars productors de proteïnes recombinants

Actualment disposem d'un ventall molt ampli de sistemes d'expressió de proteïnes. Aquestes poden ser expressades en cultius cel·lulars bacterians, de llevats, de fongs, de mamífers, de plantes o d'insectes, o bé, poden ser produïdes a través d'animals i plantes transgèniques.

La selecció del sistema més òptim d'expressió es basa en propietats com la productivitat, la bioactivitat, la finalitat i les característiques fisicoquímiques de la proteïna d'interès a produir. També són de rellevant importància factors relacionats amb la viabilitat econòmica, com el cost, el rendiment, la conveniència i la seguretat que confereix el sistema d'expressió (Adrio i Demain, 2010; Yin *et al.*, 2007).

Malgrat tot, els requeriments de modificacions post-traduccionals del producte d'interès, són els que determinen en primera instància l'elecció del sistema d'expressió.

Existeixen diferents tipus de canvis químics que tenen lloc un cop la proteïna és traduïda, com per exemple les fosforilacions, les N- i O- glicosilacions, les acilacions, les oxidacions, les hidroxiprolinacions, etc. Alguns d'ells poden resultar essencials per al plegament i activitat de la proteïna, però d'altres no tenen un paper tant essencial per a la seva funció biològica. De fet, el 40% del mercat de proteïnes terapèutiques està format per proteïnes sense requeriments essencials en modificacions post-traduccionals, i per tant, poden ser majoritàriament produïdes en bacteris o llevats (Rayder, 2008; Demain i Vaishnav, 2009).

La majoria dels polipèptids secretats d'origen eucariòtic presenten glicosilacions. Aquestes modificacions són específiques d'espècie, teixit i tipus cel·lular, i en alguns casos confereixen o estan involucrades en l'estabilitat i el correcte plegament de proteïnes funcionals.

La glicosilació té lloc mitjançant un enllaç N-glicosídic amb el grup R del residu asparagina en una seqüència de tipus Asn-X-Ser/Thr; o bé, mitjançant un enllaç O-glicosídic en el grup R d'una serina, treonina, hidroxiprolina o hidroxilisina. Generalment, aquestes reaccions poden produir-se en aquests aminoàcids de forma parcial, total o absent, donant lloc a possibles problemes d'heterogeneïtat. Tot i que l'homogeneïtat glicosídica es podria assolir mitjançant el clonatge de glicosil-transferases, aquesta solució no sempre és aplicable en tots els hosts i sistemes d'expressió (Demain i Vaishnav, 2009).

Les proteïnes N-glicosilades són produïdes majoritàriament en cèl·lules de mamífer, ja que tenen la capacitat d'imitar bastant fidelment les glicosilacions que tenen lloc en l'ésser humà. Concretament, les proteïnes produïdes en cèl·lules d'hàmsster xinès (*Chinese Hamster Ovary* – CHO cells) ocupen el 35% de les proteïnes terapèutiques en el mercat. Malauradament, el procés de manutenció i producció en aquest hoste resulta econòmicament molt costós i, en alguns casos, les glicosilacions no són exactament idèntiques a les humanes, havent de ser posteriorment modificades (Adrio i Demain, 2010). A més, depenent de les característiques i composició del medi de creixement d'aquestes cèl·lules, la glicosilació d'una proteïna pot arribar a ser diferent, aportant una nova variable a tenir en compte a l'hora d'escollir aquest sistema d'expressió.

La N-glicosilació que té lloc en plantes és estructuralment diferent a la que té lloc en mamífers. De fet, les glicoproteïnes produïdes en plantes presenten grups glucídics $\beta(1\rightarrow2)$ -xilosa i $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucosa que són absents en mamífers. Per contra, als sistemes vegetals els hi manquen grups terminals de galactosa i àcid siàlic presents en moltes proteïnes humanes.

Tot i que la composició en glicans pot variar entre espècies vegetals i entre teixits diferents d'una mateixa planta; s'han observat problemes d'immunogenicitat en diferents mamífers a qui se'ls ha administrat glicoproteïnes produïdes en plantes transgèniques (Gomord *et al.*, 2005).

Algunes de les mesures en estudi que s'estan prenent per tal d'intentar pal·liar aquest efecte són, per una banda, les modificacions *in vitro* mitjançant glicosiltransferases de galactosa i d'àcid siàlic i, per altra banda, les inhibicions dels enzims en planta fucosiltransferasa i xililtransferasa mitjançant anticossos, ribosimes, o RNA d'interferència (Gomord *et al.*, 2005). Tot i que aquestes mesures encara no han provat efecte sobre pacients humans, es creu que en molts casos la utilització de les plantes com a sistema d'expressió per a la producció productes terapèutics glicosilats formarà part dels reptes superats de la biotecnologia vegetal.

A continuació, es detallen les característiques més importants dels principals sistemes d'expressió existents, posant èmfasis en cada una dels seus avantatges i inconvenients, així com alguns resultats de productivitat d'alguns productes amb interès terapèutic o industrial. A la taula 1.1 s'hi troben resumits alguns dels aspectes més importants a l'hora de determinar el millor sistema de producció per a productes d'interès industrial, farmacèutic o veterinari.

	Bacteris	Llevats	Fongs filamentosos	Cèl·lules d'insecte	Cultius cel·lulars de mamífer	Animals transgènics	Plantes transgèniques
Costos de manteniment	Baixos	Baixos	Mitjos	Mitjos	Elevats	Elevats	Baixos
Nivells de producció teòrics	Molt alts	Molt alts	Alts	Alts	Baixos	Molt alts	Alts
Nivells de producció reals	Mitjos	Mitjos	Mitjos	Mitjos	Baixos	Alts	Mitjos
Costos de producció	Baixos	Mitjos	Mitjos	Mitjos	Alts	Mitjos	Baixos
Producció a gran escala	Difícil	Difícil	Difícil	Assequible	Difícil	Assequible	Fàcil
Costos d'escalat	Elevats	Elevats	Moderats	Elevats	Elevats	Moderats	Baixos
Temps d'escalat	Curt	Curt	Curt	Curt	Curt	Llarg	Moderat
Rendiment	Mig	Alt	Mig	Mig	Mig-Alt	Alt	Alt
Estandardització	Fàcil	Fàcil	Fàcil	Fàcil	Fàcil	Complicada	Complicada
Modificacions post-traduccionals	Absents	Presentes, no tots correctes	Correctes	Correctes	Correctes	Correctes	Correctes
Glicosilació adequada	Absent	Incorrecta	Correcta?	Correcta?	Correcta	Correcta	Correcta?
Risc per patògens contaminants	Alt	Baix	Baix	Baix	Alt	Alt	Baix
Productes al mercat	Bastants	Pocs	Pocs	Pocs	Majoria	Pocs	Molt pocs

Taula 1.1 Comparació dels diferents sistemes de producció de proteïnes recombinants. Dades extretes i elaborades a partir de diferents fonts d'informació: Goldstein, 2004 i Houdebine, 2009.

1.4.1 Producció en bacteris

La producció de proteïnes heteròlogues a *Escherichia coli* és la més antiga i la més estesa. Els principals avantatges i desavantatges de l'ús d'aquest sistema es troben resumits a la taula 1.1. Entre ells destaquen la seva fàcil manipulació a baix cost, els temps de generació curts i sobretot, el seu potencial per acumular alts nivells de proteïna recombinant.

Els coneixements avançats sobre la genètica d'aquests microorganismes, permeten la manipulació i modificació a nivell d'àcids nucleics d'una forma senzilla i ràpida, tenint control sobre el promotor i alterant el nombre de còpies del plàsmid. De fet, els progressos més recents sobre les bases fonamentals de la transcripció, la traducció i el plegament proteic que tenen lloc a *E.coli*; juntament amb el desenvolupament i la disponibilitat de noves eines d'enginyeria genètica, han fet que aquests bacteris siguin cada cop més valorats per a l'expressió de proteïnes eucariotes complexes. Altres avantatges que ofereix aquest hoste són la seva capacitat d'alterar el flux de carboni metabòlic, la baixa incorporació d'aminoàcids anàlegs, i el seu comportament reproducible sota control informatitzat.

E.coli pot acumular proteïnes recombinants fins prop del 80% del seu pes sec, i sobreviu en condicions ambientals variades. Tot i així, aquest sistema presenta una sèrie de desavantatges que en alguns casos l'invaliden per a l'expressió de determinats productes. A *E.coli* li manca la maquinària necessària per a dur a terme modificacions post-traduccional com la N- i l'O-glicosilació, l'acilació d'àcids grassos, la fosforilació i la formació de ponts disulfur; els quals són imprescindibles per al correcte plegament i funcionalitat d'algunes proteïnes (Karg i Kallio, 2009). A més, densitats cel·lulars elevades resulten en problemes de toxicitat derivats de la formació d'acetat, factor el qual podria ser controlable mitjançant la regulació dels nivells d'oxigen i de glucosa subministrada.

Un dels factors més importants a tenir en compte en la producció de proteïnes heteròlogues a *E.coli*, és la seva acumulació i formació de cossos d'inclusió. Com a resultat, les proteïnes recombinants són sovint inactives, insolubles i requereixen d'una etapa més o menys complicada de renaturalització. De fet, proteïnes riques en ponts disulfur són difícils d'expressar i el seu replegament és molt complicat.

Per tal d'intentar superar aquests inconvenients o de millorar la producció a *E. coli*, s'han pres una sèrie de mesures com les de utilitzar diferents promotors per a regular l'expressió, co-expressar amb xaperones i/o foldases, disminuir la temperatura de creixement, secretar les proteïnes a l'espai periplasmàtic o al medi, reduir la velocitat de síntesi proteica, canviar el medi de creixement, expressar la proteïna com a fusió, desnaturalitzar la proteïna *in vitro* per promoure el correcte plegament de la proteïna, etc. (Demain i Vaishnav, 2009).

Els rendiments de producció de proteïna recombinant soluble a *E. coli*, oscil·len entre 1 g/L i 5,5 g/L, depenent del tipus de proteïna, i d'on hagi estat dirigida l'expressió de la proteïna recombinant dins l'hoste: espai intracel·lular, extracel·lular o periplasmàtic (Paal *et al.*, 2009).

Altres bacteris gram negatius han estat utilitzats per a l'expressió de proteïnes recombinants. Un exemple destacat és *Ralstonia eutropha*, on s'han expressat amb èxit proteïnes propenses a acumular-se en cossos d'inclusió com l'organofosfohidrolasa, amb un rendiment de 10 g/L (Demain i Vaishnav, 2009).

Un altre sistema d'expressió són els *Bacillus*, uns gram positius que resulten molt útils per circumcidat alguns inconvenients presents en els altres sistemes d'expressió bacterians. En aquest hoste s'assoleixen rendiments pròxims als 5 g/L.

1.4.2 Producció en llevats

Els llevats són organismes unicel·lulars eucariotes de gran interès per a la indústria alimentària degut a la seva capacitat de realitzar la fermentació a partir d'hidrats de carboni. Com a sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues, els llevats són un dels organismes que resulten de primera elecció, sobretot quan l'expressió recombinant a *E. coli* no ha resultat satisfactòria degut a problemes de plegament i funcionalitat de la proteïna, o bé degut al requeriment en modificacions post-traduccionals.

La bona caracterització genètica, la manipulació econòmica i senzilla dels cultius, i l'elevada adaptabilitat a processos de fermentació en biorreactors, han permès el desenvolupament de plataformes de producció a escala industrial basades en llevats (Taula 1.1).

Les soques de llevats més utilitzades són les de *Sacharomyces cerevisiae* i les de llevat metilotròfic *Pichia pastoris*.

Els llevats metilotròfics han esdevingut hostes molt atractius per a la producció industrial de proteïnes recombinants, ja que el promotor que controlen l'expressió d'aquests gens són dels més forts i dels més estrictament regulats de tots els promotors existents en llevats. El promotor constitutiu AAC (*ATP-ADP Carrier* de la membrana mitocondrial interna) presenta una activitat promotora fins a 10 vegades superior que altres sistemes comercials d'expressió existents en llevats (Stadlmayr *et al.*, 2010). Quan l'expressió constitutiva no és adequada per a la producció de determinades proteïnes, s'utilitzen alternativament promotors induïbles com l'AOX1 (*Alcohol Oxidase 1*). Tots els llevats metilotròfics coneguts fins al moment comparteixen la mateixa via metabòlica que els hi permet utilitzar el metanol com a única font de carboni, mitjançant enzims de tipus alcohol oxidasa. La utilització del promotor induïble del gen AOX1 permet controlar l'expressió del gen d'interès, mitjançant una simple modificació en el contingut de metanol en el

medi (Tschopp et al., 1987). Tot i així, per a una producció a gran escala, la manipulació d'elevades quantitats de metanol no és recomanable ni en termes de cost, ni per la toxicitat associada.

Degut a la seva elevada taxa de creixement cel·lular fins a densitats de 130 g/L, aquests llevats poden assolir nivells de productivitat importants segons la naturalesa de la proteïna recombinant expressada. Comparat amb d'altres sistemes d'expressió com les cèl·lules S2 de *Drosophila melanogaster* o les cèl·lules CHO, *P. pastoris* dona rendiments de producció molt alts, sobretot per a proteïnes secretades. L'albumina de sèrum ha estat produïda a *P. pastoris* amb un rendiment de 14 g/L, mentre que la glucosa oxidasa d' *A. niger* ha estat produïda a *S. Cerevisiae* amb un rendiment pròxim als 9 g/L (Demain i Vaishnav, 2009).

L'avantatge més gran que presenten *P. pastoris* i altres llevats sobre sistemes bacterians com *E. coli*, és que poden promoure la formació d'enllaços disulfur i glicosilacions en proteïnes (taula 1.1).

Tot i així, hi ha glicosilacions que tenen lloc en llevats que no són adequades per a determinades proteïnes d'origen mamífer, ja que els oligosacàrids O-enllaçats només contenen sacàrids de tipus manosa, mentre que proteïnes eucariotes més complexes contenen cadenes d'àcid siàlic O-enllaçades. A més, alguns llevats solen mostrar problemes d'hiperglicosilació en llocs N-enllaçats provocant una reducció de l'activitat proteica, o bé una unió a receptors inespecífica, causant importants problemes immunològics (Jenkins i Curling, 1994)

Generalment, la hiperglicosilació no és tant important a *P. pastoris*, ja que les cadenes d'oligosacàrids N-enllaçats rics en manosa solen ser més curtes que les que es formen en *S. cerevisiae*. A més, aquest llevat és deficient en l'enzim α -1,3-manosil transferasa encarregat de produir unions terminals de tipus α -1,3-manosil a *S. cerevisiae*, el qual provoca una alta resposta antigènica en pacients (Dale et al., 1999).

1.4.3 Producció en fongs filamentosos

Els fongs filamentosos són microbis multicel·lulars eucariotes que presenten un gran interès biotecnològic com a fàbriques de proteïnes amb aplicacions farmacèutiques i industrials. Algunes espècies com *Aspergillus niger* o *Trichoderma reesei* produeixen quantitats remarcables de proteïna recombinant en l'espai extracel·lular, i la majoria produeixen modificacions post-traduccionals similars a les que tenen lloc en mamífers (Meyer, 2008). Tant és així, que la majoria de glicoproteïnes produïdes a *Trichoderma reesei*, presenten un patró de glicosilació quasi idèntic al que té lloc en cèl·lules de mamífer.

Mitjançant la transferència plasmídica, els gens forans poden ser incorporats en els cromosomes dels fongs filamentosos, on s'integren de forma estable en forma de repeticions en

tàndem. S'han arribat a observar fins a 100 còpies del transgèn integrades en el genoma d'aquests fongs, fet el qual permet una elevada estabilitat gènica a llarg termini (Keränen i Penttilä, 1995).

Pel que fa a nivells de producció, *A. niger* secreta l'enzim glucoamilasa recombinant amb un rendiment aproximat de 25 g/L. Per a altres proteïnes s'han aconseguit nivells de producció de fins a 2 g/L per la lactoferrina humana, i 0.9 g/L d'anticòs monoclonal Trastazumab. D'altra banda, la facilitat amb la que s'assoleix un escalat en fermentador, ha permès assolir nivells de producció de fins a 100 g/L de proteïna recombinant, segons les característiques del producte i el tipus d'espècie (Demain i Vaishnav, 2009).

Malgrat aquests valors de producció força competitiu, en alguns casos, els rendiments de secreció d'algunes proteïnes heteròlogues han resultat limitants. Entre les estratègies que s'han seguit per millorar aquest rendiment cal destacar la utilització de promotors homòlegs forts, l'augment del nombre de còpies de gen, la fusió d'un gen que codifiqui per a una proteïna altament secretada al nostre gen d'interès, la utilització de soques proteasa-deficients, etc.

Tot i les millores en la tecnologia de DNA recombinant, les principals limitacions del sistema tenen lloc durant el procés de transcripció. S'ha observat que un augment en el nombre de còpies del gen no sempre s'ha correlacionat amb un augment en els nivells d'expressió de proteïna recombinant (Verdoes *et al.*, 1994). Aquests estudis, realitzats sobre *A. niger* recombinant, indiquen que aquestes limitacions a nivell de transcripció podrien ser degudes al lloc d'inserció de les còpies del gen, o bé a la quantitat disponible de proteïnes reguladores en *trans*. D'altra banda, l'abundància de proteases endògenes presents en aquests fongs també poden limitar o impedir l'expressió de determinades proteïnes heteròlogues.

1.4.4 Producció en cèl·lules d'insecte

Les cèl·lules d'insecte són capaces de dur a terme modificacions post-traduccionals més complexes que les que poden realitzar els fongs. A més, també disposen d'una maquinària de plegament adequada per a la producció de proteïnes solubles d'origen mamífer (Demain i Vaishnav, 2009).

El sistema vector més àmpliament utilitzat per a l'expressió de proteïnes recombinants en insectes són els baculovirus, sobretot degut a la seva capacitat d'infecció sobre un rang ampli d'espècies d'artròpodes. El mot *baculo* prové del grec i es refereix a la forma de bastó que presenten les seves nucleocàpsides, les quals poden arribar a tenir una mida de 5µm.

El baculovirus més conegut i utilitzat com a vector d'expressió en insectes és el virus de la polihedrosi nuclear *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). El genoma d'aquest baculovirus està format per DNA circular de doble cadena, que es troba super-enrotllat i empaquetat a l'interior d'una nucleocàpsida amb forma de bastó (Ayres *et al.*, 1994). Aquesta nucleocàpsida té

la capacitat de créixer longitudinalment, fet que permet acomodar insercions molt grans de DNA exogen en el genoma víric.

Els virus ACMNPV presenten un cicle vital bifàsic amb dues formes fenotípiques diferents: per una banda, hi ha la forma oclusionada dels virus (*Occlusion-Derived Virus*, OV o ODV) i, per altra banda, hi ha una forma extracel·lular del virus en formació o en fase de gemmació (*Budded Virus*, BV) (Fig. 1.4).

Els virions BV estan formats per nucleocàpsides individuals envoltades per una coberta que conté una glicoproteïna de membrana anomenada gp64. Aquesta proteïna és la que permet que les nucleocàpsides es puguin ancorar a la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste per permetre-li la introducció del material genòmic (Blissard i Wenz, 1992). La forma BV és 1000 vegades més infecciosa per a cèl·lules d'insecte en cultiu que la forma ODV, i és responsable de la transmissió de la infecció de cèl·lula a cèl·lula, en els primers estadis de la infecció (Monsma *et al.*, 1996). La forma viral BV la que permet la transferència del gen exogen a l'interior de la cèl·lula d'insecte hoste.

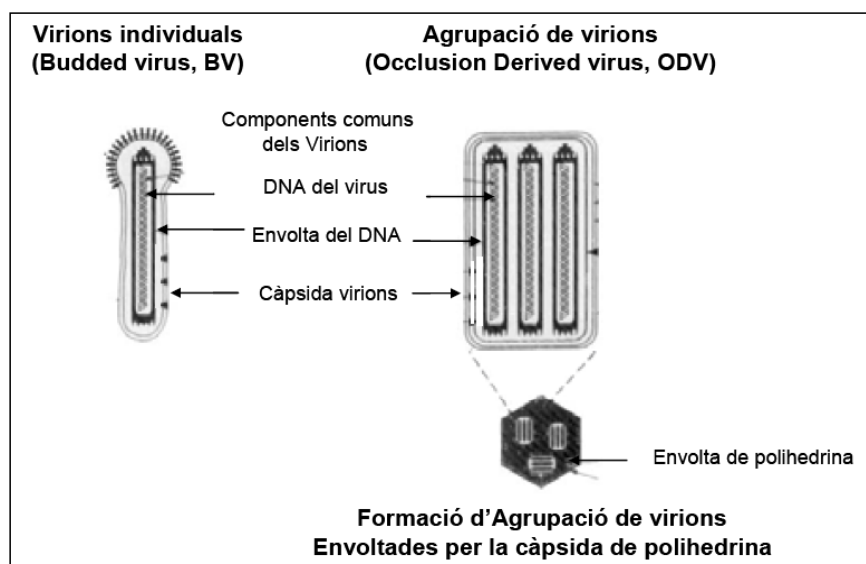


Figura 1.4. Estructures fenotípiques dels virus AcMNPV. Adaptat de van Oers MM. i Vlak JM. 2007.

Durant els estadis més tardans de la infecció es formen grans quantitats de cossos d'oclusió (*Occlusion bodies*, OB) o poliedres. Aquests cossos consisteixen en múltiples nucleocàpsides envoltades per una càpsida (ODV) que es troben incrustats en una matriu para-cristal·lina en forma de poliedre (Fig. 1.4). El component majoritari d'aquesta matriu és una proteïna de 30 kDa anomenada polihedrina (Summers i Smith, 1978; i Rohrmann, 1986), que és produïda en grans quantitats gràcies a una activitat transcripcional molt potent promoguda per un promotor fort.

Els cossos d'oclusió protegeixen els virus per a què puguin sobreviure condicions ambientals adverses entre infecció i infecció. De fet, la polihedrina té dues funcions bàsiques durant la transmissió de la infecció: la primera és la de protegir els virus (ODV) i virions (BV) de la

inactivació, i la segona és la de facilitar l'alliberament dels virions durant la primera fase de la infecció mitjançant la dissolució de la matriu polihedrínica en l'ambient bàsic de l'intestí mitjà de l'insecte (Rohrmann, 1986).

L'obtenció de baculovirus recombinants es basa en la substitució del gen de la polihedrina pel gen de la proteïna forana d'interès, i en la seva utilització per a infectar hostes cel·lulars d'insecte. Com a resultat, es poden arribar a assolir nivells d'expressió propers al 25-50% del total de proteïnes cel·lulars.

La substitució del gen de la polihedrina interfereix en la formació de virus oclusionats (per la impossibilitat de sintetitzar la polihedrina que forma el cos d'oclusió), però no s'ha observat cap efecte sobre la producció de BV. Aquest sistema d'expressió va ser dissenyat per esdevenir un sistema segur de producció, ja que fora de les condicions controlades de laboratori perd la capacitat de formar l'envolta protectora dels virions i per tant, no es pot transmetre entre els insectes en el seu entorn natural (Smith *et al.*, 1983).

Una vegada el baculovirus s'ha introduït a l'interior de la cèl·lula, aquest utilitza la maquinària cel·lular per multiplicar-se en forma de nous virions individuals. Aquest fet impedeix que la cèl·lula pugui continuar amb el seu cicle natural, però no morirà fins que el propi virus la lisi un cop s'hagi completat el cicle d'infecció.

La cèl·lula hoste d'insecte més usual per a la producció de proteïnes recombinants és la del lepidòpter *Spodoptera frugiperda* cultivada en suspensió, tot i que també mostra una feble adherència i pot ser utilitzada per al seu creixement sobre suports en superfície. La línia cel·lular Sf9 és la més comunament utilitzada, presenta una grandària d'entre 5 i 20 µm de diàmetre, i té una temperatura òptima de creixement de 27-28°C.

Fins a 200 tipus de proteïnes recombinants de diferents orígens han estat produïdes amb èxit en cultius recombinants de cèl·lules d'insecte. Aquest sistema d'expressió ofereix una sèrie d'avantatges com ara la capacitat de realitzar modificacions post-traduccionals com la fosforilació, N- i O- glicosilacions, acilació, palmitilació, miristolació, amidació, carboximetilació, i prenilació; el correcte plegament de la proteïna i la formació d'enllaços disulfur, l'obtenció d'alts nivells d'expressió, l'escalatge senzill amb elevades densitats cel·lulars, i l'expressió simultània de múltiples gens. Mitjançant aquest sistema d'expressió s'han assolit rendiments de producció de fins a 11 g/L de proteïna recombinant (Adrio i Demain, 2010). Tot i així, també s'han observat limitacions en determinats casos on les modificacions post-traduccionals no han seguit el patró de glicosilació corresponent al producte natiu o diferents graus d'heterogeneïtat. Altres complicacions derivades de l'expressió heteròloga de proteïnes en insecte inclouen casos d'ineficiència durant la secreció de determinats productes, o bé en casos en els quals les proteïnes mal plegades han format agregats intracel·lulars. (Demain i Vaishnav, 2009).

Per a aplicacions terapèutiques, la importància de la seguretat sanitària en humans és determinant per tal d'evitar respostes immunogèniques i reaccions anafilàctiques. Encara que el sistema d'expressió basat en baculovirus AcMNPV recombinant confereix certa seguretat degut a la seva incapacitat per replicar-se en cèl·lules de mamífer, l'eliminació dels virions de tipus BV i ODV dels productes derivats, resulta indispensable, ja que s'ha observat certa activitat del promotor de baculovirus en aquestes cèl·lules (Kenoutis et al., 2006; Murgues et al., 1997). Darrerament s'ha desenvolupat una estratègia encaminada a eliminar la co-producció dels dos tipus de virions mitjançant la deleció d'un gen que codifica per una proteïna essencial per a l'estructura del virus (VP80), evitant la formació de ODV i BV. Com que ambdós formes virals són requerides durant la fase inicial de la infecció, per tal d'obtenir l'*stock* de baculovirus recombinant, s'utilitza una línia cel·lular transgènica d'insectes que produeix la proteïna essencial vp80 (Marek *et al.*, 2010).

L'expressió proteica basada en baculovirus també es poden dur a terme en cultius de larves d'insecte com *Trichoplusia ni* o altres lepidòpters. El fet d'utilitzar insectes sencers en comptes de cultius cel·lulars, confereix una sèrie d'avantages com: la reducció de costos del procés, l'augment del rendiment de producció, l'absència d'infraestructures de fermentació high-tech, temps de desenvolupament més curts, i la possibilitat d'un escalat de producció més gran. Fins al moment s'han produït una gran varietat de proteïnes recombinants en larves d'insecte, incloent-hi: enzims, anticossos, hormones o vacunes (Gomez-Casado *et al.*, 2011). Tot i així, la optimització de l'expressió proteica en larves és complicada i necessita ser millorada en alguns aspectes com l'estabilitat del gen heteròleg, la reducció de la proteòlisi o en els processos de recuperació de proteïna soluble (Kovaleva *et al.*, 2009).

1.4.5 Producció en cèl·lules de mamífer

Els sistemes d'expressió en mamífers s'utilitzen per a la producció de proteïnes que per a la seva activitat biològica requereixen modificacions post-traduccionals típiques de mamífer.

Davant la necessitat de produir proteïnes glicosilades com l'eritropoetina o l'activador de plasminogen de teixit, durant la dècada dels 80 es varen començar a utilitzar les cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès (CHO). Les cèl·lules CHO són el sistema preferit per a la producció de anticossos monoclonals i les proteïnes recombinants (O'Callaghan i James, 2008). Altres tipus cel·lulars utilitzats amb la finalitat de produir proteïnes terapèutiques deriven de mielomes de ratolí, ronyons de hàmsster, ronyons de mico, i línies cel·lulars humanes provinents de cèl·lules embrionàries de ronyó (HEK cells).

El cultiu de cèl·lules de mamífer és particularment útil degut a que les proteïnes són generalment es pleguen correctament i es glicosilen seguint un patró adequat per, eliminant la posterior necessitat de renaturalitzar-les. Les cèl·lules eucariotes també són ideals per l'addició de

cadena d'àcid gras i per la capacitat de fosforilar tirosines, treonines i els grups hidroxil de les serines.

Aquest sistema d'expressió permet assolir nivells de productivitat de 20-60 pg/cèl·lula/dia. La proteïna activadora del plasminogen de teixit ha estat produïda en cèl·lules CHO amb un rendiment del 47% i uns nivells de producció de 34 mg/L. Malgrat que la mateixa proteïna produïda a *E. coli* assoleix uns nivells de producció més alts (460 mg/L), el rendiment total assolit arriba al 2.8% degut a la formació de cossos d'inclusió i una renaturalització poc eficient (Dartar *et al.*, 1993).

Gràcies a millores en el medi de cultiu, que han afavorit el creixement cel·lular, els nivells de producció assolits en cèl·lules de mamífer han millorat notablement en els últims 20 anys. De fet, al 1986 s'assolien nivells de l'ordre de 50 mg/L, mentre que els valors de l'any 2004 van assolir els 4.7 g/L. Actualment s'estan arribant a produir fins a 10 g/L de proteïna recombinant en el sector industrial. Els nivells de producció d'anticossos monoclonals també han arribat a valors òptims de producció, pròxims als 2.5-3 g/L (Aldridge, 2006).

De manera concordant, l'any 1997 les vendes de productes biofarmacèutics produïts en cultius cel·lulars de mamífer remuntaven fins als 3,25 bilions de dòlars americans, mentre que al 2006 la producció de proteïnes terapèutiques en cèl·lules de mamífer va assolir els 20 bilions de dòlars en vendes (Demain i Vaishnav, 2009).

Tot i així, les cèl·lules de mamífer també presenten una sèrie de inconvenients que cal considerar a l'hora d'escollir el sistema d'expressió per al nostre producte d'interès. Els nivells de proteïna secretada són generalment baixos (10-20 mg/L), hi ha risc de contaminació del producte per virus, prions provinents del sèrum boví o altres patògens; i els costos totals del procés i l'escalat són elevats. La producció de productes biofarmacèutics en una planta industrial basada en cèl·lules de mamífer necessita entre 2 i 4 milions de dòlars cada any per cobrir despeses en material, sobretot per al medi de cultiu.; entre 15 i 20 milions de dòlars cada any per a cobrir costos de fabricació; i entre 40 i 60 milions de dòlars per a construir i validar una instal·lació de 7600 metres quadrats (Demain i Vaishnav, 2009).

A tots aquests costos caldria afegir les despeses resultants de l'aprovació del producte per la FDA, i els de les fases pre-clíniques i clíniques abans de la introducció del producte al mercat, en aquest cas però, els costos serien aplicables a tots els sistemes d'expressió, i ascendirien a valors entre els 60 i els 100 milions de dòlars.

1.4.6 Producció en animals transgènics

La producció de proteïnes recombinants també s'ha dut a terme satisfactòriament en animals transgènics com cabres, ratolins, vaques, porcs, conills, ovelles i determinats animals aquàtics.

Fins al moment s'han expressat proteïnes en sang, orina, clara d'ou, plasma seminal o pupes de cuc de seda; resultant les millors fraccions per a la producció heteròloga la llet i l'orina (Houdebine, 2009 i Colman, 1998).

Determinats productes terapèutics han estat produïts en llet d'animals de granja com a alternativa efectiva al fraccionament del plasma sanguini per a l'obtenció de factors de coagulació com l'anti-trombina, l' α -1-antitripsina, l'albumina o el factor IX. La capacitat de producció en llet d'animals transgènics pot arribar a assolir rendiments diaris de l'ordre de mg/mL de proteïna, i la seva flexibilitat en l'escalat fan d'aquest sistema de producció una opció atractiva al cultiu de cèl·lules de mamífer com a font de grans quantitats de productes bioterapèutics (Pollock *et al.*, 2007).

Un exemple de producció satisfactòria en animals transgènics fou obtingut en ovelles transgèniques, on es van arribar a assolir fins a 35 g/L d' α -1-antitripsina humana en llet per al tractament d'emfisemes (Wright *et al.*, 1991). En cabres productores d'activador de plasminogen de teixit en llet, s'ha observat un patró de glicosilació diferent a l'obtingut en cèl·lules de mamífer, però amb una vida mitja més llarga que la proteïna nativa (Denman *et al.*, 1991). L'anti-trombina humana III fou la primera proteïna recombinant produïda en llet de cabra recombinant que l'any 2006 va rebre l'aprovació de l'Agència Europea d'Avaluació de Productes Medicinals (EMA) per entrar al mercat. Altres productes provinents d'animals transgènics que han arribat a fases clíniques en humans, han mostrat no tenir efectes secundaris adversos o problemes de seguretat biològica (Houdebine, 2009).

Un dels punts negatius derivats de la producció de proteïnes en animals transgènics, és la quantitat de temps inicial necessari per a determinar els nivells de producció. Per a tal d'obtenir vaques transgèniques, per exemple, es tarden fins a 32 mesos per tal d'obtenir un primer anàlisi. Si tenim en consideració que el cost per mantenir aquests animals de granja suposa 10000 dòlars per animal i any, el risc d'obtenir nivells baixos d'expressió fan que en molts casos la utilització d'aquest sistema sigui econòmicament inviable.

De fet, la producció de productes biofarmacèutics en animals transgènics s'ha vist negativament afectada per la desaparició de la companyia PPL Therapeutics d'Escòcia, que juntament amb l'Institut Roslin, va ser el responsable de la clonació de l'ovella Dolly.

Més recentment, s'han estat desenvolupant protozous transgènics com els tripanosomes per a produir vacunes o limfocines recombinants. Aquest sistema d'expressió presenta una sèrie d'avantatges respecte els animals transgènics, ja que el transgèn és integrat per recombinació homòloga en el genoma de l'hoste de forma estable i precisa. A més, mitjançant aquest sistema es poden expressar complexos formats per múltiples subunitats, gràcies a la seva integració controlada en llocs definits del genoma. D'altra banda, aquest hoste també ofereix un manteniment cel·lular

senzill en medis químicament semi-definits, i un creixement que assoleix densitats cel·lulars altes (Furger et al., 2001).

1.4.7 Producció en sistemes vegetals

La biotecnologia vegetal va néixer fa prop de 20 anys amb la producció d'hormones i altres biomolècules actives en plantes transgèniques. Tot i així, no va ser fins a la producció del primer anticòs monoclonal en plantes l'any 1988, que es va poder demostrar la capacitat que tenen les plantes per a produir proteïnes complexes amb significat terapèutic (Goldstein i Thomas, 2004 i Horn, 2004).

Existeixen diferents estratègies per a l'expressió de gens que poden ser utilitzades per a produir proteïnes específiques en plantes (Horn, 2004). Per una banda, l'expressió transitòria permet la inserció d'una seqüència gènica a l'interior de la cèl·lula vegetal sense la incorporació de nou material genètic en el genoma de la planta. Per a aquesta finalitat s'utilitzen mètodes físics de transformació com la balística o les infiltracions mitjançant el buit (agroinfiltració), o bé mètodes basats en vectors d'expressió virals capaços d'infectar específicament determinats tipus de cèl·lules vegetals, com el virus del mosaic del tabac (TMV). A través de l'expressió transitòria de productes recombinants es poden obtenir grans quantitats de proteïna de forma ràpida, però com que no hi ha inserció del gen en el genoma de la planta, l'expressió d'aquest no és permanent ni heretable. A més, tot i que la seva aplicació és molt útil durant les etapes de recerca i desenvolupament i, en alguns casos també pot ser útil per a la producció de fàrmacs, requereixen una producció contínua de biomassa fresca per ser transformada cada vegada, fent que sigui menys atractiva per a una producció de proteïnes a llarg terme i per a grans volums de producció.

Alternativament, es pot recórrer a una transformació nuclear estable, en la qual el cromosoma primari de la planta és alterat per permetre una expressió permanent i heretable. Aquest procés es duu a terme mitjançant *Agrobacterium tumefaciens*, un patogen típic de plantes que de forma natural transfereix material genètic al genoma de la planta (Fig. 1.5). Així, modificant el contingut genètic d'*A. tumefaciens* els gens d'interès poden ser inserits en diferents tipus de plantes, sobretot de dicotiledònies. El material genètic també pot ser transferit a través d'unes partícules petites metàl·liques cobertes amb el DNA d'interès, que són literalment bombardejades contra les cèl·lules vegetals.

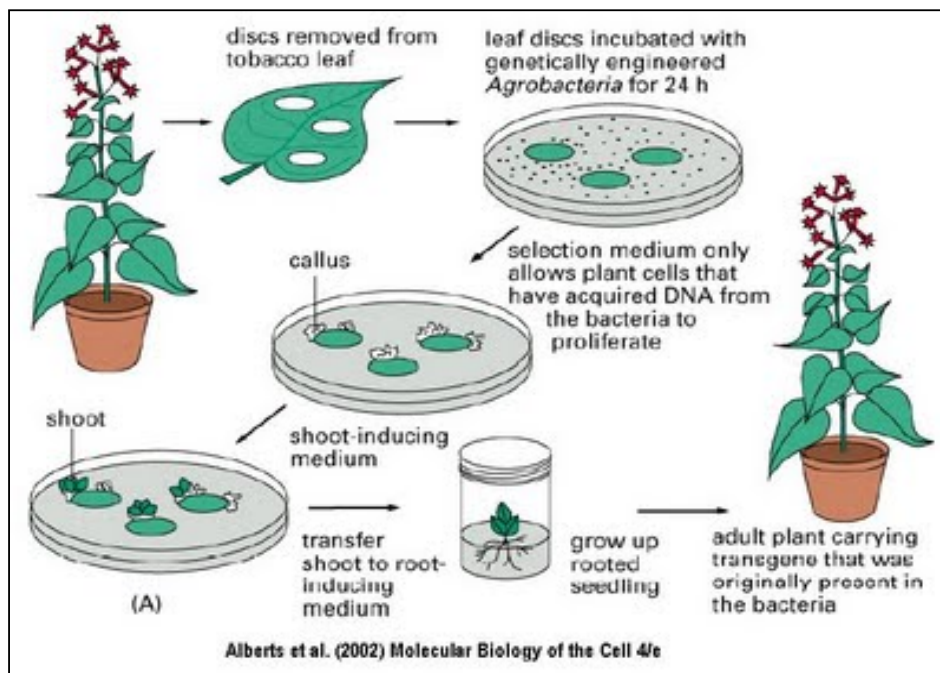


Figura 1.5. Esquema general del procés de transformació nuclear estable en plantes.

Tot i que la transformació nuclear estable és un procés llarg i més costós que el transitori, ofereix un clar avantatge i és la producció de proteïnes reiterada i estable, mitjançant el cultiu continu i a llarg termini, de les llavors homozigotes de la línia estable de plantes transformades.

Per últim, també existeix un sistema que utilitza la transformació del DNA plastídic, que també pot portar a canvis heretables per a l'expressió de proteïnes. Tenint en compte que cada cèl·lula vegetal conté centenars o milers de cloroplasts, i que aquests orgànuls són capaços de mantenir un nombre elevat de còpies del gen funcional, aquest sistema resulta molt prometedora per a la producció de proteïnes terapèutiques.

Per a la producció de proteïnes recombinants també s'han utilitzat cultius cel·lulars de plantes. Aquest sistema ofereix una sèrie d'avantatges entre els quals destaquen el control precís sobre les condicions de creixement, la reproductibilitat entre diferents *batch* cel·lulars, l'absència de risc per contaminacions derivades de l'ús de pesticides, herbicides i fungicides, i la independència de factors ambientals que puguin afectar al creixement cel·lular, entre d'altres. (Hellwig *et al.*, 2004). Les línies cel·lulars més ben caracteritzades deriven de cèl·lules de tabac: *Bright Yellow 2* (BY2) i *Nicotiana tabacum 1* (NT-1).

Malgrat això, tractant-se d'un sistema basat en cultius cel·lulars, existeixen una sèrie de limitacions que haurien de ser superades per tal de competir amb altres sistemes d'expressió existents. Rendiments de producció relativament baixos, silenciament gènic, variació somaclonal (variabilitat genètica generada durant la pràctica del cultiu de teixits), creixement cel·lular lent, així com la formació d'agregats, formen part dels principals reptes a ser circumscrits en els pròxims temps (Hellwig *et al.*, 2004).

Comparat amb els sistemes d'expressió que utilitzen animals vius o cultius cel·lulars de mamífer, la producció de proteïnes recombinants en planta és molt més segura, més econòmica, requereix menys temps, i ofereix més possibilitats d'emmagatzematge i distribució. A més, fins al moment no s'han trobat virus de plantes que siguin patogènics en humans, i el creixement a escala agrícola requereix només d'aigua, minerals i llum solar, mentre que els processos que utilitzen cultius cel·lulars, són molt delicats, més costosos, i per a un escalat comercial requereixen bioreactors costosos. Els sistemes de producció basats en plantes també ofereixen glicosilacions, direccionament, compartimentació, i magatzem natural i estable en òrgans específics de cèl·lules vegetals.

La producció de vacunes en plantes transgèniques suposa una alternativa prometedora als immunògens convencionals, ja que presenten la possibilitat d'estimular el sistema immune sistèmic i secretor per administració oral contra patògens estomacals, resultant en el que es coneix com a vacuna comestible (Escribano i Perez-Filgueira, 2009). Tot i així, el major inconvenient en l'expressió d'aquestes proteïnes en teixits de plantes transformades de forma estable, resideix en l'obtenció de baixos rendiments d'acumulació. Aquesta baixa eficiència pot ser deguda a una combinació entre un plegament proteic inapropiat i la pròpia inestabilitat de la vacuna (Brun et al., 2011).

Existeixen diferents espècies vegetals que poden ser utilitzades com a productores de compostos biofarmacèutics. Encara que la planta del tabac (*Nicotiana tabacum*) és la més àmpliament usada, també s'han produït proteïnes recombinants en *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, en arròs, en ordi, en alfals (*Medicago sativa*), en patata, tomàquet, en cèl·lules de pastanaga, etc. (Karg i Kallio, 2009)

Les plantes del tabac resulten atractives per la gran quantitat de biomassa que generen, però també pel gran nombre de llavors que produeixen en cada cicle vital. A més, les tècniques i metodologies de transformació estable o transitòria estan ben establertes amb el qual es veu incentivada la seva aplicació en una producció a gran escala. Tanmateix, pel fet de no ser una planta comestible, existeix un risc molt baix de contaminació de la cadena alimentària humana. Malgrat això, un dels inconvenients que presenten les plantes del tabac és l'alt contingut en nicotina i altres alcaloides tòxics, els quals han de ser extrets durant les etapes de processament i recuperació de la proteïna d'interès. Actualment, existeixen varietats de plantes de tabac amb baix contingut d'alcaloides, que minimitzen aquest efecte (Fischer *et al.*, 2004).

La producció de proteïnes recombinants en plantes ha assolit nivells de producció que representen fins el 14% del total de proteïnes solubles, com és el cas de la fitasa d'*A. niger* expressada en tabac (Demain i Vaishnav, 2009).

1.5 Tecnologies per a la producció de proteïnes recombinants

Un dels punts crítics per tal de que un sistema de producció sigui viable i competitiu dins el mercat, és la necessitat d'assolir nivells elevats de proteïna recombinant acumulada. Per tant, apart de l'optimització dels sistemes d'expressió existents, també sorgeix la necessitat de disposar un ventall més ampli de tecnologies encaminades a obtenir nivells òptims d'expressió i producció de proteïnes actives i funcionals.

Algunes d'aquestes tecnologies han estat desenvolupades en àmbits empresarials per tal de promoure la comercialització i aplicació de la tecnologia, del producte en qüestió o la infraestructura relacionada. Exemples de biotecnologies desenvolupades en empreses de producció de proteïnes recombinants amb aplicacions industrials, terapèutiques i veterinàries, es troben resumides a la taula 1.2.

Empresa biotecnològica	País	Tecnologia	Avantatges	Inconvenients
Algenex	Espanya	Tecnologia IBES® Acumulació de proteïnes en larves i cèl·lules d'insecte.	Elevada productivitat i rapidesa. Seguretat. Reducció de costos.	Producte d'interès exposat a agents proteolítics. Possibles reaccions anafilàctiques.
Chesapeake-PERL	EUA	Plataforma d'expressió per infecció de larves de <i>Trichoplusia ni</i> .	Rapidesa, escalat, flexibilitat.	Proteòlisi. <i>Downstream</i> complicat.
ERA Biotech	Espanya	Tecnologia Zera®. Proteïna de fusió. Acumulació de proteïna en orgànuls heteròlegs densos.	Expressió multi-hoste eucariota. Elevada productivitat. Múltiples aplicacions. <i>Downstream</i> senzill.	Influència de la naturalesa de la proteïna. Necessitat de proteases exògenes.
ExpreS²ion Biotechnologies	Dinamarca	Plataforma de producció en cèl·lules <i>Schneider-2</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> .	Rapidesa, escalat. HTS. Condicions de producció competitives.	Nivells d'expressió i acumulació dependents de la naturalesa de la proteïna.
Icon Genetics - Bayer	Alemanya	Sistema de transformació viral i cloroplàstica.	Sistema ràpid. Nivells d'expressió elevats.	Només aplicable a plantes. Manca de glicosilació per transformació cloroplàstica.
Lentigen	EUA	Sistema de transformació basat en vectors lentivirals.	Sistema ràpid i eficient. Reprogramació estable de la funció de cèl·lules de mamífer.	Només aplicable a cèl·lules de mamífer. Seguretat.
Pfenex Inc.	EUA	Tecnologia d'expressió en <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Adaptat per a HTS. Mètode d'escalat i <i>downstream</i> simplificats. Hoste no patogènic.	No hi ha glicosilacions. Risc de heterogeneïtat en el producte final.

Empresa biotecnològica	País	Tecnologia	Avantatges	Inconvenients
ProdiGene	EUA	Producció de productes biofarmacèutics en blat de moro i soja.	Producció de vacunes comestibles.	Contaminació horitzontal de cultius no transgènics.
Protalix Biotherapeutics	Israel	ProCellEx™ Expressió en cèl·lules de pastanaga i tabac en biorreactors.	Escalat. Seguretat i consistència del producte final. Ampli rang de proteïnes.	Baixos nivells d'expressió, proteòlisi. Modificacions post-traduccionals.
ProteoNic	Països Baixos	Augmenta el rendiment de traducció de mRNA per mitjà de la tecnologia UNic™.	Independent de la naturalesa de la proteïna. Expressió multi-hoste.	No aporta millores en els processos de <i>downstream</i> ni purificació.
Rincon Pharmaceuticals inc.	EUA	Producció de proteïnes en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mitjançant el sistema AlgRx™.	Sistema de producció ràpid i eficient. Elevada seguretat. Producció en fotobiorreactors.	Manquen modificacions post-traduccionals. <i>Downstream</i> complicat.
Selexis	Suïssa	Elements genètics que fan augmentar la productivitat en cèl·lules de mamífer.	Increment entre 2 i 10 vegades la producció de proteïnes.	No funciona en plantes ni cèl·lules d'insecte.
Symbiosys	Canadà	Acumulació de proteïnes en <i>oil bodies</i> . Transformació nuclear en gira-sol.	Downstream efectiu i senzill.	Producte d'interès exposat a agents proteolítics. Requereix processament per proteases exògenes.
Ventria Biosciences	EUA	Express Tec® Acumulació en plantes d'arròs.	Seguretat. Cost efectiu. Ampli espectre de proteïnes.	Llarg temps de posada a punt.
VTT	Finlàndia	Producció en fongs filamentosos	Elevada productivitat. Modulació de l'expressió.	<i>Downstream</i> de recuperació complicat
VTU technologies	Àustria	Plataforma de producció en <i>Pichia pastoris</i> .	Regulació de l'expressió mitjançant el promotor AOX1. Disseny de producció cost-efectiva.	Producció extracel·lular. Modificacions post-traduccionals. Hiper-glicosilacions.
X-Brane Bioscience	Suècia	Sistema Rhamex™ per la producció de proteïnes en bacteris gram-negatius.	Elevat rendiment. Cost-efectiu.	Producció de proteïna en cossos d'inclusió. Manca de modificacions post-traduccionals.

Taula 1.2. Exemples significatius d'empreses biotecnològiques de producció de proteïnes recombinants.

Per tal d'assolir nivells competents de productivitat de proteïna recombinant mitjançant mètodes cost-efectius, existeixen solucions divergents com la secreció del producte d'interès, o bé, la seva acumulació en compartiments intracel·lulars. L'emmagatzematge intracel·lular de proteïnes recombinants es pot donar per expressió en el citoplasma, o bé per acumulació en algun compartiment del sistema endomembrana.

1.5.1 Secreció de proteïnes recombinants

Generalment, la secreció de proteïnes recombinants al medi de cultiu permet que el producte d'interès esdevingui similar a la proteïna nativa, ja que normalment en el decurs de la via de secreció de la cèl·lula hoste, les proteïnes reben el processament adequat per a la seva funcionalitat. A més, mitjançant aquest sistema es redueixen els efectes tòxics produïts per proteases internes que solen degradar o malmetre proteïnes que han estat sobreexpressades en l'espai intracel·lular de la cèl·lula hoste. D'altra banda, el procés de *downstream* i purificació de la proteïna secretada, resulten ser més senzills, i parcialment més eficients, ja que no és necessària cap etapa de lisi ni extracció proteica sobre teixits o cèl·lules de l'hoste (Yin *et al.*, 2007 i Paal *et al.*, 2009).

Les proteïnes de secreció s'expressen inicialment com a precursors amb un pèptid senyal a l'extrem N-terminal que posteriorment és processat per part d'una peptidasa de senyal. Degut a que els pèptids senyal són evolutivament conservats en moltes espècies, i a que la peptidases de senyal reconeixen més aviat motius estructurals que seqüències lineals, molts pèptids senyal són funcionals tant en procariotes com en eucariotes, facilitant així l'aplicació d'aquest sistema en múltiples hostes d'expressió (Olczak i Olczak, 2006).

1.5.2 Direccionament de l'expressió a compartiments subcel·lulars

Per tal d'augmentar els nivells d'expressió de la proteïna recombinant, la seva acumulació dirigida a determinats compartiments subcel·lulars afavoreix a mantenir l'estructura i integritat de la proteïna. Algun dels compartiments que s'han emprat per a aquesta finalitat inclouen l'espai periplasmàtic, el reticle endoplasmàtic (RE), el cloroplast, els vacuols, etc.

Per l'interès del present treball, només es detalla la informació relativa al direccionament de l'expressió proteica a RE.

Diversos estudis han demostrat que el direccionament de la proteïna recombinant a la via de secreció, i la seva retenció en el RE mitjançant l'addició del tetrapèptid H/KDEL a l'extrem carboxi-terminal afavoreix la seva estabilitat, integritat i, conseqüentment, al seu grau d'acumulació. En bona part, aquest conjunt de distincions les ajuden a conferir la presència d'una gran varietat de xaperones en aquest compartiment. Tanmateix, aquesta estratègia comuna a tots els eucariotes presenta certs inconvenients ja que, al tractar-se d'una retenció dependent d'unió lligand-

receptor, s'assoleix amb facilitat una saturació del procés, de forma que les proteïnes recombinants acaben resultant secretades o transportades a vacuoles vegetals de lisi. Algunes del les proteïnes heteròlogues que contenen KDEL també poden resultar mal plegades i conseqüentment eliminades per la via de degradació dependent de RE (Semenza *et al.*, 1990). A més, l'addició de 4 residus a la seqüència aminoacídica d'interès, fa que aquesta estratègia tampoc no sigui aplicable a determinades proteïnes amb aplicació farmacològica.

1.5.2.1 Tecnologia Zera[®] - ERA Biotech S.A.

Arrel dels estudis realitzats en el laboratori de recerca de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB – CSIC) sota la direcció de la doctora M. Dolors Ludevid, l'any 2002 es va crear ERA Biotech S.A. És una empresa *spin-off* ubicada al Parc Científic de Barcelona, que desenvolupa una tecnologia per a la producció de proteïnes recombinants amb aplicacions principalment biofarmacèutiques i industrials. El sistema es basa en la producció de proteïnes de fusió que són acumulades a l'interior d'unes estructures intracel·lulars membranoses que deriven de reticle endoplasmàtic (RE) anomenades cossos proteics (CP).

Les llavors de les plantes contenen grans quantitats de proteïnes de reserva que durant la germinació són hidrolitzades en aminoàcids per tal de satisfer les posteriors necessitats anabòliques durant el procés embrionari i desenvolupament de la plàntula (Coleman *et al.*, 1996).

Les prolamines són un grup de proteïnes de reserva que es troben en les llavors de cereals i, degut al seu contingut ric en prolines i glutamines, presenten un grau elevat d'hidrofobicitat. En el cas del gra de blat de moro, les prolamines s'anomenen zeïnes i són classificades en 4 grups principals: α -, β -, δ - i γ - zeïnes, segons propietats com la solubilitat, estructura, pes molecular, i resposta immunològica (Cabra *et al.*, 2005).

Un cop sintetitzades en el reticle endoplasmàtic rugós de les cèl·lules de l'endosperm, les zeïnes promouen interaccions específiques amb d'altres zeïnes i formen acumulacions de proteïna ensamblada, que permeten la seva retenció a RE i la formació de cossos proteics. El grau d'acumulació de les zeïnes dins dels CPs pot arribar a suposar fins el 70% de les proteïnes totals del gra madur. La γ -zeïna s'acumula juntament amb les α -, les β - i les δ - zeïnes en CPs densos d'entre 1,1- 1,3 g/cm³, amb forma esfèrica i de mida aproximada entre 1-2 μ m (Larkins i Hurkman, 1978; Geli *et al.*, 1994).

Encara que el mecanisme de formació dels CPs no està totalment caracteritzat, sembla que les γ -zeïnes són les encarregades de proporcionar estabilitat envers altres proteïnes de reserva de l'interior del RE. S'ha observat que quan les α -zeïnes són expressades en plantes transgèniques, aquestes proteïnes són ràpidament conduïdes cap vacuoles de lisi on són degradades per part de

proteases vacuolars. Només quan les α -zeïnes són co-expressades juntament amb γ -zeïnes, ambdues proteïnes s'acumulen de forma estable en CPs que deriven de RE (Coleman *et al.*, 1996).

Complementant aquesta informació i, a partir d'estudis d'immunolocalització per microscòpia electrònica, s'ha pogut determinar que la γ -zeïna es troba localitzada a la perifèria dels CPs envoltant els agregats, principalment de α -zeïna, però també d'altres zeïnes que solen ocupar la fracció central del cos proteic de les cèl·lules de l'endosperm de blat de moro (Ludevid *et al.*, 1984 i Lending i Larkins, 1989). Com veurem més endavant, aquesta distribució no és a l'atzar, sinó que és deguda a les propietats amfipàtiques de la γ -zeïna, que contraresten amb l'alta hidrofobicitat de les α -zeïnes.

L'acumulació de les zeïnes en cossos proteics promou que aquestes proteïnes no entrin a la via de degradació associada a reticle endoplasmàtic (ERAD), i evita la seva exportació des del RE cap a altres compartiments de la via de secreció (Vitale i Ceriotti, 2004 i Torrent *et al.*, 2009). A més, com que les proteïnes de reserva romanen embolcallades per membrana, el contingut del CP resta protegit d'activitats proteolítiques i enzimàtiques típiques del compartiment citosòlic.

El gen de la γ -zeïna, també anomenat glutelina-2, codifica per una proteïna de 204 residus que no mostra homologia amb cap dels polipèptids de la α -zeïna. És una proteïna rica en sulfurs, que presenta una estructuració en dos dominis. A N-terminal, el pèptid senyal precedeix un domini repetitiu ric en prolines compost per diverses repeticions de l'hexapèptid Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, i a C-terminal, un domini ric en cisteïnes està unit al domini repetitiu a través d'un espaiador curt format per la seqüència Pro-X (Torrent *et al.*, 1994) (Fig.1.6.A).

La γ -zeïna és una proteïna de 27 kDa que, tot i que no conté cap senyal de retenció de tipus H/KDEL és retinguda eficientment a RE, i acaba formant part del sistema d'endomembranes que conformen els CPs derivats de RE. A partir d'uns estudis basats en la caracterització d'aquesta zeïna, s'ha pogut determinar que la informació que confereix les capacitats de retenció i autoensamblatge de les γ -zeïnes, i que permeten a la vegada la formació de CPs, està continguda en el domini N-terminal ric en prolines (Geli *et al.*, 1994).

La retenció al RE provocada pels dominis rics en prolina de la γ -zeïna, sembla estar relacionada amb la seva capacitat d'agregació en aquest compartiment. Existeixen dos factors que podrien intervenir en aquest procés: per una banda la capacitat d'autoensamblament que confereix el domini repetitiu, i per altra banda, l'estabilitat que confereixen els ponts disulfur intermoleculars que es formen entre les 6 cisteïnes que contenen aquestes proteïnes (Llop-Tous *et al.*, 2010)

Les propietats físico-químiques del domini repetitiu PPPVHL permeten un plegament que adopta una conformació en hèlix de tipus poliprolina II (Kogan *et al.*, 2002). Diferents tècniques biofísiques com la RMN o el dícroïsme circular, han permès el plantejament d'una sèrie de models tridimensionals a partir del pèptid sintètic format per la seqüència del domini repetitiu en solució aquosa (Fig. 1.6).

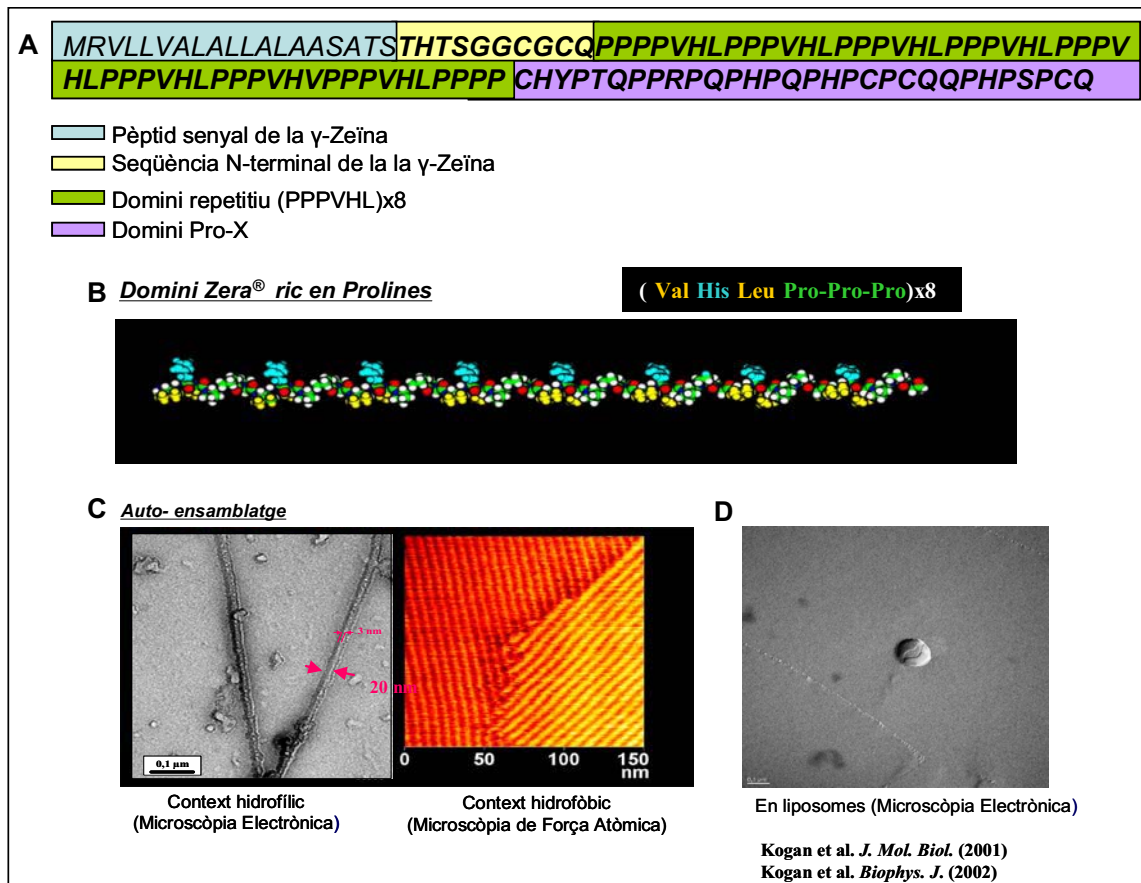


Figura 1.6. Capacitat d'autoensamblatge del domini repetitiu de la γ -zeïna. **A.** Seqüència d'aminoàcids del domini Zera[®] amb el pèptid senyal de la γ -Zeïna. **B.** Conformació en hèlix de poliprolina-II del pèptid (PPPVL)8. Les cadenes hidrofòbiques de les leucines i valines es marquen en groc, les cadenes polars de les histidines en blau. **C.** Imatge de microscòpia electrònica de transmissió de la disposició del pèptid en una solució aquosa. **D.** Imatge de microscòpia de força atòmica de la disposició del pèptid sobre una superfície pirolítica de grafit.

Quan la γ -zeïna és expressada de forma heteròloga en un teixit alternatiu a la llavor, com és el cas de les fulles transgèniques d'*Arabidopsis thaliana*, és capaç per sí sola de formar ectòpicament, estructures envoltades de membrana molt similars als CP naturals presents en l'endosperm de blat de moro (Geli *et al.*, 1994).

En base a les particularitats bioquímiques de les γ -zeïnes, i en el seu mecanisme d'acumulació natural en cossos proteics, l'any 2002 es va fundar l'empresa ERA Biotech (www.erabiotech.com) amb l'ànim de desenvolupar una nova tecnologia anomenada Zera[®] (provinent de *Zein Endoplasmatic Reticulum Accumulation*). Aquesta tecnologia es basa en la

producció de pèptids i proteïnes recombinants mitjançant l'ús d'un element de fusió Zera[®], que deriva del domini N-terminal de la γ -zeïna.

L'expressió heteròloga d'una proteïna quimèrica de fusió formada per la unió del domini Zera[®] a una proteïna d'interès, indueix la formació *de novo* d'estructures amb característiques i propietats equivalents a les dels cossos proteics naturals de blat de moro (StorPro[®] *bodies*).

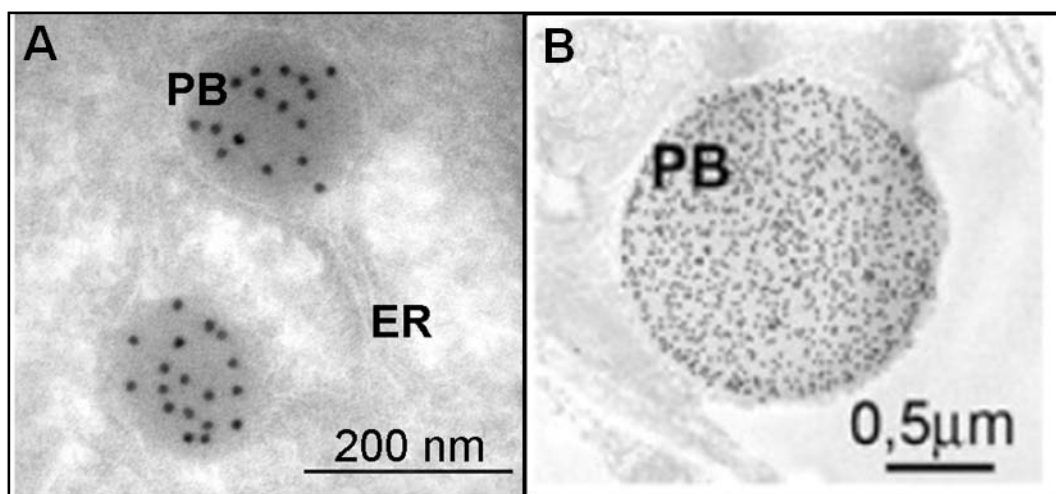


Figura 1.7. Micrografies electròniques de cossos proteics formats per l'expressió transitòria de proteïnes de fusió Zera[®]. **A.** Immunodetecció realitzada sobre cèl·lules d'insecte Sf9 expressant Zera-EGF. **B.** Immunodetecció sobre fulles de planta de tabac transgèniques, expressant Zera-Calcitonina (Torrent et al., 2009a).

Els cossos StorPro[®], apart d'acumular quantitats importants de proteïna recombinant, també contenen xaperones eucariotes que permeten el plegament proteic correcte, i confereix estabilitat i aïllament front als agents proteolítics presents en el citosol. Recentment, s'ha descrit la producció constitutiva de l'enzim xilanasa mitjançant la tecnologia Zera[®] en plantes de tabac transformades transitòriament. Després de 7 dpi, la proteïna de fusió Zera[®]-xilanasa resultava activa i suposava el 9% de la proteïna total present en les fulles transformades, indicant l'eficiència de producció d'aquest enzim industrial mitjançant aquest sistema. Aquest estudi també incloïa anàlisis d'estabilitat enzimàtica i resistència front a agents proteolítics com la tripsina i la pepsina, els resultats dels quals indicaren una estabilitat de l'activitat xilanasa de fins a 2 mesos a temperatura ambient, i una resistència proteolítica de la proteïna de fusió acumulada a cos proteic heteròleg (Llop-Tous *et al.*, 2011).

D'altra banda, l'elevada densitat i el grau d'acumulació proteica propis dels cossos proteics, fan que el procés de recuperació de la proteïna recombinant sigui simple i econòmic (Fig.1.8).

Avui dia, els costos associats a la recuperació i purificació de la proteïna d'interès poden suposar fins el 40% del total dels costos de producció dels productes biofarmacèutics (Langer, 2009b).

Durant aquests anys, els estudis realitzats a ERA Biotech han permès validar la tecnologia Zera[®] aplicada a un elevat nombre de proteïnes de naturaleses diferents, amb uns resultats de productivitat i rendibilitat superiors a les tècniques convencionals de producció.

Tanmateix, la gran versalitat d'aquesta tecnologia ha estat demostrada amb els resultats obtinguts arrel de l'expressió de proteïnes de fusió Zera[®] en molts tipus de cèl·lules hoste diferents. Entre ells destaquen hostes eucariotes com: les plantes de tabac (*Nicotiana tabacum* i *benthamiana*), d'arròs (*Oryza sativa*), d'alfals (*Medicago sativa*), d'*Arabidopsis thaliana*, de tomàquet (*Solanum lycopersicum*); cultius de cèl·lules vegetals (NT1), de cèl·lules de mamífer (CHO, Cos-2), de cèl·lules d'insecte (Sf9, Sf21, High5), larves de *Trichoplusia ni*, fongs filamentosos (*Trichoderma reesei*), etc. (Fig. 1.7; Torrent *et al.*, 2009a).

Un altre exemple satisfactori d'acumulació de proteïna recombinant en cossos proteics heteròlegs el conforma la producció recombinant de l'antigen F1-V de *Yersinia pestis* mitjançant tres sistemes d'expressió vegetals diferents: *N. benthamiana*, *M. sativa* i cèl·lules en cultiu NT1. L'eficiència de producció de la proteïna de fusió va ser valorada en presència i absència del domini Zera[®] fusionat, donant com a resultat uns rendiments d'acumulació de F1-V en cossos StorPro[®] de fins a tres vegades superior respecte a la proteïna acumulada en citoplasma (Alvarez, 2009).

Aquest conjunt de resultats han estat complementats amb els estudis realitzats al llarg dels últims anys al laboratori d'ERA Biotech, per tal d'obtenir un procés de recuperació (*downstream*) i purificació de la proteïna d'interès, a partir de cossos proteics heteròlegs provinents de diferents hostes d'expressió. Les característiques físico-químiques dels cossos StorPro[®] permeten recuperar la proteïna de fusió d'interès acumulada, lliure de la majoria de contaminants cel·lulars presents en l'hoste mitjançant tècniques senzilles de separació diferencial per densitat. Com a conseqüència, el procés de *downstream* aplicat per a proteïnes de fusió Zera[®], permet una fracció enriquida de proteïna recombinant d'una manera escalable i cost-efectiva (Fig. 1.8).

Les propietats que confereix el domini Zera[®] a nivell d'acumulació, recuperació i purificació proteica, han estat objecte de dipòsit d'un conjunt de patents.

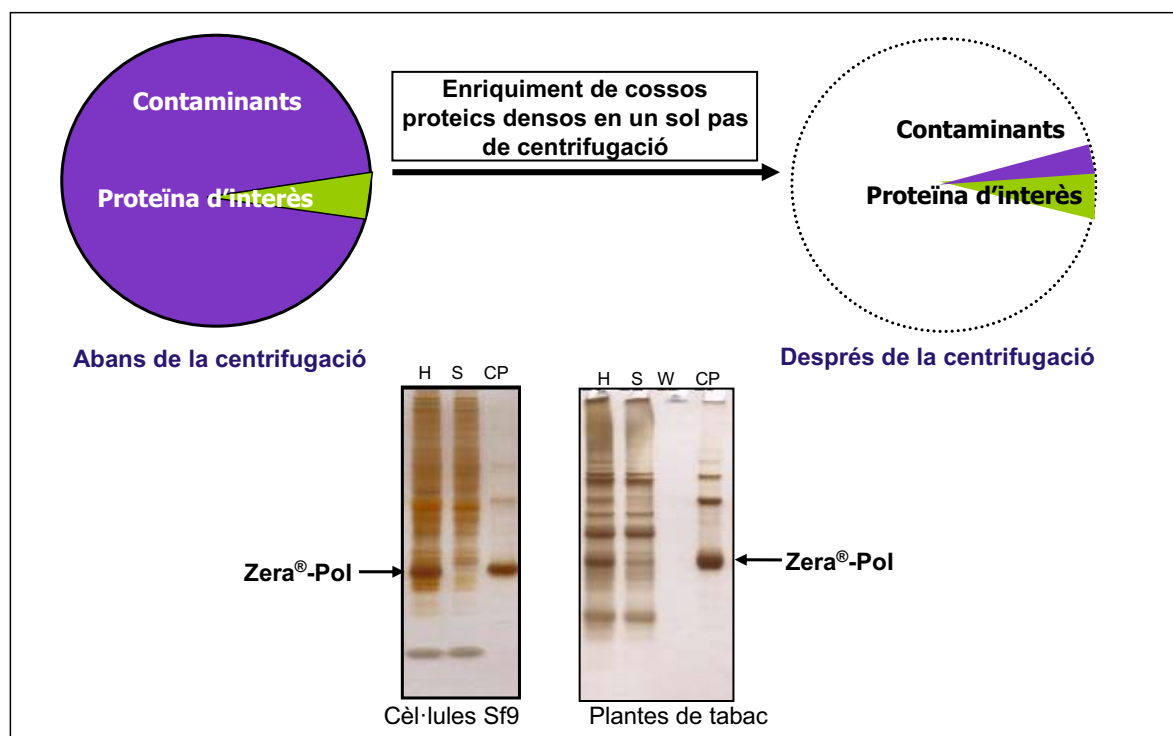


Figura 1.8. Enriquiment de la proteïna de fusió Zera®- PoI acumulada en cossos proteics (CP) densos heteròlegs. Amb un únic pas de centrifugació a baixa velocitat, s'obté una fracció de cos proteic (CP) concentrada i lliure de la majoria de contaminants de l'hoste. H: homogenat, S: sobrenedant resultant de la centrifugació, W: sobrenedant del rentat, CP: fracció de cossos proteics resultants de la centrifugació.

Darrerament s'han descrit altres tecnologies basades en proteïnes de fusió, que permeten el direccionament a RE i l'acumulació en estructures de tipus cos proteic en plantes (Conley et al., 2011). Aquestes metodologies empen diferents elements de fusió com: 1) biopolímers sintètics derivats de l'elastina de mamífers (ELP), 2) hidrofobines o 3) zeolines.

Les proteïnes de fusió ELP s'aïllen i recuperen mitjançant mètodes de separació no-cromatogràfics basats en una inversió tèrmica cíclica (ITC) (Conley et al., 2009). Les hidrofobines són unes proteïnes petites (10 kDa) derivades de fongs que, degut a la presència de 4 ponts disulfur intramoleculars permeten la formació d'unes estructures amb naturalesa altament hidrofòbica. Degut a aquestes propietats, les proteïnes de fusió basades en hidrofobines poden ser aïllades per un mètode senzill d'extracció bifàsica (ATPS- *Aqueous Two-Phase System*), mitjançant el qual s'obté la proteïna concentrada en la fase del surfactant. Finalment, les proteïnes de fusió de tipus zeolina també són recuperades per mètodes de separació per densitat. Tots aquestes tecnologies es troben en fase de desenvolupament, i ofereixen avantatges i inconvenients contrastats en la literatura per Conley *et al.*, 2011.

1.5.3 Elements de fusió: producció de proteïnes de fusió recombinants

La producció de proteïnes recombinants en diferents sistemes d'expressió es veu facilitada per la utilització d'elements proteics o peptídics de fusió. Aquests elements solent introduir-se a N-

terminal o a C-terminal de la proteïna d'interès, o menys usualment, en una regió interna de la proteïna on hi hagi suficient superfície d'exposició i no malmeti gaire la estructura de la proteïna (Fong *et al.*, 2010). La proteïna de fusió resultant, permet augmentar l'estabilitat del producte expressat i sobretot, facilitar la recuperació i purificació de la proteïna d'interès (Lichty *et al.*, 2005). Existeixen molts tipus d'aquests elements proteics, que sovint s'aprofiten per a dur a terme una purificació per afinitat (taula 1.3). Bàsicament, un element d'afinitat és una seqüència d'aminoàcids exògena que presenta gran afinitat per un lligand biològic, de tipus proteïna o anticòs, o bé químic. Aquests lligands solen estar acoblats a un suport sòlid per tal de facilitar la purificació del producte d'interès (Arnau *et al.*, 2006).

Elements de fusió	Mida (aa)	Propietats / Característiques
His-tag	5-15	Purificació en condicions natives o desnaturalitzants.
FLAG	8	Calci dependent. Purificació basada en anticòs. Diana per a l'enteroquinasa.
Streptag II	8	Streptavidina modificada, elució amb un anàleg de biotina.
HA-tag	9	Basat en l'hemaglutinina del virus influenza. Purificació basada en anticòs.
Softag 1, Softag 3	13,8	Reconegut per l'anticòs responsable del poliol.
c-myc	10	Purificació basada en anticòs.
T7- tag	11-16	Purificació basada en anticòs.
S-tag	15	Purificació basada resines d'afinitat de proteïna S.
Pèptids elastin-like (ELP)	18-320	Agregació proteica per canvi de temperatura, tall basat en inteïnes.
Chitin-Binding Domain (CBD)	52	Uneix únicament quitina insoluble.
Thioredoxin	109	Purificació per afinitat mitjançant una resina modificada.
Xylanase 10A	163	Capturació basada en cel·lulosa, elució amb glucosa.
Glutathione S-Transferase (GST)	201	Afinitat per glutatió o anticòs contra GST.
Oleosin		Purificació per aïllament d'orgànuls de tipus <i>oil bodies</i> .
Maltose Binding Protein (MBP)	396	Columna d'afinitat mitjançant amilosa.
NusA	495	Incrementa la solubilitat a <i>E.coli</i> . Necessita etiqueta d'afinitat per purificar.

Taula 1.3. Elements proteics d'afinitat i solubilitat per a la producció de proteïnes recombinants (Arnau, 2006).

Els principals avantatges que deriven de l'expressió de proteïnes de fusió recombinants són, per una banda la simplificació i agilització de l'etapa de purificació; i per altra banda, el possible augment de l'acumulació i solubilitat de la proteïna de fusió (Kühnel *et al.*, 2003).

L'elecció d'un element de fusió o altre està basada en paràmetres com les característiques bioquímiques de la proteïna d'interès, el tipus de cèl·lules hoste o el tipus d'aplicació que hi puguin derivar. Tot i que hi ha diferències substancials entre els diferents elements d'afinitat en termes d'eficiència en la purificació, hi ha indicadors que fan que determinats elements de fusió siguin més apropiats per a la purificació, com és el cas del tag d'histidines (His-tag); n'hi ha que han estat dissenyats per ajudar o millorar la solubilitat o el plegament, com el MBP o SUMO; o n'hi ha que

fins i tot serveixen per ajudar tant en la solubilitat com en la purificació de la proteïna de fusió, com la GST o la MBP (Lichty *et al.*, 2005).

Tot i així, per tal de recuperar la forma nativa de la proteïna d'interès lliure del segment fusionat, és necessària una etapa de tall o processament abans de les etapes definitives de purificació (Fong *et al.*, 2010).

Per permetre el tall entre la proteïna d'interès i l'element d'afinitat, normalment s'afegeix entremig un regió d'unió o *linker*. Aquest *linker*, apart de contenir la seqüència específica de tall per a una endoproteasa externa, també conté uns residus extra que contribueixen a millorar l'accessibilitat de la proteasa i permeten un millor plegament de la proteïna de fusió (Kühnel *et al.*, 2003).

1.6 Estratègies de processament de proteïnes de fusió

Per a la producció de proteïnes recombinants amb finalitats terapèutiques o farmacèutiques, l'autenticitat de la cadena polipeptídica és un tret essencial i imprescindible. Per això moltes tecnologies que expressen proteïnes de fusió recombinants, com és el cas de la tecnologia Zera[®], requereixen una etapa de processament per tal de recuperar la proteïna d'interès nativa.

Els mètodes actuals de processament poden classificar-se segons la seva naturalesa química o enzimàtica (Arnau *et al.*, 2006). El processament químic s'utilitza en alguns casos específics en els quals la proteïna de fusió és sotmesa a un tractament agressiu en presència de certs compostos tòxics com l'hidroxilamina o el bromur de cianogen (CnBr). El CnBr talla les metionines convertint-les en homoserina lactona, deixant un grup amino a N-terminal (Rais-Beghdadi *et al.*, 1998). Conseqüentment, aquests sistemes requereixen de l'addició d'un únic residu de metionina entre la proteïna d'interès i l'etiqueta d'afinitat, posant en evidència l'alta inespecificitat que en deriva. A més, sota aquestes condicions, la cadena lateral resulta desnaturalitzada o modificada en certs residus de la proteïna d'interès, dificultant així el procés posterior de purificació.

El tractament enzimàtic mitjançant proteases és més suau i específic i, en el major dels casos, garanteix la integritat de la proteïna. A la taula 1.4 hi trobem descrites les característiques dels sistemes enzimàtics més comuns. D'entre totes les endoproteases específiques comercialment disponibles, les més utilitzades són la trombina i el factor Xa. Ja que, degut a la seva condició de proteases reguladores, tenen una especificitat notòria respecte a altres proteases conegudes com la tripsina (Jenny *et al.*, 2003). El gran inconvenient que presenta la trombina i altres endoproteases com el TEV o la proteasa C, és l'addició de residus exògens a l'extrem N-terminal de la proteïna d'interès. En aquests casos convé fer un estudi sobre la idoneïtat de l'ús d'aquestes proteases i avaluar l'efecte d'aquests residus exògens sobre la proteïna d'interès.

Altres possibles inconvenients en l'ús de proteases exògenes són: la inespecificitat del tall degut a la presència de seqüències de reconeixement dins de la proteïna d'interès; la ineficiència del tall degut al difícil accés de la proteasa al lloc de reconeixement; les altes temperatures de reacció catalítica, que poden afectar negativament a l'estabilitat o a l'activitat de la proteïna d'interès; la possible precipitació de la proteïna d'interès i, finalment, els passos addicionals de purificació necessaris per extreure i inactivar la proteasa externa. (Chong *et al.*, 1997)

Enzim	Diana de reconeixement	Comentaris
Enteroquinasa	DDDDK [~]	Talls inespecífics en altres aminoàcids bàsics
Factor Xa	ID/EGR [~]	Talls inespecífics a GR
Trombina	LVPR [~] GS	Talls inespecífics.
PreScission	LEVLFQ [~] GP	Fusionada a GST per extreure la proteasa després de la digestió
TEV protease	ENLYFQ [~] G/S	Fusionada a His-tag per extreure la proteasa després de la digestió
3C protease	ETLFQ [~] GP	Fusionada a GST per extreure la proteasa després de la digestió
Sortasa A	LPET [~] G	Inducció del tall per Ca ²⁺
Granzyme B	D [~] X, N [~] X, M [~] N, S [~] X	Serina-proteasa. Risc de tall inespecífic
Inteïna	Residus involucrats: N i C	Autoprocessament induïble en condicions reductores o de temperatura i pH
SUMO	onformacional, seqüència llarga d'aa	Necessitat d'extreure la proteasa després de la digestió
DAPasa (TAGZyme)	Exo(di)peptidasa	Talla a N-terminal. Utilitza His-tag per separar la proteasa post-digestió
Aeromonas aminopeptidasa	Exopeptidasa	Talla a N-terminal, efectiu en residus M i L. Requereix Zinc.
Aminopeptidasa M	Exopeptidasa	Talla a N-terminal, no talla abans de P
Carboxipeptidasa A	Exopeptidasa	Talla a C-terminal, no talla abans de R ni P
Carboxipeptidasa B	Exopeptidasa	Talla a C-terminal, abans de R o K

Taula 1.4. Mètodes enzimàtics per separar l'element proteic de fusió (Arnau, 2006).

Les proteases ideals per a processar proteïnes de fusió recombinants com les de Zera[®], són les que presenten suficient especificitat per a la seqüència de reconeixement, independentment als residus que es trobin a l'extrem carboxil del punt de tall, i que eviten possibles talls inespecífics en la zona interna de la proteïna d'interès. L'enteroquinasa i el factor Xa són exemples adients de proteases que poden tallar sense deixar cap residu a l'extrem C-terminal del lloc de reconeixement, permetent l'alliberament de la proteïna nativa.

1.6.1 Factor Xa

El factor Xa és una serina-proteasa que talla l'extrem carboxil d'un residu arginina (Jenny *et al.*, 2003). Generalment, la seva seqüència de reconeixement és IEGR↓, tot i que depenent de la conformació del substrat, també pot tallar en altres residus bàsics. Alguns estudis fan pensar que hi ha una correlació entre el mal plegament de la proteïna d'interès, i el processament secundari per part de la proteasa. Per tal d'optimitzar l'eficiència de tall, cal avaluar els paràmetres i condicions

que afecten la reacció tals com la temperatura, la força iònica i el pH del solvent (Jenny *et al.*, 2003).

1.6.2 Enteroquinasa

L'enteropeptidasa, també anomenada enteroquinasa (EK), és una serina-proteasa que consisteix en una cadena pesada i una lleugera unides per un pont disulfur. La cadena lleugera conté el domini catalític suficient per al reconeixement i processament del seu substrat (Yuan i Hua, 2002). En condicions fisiològiques, aquesta proteasa reconeix la seqüència d'aminoàcids DDDDK↓X del tripsinògen, i aquesta esdevé tripsina activa. Entre els avantatges que ofereix l'ús biotecnològic d'aquesta proteasa, la més destacable és la seva seqüència específica de reconeixement de 5 residus, que permet alliberar la proteïna recombinant processada sense cap residu afegit a l'extrem N-terminal. A més, aquesta proteasa manté la seva activitat en diferents condicions de reacció i en un rang de pH i temperatura amplis (Fang *et al.*, 2004). La majoria d'EK disponibles comercialment, són holoenzims recombinants altament purificats produïts a llevat, procedents de la cadena lleugera de l'enteroquinasa bovina o porcina, i el seu preu encareix considerablement el procés de purificació (Vozza *et al.*, 1996). Altrament, cal remarcar l'elevada presència de tall inespecífic derivat de l'acció proteolítica de la proteasa. S'han descrit mètodes que permeten reduir en cert grau aquest efecte (Shahravan *et al.*, 2008), però en molts casos la millor solució ha consistit en canviar d'endoproteasa.

1.6.3 Trombina

La trombina és una serina-proteasa que intervé de forma natural en el procés de la coagulació de la sang. El domini catalític és alliberat de la proteïna precursora protrombina per acció de la proteasa Factor Xa, alliberant l'enzim actiu de 36 kDa. Degut a l'elevada especificitat proteolítica envers al lloc de reconeixement LVPR↓GS, la seva utilització per al processament de proteïnes de fusió recombinants es troba bastant extesa. Una característica que la fa remarcable per la seva aplicació biotecnològica és la seva baixa sensibilitat proteolítica a detergents que s'utilitzen habitualment per a la producció de proteïnes recombinants i per a la cristal·lització de proteïnes (Vergis i Wiener, 2011). El principal inconvenient que presenta l'ús d'aquesta proteasa és l'absència d'un tall proteolític net, el qual suposa l'addició de dos residus a la proteïna d'interès. D'altra banda, s'han descrit casos en els quals s'ha observat cert grau de processament inespecífic en proteïnes recombinants (Jenny *et al.*, 2003).

1.6.4 Proteasa TEV

La proteasa TEV és una cisteïna-proteasa de 27 kDa que correspon al domini catalític de la proteïna d'Inclusió Nuclear a (NIa), que es troba en el virus del gravat del tabac. Degut a la seva

elevada especificitat de seqüència, és molt més estricta que el factor Xa, la trombina o l'enteroquinasa. La seva seqüència de reconeixement segueix un patró del tipus EXXYXQ↓G/S, encara que la més utilitzada és ENLYFQ↓G/S. Les proteases virals com la TEV presenten una especificitat molt elevada, i la seva activitat es manté en un ventall molt ampli de condicions de reacció (Waugh, 2010). Apart de la seva elevada especificitat, la seva producció a escala de laboratori és molt senzilla i se n'obté en grans quantitats. D'altra banda, com moltes altres proteases virals descrites, la TEV presenta una velocitat de *turnover* quatre ordres de magnitud més lenta que les proteases no-virals, de forma que, generalment, se'n requereix més quantitat per proteïna de fusió i temps de reacció (Vergis i Wiener, 2011).

1.6.5 Enzims desumolitzants

La tecnologia SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) ha sorgit com a alternativa als sistemes de processament convencionals. Aquest sistema desenvolupat per l'empresa Lifesensors Inc., està basat en la fusió de la proteïna d'interès a una proteïna de la família de les ubiquitines o SUMO (Malakhov *et al.*, 2004). Un cop expressada la proteïna de fusió, aquesta és processada per una proteasa de SUMO (similar a l'enzim desubiquitinant) que reconeix la conformació terciària globular que adopta SUMO. La proteasa mai talla dins la proteïna d'interès i aquesta s'allibera sense cap residu addicional al seu extrem N-terminal. Entre els avantatges que ofereix aquesta tecnologia cal destacar l'alta solubilitat i el correcte plegament de la proteïna de fusió, ajudant a augmentar el rendiment i a reduir els costos de producció.

Un inconvenient important que presentava aquest mètode basat en SUMO, però que ja s'ha pogut solventar, resultava per l'efecte dels enzims desubiquitinants endògens en hostes eucariotes sobre les proteïnes de fusió SUMO, les quals eren processades *in vivo* interferint en l'eficiència de la tecnologia. Per tal de circumcidat aquest problema, es va desenvolupar una estratègia basada en la partició del *tag* SUMO en dues meitats: CTHS (*C-terminal half SUMO*) i NTHS (*N-terminal half SUMO*). La fusió del domini CTHS a la proteïna d'interès i la seva expressió en cèl·lules eucariotes, permet nivells elevats d'acumulació, impedit l'activitat de les proteases endògenes sobre la proteïna de fusió. Una vegada aquesta proteïna de fusió és purificada del contingut cel·lular, la meitat NTHS es reconstitueix amb la proteïna de fusió CTHS per formar el complex hidrofòbic que reconeixerà la proteasa SUMO *in vitro*. Tot i que aquesta estratègia resulta complexa, permet que els beneficis derivats de SUMO puguin ser aplicats tant en sistemes procariotes com eucariotes (LifeSensors Inc. White Paper, 2004).

Recentment s'ha desenvolupat una altra estratègia de processament de proteïnes de fusió SUMO expressades en cèl·lules d'insecte. Aquesta metodologia consisteix en una doble modificació d'una seqüència SUMO provinent de llevat (*smt3*), que permet evadir els enzims

desumolinitzants nadius, però és reconeguda específicament per una proteasa de tipus SUMO modificada (Liu *et al.*, 2008).

Pel que fa a la sensibilitat de la proteasa SUMO envers a les condicions de digestió, s'ha pogut observar que la majoria de detergents que normalment s'empren en l'extracció i cristal·lització de proteïnes, afecten dràsticament a l'activitat de la proteasa (Vergis i Wiener, 2011). Degut a que l'estructura terciària que adopta la seqüència SUMO és essencial per al reconeixement de la proteasa, pot ser que la proteïna de fusió resulti parcialment desplegada en presència de solucions micel·lars de detergent, o bé que la proteïna s'insereixi en les micel·les evitant la interacció de la proteasa.

1.6.6 Autoprocessament controlable d'elements de fusió

Alternativament, també existeixen el que s'anomenen elements de fusió autoprocessables, que contenen o inclouen mòduls proteics amb capacitat proteolítica induïble. Les proteïnes de fusió que els contenen poden autocatalitzar-se específicament com a resposta a un canvi conformacional, o per efecte d'un compost de baix pes molecular (Li, 2010).

Entre ells, destaquen la sortasa A, la proteasa N^{PRO}, el mòdul FrpC, el domini derivat de la cisteïna proteasa i les inteïnes (taula 1.5.). Tots ells poden combinar-se amb mètodes que permeten la purificació de proteïnes per afinitat, de manera que permeti la purificació, tall i separació de la proteïna d'interès en una única etapa de *downstream*.

Element d'auto-processament	Mida (kDa)	Condicions d'inducció del processament	Avantatges	Inconvenients
Sortasa A (SrtA)	17	5mM Ca ²⁺	Millora l'expressió i la solubilitat de la proteïna a <i>E.coli</i>	Processament <i>in vivo</i> . Tall incomplet. Introducció de residu Gly a N-term de la proteïna
N ^{PRO} proteasa	19	Canvi de condicions cosmotròpiques	Tall net, sense addició de residus a la proteïna d'interès	Exclusiu per proteïnes que suporten el repliegament <i>in vitro</i> . Reacció llarga. Tall incomplet
Mòdul FrpC	26	10mM Ca ²⁺	Tall eficient i específic. Insensible a inhibidors de proteases	No millora la solubilitat de la proteïna de fusió. Introducció de Asp a C-term de la proteïna. Exclusiu per a proteïnes de fusió C-term.
Domini CPD	23	50-100µM InsP6	Millora solubilitat i expressió de proteïnes a <i>E.coli</i> . Eficient i altament específic. Insensible a inhibidors de proteases	Introducció de fins a 4 residus no nadius a C-term de la proteïna. Exclusiu per a proteïnes de fusió C-term.
Inteïnes	18-22	Tiols. Canvi de temperatura i/o pH	Construcció de la proteïna de fusió flexible i amb diferents opcions de tall. No addiciona residus a la proteïna d'interès.	No augmenta la solubilitat de la proteïna. Tall <i>in vivo</i> . Tall incomplet.

Taula 1.5. Característiques principals de cinc mètodes d'autoprocessament de proteïnes de fusió (Adaptat de Li, 2010)

1.6.6.1 Sortasa A

La sortasa A (SrtA) de *Staphylococcus aureus* catalitza la reacció de transpeptidació que permet l'ancoratge de proteïnes de superfície a la paret cel·lular (Li, 2010). L'enzim catalitza primer el tall entre l'enllaç de Thr-Gly de la seqüència LPXT↓G present en el substrat, i després catalitza la formació de l'enllaç peptídic entre la Thr i la pentaglicina de la paret cel·lular. La SrtA utilitza el calci com a cofactor, la presència de la qual permet l'activitat de l'enzim (Ilangoan *et al.*, 2001).

L'activitat induïble del domini catalític d'aquesta proteasa ha estat utilitzada per al processament de proteïnes de fusió (Mao, 2004). La proteïna de fusió original contenia un His-tag a N-terminal, seguit del domini catalític de la SrtA, la seqüència de reconeixement LPTXG, i la proteïna d'interès. Aquesta proteïna fou expressada a *E. coli* de forma soluble i immobilitzada en una columna IMAC. L'autoprocessament fou induït per addició de calci en el tampó, donant com a resultat l'alliberament de la proteïna d'interès amb un residu Gly extra a N-terminal. Les avantatges i inconvenients d'aquest sistema envers als altres mètodes basats en l'autoprocessament, es troben resumits a la taula 1.5.

1.6.6.2 N^{PRO} proteasa

Aquesta proteasa conforma la primera proteïna de la poliproteïna de pestivirus. Presenta activitat autoproteolítica, i durant la biogènesi de les proteïnes del virus, catalitza el tall entre sí mateixa i la proteïna de la nucleocàpside subseqüent (Li, 2010). La N^{PRO} proteasa provinent del virus de la febre porcina clàssica va ser utilitzada com a element autoprocessable de proteïnes de fusió (Achmüller *et al.*, 2007). La proteïna de fusió consistia en la proteïna d'interès fusionada a C-terminal de N^{PRO}, i expressada a *E. coli* majoritàriament en cossos d'inclusió. Un cop la proteïna era replegada *in vitro*, el canvi de condicions cosmotròpiques cap a caotròpiques, feia que la proteasa recuperés la seva activitat i alliberés la proteïna d'interès amb el seu extrem N-terminal autèntic. Malgrat això, la proteasa N^{PRO} és bastant hidrofòbica, i té tendència a formar agregats insolubles durant el replegament *in vitro*, fet el qual redueix notòriament el rendiment de l'autoprocessament. A més, hi ha casos que indiquen que la proteïna d'interès a la qual està fusionada la proteasa N^{PRO} té un efecte determinant sobre el rendiment de la reacció, essent els pèptids i proteïnes petites les menys influents sobre l'acció de la proteasa (Li, 2010).

1.6.6.3 Mòdul FrpC

El mòdul FrpC és una proteïna regulada per ferro, que és produïda pels bacteris gram-negatius *Neisseria meningitidis*. Osicka *et al.*, 2004, varen mostrar que la proteïna FrpC en presència de calci és capaç d'induir el seu autoprocessament entre els residus Asp 414 i Pro 415, mitjançant un mòdul d'autoprocessament SPM (*Self-Processing Module*) que es troba situat immediatament després de la diana Asp-Pro. La seva aplicació per al processament de proteïnes de

fusió fou desenvolupada pel mateix grup de recerca, mitjançant la construcció de la proteïna d'interès a N-terminal seguida de la diana de reconeixement Asp-Pro i el mínim mòdul SPM funcional amb un element d'afinitat a C-terminal (His-tag). La incubació de la proteïna de fusió resultant en un tampó que conté calci, permet la inducció del processament mediat pel SPM, que allibera la proteïna d'interès amb un residu Asp addicional a C-terminal. Degut a la proximitat del mòdul SPM a la diana de tall, és un sistema altament específic que no processa altres possibles dianes presents en la proteïna d'interès (Li, 2010).

1.6.6.4 Domini CPD (*Cysteine Protease Domain*).

El bacteri gram-negatiu *Vibrio cholerae* secreta una toxina multifuncional que, durant la seva translocació a les cèl·lules hoste, presenta activitat autoproteolítica sobre dominis repetitius de la toxina (MARTX – *Multifunctional Autoprocessing Repeats-In-Toxin*). Aquesta proteòlisi està mediada per un domini intern conservat de tipus CPD (*Cysteine Protease Domain*), que és activat per la unió d'una molècula petita de inositol hexakisfosfat (InsP6) (Li, 2010).

Basat en la toxina MARTX i el domini CPD, es va desenvolupar un sistema d'autoprocessament de proteïnes de fusió, en les quals el domini CPD-His tag fou fusionat a C-terminal de la proteïna d'interès (Shen *et al.*, 2009). La diana de reconeixement específica que es disposà entre els dos elements fou VDAL↓ADGK, i el tall va ser induït en columna, mitjançant l'addició de la molècula de baix cost InsP6. Actualment s'estan cercant alternatives que permetin evitar l'addició de 4 residus no nadius a l'extrem C-terminal de la proteïna d'interès.

1.6.6.5 Inteïnes

Des de la seva descoberta fa poc més de 20 anys, les inteïnes han anat ampliant els seu espectre d'aplicació en diferents camps de la biologia, de l'enginyeria química i de la biotecnologia (Elleuche i Pöggeler, 2010). Les inteïnes es defineixen com a segments proteics interns capaços de catalitzar la seva pròpia excisió d'una proteïna precursora afuncional, i catalitzar la lligació dels fragments que la flanquegen (exteïnes) mitjançant la formació d'un enllaç peptídic (Fig. 1.9). Com a resultat de la lligació de les exteïnes, es forma una proteïna madura i funcional.

Per analogia amb l'*splicing* de RNA en el qual intervenen introns i exons de pre-mRNA, es va definir el fenomen post-traducciona de les inteïnes com a *splicing* de proteïnes (Gogarten *et al.*, 2002 i Paulus, 2000). Les inteïnes es troben distribuïdes en organismes pertanyents a 3 dominis: Archea, Bacteria i Eucarya, i en proteïnes virals. Actualment se'n coneixen més de 100, registrades en una base de dades exclusiva d'inteïnes (InBase de New England Biolabs). Entre elles trobem enzims metabòlics, DNA i RNA polimerases, proteases, ribonucleòtid-reductases i ATPases vacuolars.

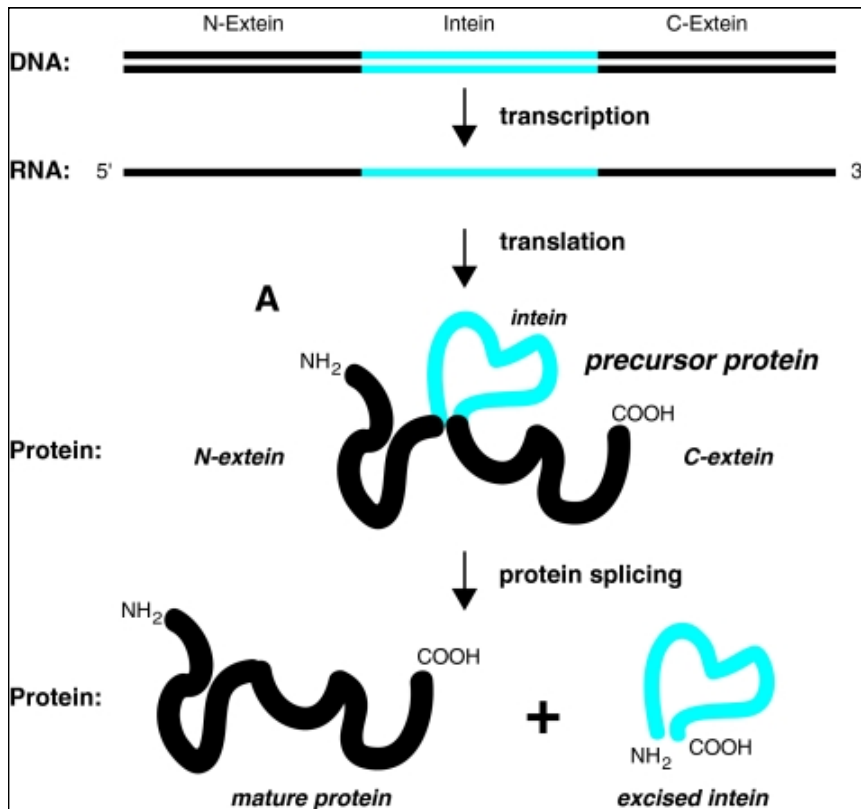


Figura 1.9. Esquema del mecanisme de *splicing* de proteïnes mediat per inteïnes (Elleuche i Pöggeler, 2010).

Moltes de les inteïnes descrites contenen un domini amb activitat *homing* endonucleasa, que consisteix en un segment de doble cadena de DNA que pot promoure la mobilitat genètica lateral entre dos genomes diferents mitjançant un procés dependent de recombinació (Elleuche i Pöggeler, 2010). Alguns gens contenen segments codificants per inteïnes a diferents posicions, per això també se'ls considera elements genètics parasitaris (Xu i Evans, 2001 i Perler i Adam, 2000).

L'*splicing* proteic és un procés ràpid que té lloc a través d'una sèrie de reaccions que comprenen 4 arranjaments nucleofílics (Fig. 1.10).

Per a què la reacció tingui lloc, és essencial que l'extrem N-terminal de la inteïna contingui un residu amb grup hidroxil o tiol (Cys, Ser o Thr), i l'extrem C-terminal contingui una Asn. El mecanisme s'inicia amb un rearranjament acil N-S (o N-O), en el qual el grup tiol de la Cys1 genera un enllaç tioester reactiu just en el lloc de tall a N-terminal de la inteïna. A continuació, es produeix un atac nucleofílic per part de la cadena lateral d'un residu Ser, Cys o Thr al començament de l'exteïna C-terminal, que dona pas a una transesterificació. Com a conseqüència, es forma un embrancament que rep un altre atac nucleofílic per part de l'Asn C-terminal i afecta l'enllaç peptídic que uneix la inteïna i l'exteïna C-terminal, i es forma un ciclació del residu Asn. Finalment, l'enllaç tioester entre les dues exteïnes sofreix un rearranjament espontani per formar una unió peptídica nativa (Mathys *et al.*, 1999).

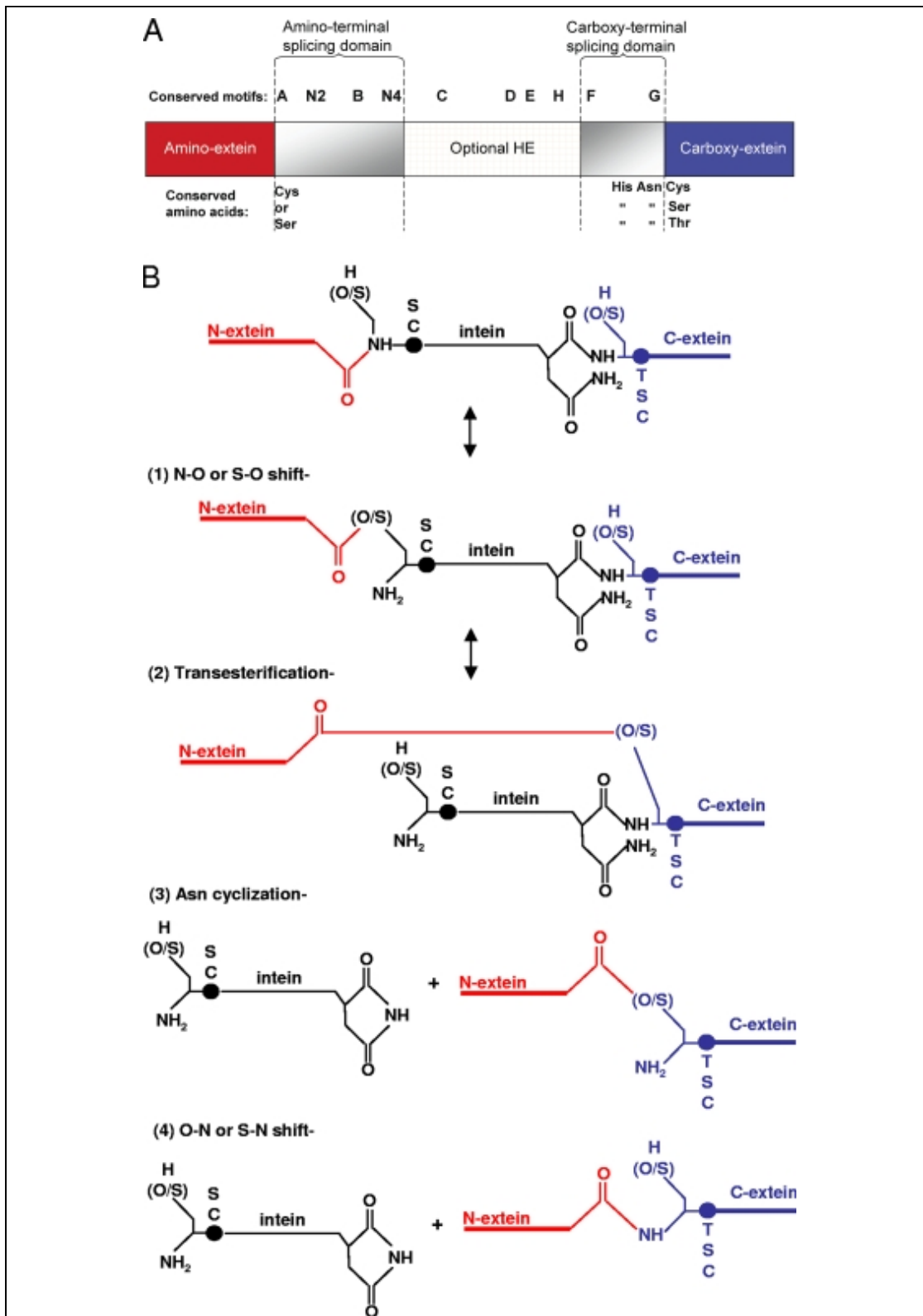


Figura 1.10. Estructura de les inteïnes i mecanisme estàndard del *splicing* de proteïnes. **A:** Estructura modular d'una inteïna amb les seves corresponents exteïnes. S'hi indiquen els dominis N- i C- de *splicing* i el domini opcional endonucleasa (HE) amb els seus residus i motius conservats (A-H i N2 i N4). **B:** Mecanisme de *splicing*. Comprèn 4 reaccions nucleofíliques de reorganització. Les exteïnes N i C s'hi indiquen en vermell i blau, respectivament. (Raghavan i Minnick, 2009).

El grau de similaritat de seqüència de totes les inteïnes conegudes és molt baix, només hi ha certs residus clau que són conservats als extrems N- i C- de la inteïna. Tot i així, els residus

d'ambdues N- i C- extreïnes pròxims al lloc de tall, tenen un paper important en la modulació del *splicing* proteic (Amitai *et al.*, 2009). L'estudi del mecanisme de *splicing* proteic i la identificació dels residus clau per a l'auto-excissió de les inteïnes, han permès obtenir inteïnes modificades per a modular el seu autoprocesament, per a un ampli ventall d'aplicacions biotecnològiques. Una de les aplicacions més rellevants és la seva utilització com a elements autoprocesables de proteïnes de fusió per tal d'alliberar el producte d'interès. Es tracta de combinar o fusionar la proteïna diana a un extrem de la seqüència de la inteïna, i a l'altre extrem l'*affinity tag* emprat per a l'expressió i purificació de la mateixa. L'etapa d'autoprocesament pot ser induïda i modulada *in vitro* com a resposta a un estímul o inductor químic o físic. El processament és molt específic de seqüència, no requereix l'addició de proteases externes, ni de cofactors, ni de fonts d'energia, suposant un estalvi considerable. A més, una altra avantatge d'aquest sistema és que la reacció de processament pot ser induïda a la vegada que la proteïna de fusió resta unida a una columna d'afinitat, amb el qual s'eliminen etapes posteriors per al descartament del *tag* processat (Banki i Wood, 2005) (Fig. 1.11).

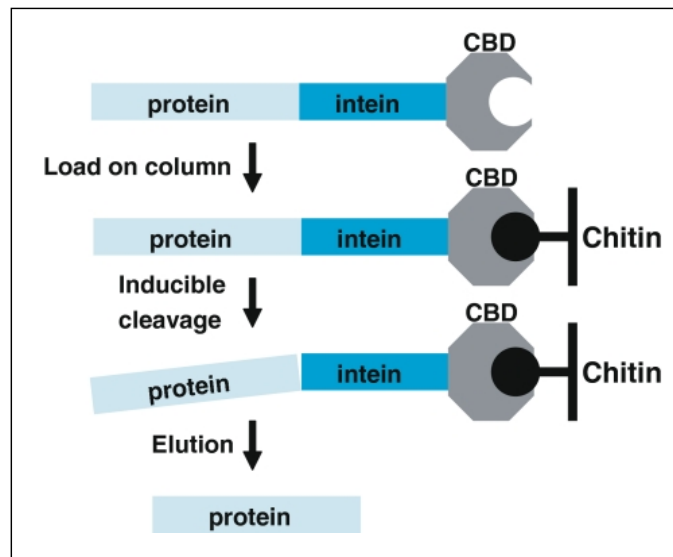


Figura 1.11. Exemple de purificació en columna mitjançant l'ús d'inteïnes. La proteïna d'interès és fusionada a N-terminal d'una mini-inteïna modificada, i purificada a través d'un domini d'unió a quitina (CBD) en una columna de quitina. Sistema desenvolupat per New England Biolabs –IMPACT™ System (Elleuche i Pöggeler, 2010).

Actualment, en el mercat disposem de vectors d'expressió que contenen inteïnes modificades a les quals se'ls hi ha extret el domini amb activitat endonucleasa (mini-inteïnes), i que permeten l'autoprocesament a N- o C-terminal de l'inteïna sota condicions d'inducció diferents. És l'anomenat sistema IMPACT™ (*Intein-Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*), que a més, està acoblat a un sistema de purificació compatible d'unió a quitina. A la figura 1.11 s'hi il·lustra de forma esquemàtica el procés de purificació que ha estat desenvolupat i comercialitzat per New England Biolabs.

2. Plantejament i objectius del treball

Un dels punts que la companyia ERA Biotech va considerar claus per al desenvolupament de la seva tecnologia va ser el processament del domini de fusió Zera[®] per tal d'optimitzar la producció de proteïnes natives com per exemple les proteïnes i els enzims terapèutics. Tenint en compte que per a una producció a escala industrial l'addició de proteases comercials exògenes suposa un cost inviable, sorgia la necessitat de cercar mesures alternatives més cost-efectives.

Per tal de fer front a aquesta necessitat, la missió principal del present treball es focalitza en cercar aproximacions que permetin abaratir els costos globals en la producció de proteïnes d'alt valor afegit mitjançant la tecnologia Zera[®].

En aquest context, la primera de les solucions plantejades es va enfocar en la producció *in house* d'una endoproteasa específica de tall mitjançant la tecnologia Zera[®]. Entre les possibles endoproteases candidates, les més apropiades són aquelles que permeten un tall específic net, sense lliurar el producte amb residus addicionals. D'entre les proteases recombinants existents, l'enteroquinasa bovina compleix aquests requisits, i per tant, fou seleccionada per a la seva producció per mitjà de la tecnologia Zera[®].

Una altra aproximació va consistir en la cerca d'estratègies basades en l'autoprocessament de proteïnes de fusió Zera[®]. Amb els mateixos requisits que per les endoproteases específiques, les mini-inteïnes ofereixen un tall específic sense deixar residus addicionals en el producte d'interès. A més, aquests elements autoprocessables no requereixen d'energia o cofactors exògens, amb el qual simplifiquen i abarateixen el processos de producció.

L'anàlisi comparatiu dels diferents sistemes de tall es va plantejar amb expectatives futures per al disseny de plantes de producció de proteïnes Zera[®], que es dimensionarien en base a les dades obtingudes a escala de laboratori. Altrament, amb l'ajut d'un programa de simulació, es va dur a terme un anàlisi econòmic per tal d'aportar informació sobre els diferents sistemes de tall, els seus límits productius i els seus costos associats.

Objectiu principal

L'objectiu general d'aquesta tesi es basa en cercar i desenvolupar estratègies de processament de proteïnes de fusió Zera[®] produïdes en diferents sistemes d'expressió.

Objectius específics

En base a la informació especificada en el plantejament d'aquesta tesi, podem definir tres grans blocs d'objectius concrets:

1. Estudi de la producció de diferents proteïnes de fusió Zera[®]-enteroquinasa, en diferents cèl·lules hoste.
2. Estudi de l'aplicabilitat de sistemes basats en l'autoprocessament mediat per inteïnes en proteïnes de fusió Zera[®], emprant diferents sistemes d'expressió.
3. Anàlisi comparatiu dels costos globals de producció de Zera[®]-hGH emprant dos sistemes de processament diferents, en plantes de tabac.

Per assolir aquests objectius s'han escollit tres sistemes concrets d'expressió eucariota: les cèl·lules de mamífer, les cèl·lules d'insecte i les plantes de tabac.

Les línies cel·lulars emprades per a cada un dels tres hostes, es troben resumides a la taula següent.

Sistema d'expressió	Línia cel·lular d'expressió transitòria
Cèl·lules de mamífer	CHO
Cèl·lules d'insecte	Sf9, Sf21 i High5
Plantes transgèniques	<i>Nicotiana benthamiana</i>

En el segon capítol s'ha emprat l'hormona humana de creixement hGH (de l'anglès *human Growth Hormone*) com a proteïna model de producció, ja que es tracta d'una proteïna àmpliament caracteritzada i amb elevat interès per al sector biofarmacèutic. Degut al seu paper en mecanismes de síntesi proteica, proliferació cel·lular i metabolisme, s'utilitza per al tractament de malalties relacionades amb el creixement i desenvolupament del cos humà, així com per al tractament de cremades a la pell, per a fractures òssies i per a úlceres sagnants.

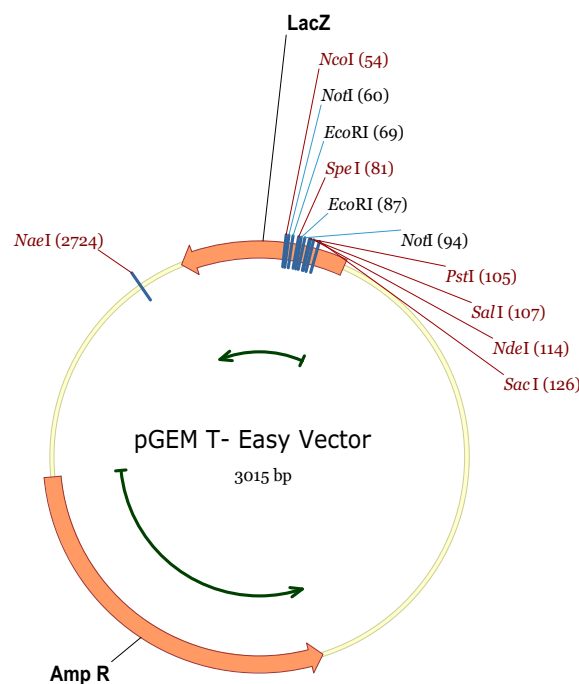
3. Materials i mètodes

3.1 Tècniques de DNA recombinant.

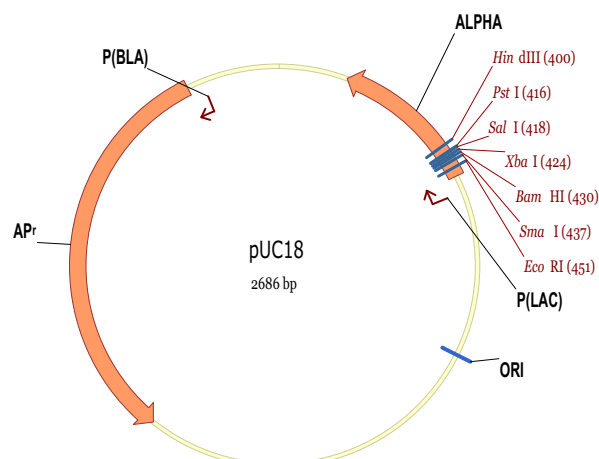
3.1.1 Plasmidis i oligonucleòtids

Plasmidis:

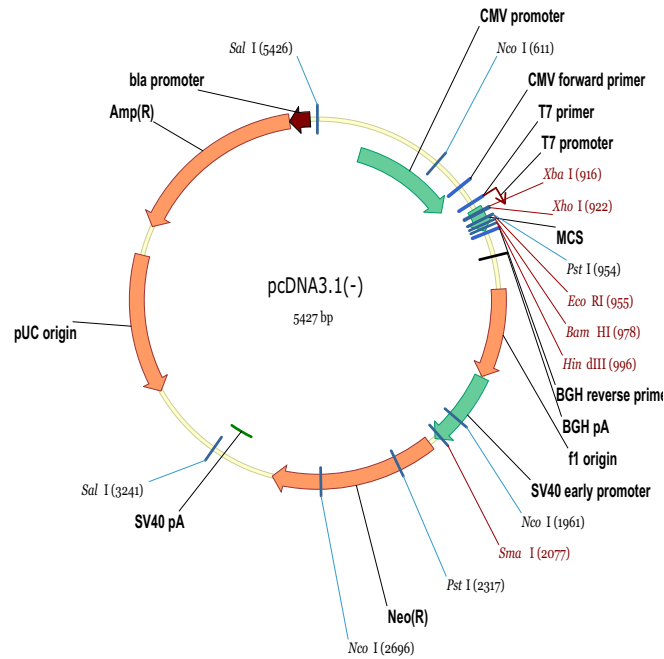
- **pGEM-T Easy vector:** plasmidi que va ser utilitzat per al clonatge de productes de PCR (Promega Corporation). Es tracta d'un vector d'alt nombre de còpies que conté la regió codificant per l' α -pèptid de l'enzim β -galactosidasa en la regió de clonatge múltiple. La inserció del producte de PCR en el vector provoca la inactivació del pèptid, el qual permet la identificació directa degut a la manca de color de les colònies recombinants en plaques d'IPTG i X-Gal.



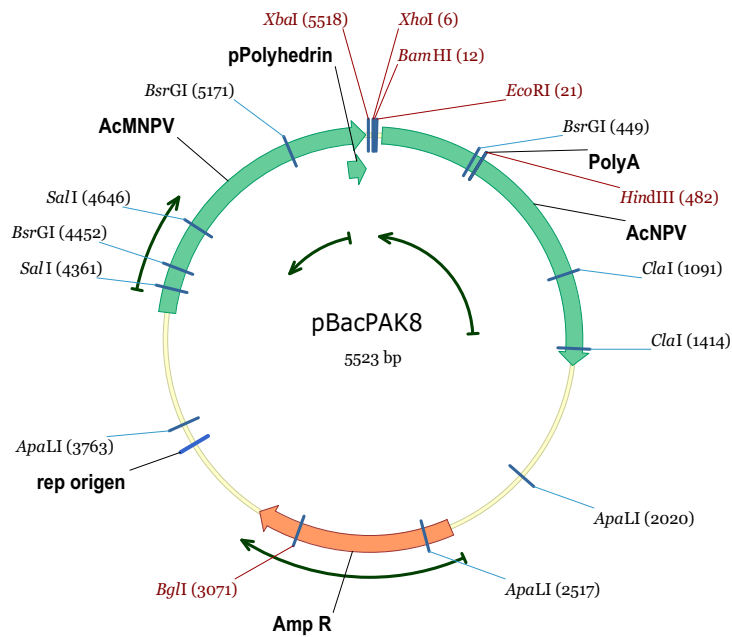
- **pUC18:** plasmidi que va ser utilitzat en la construcció de cassetes d'expressió intermedis, Amp^R, (Fermentas).



- **pcDNA3.1**: plasmidi que va ser emprat per a l'expressió transitoria en cèl·lules de mamífer CHO, Amp^R (Invitrogen)



- **pBacPAK8** : plasmidi que va ser emprat per a l'expressió en cèl·lules d'insecte, Amp^R (Clontech)



oE108-Ek13	GTGCTGGATACGAGGCAGGAGGTGTGGATTCTTG TCAGGGAGATTCTGGAGTCCCTTATGTG	
oE109-Ek14	CTGGAGGTCTCTTATGTGCCAGGAGAATAACAG ATGGCTTTTAGCCGAGTTACTTCTTTCGG	
oE110-Ek15	GAACCTAGCATAACACCAGGTCTATTTGGCAA TGCGCATTGGTATCCGAAAGAAGTAACTCCGGC	
oE111-Ek16	GACCTGGTGTGTATGCTAGAGTTCCAAGGTTTAC AGAGTGGATTCAATCATTCTTCAC	
oE112-Ek17	GGATTCTCAATCATTCTTCACCACCATCATCACC ACCATCACCATCACTG	
oE113-Ek18	AGGGCAGGTACCTACCCGGGGATCCTTATCAGTG ATGGTGATGGTGGTGATG	
oE120- SspDnaB hGH	ATCATTGTACACAACGGACGCTTCCCAACCATTC CCTTATCC	Clonatge de la construcció Zera- SspDnaB-hGH
oE121- BamHI hGH rev	GCTCGGATCCTCATTACGAAGCCACAGCTGCCCT CCAC	
oE150- SspDnaB ECFP	ATCATTGTACACAACGGACGCATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTG	Clonatge de la construcció Zera- SspDnaB-ECFP
oE154- BamHI ECFP rev	GCTCGGATCCTCATTACTTGTATAGCTCGTCCATG CCGAG	
oE176- SspDnaB DsRED	ATCATTGTACACAACGGACGCATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGGATAAC	Clonatge de la construcció Zera- SspDnaB-DsRED
oE177- BamHI DsRED rev	GCTCGGATCCTCATTACTTGTACAGCTCGTCCAT GCC	
oE138-XhoI SP hGH	GACCTCGAGACACCATGAGGGTGTGCTCGTTG	Clonatge de la construcció SP-hGH- MxeGyrA-Zera
oE139- MxeGyrA -SpeI	TGCATCACGGGAGATGCACTAGTTGCC	
oE140-MxeGyrA -SpeI-hGH	GGCAACTAGTGCATCTCCCGTGATGCAGAAGCCA CAGCTGCCCTCCACAGAGCGGCA	
oE141-MxeGyrA- NcoI rev	CCTCCCATGGTAGCGTGGCTGACGAACCCGTTG	
oE142-MxeGyrA- SpeI rev	CCGGCACGATGTCGGCGATG	

3.1.2 Amplificació del DNA per reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet, mitjançant la utilització de DNA polimerases termoestables, l'amplificació específica i en grans quantitats de DNA d'interès. En aquest treball va ser utilitzada bàsicament per a l'obtenció de quantitats suficients de DNA d'interès per al seu posterior clonatge en plasmidis o vectors de transferència.

Per tal de preparar els inserts, es va dissenyar una estratègia de clonació emprant dianes disponibles en els MCS dels dos plasmidis, per tal de inserir-lo en el lloc correcte. Es varen utilitzar dos oligonucleòtids encebadors complementaris a les dues cadenes, que flanquejaven la regió a amplificar, i podien contenir les dianes per on anaven a ser inserides al plasmidi final.

La reacció es va dur a terme en varis cicles de desnaturalització, hibridació d'oligonucleòtids, i extensió mitjançant la Taq polimerasa.

Les condicions habituals de reacció utilitzades varen ser les següents:

Components	Casa comercial	Concentració final
DNA		+/- 100 ng
Tampó de la polimerasa 10x	Applied Biosystems	1x
dNTPs	Applied Biosystems	0,4 mM
MgCl ₂	Applied Biosystems	2,5 mM
Oligonucleòtid <i>forward</i>	Thermo Electron Corp.	0,2 pmol/μL
Oligonucleòtid <i>reverse</i>	Thermo Electron Corp.	0,2 pmol/μL
Taq polimerasa <i>High Fidelity</i>	Applied Biosystems	0,8/1U
H ₂ O		Fins a 100μL

Les condicions de PCR solen ser molt variables, depenent de la mida del fragment a amplificar, la T_m dels oligonucleòtids, i de les finalitats preparatives o analítiques de la mostra amplificada. Tot i així, es varen tenir en compte una sèrie de paràmetres:

Nº cicles	Temperatura (°C)	Durada	Objectiu
1	94	3 min	Linealització i desnaturalització inicial del DNA
25	94		Desnaturalització de DNA –separació de la doble cadena
	55-65	30 s	Hibridació dels encebadors (la temperatura depèn de la T _m)
	72	variable	Elongació de la cadena per part de la polimerasa (1kb/min)
1	72	4 min	Polimerització del DNA de seguretat

Per tal de portar a terme aquesta reacció es va emprar un termociclador (Applied Biosystems) amb capacitat per a regular la temperatura tant a la base, com a la tapa de l'aparell. Aquest fet evitava la condensació a la tapa del tub, de forma que s'evitava l'addició d'oli a la mostra.

Els fragments amplificats varen ser dissolts en tampó de càrrega 6x en blau de bromofenol o blau de xilè (Xylene Lyanoles), per ser comprovats mitjançant electroforesi en gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE i bromur d'etidi al 0,005%. Per a la determinació de la mida del fragment, les bandes corresponents als fragments amplificats varen ser visualitzades mitjançant un transiluminador de llum ultravioleta, i l'ajuda d'un marcador de pes molecular DNA-ladder (Fermentas).

La banda amplificada de mida correcta era excisada i purificada mitjançant el kit de purificació de DNA a partir de gels d'agarosa DNA-kit GFX™ (GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant.

Tampó TAE:	Tris	40mM
	Àcid Acètic Glacial	0,12%
	EDTA	2mM pH8

Tampó de càrrega 6x:

Glicerol	30%
Blau de bromofenol / Xylene Lyanoles	0,25%
EDTA	0,5M pH8

3.1.3 Clonatge de fragments de DNA amplificats per PCR en plasmidis

El fragments amplificats per PCR i purificats a partir de gels d'agarosa, varen ser clonats en un plasmidi intermedi, per facilitar les posteriors etapes de clonatge. Amb aquesta finalitat, es va emprar el *kit* comercial pGEM-T *Easy Vector System* (Promega), seguint les instruccions del fabricant.

3.1.4 Clonatge per digestió amb enzims de restricció

Per tal de clonar una seqüència d'interès en un plàsmid determinat, es va procedir a la digestió mitjançant endonucleases de restricció apropiades. La majoria de combinacions de parells d'enzims mostraven compatibilitat en les condicions descrites pel fabricant. D'altra banda, la majoria d'ells també deixaven extrem protuberants, fet el qual agilitzava l'etapa posterior de lligació dels fragments. Totes les endonucleases emprades en aquest treball, varen ser adquirides a la casa comercial Fermentas.

Per a la preparació de vector donador digerit, s'emprava fosfatasa alcalina bovina (Roche) per tal de desfosforilar els extrems 5' en una relació de 3 U per cada 100 µl totals de digestió, a 37°C, durant 45'.

3.1.5 Purificació de DNA a partir de gels d'agarosa

El mètode emprat està basat en la utilització d'una reïna que uneix DNA. S'ha purificat amb el *kit DNA Gel Band Purification Kit GFX™* (GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant.

3.1.6 Lligació

Les lligacions es varen efectuar procurant que la relació molar entre insert i vector de la barreja final de lligació fos aproximadament de 3 a 1, en un volum final de 20 µl. Aquesta comprovació es feia valorant de forma aproximada la quantitat de cada fragment mitjançant el transiluminador.

Aleshores aplicàvem l'equació:

$$\text{ng insert} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{mida de l'insert (kb)}}{\text{mida del vector (kb)}} \times \text{relació molar insert : vector}$$

i deixàvem incubar amb 1U de DNA lligasa T4 (Fermentas), durant 16 hores a temperatura ambient. Per a algunes lligacions també varem emprar el *kit* de lligació ràpida (*Rapid Ligation Kit*) de Fermentas, que permetia escurçar la incubació a una hora.

L'eficiència de lligació era valorada mitjançant una lligació control al qual només s'hi havia afegit vector.

3.1.7 Preparació i transformació de cèl·lules competents de la soca DH5 α d'*Escherichia coli*

Les cèl·lules d'*E.coli* DH5 α conformen una soca comercial que s'utilitza per a la propagació i extensió dels vectors o plasmidis per a la posterior clonació de la construcció a la soca productora, ja siguin organismes bacterians o llevats.

Protocol de preparació de cèl·lules competents:

- Fer una estria en una placa de LB de la soca *E.coli* DH5 α a partir d'un glicerinat stock
- Inocular en 10 ml de LB una colònia aïllada de la estria
- Deixar créixer el cultiu 1 o/n a 37°C amb agitació vigorosa (250 rpm)
- Deixar créixer el cultiu a 37°C amb agitació vigorosa fins assolir una densitat òptica de 0.39 a 600nm (1-1.5 hores) en un volum de 200 mL
- Refredar el cultiu en gel durant 15-30 minuts
- Transferir el cultiu a 4 ampolles de polipropè de 50 ml estèrils i fredes
- Tots el passos que venen a continuació s'han de fer en condicions estèrils i mantenir les cèl·lules en gel.
- Centrifugar a 4°C, durant 10 minuts, a 4000 rpm
- Decantar el sobrenedant i resuspendre suament el sediment bacterià en 60 ml totals (15 ml per ampolla) de solució TFB1 freda mitjançant la pipeta fins a que no quedin grumolls
- Deixar reposar 10 minuts en gel
- Centrifugar a 4°C, durant 10 minuts, a 5000 rpm
- Decantar el sobrenedant. Mantenir els tubs invertits 1 minut per a eliminar les restes.
- Resuspendre suaument el sediment bacterià en 8 ml totals (2 ml per ampolla) de solució TFB2 freda.
- Aliquotar les cèl·lules en fraccions de 100 μ l i congelar-les immediatament en nitrogen líquid
- Guardar les aliquotes a -80°C

Medi TFB1:

KOAc	30mM
MnCl ₂	50mM
CaCl ₂	10mM
RbCl	100mM
Glicerol	15%
-ajustar el pH a 5,8 amb àcid acètic i autoclavar	

Medi TFB2:

MOPS	10mM
CaCl ₂	75mM
RbCl	10mM
Glicerol	15%
-ajustar el pH a 7 amb àc. acètic i filtrar amb Millipore 0,22 μ m	

Protocol de transformació de cèl·lules competents per xoc tèrmic.

- Afegir el DNA (plasmidi o producte de lligació) a una alíquota de 100µl de cèl·lules competents descongelades i mantingudes en gel.
- Barrejar suaument i incubar 10 minuts en gel.
- Incubar 5 minuts a 37°C.
- Afegir 800µl de medi LB i incubar 45 min a 37°C en agitació.
- Centrifugar a 5000 rpm durant 10 min, i descartar uns 700µl de sobrenedant.
- Plaquejar les cèl·lules resuspeses en els 100µl restants en plaques amb medi LB-Agar 1,5% i antibiòtic adequat.
- Incubar O/N a 37°C en posició invertida.

Medi LB:

Triptona	1g/100mL
Extracte de llevat	0,5g/100mL
NaCl	1g/100mL
-ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i autoclavar	

Antibiòtics i altres compostos de selecció:

<u>Compost</u>	<u>Per cada 100 mL LB</u>
Carbenicilina	10 mg
Kanamicina	2,5 mg
Rifampicina	10 mg
Streptomicina	30 mg
X-Gal	4 mg
IPTG	2,38 mg

- Per tal de generar glicerinat stock es partia d'1µl de DNA plasmídic per a la transformació, i es plaquejava 1/15 del volum.

3.1.8 Extracció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians.

Per a l'obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius bacterians, s'han fet servir diferents kits de preparació, segons la quantitat de DNA necessària per a etapes posteriors.

- Miniprep: QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen), a partir de 1,5 mL de cultiu i seguint les instruccions del fabricant. Aproximadament, s'obtenen 10µg de DNA plasmídic.

- Midiprep: QIAprep[®] Spin Midiprep Kit (Qiagen), a partir de 25mL de cultiu i seguint les instruccions del fabricant. Aproximadament, s'obtenen 100µg de DNA plasmídic.

A partir del DNA plasmídic resultant, quan era escaient, es calculava la concentració de DNA resultant mitjançant el factor de conversió: 1 OD (260nm) = 50 µg/mL dsDNA.

La concentració DNA es pot calcular aplicant la següent fórmula:

$$X \mu\text{g/mL (ng}/\mu\text{L) DNA} = (\text{OD}_{260} \times \text{Factor Dilució} \times 50 \mu\text{g DNA/mL})$$

Per determinar la puresa del dsDNA es mesurava la relació OD₂₆₀/OD₂₈₀.

- un ratio entre 1,8 i 2 indicava que l'absorció era deguda a àcids nucleics i, per tant era indicatiu d'una mostra pura
- un ratio més baix que 1,8 indicava la presència de proteïnes i/o altres elements contaminants que absorbeixen a l'UV

Majoritàriament, el DNA obtingut pels mètodes descrits, resultava de gran puresa i lliure de Dnases, el qual permetia la seva utilització en la transformació tant de cèl·lules de mamífer com d'insecte.

3.1.9 Seqüenciació de DNA

Per tal de tenir una comprovació més acurada dels elements introduïts en les construccions, els clons positius per digestió amb enzims de restricció eren sotmesos a seqüenciació. Amb aquesta finalitat, la parella d'oligonucleòtids eren dissolts en aigua MilliQ fins a una concentració de 10 μM.

3.2 Sistemes d'expressió

3.2.1 Cèl·lules de mamífer CHO-K1

Per a l'expressió de proteïnes recombinants Zera[®] en un hoste basat en cèl·lules de mamífer, es va emprar la línia cel·lular CHO-K1 (ECACC) provinent d'ovaris d'hàmsster xinès. Aquesta línia de mamífer és la més àmpliament utilitzada per a la producció industrial de proteïnes recombinants terapèutiques.

3.2.1.1 Manteniment de cèl·lules CHO

Les cèl·lules CHO varen ser mantingudes en medi líquid HAM F-12 (Gibco-Invitrogen), suplementat amb 10% de sèrum fetal boví – FBS (Gibco-Invitrogen), 2mM de L-glutamina (Gibco-Invitrogen) i la parella d'antibiòtics Streptomicina (100 μg/mL) /Penicil·lina (100U/mL) (Gibco-Invitrogen).

Els cultius cel·lulars en monocapa es mantien en un incubador a 37°C, en atmosfera al 5% de CO₂ i una humitat relativa del 100%. En aquestes condicions de creixement les cèl·lules es divideixen un cop cada 24 hores.

Per tal de mantenir la viabilitat de les cèl·lules elevada (>90%) i amb un creixement saludable, es feien resembatges quan la confluència cel·lular de la placa arribava al 70-80% (al cap de 2-3 dies d'incubació). Per a tal efecte, es rentaven les cèl·lules adherides amb PBS (Phosphate Buffered Saline), i s'afegia una dilució al 0,05% de Tripsina-EDTA (Gibco) en PBS, prèviament temperada a 37°C. Un cop la majoria de cèl·lules s'havien desadherit, al cap de 2-3 minuts a 37°C,

la reacció era aturada amb l'addició de medi HAM-12 complet. Amb les cèl·lules en suspensió, es procedia a realitzar les dilucions cel·lulars, partint d'una confluència del 25%, tot sacsejant suaument la placa per tal d'obtenir una monocapa cel·lular més uniforme i homogènia.

3.2.1.2 Congelació de les cèl·lules CHO – crioconservació de stocks cel·lulars

Per tal de mantenir un *stock* d'emmagatzematge a llarg termini de cèl·lules CHO-K1 congelades, es va emprar un medi de congelació format per medi HAM complet suplementat amb 10% de DMSO (Sigma).

Aquest procediment consistia en desadherir de la placa o flascó confluent (80-100%), les cèl·lules CHO-K1 d'un passatge de cultiu baix. Un cop aturada la reacció de tripsinització per addició de 5mL de HAM, les cèl·lules eren centrifugades a 200 g durant 5 minuts, a temperatura ambient. Per tal de mantenir una concentració de cèl·lules adequada per a la congelació, les cèl·lules eren resuspeses en medi de congelació a raó aproximada de $4 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^7$ cèl·lules/mL). Seguidament, alíquotes d'1mL de suspensió cel·lular eren transferits en criotubs d'1,8mL (Nunc), mantinguts en gel. La congelació era gradual i lenta mitjançant un bany en isopropanol (Mr. Frosty - Nalgene), col·locat durant 2 hores a -20°C, durant 12 hores a -80°C i finalment, transferits al seu emplaçament en el tanc de nitrogen líquid a -196°C.

3.2.1.3 Transfecció transitòria de cèl·lules CHO

La transformació de cèl·lules CHO es va dur a terme mitjançant el mètode basat en lipofectamina (Invitrogen), segons les instruccions del fabricant.

Per a la transfecció transitòria, les cèl·lules havien de presentar una confluència del 40-60% en un flascó de 175cm². S'utilitzaven 15µg de DNA d'alta qualitat, 35µl del Lipofectamine Plus[®] (Invitrogen) i 35µl Plus Reagent[®] (Invitrogen) en 35ml de medi HAM sense antibiòtics ni sèrum. Després de 4 hores d'incubació a 37°C /5% CO₂, es renovava el medi de les cèl·lules amb HAM complet. Al cap de 3-4 dies post-transfecció, s'analitzaven els nivells d'expressió de la proteïna recombinant per Western Blot i/o immunofluorescència.

3.2.2 Cèl·lules d'insecte Sf9, Sf21 i High-Five™

Per a l'expressió de proteïnes recombinants de fusió Zera[®] en un hoste basat en cèl·lules d'insecte, s'han emprat tres línies cel·lulars: majoritàriament la línia Sf9 de *Spodoptera frugiperda* 9, la soca Sf21, i les cèl·lules High Five™.

Totes les línies cel·lular emprades eren comercials i foren adquirides de la casa Invitrogen.

Les línies cel·lulars Sf9 i Sf21 foren originalment aïllades a partir de la larva del Lepidòpter *Spodoptera frugiperda*, mentre que les High Five™ (BTI-TN-5B1-4) deriven d'una línia cel·lular parental de *Trichoplusia ni*.

Mitjançant la seva infecció amb baculovirus recombinant, aquestes cèl·lules poden expressar gens foranis sota control del promotor de la polihedrina del baculovirus.

El baculovirus emprat en aquest treball *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), és un dels més àmpliament utilitzats per a aquesta finalitat. Aquest virus conté un DNA genòmic circular, super-enrotllat, de doble-cadena, encapsulat en una nucleocàpside en forma de bastó. Aquesta nucleocàpside pot estendre's longitudinalment, de forma que pot acomodar grans inserts de DNA exogen.

3.2.2.1 Manteniment de les cèl·lules d'insecte

Les cèl·lules d'insecte Sf9, Sf21 i HighFive™ foren mantigudes a 28°C en suspensió, mitjançant una agitació constant a 130 rpm. Per a les cèl·lules Sf9 i Sf21 utilitzàvem el medi de cultiu comercial SF 900 II, SFM (Gibco-Invitrogen), mentre que per a les HighFive™ empràvem el medi de cultiu Express Five™ SFM (Gibco-Invitrogen).

Durant les etapes de generació, amplificació i titulació del baculovirus recombinant sempre vàrem emprar les cèl·lules Sf9, les quals s'adherien fàcilment a la superfície de la placa formant una monocapa cel·lular.

3.2.2.2 Congelació de les cèl·lules d'insecte

Per tal de mantenir un *stock* de cèl·lules Sf9, Sf21 i HighFive™ emmagatzemades a llarg termini, procedirem a la congelació d'aliquotes cel·lulars.

S'utilitzaven cèl·lules d'insecte en fase exponencial de creixement i amb una viabilitat superior al 90%.

Protocol:

- Es fan créixer cèl·lules en suspensió amb pocs passatges de cultiu acumulats, i al dia següent, es compten el nombre de cèl·lules i la seva viabilitat amb ajut de la cambra de Neubauer i la tinció per Tripan Blue.

- La quantitat de cèl·lules necessàries es centrifuguen a 100 g, durant 5 min., a temperatura ambient, per tal de descartar el medi sobrenedant.

-Es prepara el medi de congelació contenint el 50% de medi de creixement fresc (Sf900-SFM o Express Five™ SFM) i el 50% de medi de conservació: DMSO 15% (Sigma, Hybri-Max), FBS 10% i Sf9-SFM 75%.

- El pellet cel·lular es resuspèn en un volum de medi de creixement fresc, i seguidament amb un altre volum de medi de conservació.

-Mantenint sempre les cèl·lules en gel, es procedeix a transferir 1mL de la resuspensió ($\pm 15 \cdot 10^6$ cèl·lules) en criotubs de 1,8mL (Nunc).

- Els criotubs es sotmeten a una congelació gradual i lenta emprant el recipient Mr. Frosty (Nalgene). Aquest s'ha de disposar un mínim de 2 hores a -20°C , seguidament 3 dies a -80°C , i finalment ser dipositades al seu emplaçament en el tanc de nitrogen líquid a -196°C .

3.2.2.3 Obtenció del baculovirus recombinant – Cotransfecció mitjançant el sistema flashBAC (OET. Ltd)

El gen de la polihedrina no és essencial per a la replicació del virus en la cèl·lula d'insecte, per tant, molts sistemes d'expressió basats en infeccions amb baculovirus substitueixen el gen de la polihedrina per la seqüència codificant del gen d'interès exogen. El promotor fort de la polihedrina és el que controla l'expressió del gen forani.

Degut a que el genoma del virus és molt gran i la inserció del DNA forani pot resultar una tasca complexa, generalment es clona el gen exogen en un vector de transferència (pBacPAK8 en el nostre cas) que conté seqüències del genoma viral que flanquegen el gen de la polihedrina.

El genoma viral i el vector de transferència s'introdueixen a la vegada en la cèl·lula insecte hoste (co-transfecció), de forma que per recombinació homòloga entre les seqüències flanquejants comuns, es produeix la inserció del DNA exogen en el genoma del virus, resultant en un baculovirus recombinant polihedrina-negatiu.

Per tal de produir el baculovirus recombinant mitjançant co-transfecció i recombinació homòloga, hem emprat el sistema flashBAC™ (Oxford Expression Technologies Limited), segons les indicacions del fabricant.

Material necessari:

- DNA *flashBAC*: 100ng (5 μ l) per cada co-transfecció (stock 20ng/ μ l)
- DNA exogen d'interès estèril, 500ng per cada co-transfecció (stock aproximat 100ng/ μ l).
- Plaques de cultiu 35mm (p35- Nunc) amb una monocapa subconfluent de cèl·lules Sf9 ($1 \cdot 10^6$ cèl·lules).
- Medi de cultiu SF 900 II, SFM (Gibco) sense sèrum.
- FuGENE 6 (Roche), 5 μ l per cada co-transfecció.
- Tubs tipus Bijou de poliestirè per a preparar la barreja de transfecció.
- Incubador a 28°C

Procediment:

- Plaquejar $1 \cdot 10^6$ cèl·lules Sf9 en 2mL de medi SFM a cada placa p35. Cada placa correspon a una co-transfecció, més una placa addicional que correspon al control negatiu (sense DNA exogen).
- Deixar que s'adhereixin les cèl·lules a la superfície de la placa durant 1 hora a temperatura ambient. Les cèl·lules han de presentar bon estat, elevada viabilitat, i trobar-se en fase logarítmica de creixement (al voltant de $2 \cdot 10^6$ cèls./mL en suspensió).
- Paral·lelament, es prepara la barreja de co-transfecció: es col·loquen 95µl de medi SFM en un tub Bijou, s'hi afegeixen 5µl del reactiu de transfecció (FuGENE 6) i, després de barrejar-ho bé, s'incuba 5 min. a temperatura ambient.
- A la barreja anterior, se li afegeixen 5µl de DNA *flashBAC* (100 ng), i 500 ng de DNA vector (5µl), i es deixa incubar 20 min. més a temperatura ambient.
- Per acabar, s'afegeixen 900µl de medi de cultiu SFM.
- De les plaques amb les cèl·lules adherides, se li extreu el medi de cultiu, tot evitant que quedin completament seques.
- A continuació s'hi afegeix gota a gota la barreja de cotransfecció al centre de la placa.
- Les plaques en procés d'infecció són disposades en una caixa aïllada, i s'incuben o.n. a 28°C
- Al dia següent, s'hi afegeix 1mL de medi de cultiu SFM, i es segueixen incubant a 28°C durant un total de 5 dies.
- Al cap d'aquest temps, es col·lecta el medi de les cèl·lules que conté el baculovirus recombinant. Aquest *stock* viral es guarda a 4°C i en foscor, fins a un màxim de 3 mesos.

3.2.2.4 Amplificació del baculovirus recombinant

Per tal d'augmentar el volum de *stock* viral recombinant i així permetre infeccions posteriors a una major quantitat de cèl·lules, es procedeix a fer una amplificació del baculovirus recombinant. Aquesta infecció es produeix sobre cèl·lules en suspensió per tal de recuperar 100-200mL de baculovirus recombinant.

Material necessari:

- *Stock* viral inicial provinent de la co-transfecció, mantingut en gel i foscor.
- 100 ml de cèl·lules Sf9 en fase exponencial de creixement, aproximadament $2 \cdot 10^6$ cèls./mL.
- Flascons de tipus Erlenmeyer de poliestirè, estèrils, de 500 ml (Corning).
- Medi de cultiu SF 900 II, SFM (Gibco 10902) sense sèrum.
- Incubador a 28 °C amb agitació a 130 rpm.
- Cambra de Neubauer i tinció amb Trypan Blue.

Procediment:

- Es preparen 100mL de cultiu cel·lular de Sf9 a $2 \cdot 10^6$ cèls./mL en el flascó Erlenmeyer de 500mL. És important que el cultiu es trobi en fase exponencial de creixement i que presenti una viabilitat superior al 90%.
- S'hi afegeixen 500µl de *stock* viral inicial. Si el títol del virus és conegut, es precis infectar amb una MOI baixa (0,5-0,8), d'aquesta manera ens assegurem d'obtenir un títol elevat en la nova amplificació.
- Incubar 5 dies a 28°C, amb agitació a 130 rpm.
- Quan detectem que gairebé totes les cèl·lules estan infectades (s'observen més grans i arrodonides que les no infectades), es transfereix el cultiu a tubs de centrífuga.
- Centrifuguem a 3000 rpm, 15min., a 4°C.
- Recuperem el sobrenedant i el guardem a 4°C i en foscor, fins que procedim amb la titulació del baculovirus.

3.2.2.5 Titulació de la concentració vírica del baculovirus recombinant

La titulació del baculovirus recombinant es basava en el recompte de les unitats formadores de partícules. L'assaig de plaques s'utilitza per a determinar la potència d'infecció d'un *stock* de virus o d'una mostra d'un cultiu infectat (concentració vírica) per formació de partícules en un cultiu de cèl·lules immobilitzades en monocapa.

Material necessari:

- Plaques de cultiu de 6 pous (P35, Nunc)
- Vials de plàstic poliestirè de 7 mL (tipus Bijou) (Sterilin)
- Pipetes estèrils
- Bany d'aigua a 60°C
- Agarosa LM (low-melting) 1% (p/v) (Pronadisa)
- Solució de tinció Neutral Red (0,33% p/v) (Sigma)
- Sobrenedant amb baculovirus, clarificat, lliure de cèl·lules i estèril
- Cultiu de cèl·lules Sf9 a $5 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL

El procediment a seguir en aquest assaig es detalla a continuació:

- Preparar 10 pous multiwells 6 (2mL SFM) amb cèl·lules Sf9. La densitat ha de ser de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/pou. Deixar les plaques 1 h a temperatura ambient per permetre la seva adhesió.
- Paral·lelament es preparen dilucions seriades de la mostra vírica en tubs de plàstic de tipus Bijou. Generalment es realitzaven dilucions fins a dos exponents majors dels que caldria esperar, així sovint el rang de dilucions anaven de 10^{-1} a 10^{-7} . Els controls negatius consistien en medi de cultiu SFM sense virus.

- 1 hora després de sembrar els pous, es comprovava que les cèl·lules estiguessin adherides. Evitant que les cèl·lules s'assequessin, s'extreia el medi de cultiu dels pous, tot procurant no erosionar la monocapa cel·lular.
- A continuació, s'afegien 100 µl de les dilucions 10^{-4} a 10^{-7} a cada placa, per duplicat. Afegir el virus diluït gota a gota en el centre de cada placa, fent servir una pipeta neta. També hem d'incloure dos pous com a control on afegirem 100 µl del medi de cultiu enlloc del virus diluït.
- Incubar les plaques a temperatura ambient durant 1 hora.
- Aproximadament 30 minuts abans del final del període adsorció del virus, preparar agarosa LM (low melt) per a cobrir les cèl·lules. Agarosa 1% (p/v) concentració final: 220 mg / 22 mL aigua estèril / SFM estèril (afegir a la campana).
- Desfer completament l'agarosa en 2 mL d'aigua estèril i 3 mL de medi SFM (mitjançant microones), quan estigui desfeta i translúcida afegir 17 ml del medi de cultiu estèril. Barrejar sense crear bombolles d'aire. Mantenir a bany d'aigua a 60°C a la sala de cultius.
- Retirar el virus inoculat de les plaques. Immediatament, afegir 2mL de l'agarosa fosa, procurant no afectar la monocapa cel·lular.
- Incubar a temperatura ambient durant 15 minuts fins que l'agarosa es solidifiqui.
- Una vegada està en estat sòlid, afegir 1,5 ml del medi de cultiu a cada pou, com una mena de recobriment líquid.
- Incubar la placa a 28°C durant 5-6 dies, procurant que l'agarosa no quedi mai seca.
- Tinció de les plaques i recompte de calbes: Al cap de 6 dies les calbes eren visibles a ull nu. Per tal de facilitar la seva visualització es tenyien les mostres amb una solució de Neutral Red:
- Per preparar una solució stock Neutral Red (Sigma) es preparava una concentració de 5 mg/mL en aigua estèril, es filtrava per un microfiltre de 0,2µm, i es mantenia a temperatura ambient protegida de la llum.
- Retirar el medi de cultiu de cada placa (en lleixiu) i afegir-hi 1 mL de Neutral Red diluït 1/20 en PBS pH7,4.
- Incubar 4 hores a 28°C. Retirar la solució de tinció i deixar assecar a la foscor o.n. D'aquesta manera les calbes s'engrandien i es feien més visibles.
- Per al recompte de calbes, s'empraven les dilucions víriques que presentaven entre 10 i 30 calbes, i es calculava el títol del virus segons la fórmula següent:

Títol del virus (pfu/mL)= Mitjana de les calbes del duplicat x Factor Dilució x 10

$$\text{MOI (pfu/mL)} = \frac{\text{Títol del virus (pfu/mL)} \times \text{mL d'inòcul}}{\text{n}^\circ \text{ de cèl·lules infectades}}$$

3.2.2.6 Infecció de cèl·lules d'insecte amb baculovirus recombinant

Un cop teníem el baculovirus recombinant titulat i en quantitat suficient, per tal d'obtenir proteïna recombinant calia infectar cèl·lules d'insecte.

El procediment consistia en preparar un cultiu de Sf9 en suspensió i en fase exponencial de creixement ($2 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL), incubant-lo a 28°C i agitació a 130 rpm.

Opcionalment i, per tal d'evitar contaminacions indesitjades, es podia addicionar al medi de cultiu la parella d'antibiòtics Penicil·lina/Streptomicina (Gibco-Invitrogen) a una concentració final de 100 µg/mL.

Un cop comprovàvem que el cultiu es trobés en fase exponencial i una viabilitat superior al 90%, s'infectaven les cèl·lules a un densitat de $1-2 \cdot 10^6$ cèl·lules. Per a la majoria de construccions provades, la productivitat fou major quan la densitat era de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules.

A continuació s'inoculava amb baculovirus recombinant, la quantitat de cèl·lules desitjades, en funció de les variables mostrades a la taula següent:

Tipus d'Erlenmeyer	Nº total de cèl·lules	Volum total	Volum d'inòcul
E 125 mL	$30-60 \cdot 10^6$	30 mL	Depèn de la MOI, s'aplica la fórmula*
E 250 mL	$70-140 \cdot 10^6$	70 mL	
E 500 mL	$120-240 \cdot 10^6$	120 mL	

$$*\text{mL d'inòcul} = \frac{\text{MOI (pfu/mL)} \times \text{n}^\circ \text{ de cèl·lules a infectar}}{\text{Títol del virus (pfu/mL)}}$$

Un cop inoculades, les cèl·lules eren incubades a 28°C, en agitació i durant 24, 48, 72 i/o 96 hores, en funció del pic màxim d'expressió de la proteïna recombinant.

Passat aquest temps, el cultiu infectat era transferit en tubs de centrifuga tipus Falcon de 50mL, i eren centrifugats a 1500 rpm, durant 15 min a 4°C.

Es separaven pellet i sobrenedant per al seu posterior anàlisi d'expressió.

3.2.3 Plantes de tabac *Nicotiana benthamiana*

L'espècie vegetal *Nicotiana benthamiana* és habitualment utilitzada com a organisme per a l'expressió transitòria de proteïnes mitjançant agroinfiltració. Aquesta planta presenta un creixement ràpid, un cultiu senzill, un cicle vital relativament curt, i un teixit vegetatiu làbil, fet el qual facilita la infiltració tant per xeringa com pel buit.

En aquest treball, vàrem cultivar les plantes de *N. benthamiana wild-type* en condicions estàndard d'hivernacle, a una temperatura de 18-28°C, 55-65% d'humitat relativa, i un fotoperíode de 16 hores. El cultiu es realitzava en testos de Ø10 cm i 8 cm d'alçada, amb substrat TC2 (Sicosa) contenint una barreja de torba rossa, negre i fibra de coco. L'aport d'aigua es realitzava diàriament per tal d'evitar qualsevol tipus d'estrès hídric.

En aquestes condicions les plantes es deixaven créixer entre 4 i 6 setmanes (20-25 cm) fins al moment de l'agroinfiltració.

3.2.3.1 Preparació d'*Agrobacterium thumefaciens* recombinant

Per a la transformació transitòria de plantes de tabac, vàrem utilitzar la soca d'*A. thumefaciens* EHA 105, que presenta una alta virulència.

Protocol de preparació de cèl·lules competents d'*A. thumefaciens*:

La preparació de 'agrobacteris competents es realitzava d'acord amb el protocol descrit per An, *et al.* (1988):

- Inocular un cultiu de 5 mL de medi LB amb Rifampicina (100 µg/mL) i Streptomycina (300 µg/mL), i incubar o/n a 28°C en agitació a 250 rpm.
- Al dia següent es realitza una dilució 1/100 del pre-cultiu, generant un nou cultiu de volum final 100 mL de LB/Rifampicina/Streptomycina, en un erlenmeyer de 500mL. Incubar o/n a 28°C, en agitació.
- Quan la densitat òptica (DO) a 600nm assoleixi un valor entre 0,6 i 0,8, es centrifuga a 3000xg durant 10 min a 4°C.
- Es descarta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules suaument amb 2 mL de CaCl₂ 20mM estèril i fred.
- Es preparen aliquotes de 100 µl i es congelen immediatament en N₂ líquid.
- Posteriorment, es guarden a -80°C fins a un màxim de 4 mesos.

Protocol de transformació de cèl·lules d'*A. thumefaciens* EHA 105 competents:

- Afegir entre 500 ng i 1000 ng de plasmidi d'interès a 100µl de cèl·lules EHA 105 competents descongelades i mantingudes en gel.
- Incubar 5 minuts en gel.
- Incubar 5 minuts en N₂ líquid.
- Incubar 5 minuts a 37 °C.
- Afegir 900 µl de medi YEB i incubar 4 hores a 28°C, en agitació a 250 rpm.
- Plaquejar en medi YEB amb rifampicina (100 µg/ml) i l'antibiòtic de selecció, que en el nostre era kanamicina (50µg/ml).
- Incubar 2-3 dies a 28 °C.

Medi YEB:

Beef Extract	0,5g /100 mL
Extracte de llevat	0,1g /100 mL
Peptona	0,5g /100 mL
Sacarosa	0,5 g /100 mL
MgSO ₄ (sòlid)	0,048 g /100 mL
MgSO ₄ (solució 1M)	200µl /100 mL
Ajustar el pH a 7,2 amb NaOH 1M. En el cas de fer plaques afegir Agar 15 g/L.	

Generació de glicerins stock d'*A. thumefaciens* recombinants:

Un cop havíem obtingut l'*A. thumefaciens* recombinant d'interès, i per tal de mantenir-ne stock glicerins, preparàvem un cultiu del clon d'interès amb 30mL de LB /Rifampicina /Streptomycina/ Kanamicina, en un erlenmeyer de 100mL, i l'incubàvem o/n a 28°C, en agitació a 250 rpm.

A partir d'aquest cultiu crescut (D.O. a 600 nm, al voltant de 1,0), es procedia a preparar els glicerins en criotubs de 1,8 mL (Nunc), en presència de 50% de glicerol estèril.

Els glicerins eren congelats en N₂ líquid, i transferits a la seva posició d'emmagatzematge a -80°C, durant un màxim de 4 mesos.

3.2.3.2 Transformació transitòria de *Nicotiana benthamiana* per agroinfiltració

Per a l'expressió transitòria en plantes de tabac, empràvem una combinació de dos cultius d'*Agrobacterium* recombinants: un de la pròpia construcció d'interès, i l'altre contenint el supressor de silenciament HC-Pro.

En efecte, per fer front a la transformació d'*Agrobacterium*, les plantes sovint responen mitjançant un mecanisme de defensa que provoca el silenciament post-traducciona l de l'expressió del transgèn, limitant la eficiència en la producció de proteïna recombinant.

Aquest efecte es pot veure contrarestat amb la co-expressió de supressors virals del silenciament gènic. La co-expressió de les construccions que contenen proteïnes de fusió Zera[®] amb el supressor de silenciament HC-Pro provinent del virus del mosaic del tabac (TEV), augmenta considerablement l'expressió de proteïna recombinant (Torrent *et al.*, 2009).

La introducció del transgèn d'*Agrobacterium* a les fulles de planta es duia a terme a través dels estomes de la fulla, mitjançant un sistema d'expressió transitori anomenat agroinfiltració.

Mitjançant l'agroinfiltració per xeringa, obteníem biomassa suficient per a realitzar cribatges d'expressió, i per fer les primeres proves de recuperació de cossos proteics a petita escala.

Quan hi havia necessitat de generar més biomassa transformada, es procedia a una agrinfiltració mitjançant el buit, en la qual la planta era submergida en la solució d'*Agrobacterium*, afectant a més massa foliar a la vegada.

Preparació del cultiu bacterià per a una agroinfiltració mitjançant xeringa:

- A partir de colònies aïllades d'*Agrobacterium* plaquejades en medis de selecció, o bé, a partir de glicerinatats de -80°C de les construccions d'interès, es preparava un cultiu bacterià primari de 5 mL LB /Rifampicina /Streptomomicina/ Kanamicina.
- De forma paral·lela, també es preparava el cultiu primari de l'*Agrobacterium* transformat amb el supressor de silenciament HC-Pro.
- Ambdós cultius eren incubats o/n a 28°C, en agitació a 250 rpm
- A partir dels cultius primaris crescuts, per a cada un d'ells es feia una dilució 1/200 amb medi i antibiòtics frescos, en un volum final de 20 mL.
- Ambdós cultius eren incubats o/n a 28°C, en agitació a 250 rpm
- Es mesurava la DO a 600nm, la qual havia de ser pròxima a 1,0.
- Centrifugàvem el cultiu a 3000g, durant 15 min, a RT.
- El sobrenedant era descartat, i les cèl·lules eren resuspeses suaument en tampó d'agroinfiltració. El volum de tampó d'agroinfiltració afegit, havia de permetre mantenir la DO a 600nm prop de 1,0.
- Incubàvem aquests cultius a temperatura ambient, sense agitació, durant 2-3 hores.
- En els moments previs a l'agroinfiltració, barrejàvem en una relació de volums 1:1, el cultiu corresponent al HC-Pro amb el cultiu de la construcció d'interès.

Tampó d'agroinfiltració:

2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
5' dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (acetosiringona)	200 µM *
Ajustar el pH a 5,6 amb KOH 1M. *per resuspendre l'acetosiringona, primer es dilueix amb DMSO, i després s'afegeix 1:1 (v/v) d'aigua, fins a una concentració stock de 0,2 M.	

Preparació del cultiu bacterià per a una agroinfiltració mitjançant el buit:

Bàsicament, el procediment és idèntic que el de l'agroinfiltració per xeringa, però preparant un volum de cultiu en solució d'agroinfiltració més gran.

Així, el volum final d'*Agrobacterium* recombinant en solució d'agroinfiltració ha de ser de 250-300 mL, per tal de cobrir tota la biomassa vegetal.

3.2.3.2.1 Agroinfiltració mitjançant xeringa.

De cada planta *N. benthamiana* de 4-6 setmanes, s'escollien i marcaven 2 ó 3 fulles ben exteses, i de mida similar.

Es prenia una xeringa estèril de 1mL, sense agulla, la qual era carregada amb el cultiu d'*Agrobacterium* a infiltrar. Amb la punta de la xeringa, exercíem pressió sobre el revers de la fulla, a la vegada que amb el dit exercíem una contrapressió en l'anvers de la fulla.

D'aquesta manera i, evitant els nervis principals de la fulla, anàvem infiltrant el cultiu a l'interior de la fulla.

Un cop observàvem que en aquell punt no s'infiltrava més cultiu, canviàvem de posició per tal d'agroinfiltrar teixits adjacents.

Les plantes agroinfiltrades eren retornades a les condicions de l'hivernacle.

Al cap de entre 4 i 7 dies post-agroinfiltració, el material agroinfiltrat (tota la fulla, o part d'ella) era recol·lectat i congelat a -80°C en la màxima brevetat possible.

3.2.3.2.2 Agroinfiltració mitjançant el buit.

Per a l'agroinfiltració mitjançant el buit s'empraven plàntules de *N. benthamiana* de 3-4 setmanes, crescudes *in vitro*.

Preparació del material vegetal *in vitro*.

Per al cultiu *in vitro* de plàntules de tabac, es necessari treballar en condicions estèrils.

Esterilització de llavors:

- Transferir a un tub Eppendorf una quantitat de llavors equivalent a 50 µL.

- Afegir 1 ml d'etanol 70% barrejant per inversió durant 15 s.
- Treure l'etanol amb pipeta, descartant les llavors que suren.
- Rentar amb 1 ml d'H₂O milli-Q estèril.
- Treure l'H₂O amb pipeta i afegir 1mL de solució d'esterilització.
- Incubar durant 5 minuts, barrejant per inversió periòdicament.
- Treure la solució d'esterilització amb pipeta.
- Rentar 3 vegades amb 1 mL d'H₂O estèril, barrejar per inversió cada vegada.
- Treure l'H₂O amb pipeta i deixar assecar.
- Conservar les llavors a 4°C, i al dia següent ja es poden emprar per a sembrar.

Solució d'esterilització:

Hipoclorit sòdic	20%
Tween-80	0,1%
H ₂ O milli-Q estèril	79,9%

Germinació i creixement de plantes de tabac *in vitro*:

Sembrar les llavors esterilitzades en pots de creixement de vidre amb medi MS, a raó de 50 llavors per pot amb ajuda d'una agulla emmanegada.

Es fan germinar i créixer les plantes durant 3-4 setmanes en condicions estèrils *in vitro*, a 25-26°C, amb un fotoperíode de 16 hores de llum i 8 hores de foscor, fins que presentin una mida de 2-3 cm.

Medi MS:

Medi MS + MES (M0255) <i>Macro/micro amb vitamines</i>	4,9 g/L
Sacarosa	30 g/L
Gelrite (Duchefa)	3 g/L
Ajustar el pH a 5,8 amb KOH 1M abans d'afegir el Gelrite, i autoclavar	

Infiltració del cultiu d'*Agrobacterium* en condicions de buit

- Abocar el cultiu d'agrobacteri en solució d'agroinfiltració (preparat anteriorment), procurant que totes les plàntules quedin totalment submergides.
- Introduir el pot destapat dins d'una campana de buit, i generar buit mitjançant una bomba d'oli.
- Quan apareguin bombolles en el cultiu d'agrobacteri, mantenir el buit durant 5-10s, i desfer-lo molt suaument per evitar que el medi es fragmenti. En aquest procés es pot observar com les fulles de tabac es tornen translúcides, indicant que la infiltració ha funcionat correctament.

- Retirar el cultiu d'agrobacteri amb cura de no desenganxar el medi del recipient.
- Tapar els pots i traslladar-los a la cambra de cultiu *in vitro*, per fer-les créixer durant 4-5 dies en condicions controlades.
- Recol·lectar les plàntules mitjançant l'ajuda d'un escalpel, tot evitant agafar medi. La biomassa es pot congelar a -80°C fins al moment del seu anàlisi.

3.3 Tècniques d'anàlisi i manipulació de proteïnes

3.3.1 Tècniques generals

3.3.1.1 Electroforesi en condicions desnaturalitzants.

Aquest anàlisi es va dur a terme segons el mètode descrit per Laemmli, 1970; emprant l'aparell *Miniprotean II* (BioRad) com a suport.

Preparació del gel:

Tampó concentrador: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,4%.

Tampó separador: 0,5 M Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,4%.

Gel separador	10%	12,5%	15%
Tampó separador	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Acril: bisacrilamida 40%	2,5 mL	3,13 mL	3,75 mL
Temed	5 µL	5 µL	5 µL
APS 10% (p/v)	40 µL	40 µL	40 µL
H ₂ O	5 mL	4,38 mL	3,75 mL

Gel concentrador	
Tampó concentrador	1 mL
Acril: bisacrilamida 40%	0,5 mL
Temed	6 µL
APS 10% (p/v)	40 µL
H ₂ O	2,25 mL

Utilització de gels de gradient prefabricats:

Alternativament, també varem utilitzar gels de gradient prefabricats 4-12% NuPAGE[®] Novex[®] Bis-tris Mini Gels d'Invitrogen, seguint les indicacions del fabricant.

Preparació de les mostres:

- Les mostres que eren analitzades per electroforesi en condicions desnaturalitzants, es diluïen en un tampó de càrrega més o menys concentrat segons el volum de mostra que volíem carregar : TM 2X i TM 5X.

- Afegiem β -mercaptoetanol a una concentració final del 10%.
- Bullíem les mostres a 95°C, durant 5-10 min.
- Temperàvem i carregàvem al gel.

TM 2X	
Tris	0,125 M
Glicerol 87%	20%
SDS (10 %)	4%
Bromophenol	0,04%

TM 5X	
Tris	0,3125 M
Glicerol 87%	50%
SDS	10%
Bromophenol	0,1%

Condicions de migració:

Condicions/ tipus de gel	Preparats manualment	Prefabricats NuPAGE® 4- 12%
Voltatge	120 V	200 V constant
Temps	45-50 min	35 min
Tampó d'electroforesi	0,25M Tris-HCl pH8.5, Glicina 1,92M, SDS 1%	NuPAGE® MES buffer

Marcadors de pes molecular:

Per tal de determinar el pes molecular aproximat de les proteïnes resoltes en gels d'acrilamida, es va emprar un marcador de pes molecular de tipus comercial:

-Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen – LC5800), que consisteix en 12 bandes proteiques pre-tenyides. Rang de pes molecular d'entre 3,5 i 260kDa.

3.3.1.2 Tinció de gels de poliacrilamida

3.3.1.2.1 Tinció amb blau de Coomassie

Aquesta tinció es va utilitzar de forma rutinària per analitzar patrons proteics en les diferents etapes de *downstream*, per determinar el grau d'enriquiment durant les diferents etapes de *downstream*, o bé per tal de comprovar la quantitat de proteïna transferida per *Western Blot*, entre altres.

El seu límit de detecció és de 0,1-0,2 μ g de proteïna.

Protocol:

- Fixar les proteïnes del gel en una solució de blau de Coomassie R (Sigma) 0,05% i metanol 50% i àcid acètic 10%, durant 10-15 min.
- Fer rentats successius amb una solució de metanol 50% i àcid acètic 10%.
- Quan el gel està prou destenyit, fer rentats amb aigua MilliQ.

3.3.1.2.2 Tinció amb nitrat de plata

La tinció amb nitrat de plata presenta un límit de detecció de 5-10 ng de proteïna. Amb el qual la seva aplicació va ser molt útil per tal de detectar fraccions on la quantitat de proteïna era molt baixa. En termes generals sempre va ser emprada per a les mateixes finalitats que la tinció per Coomassie.

Protocol:

- Fixar les proteïnes en una solució de metanol 40% i formaldehid 5%, durant 45-60 min.
- Realitzar dos rentats de 5 min, amb aigua MilliQ.
- Sensibilitzar el gel durant 1 min en una solució de tiosulfat de sodi 0,02%.
- Realitzar dos rentats de 20 s amb aigua MilliQ.
- Incubar el gel durant 10 min amb una solució de nitrat de plata (AgNO_3) 0,1% (p/v).
- Realitzar un rentat de 20 s amb aigua MilliQ.
- Revelar fins que apareguin les bandes de proteïna (1-5 min), amb una solució de carbonat de sodi 3%, formaldehid 0,02% i tiosulfat de sodi 0,000016%.
- Parar la reacció incubant el gel 10 min en una solució d'àcid cítric 2,3 M
- Rentat el gel 3 vegades, 5 min, en aigua MilliQ.

3.3.1.3 *Western Blot*

Aquesta tècnica va ser utilitzada per tal d'identificar i avaluar els nivells d'expressió de les proteïnes recombinants d'interès, en els extractes dels diferents sistemes eucariotes emprats.

En el decurs d'aquest treball, es varen emprar dos sistemes diferents per a transferir les proteïnes resoltes en gels d'acrilamida a membranes de nitrocel·lulosa: la transferència vertical en fase líquida (BioRad), i la transferència en horitzontal en semi-sec (Ibлот[®] Dry Blotting System d'Invitrogen).

Protocol de transferència vertical:

- Preparar 6 trossos de paper 3MM de la mida de l'esponja i tallar la membrana de nitrocel·lulosa de 0,2 μm (Schleicher & Schuell) a la mida del gel. Manipular la membrana amb guants. S'ha de mantenir la membrana sempre humida.
- En un recipient en agitació, equilibrar la membrana submergint-la primer en aigua destil·lada i després en tampó de transferència. Fer el mateix amb el gel de poliacrilamida, en aquest cas, submergir-lo directament en tampó de transferència (10-15 minuts).

- Mullar tres trossos de paper 3MM en tampó de transferència i col·locar-los sobre l'esponja saturada a la part negra del *sandwich* assegurant-nos que no queden bombolles entre l'esponja i el paper.
- Col·locar el gel sobre el paper mantenint tot el conjunt mullat amb tampó de transferència.
- Col·locar la membrana sobre el gel. Eliminar les possibles bombolles que s'hagin format amb l'ajuda d'un rodet cilíndric.
- Col·locar tres trossos de paper 3MM mullat en tampó de transferència i l'altra esponja saturada per a tancar el *sandwich*.
- Tancar el *sandwich* i col·locar-lo de forma correcta en la cubeta de transferència vertical. Omplir la cubeta amb tampó de transferència, submergint totalment el *sandwich*.
- Transferir o/n a 30V, a 4°C; o bé durant 1h a 90V, a 4°C.

Tampó de transferència vertical:	
Tris Base	48 mM
Glicina	39 mM

Protocol de transferència horitzontal, sistema Iblot[®] Dry Blotting System (Invitrogen)

És un sistema ràpid i senzill, encara que l'eficiència de la transferència pot arribar a ser més baixa que el sistema vertical en fase líquida.

Es varen seguir les instruccions i indicacions del fabricant, mitjançant el programa 3 de l'aparell, amb un temps màxim de transferència de 7 min.

Tinció de la membrana de nitrocel·lulosa amb Ponceau

Un cop les proteïnes varen ser transferides a la membrana, i per tal de comprovar el grau de transferència, es podien tenyir les membranes amb la tinció reversible del roig de Ponceau.

S'incubaven les membranes en una solució de Ponceau 0,1% i àcid acètic 1%, durant 1-5 min. Es rentaven els excedents amb aigua. Un cop tenyida la membrana, i quan era necessari, marcàvem amb un llapis les bandes corresponents als marcadors de pes molecular.

La membrana era destenyida amb PBS/Tween-20 0,1%, i es prosseguia amb el protocol d'immunodetecció de proteïnes.

3.3.1.4 Immunodetecció de proteïnes

Protocol:

- Bloquejar la membrana en una solució del 10% de llet en pols desnatada en PBS-Tween, incubar 30 min a RT.

- Incubar amb la dilució d'anticòs primari que interressi en 10% de llet en pols en PBS-Tween durant 1h a RT. Veure les dilucions d'anticòs emprades en el requadre inferior.
- Realitzar tres rentats de la membrana de 5 min amb PBS-Tween
- Incubar amb l'anticòs secundari diluït en 10% de llet en pols en PBS-Tween durant 45 min a RT. En aquest treball varem emprar en la gran majoria dels casos una dilució 1:10000 d'un anticòs secundari anti-IgG de conill conjugat a la peroxidasa de rave (GE Healthcare).
- Realitzar tres rentats de la membrana de 5 min amb PBS-Tween.
- Detectar les proteïnes marcades amb el kit ECL *Western Blotting Detection* (GE Healthcare), seguint les instruccions del fabricant.

Anticossos

En aquest treball varem emprar una sèrie d'anticossos policlonals primaris els quals varen ser produïts en conill.

Anticòs primari	Antigen	Dilució emprada per a Western Blot
α R8	Pèptid sintètic format per les 8 repeticions de la seqüència aminoacídica PPPVHL de Zera [®]	1:7000
α EK	Subunitat catalítica de l'enteroquinasa desnaturalitzada	1:1000
α hGH	Hormona de creixement humana	1:1500

3.3.1.5 Quantificació de proteïnes

3.3.1.5.1 *Determinació de la quantitat de proteïna total pel mètode Bradford.*

Per tal de determinar la quantitat de proteïna present en un extracte, procedíem a realitzar l'assaig desenvolupat per Bradford, 1976. Aquest mètode colorimètric, està basat en la capacitat que presenta el Coomassie Brilliant Blue G-250 de presentar dues coloracions diferents segons si està unit a o no a proteïna. Aquest assaig presenta un rang de detecció linear de proteïna d'entre 2 μ g/mL i 120 μ g/mL.

Depenent del tampó d'extracció emprat, la presència de detergents és incompatible amb el reactiu de Bradford. Per tant, quan l'extracció de proteïnes era total (en presència de SDS) s'empraven 2 μ L d'extracte per cada mL total de reacció, mentre que si el tampó resultava més innocu, se n'utilitzaven 10 μ L.

Material:

- solució de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BioRad)
- BSA (Albumina de Sèrum Boví, Roche) a una concentració *stock* de 0,2 mg/mL.
- Buffer d'extracció de proteïnes

- Cubetes d'espectrofotòmetre d'1mL, o bé plaques de 96 pous de tipus ELISA
- Espectrofotòmetre

Procediment:

- Realitzar una sèrie de dilucions de BSA en presència de tampó d'extracció. Generalment un rang de dilucions entre 1 i 15µg/mL de BSA resultava en una corba de regressió lineal.
- Tanmateix, també es preparen el blancs, contenint només tampó d'extracció i aigua.
- Diluir les mostres, tenint en compte que la composició del tampó d'extracció podia resultar incompatible amb el reactiu de Bradford. Si la mostra contenia detergent, empràvem 1-2µL de mostra inicial /mL de reacció total. En absència de detergents, se'n podia utilitzar fins a 10-15µL, depenent de l'origen i tipus de mostra.
- A totes les mostres se li afegia la solució de Bradford. Si la lectura d'absorbància es realitzava en cubetes espectrofotomètriques d'1mL, s'hi afegien 200µL de solució de Bradford. Si la lectura es feia en placa multi-pous de 200µL, se n'hi afegia 40µL de Bradford.
- Un cop feta la barreja, es deixava actuar 5 min en repòs.
- La lectura d'absorbància es realitzava a 595nm.
- Per tal de determinar la quantitat de proteïna de les mostres problema, s'extrapol·laven els valors obtinguts d'absorbància en la corba obtinguda amb el BSA com a proteïna estàndard.

3.3.1.5.2 Quantificació per densitometria

Aquest mètode semi-quantitatiu consistia en resoldre per immunoblot una sèrie de dilucions de la mostra problema i la d'una proteïna estàndard quantificada.

La proteïna emprada com a estàndard tant podia consistir en la proteïna recombinant comercial d'interès, o bé en la proteïna de fusió Zera[®] purificada i quantificada per anàlisi d'aminoàcids. Tanmateix, l'expressió de proteïnes de fusió Zera[®] també podia ser quantificada emprant la γ -zeïna com a estàndard, ja que l'anticòs primari anti-R8 reconeix el domini repetitiu (PPPVHL)₈ que conté tant Zera[®] com la γ -zeïna. La γ -zeïna s'extreia de la farina de blat de moro, i la seva quantificació es determinava per anàlisi d'aminoàcids.

L'anàlisi densitomètric es realitzava mitjançant el programa informàtic QuantityOne[™] (Bio-Rad) sobre la imatge escanejada del film revelat.

En el cas que les mostres o les proteïnes patró mostressin bandes multimèriques, aquestes també eren considerades per a la quantificació densitomètrica.

Una bona corba patró era considerada amb una $R^2 > 0,98$. S'acceptaven valors de quantificació corresponents a un $\pm 20\%$ per sobre o per sota els límits de la corba estàndard

3.3.1.5.3 ELISA

Aquesta tècnica va ser emprada per quantificar la proteïna de fusió Zera[®] o la hGH alliberada en les diferents mostres corresponents a diferents etapes de *downstream* estudiades en aquesta tesi.

3.3.1.5.3.1 ELISA hidrofòbica

Aquest experiment consisteix en unir per adsorció l'antigen a una placa de 98 pous MaxiSorp (Nunc), i la detecció de la proteïna recombinant amb un anticòs específic. Com a proteïna estàndard s'ha emprat, per una banda γ -zeïna purificada a partir de farina de blat de moro (extracció segons el protocol d'Osborne i quantificada per anàlisi d'aminoàcids), o bé hGH recombinant produïda a E.coli (Anhui Anke Biotechnology Co., Ltd.).

El rang de detecció i la sèrie de dilucions de la patró anava de 0,4 a 25ng R8/mL per a la γ -zeïna i de 1 a 25ng hGH/mL per a la rhGH.

La conversió de γ -zeïna a R8 es va establir per la proporció en massa molecular del domini repetitiu R8 en la γ -zeïna. A la vegada, i emprant càlculs equivalents, també es va establir la conversió de R8 a la quantitat de domini proteic Zera[®].

En la posada a punt d'aquesta tècnica, vàrem comprovar l'efecte de la matriu en la proteïna emprada com a estàndard. Idealment aquesta matriu havia de ser específicament la mateixa que la de la mostra que conté la proteïna de fusió.

Protocol:

- Diluir 1/50 les mostres i la proteïna estàndard en tampó d'ELISA hidrofòbica.
- Sonicar les mostres amb Digital Sonifier (Branson Ultrasonics) amb la sonda *microtip* a una amplitud del 20% i amb polsos de 2 s, durant 30 s
- Bullir les mostres durant 30 min a 95°C
- Incubar les mostres durant 5 minuts en un agitador orbital.
- Centrifugar les mostres a 16000g durant 10 min a temperatura ambient.
- Descartar el sediment i utilitzar el sobrenedant per carregar la placa d'ELISA.
- Barrejar bé les mostres abans de carregar-ne 200 μ L per triplicat a cada pou de la placa d'ELISA Maxi Sorp (Nunc 439454). Carregar la recta patró per duplicat.
- Mantenir la placa en agitació (150rpm) a temperatura ambient, durant 45 min.
- Rentar la placa 5 vegades amb 300 μ L PBS/Tween-20 0,1%.
- Saturar els pous amb 10% de llet en pols en PBS (tampó de bloqueig) durant 1h a temperatura ambient, o o/n a 4°C.

- Rentar la placa 2 vegades amb 300 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Incubar amb una dilució de l'anticòs primari en tampó de bloqueig, durant 1 hora a RT.
- Rentar la placa 5 vegades amb 300 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Incubar amb una dilució d'anticòs secundari (en el nostre cas anti-conill-HRP de GE Healthcare diluït 1/1000 en tampó de bloqueig), durant 1 hora a RT.
- Rentar la placa 5 vegades amb 300 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Revelar la placa d'ELISA afegint 100µL d'una solució de TMB (Sigma – *Ready to use*). Agitar suaument fins que aparegui un color blau en els pous amb mostra (màxim 30 min).
- Aturar la reacció afegint 100µL H₂SO₄ 1M, amb el qual el color blau canviarà a groc.
- Llegir la densitat òptica a 450nm en un espectrofotòmetre de plaques (*Universal Microplate Reader Elx 800 – BIO-TEK® Instruments, Inc.*), i tractar les dades.

Tampó d'ELISA hidrofòbica:

Borat de sodi	12,5mM
SDS	0,1%
TCEP	50mM
Urea	8M
Aigua desionitzada	

3.3.1.5.3.2 ELISA de Níquel

En els últims anys, a ERA Biotech s'ha desenvolupat una tècnica de quantificació basada en ELISA-IMAC específica per a Zera[®], amb aplicació per a la quantificació de proteïnes de fusió Zera[®], independentment del seu origen i de l'estat de puresa en què es trobi. L'estructura del domini Zera[®] (en concret del domini repetitiu PPPVHLx8) orienta les 8 histidines en un mateix pla, de forma que poden ser unides per afinitat a un metall divalent com el níquel. Per a la quantificació de proteïnes Zera[®] s'empraven plaques de 96 pous amb el metall immobilitzat que, en condicions desnaturalitzants, presentava afinitat pel domini Zera[®].

La proteïna de fusió Zera[®] unida al metall era reconeguda amb l'anticòs contra R8, i es prosseguia amb el procés complet de detecció i monitoratge típics de la tècnica d' ELISA

Protocol:

- Diluir les mostres problema i estàndard (rang de 0 a 25ng R8/mL) en tampó d'ELISA-Ni.
- Incubar les mostres a 60°C durant 30 min.
- Sacsejar les mostres mitjançant vortex abans de carregar-les a la placa d'ELISA HisGrab[™] Nickel (Pierce – ref. 15442).
- Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, amb agitació suau.

- Rentar la placa 5 vegades amb 200 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Afegir 200µL de solució bloquejant (BSA 1%, Llet desnatada en pols 1%, PBS/Tween-20 0,1%) a cada pou. Incubar durant 30-60 min a temperatura ambient.
- Incubar amb una dilució de l'anticòs primari contra R8 1:1000 en tampó de bloqueig, durant 1 hora a RT.
- Rentar la placa 5 vegades amb 200 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Incubar amb una dilució d'anticòs secundari (anti-conill-HRP de GE Healthcare diluït 1/1000 en tampó de bloqueig), durant 1 hora a RT.
- Rentar la placa 5 vegades amb 200 µL PBS/Tween-20 0,1%.
- Revelar la placa d'ELISA afegint 100µL d'una solució de TMB (Sigma – *Ready to use*). Agitar suaument a temperatura ambient, fins que aparegui un color blau en els pous amb mostra (màxim 30 min).
- Aturar la reacció afegint 100µL H₂SO₄ 1M, amb el qual el color blau canviarà a groc.
- Llegir la densitat òptica a 450nm en un espectrofotòmetre de plaques (*Universal Microplate Reader Elx 800 – BIO-TEK® Instruments, Inc.*), i tractar les dades.

Tampó d'ELISA-Ni:

Tampó fosfat pH7	20mM
NaCl	300mM
Imidazol	5mM
Triton X-100	0,1%
MESNA	10mM
TCEP	5mM
Urea	8M
Aigua desionitzada	

3.3.1.5.3.3 ELISA comercial de quantificació de hGH

El *kit* comercial de quantificació de hGH en mostres biològiques (Roche - ref. 11 585 878 001), estava basat en un immunoassaig colorimètric en plaques de 96 pous. Tots els reactius i patrons foren subministrats pel *kit*. Es preparaven dilucions seriades de les mostres per tal de detectar la hGH soluble en un rang de concentració entre 10 i 400 pg/mL, amb una sensibilitat mínima de 5 pg/mL. A continuació es seguien les etapes d'immunodetecció d'acord amb les instruccions del kit. Aquest mètode permetia quantificar hGH conformacionalment activa.

3.3.2 Tècniques específiques d'anàlisi i manipulació de proteïnes, segons el sistema d'expressió emprat

3.3.2.1 Extracció total de proteïnes intracel·lulars

A. Extracció de proteïnes en cèl·lules de mamífer CHO i en cèl·lules d'insecte Sf9, Sf21**o HighFive.**

Aquest protocol s'ha utilitzat per a l'anàlisi d'expressió mitjançant *Western Blot*, de les cèl·lules CHO transfectades i les cèl·lules d'insecte Sf9 infectades amb la construcció d'interès.

A continuació es descriu el procediment general, posat a punt per a una extracció total de proteïnes.

Protocol:

- Entre 3-4 dies després de la transfecció transitòria de cèl·lules CHO, s'extreia el medi de cultiu i les cèl·lules eren recuperades en PBS pH7,4 amb l'ajuda d'un *scraper*.
- A continuació, les cèl·lules eren centrifugades a 1500g, durant 10 min, a 4°C i es guardaven a -80°C fins al seu processament.
- Pel cas de les cèl·lules d'insecte, les cèl·lules infectades a diferents MOI i HPI eren pelletejades a 300g durant 15 minuts, i s'analitzaven el medi i el contingut cel·lular.
- Per a l'extracció proteica total, es resuspenien les cèl·lules en un tampó de lisi cel·lular: Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 5mM, NaCl 100mM, SDS 0,5%, β -Mercaptoetanol 2% i cocktail d'inhibidors de proteases Complete[®] 1X (Roche); mantenint una relació 1:5 volum de cultiu: volum de tampó d'extracció.
- L'extracte s'incubava 5-10 min a 95°C i es determinava la quantitat de proteïna total pel mètode Bradford.
- L'anàlisi de l'expressió proteica es realitzava mitjançant immunoblot carregant l'equivalent a 5 μ g de proteïna total de l'extracte de cèl·lules CHO o 0,5 μ g de l'extracte cel·lular d'insectes, en el gel SDS-PAGE. A continuació es valoraven els nivells d'expressió per Western Blot i densitometria de la senyal

B. Extracció de proteïnes a partir de plantes de tabac (*N.benthamiana*)

Aquesta tècnica fou emprada per a l'extracció total de proteïnes a partir de fulles de plantes de tabac agroinfiltrat (biomassa vegetal). Generalment partíem de biomassa que havia estat recol·lectada sense tiges ni nervis principals i emmagatzemada a -80°C fins a la seva utilització.

Protocol:

- Esmicolar una quantitat coneguda de biomassa congelada amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid.
- Afegir i barrejar amb tampó d'extracció de plantes en una relació 1:5 (p/v) (pes fresc/volum de tampó). Per tal de millorar l'extracció, i de forma alternativa, liofilitzàvem el material esmicolat abans d'afegir el tampó
- Incubar la mostra a 95°C durant 30 min.
- Centrifugar a 16200g durant 20 min a temperatura ambient.

- Separar sobrenedant i pellet.
- Resuspendre el pellet amb tampó de càrrega 2X, incubar 20 min a 95°C, centrifugar 5 min a màxima velocitat.
- Analitzar totes les mostres generades per SDS-PAGE.

Tampó d'extracció de plantes: Tris-HCl 100mM pH8, SDS 5%, β -mercaptoetanol 5%, NaCl 200mM, inhibidors de proteases: leupeptina, pepstatina, aprotinina, E-64 0,2%.

3.3.2.2 Immunofluorescència

A. Sobre cèl·lules de mamífer CHO transfectades.

Aquesta tècnica va ser emprada per tal de conèixer la immunolocalització de les diferents proteïna de fusió Zera[®] d'interès, en cèl·lules CHO transfectades.

Protocol:

- Les cèl·lules es transfecten en placa en presència d'un cobreobjectes sobre el qual es deixen adherir les cèl·lules a transfectar.
- En el moment de procedir a la immunodetecció després de la transfecció, s'aspira el medi de cultiu i es realitzen un parell de rentats amb PBS temperat.
- Etapa de fixació: Afegir paraformaldehid fred al 2% en PBS sobre les cèl·lules, assegurant una cobertura total del material cel·lular. Incubació a 4°C durant 30 min.
- S'aspira la solució de paraformaldehid, tot descartant-lo en el contenidor adequat degut a la seva toxicitat.
- Es realitzen 2 rentats amb PBS temperat. En aquest punt es pot aturar el protocol afegint BSA 1% en PBS + azida sòdica 0,02%; o bé, es segueix amb la permeabilització de les cèl·lules.
- Etapa de permeabilització: Afegir BSA 1%, Saponina 0,1% en PBS (la BSA per bloquejar llocs inespecífics de la tinció i la saponina és un detergent que permeabilitza les cèl·lules). Permeabilitzar durant 30 min, a temperatura ambient.
- Etapa de tinció:
 - Es dilueixen els anticossos en BSA 1%, Saponina 0,1% en PBS.
 - Bloqueig: es posa 100 μ l de BSA al 5% en PBS sobre un paper de *parafilm*. Després es posen els cobreobjectes amb les cèl·lules sobre la BSA durant 10 min.
 - Rentar amb PBS.
 - Incubar amb 100 μ l del primer anticòs 45 min a temperatura ambient (veure taula inferior).
 - Rentar amb PBS.

- Fer un segon bloqueig amb BSA 5% en PBS. 10 min (opcional).
- Incubar 45 min amb 100 µl del segon anticòs.
- Rentar amb PBS.
- Posar una gota de gel de muntatge (Mowiol) sobre un portaobjectes.
- Posar els cobreobjectes sobre el gel de Mowiol. Esperar 10 minuts a temperatura ambient fins que el Mowiol polimeritzi.
- Observar la tinció en el microscopi de fluorescència.

B. Sobre cèl·lules d'insecte

La immunofluorescència sobre cèl·lules d'insecte diferia respecte a la de mamífers en l'etapa de la fixació.

Protocol:

- Les cèl·lules s'infecten en plaques de 60 mm de diàmetre en presència d'un cobreobjectes sobre el qual s'hi deixen adherir les cèl·lules.
- Un cop infectades les cèl·lules, s'incuben durant 36 hores a 28°C. En el moment de procedir a la immunodetecció, s'aspira el medi de cultiu i es realitzen un parell de rentats amb PBS temperat.
- Etapa de fixació: Afegir paraformaldehid fred al 3% en PIPES 0,1M sobre les cèl·lules, assegurant una cobertura total del material cel·lular. Incubació a 4°C durant 30 min.
- Es realitzen 2 rentats amb PBS temperat. En aquest punt es pot aturar el protocol afegint BSA 1% en PBS + azida sòdica 0,02%; o bé, es segueix amb la permeabilització de les cèl·lules.
- Etapa de permeabilització: Afegir BSA 1%, Saponina 0,1% en PBS. Permeabilitzar durant 30 min, a temperatura ambient.
- Etapa de tinció:
 - Es dilueixen els anticossos en BSA 1%, Saponina 0,1% en PBS.
 - Bloqueig: es posa 100 µl de BSA al 5% en PBS sobre un paper de *parafilm*. Després es posen els cobreobjectes amb les cèl·lules sobre la BSA durant 10 min.
 - Rentar amb PBS.
 - Incubar amb 100 µl del primer anticòs 45 min a temperatura ambient (veure taula inferior).
 - Rentar amb PBS.
 - Fer un segon bloqueig amb BSA 5% en PBS. 10 min (opcional).
 - Incubar 45 min amb 100 µl del segon anticòs.
 - Rentar amb PBS.
- Posar una gota de gel de muntatge (Mowiol) sobre un portaobjectes.

- Posar els cobreobjectes sobre el gel de Mowiol. Esperar 10 minuts a temperatura ambient fins que el Mowiol polimeritzi.
- Observar la tinció per microscòpia confocal SP 5 amb objectiu 63X Leica (Heidelberg), amb talls seccionals de 1µm.

	Nom	Antigen	Dilució emprada per a Immunofluorescència
Anticòs primari	α R8	Pèptid sintètic format per les 8 repeticions de la seqüència aminoacídica PPPVHL de Zera [®]	1:800
	α hGH	Hormona de creixement humana	1:150
Anticòs secundari	Alexa Fluor 488	Anticòs anti-IgG de conill (Invitrogen-Molecular Probes)	1:2000

3.3.2.3 Fraccionament subcel·lular mitjançant gradients de densitat.

A. Gradient de densitat aplicat a extractes de cèl·lules CHO transfectades.

La densitat característica dels diferents orgànuls subcel·lulars, permet aïllar-los en gradients de densitat. Els cossos proteics derivats de la tecnologia Zera[®], mantenen l'elevada densitat característica dels cossos proteics naturals del gra de blat de moro, fet el qual permet el seu aïllament i purificació mitjançant aquesta tècnica.

Protocol:

- Resuspendre les cèl·lules CHO transfectades amb el vector d'interès en un tampó d'homogeneïtzació Tris-HCl 100mM pH7,5, EDTA 5mM, KCl 50mM, MgCl₂ 5mM contenint 10% de sacarosa (p/p) per tal d'obtenir una suspensió amb una densitat cel·lular de 2-3·10⁶ cèl·lules/mL.
- Homogeneïtzar-les emprant un homogenitzador Dounce potter (5cm³) durant 5 min, en gel.
- Preparar un gradient discontinu de densitat en un tub d'ultracentrífuga amb les concentracions de sacarosa descrites a la taula següent, dissoltes en el tampó d'homogeneïtzació.

[sacarosa] (p/v)	[sacarosa] (p/p)	Densitat (g/cm ³)	Volum del coixí (mL)
10%	10%	1,038	2,5
30%	27%	1,112	2
40%	35%	1,151	2,5
50%	42%	1,186	2,5
70%	56%	1,263	2

- Aplicar 2mL d'homogenat cel·lular al gradient, de manera que formi part del coixí del 10% de sacarosa (p/p).

- Centrifugar a 80.000 g durant 2 h, a 4°C, desacceleració lenta (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima TM XL-100K – rotor vasculant Sw 41 Ti)
- Recuperar separatament les diferents interfases formades, el sobrenedant i el sediment.
- Per tal de determinar la localització subcel·lular de la proteïna en qüestió, analitzar cadascuna d'aquestes fraccions i per equivalents de volums en gels SDS-PAGE i *Western Blot*.

Per a la preparació de gradients discontinus, també varem emprar un sistema comercial basat en una solució de iodixanol 60% (p/v) en aigua (δ 1,32 g/mL), de la marca Optiprep™ - Axis Shield, comercialitzat per Sigma-Aldrich. La solució d'iodixanol presenta viscositat i osmolalitat baixes, i barrejada amb el tampó d'homogeneïtzació permet mantenir la isosmòsi en totes les fases de diferent densitat, mantenint així la integritat i l'estructura dels orgànuls cel·lulars.

B. Gradient de densitat aplicat a extractes de cèl·lules d'insecte Sf9.

L'elevada densitat que presenta Optiprep™ (solució d'iodixanol 60%), facilita el fraccionament subcel·lular dels orgànuls cel·lulars en un gradient discontinu. A diferència dels gradients de sacarosa tradicionals, aquesta solució presenta una menor viscositat i permet mantenir l'isosmòsi en les diferents fases del gradient, mantenint l'estructura dels orgànuls i augmentant l'eficiència de separació.

Protocol:

- Resuspendre el sediment congelat a -80°C corresponent a $1 \cdot 10^6$ cèl·lules d'insecte Sf9 infectades en un tampó d'homogeneïtzació Tris-HCl 10mM pH7.4, EDTA 1mM, sacarosa 0,25 M per tal d'obtenir una suspensió amb una densitat cel·lular de $3 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL.
- Homogeneïtzar-les emprant un homogenitzador Dounce potter (5 cm^3) durant 10 min, en gel.
- Preparar un gradient discontinu de densitat en un tub d'ultracentrífuga amb les concentracions de iodixanol descrites a la taula següent, dissoltes en el tampó d'homogeneïtzació.

[iodixanol] (p/v)	Densitat (g/cm^3)	Volum del coixí (mL)
-	1,030	2,5
18	1,117	2,5
26	1,156	2,5
32	1,185	2,5
50	1,272	2

- Aplicar 2,5mL d'homogenat cel·lular al gradient, de manera que formi part del coixí del 10% de sacarosa (p/p).
- Centrifugar a 80.000 g durant 2 h, a 4°C, desacceleració lenta (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima TM XL-100K – rotor vasculant Sw 41 Ti)
- Recuperar separatament les diferents interfases formades, el sobrenedant i el sediment.
- Per tal de determinar la localització subcel·lular de la proteïna en qüestió, analitzar cadascuna d'aquestes fraccions i per equivalents de volums en gels SDS-PAGE i *Western Blot*.

C. Gradient de densitat aplicat a extractes de plantes de tabac.

L'homogenat provinent de biomassa transgènica de tabac també fou resolta en gradient discontinu de densitat mitjançant Optiprep™.

Protocol:

- Homogeneïtzació de 0,5g de biomassa transgènica de tabac en 5mL de tampó d'homogeneïtzació Tris-HCl 100mM pH8, EDTA 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 6mM, NaCl 400mM contenint 10% de sacarosa (p/p), mitjançant un morter de porcellana.
- Filtrar l'homogenat a través d'una capa de teixit de polièster i acrílic Miracloth (Calbiochem®) amb un porus de 22-25µm.
- Preparar un gradient discontinu de iodixanol seguint el protocol descrit anteriorment per a cèl·lules d'insecte.
- Aplicar 2,5mL de l'homogenat filtrat al gradient, de manera que formi part del coixí del 10% de sacarosa (p/p).
- Centrifugar a 80.000 g durant 2 h, a 4°C, desacceleració lenta (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima TM XL-100K – rotor vasculant Sw 41 Ti)
- Recuperar separatament les diferents interfases formades, el sobrenedant i el sediment.
- Per tal de determinar la localització subcel·lular de la proteïna en qüestió, analitzar cadascuna d'aquestes fraccions i per equivalents de volums en gels SDS-PAGE i *Western Blot*.

3.3.2.4 Aïllament i obtenció de cossos proteics per centrifugació a partir d'homogenats cel·lulars.

L'elevada densitat dels cossos proteics heteròlegs és deguda a l'habilitat que presenten les proteïnes de fusió Zera® d'ensamblar-se en multimers i acumular-se en agregats associats a membrana. Generalment els cossos proteics derivats de la fusió amb Zera® presenten una densitat d'entre 1,1 i 1,35 g/mL, la qual resulta substancialment superior a la de la majoria de proteïnes

endògenes de la cèl·lula hoste. Aquesta particularitat permet la recuperació d'aquests orgànuls a través d'una centrifugació a baixes revolucions de l'homogenat cel·lular.

La recuperació de cossos proteics per centrifugació en un determinat hoste no només depèn de la capacitat de la cèl·lula hoste per formar-los, sinó que també depèn de les propietats de la proteïna fusionada al domini Zera[®]. Així, per a proteïnes més hidrofíliques o solubles, la recuperació fou superior a velocitats majors de 1500g, fins a un màxim de 4500g, de forma que per cada hoste i tipus de proteïna de fusió es va haver de posar punt les condicions més òptimes de recuperació de cossos proteics.

A. Recuperació de cossos proteics a partir d' cèl·lules CHO

Pel cas de les cèl·lules de mamífer CHO transfectades, el trencament cel·lular i l'homogeneïtzació es duia a terme en condicions hipotòniques.

Protocol:

- Rentar les cèl·lules dues vegades amb 1mL de tampó HBS (*Hypotonic Buffer Saline*). En cada rentat es centrifuguen les cèl·lules a 5000g, 10', 4°C.
- Es resuspèn el pellet amb 1mL de solució A i s'incuba 10' en gel. De nou, centrifuguem a 5000g, 10'.
- Es descarten 600µL del sobrenedant, i es resuspèn el sediment amb el volum restant.
- L'homogeneïtzació de les cèl·lules té lloc mitjançant l'homogenitzador *Dounce potter* (5cm³) durant 25 moviments verticals.
- S'afegeixen 80µL de solució B i es barreja bé amb el *vortex*.

Observant la preparació cel·lular tenyida amb Trypan Blue, podíem realitzar un seguiment de la integritat de les cèl·lules, fins que aproximadament el 90% de les cèl·lules havien estat lisades, aleshores procedíem a recuperar els cossos proteics.

- Centrifuguem a 1500g (o a velocitats més altes depenent de les característiques de la proteïna recombinant), 10', 4°C per aïllar cossos proteics.

Com que la fracció de cossos proteics provinents de cèl·lules CHO solia venir acompanyada d'altres components cel·lulars, sovint havíem d'afegir una etapa de neteja de la fracció de cossos proteics.

Aquest rentat consistia en afegir el tampó de rentat de CPs de CHO durant 5-30 min a temperatura ambient. La relació era de 100µL de tampó per cada $\sim 3 \cdot 10^6$ cèl·lules.

Posteriorment, i per tal de degradar el DNA present en la mostra, sonicàvem 15s amb un 50% d'intensitat i una durada de cicle de 0,8s.

Finalment, recuperàvem els cossos proteics lliures de bona part de les impureses, mitjançant una centrifugació a 1500 g, durant 10 min a 4°C.

Després es separaven sobrenedant i sediment per al posterior anàlisi.

Tampó HBS:

Tris-HCl pH 7.5	10mM
EDTA	5mM
MgCl ₂	2mM
NaCl	10mM
CaCl ₂	1mM

Solució A:

KCl	15mM
(MgOAc) ₂ ·4H ₂ O	1,5mM
DTT	1mM
Hepes-KOH pH 7.5	10mM

Solució B:

KCl	375mM
(MgOAc) ₂ ·4H ₂ O	22,5mM
DTT	1mM
Hepes-KOH pH 7.5	200mM

Tampó de rentat CPs de CHO:

Hepes-KOH pH 7.4	50mM
Triton X-100	1% (v/v)
MgCl ₂	200mM
NaCl	1M
CaCl ₂	50mM

B. Recuperació de cossos proteics a partir de cèl·lules d'insecte.

Protocol:

1. Resuspendre el sediment de cèl·lules congelades a raó de $5 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL en tampó Tris 10 mM pH 8, deoxicolat 0,1%, NaCl 1M, CaCl₂ 2mM.
2. Sonicar l'homogenat durant 15 polsos a 10% intensitat / durada del cicle 0,5s (per degradar DNA).
3. Centrifugació a 1500g, durant 10min a temperatura ambient per aïllar cossos proteics.

C. Recuperació de cossos proteics a partir de biomassa transgènica de tabac.

La recuperació de cossos proteics a partir de teixit foliar transgènic fou duta a terme en base a la descripció publicada a la patent W02006/056484A1 (Ludevid *et al.*, 2006).

En el present treball hem partit de biomassa fresca transgènica, congelada en nitrogen líquid i guardada a -80°C.

Protocol:

1. Per a l'homogeneïtzació de la biomassa congelada s'esmicola la quantitat desitjada en un morter mantingut en fred amb ajuda de nitrogen líquid.
2. A raó de 1g de biomassa fresca/10mL de tampó d'extracció PBP3, es resuspèn el polsim generat i es segueix esmicolant. Per a quantitats superiors a 20g de biomassa fresca, s'utilitza una liquidadora de cuina a màxima potència, durant 5 min.
3. El procés d'homogeneïtzació finalitza amb la força de cisallament del politró (IKA T25 Basic). Es transfereix l'homogenat a un vas de precipitats mantingut en gel i aigua (0°C), i s'hi introdueix la sonda del politró amb un esmicolat continu a 17 500 rpm durant 20 min.
4. Les fibres sòlides que romanen després de l'homogeneïtzació són descartades mitjançant el filtrat a través d'una capa de teixit Miracloth de 22-24 µm (Calbiochem).
5. Centrifugació a 1500g, durant 10 min a temperatura ambient, per tal d'aïllar els cossos proteics. Es descarta el sobrenedant amb la majoria de contingut proteic de la planta de tabac.
6. Per tal de netejar la fracció enriquida de cossos proteics, es procedeix a fer 2 rentats amb un volum d'una solució de Triton X-100 1% en aigua. La resuspensió dels CPs es duu a terme amb ajut d'una breu sonicació a 10% d'amplitud, en polsos de 1s. Cada rentat s'incuba 10 min a temperatura ambient i en agitació.
7. Centrifugació a 1500g, durant 10 min a temperatura ambient, per tal de recuperar la fracció neta de cossos proteics. Es descarta el sobrenedant.
8. El sediment que conté els cossos proteics, presenta un aspecte gris-blanquinós. Aquests sediment es poden utilitzar directament per a la solubilització, o bé s'emmagatzemen congelats a -20°C.

3.3.2.5 Solubilització de cossos proteics heteròlegs.

Gràcies a la naturalesa de la conformació poliprolina II que adopta el domini repetitiu PPPVHL de Zera[®], la proteïna de fusió és acumulada en cossos proteics de forma estable mitjançant una combinació d'interaccions amfipàtiques i enllaços disulfur intermoleculars. Els cossos proteics en solució formen agregats o acumulacions proteiques que han de ser solubilitzades per tal de recuperar la proteïna de fusió. Malgrat trobar-se en estat agregat, com que les proteïnes de fusió Zera[®] deriven de reticle endoplasmàtic, es troben acomplexades amb xaperones i foldases que afavoreixen el seu correcte plegament.

Els enllaços disulfur intermoleculars que es donen entre proteïnes de fusió Zera[®] es poden trencar mitjançant l'addició d'un medi aquós que contingui poder reductor com el ditiotreitòl (DTT) o 2-mercaptoetanol o β-mercaptoetanol, entre d'altres agents reductors.

En general, les condicions de solubilització escollides en cada cèl·lula hoste intentaven no malmetre i desplegar la proteïna de fusió, de forma que es mantingués l'activitat biològica de la proteïna d'interès.

A. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de cèl·lules CHO.

Per tal de solubilitzar els cossos proteics recuperats a partir de cèl·lules CHO transfectades s'ha provat una bateria de condicions que han estat optimitzades per a cada proteïna de fusió Zera[®] en concret.

Pel cas de proteïnes de fusió Zera[®]-EK acumulada en cos proteic, les condicions optimitzades de solubilització consistien en la seva resuspensió en un tampó Tris 20mM pH7, NaCl 200mM, EDTA 1mM, SDS 0,1% i β -mercaptoetanol 20mM. A continuació, s'incubava la mostra a 37°C en agitació, durant 2 hores. Finalment, es procedia a recuperar la fracció soluble mitjançant una centrifugació a 16.000 g, durant 10 min a 4°C.

Per altra banda, els cossos proteics aïllats de CHO corresponents a Zera[®]-DnaB-hGH, foren solubilitzats en un tampó Tris 20mM pH7, NaCl 200mM, EDTA 1mM, SDS 0,1% i TCEP 0,1mM a 37°C durant 2 hores. L'elecció d'aquest tampó de solubilització i el d'inducció del tall posterior, foren convinguts d'acord amb les recomanacions de la casa comercial d'aquesta intèina (*Impact[™]-Twin de New England Biolabs*).

Pel cas dels cossos proteics de hGH-MxeGyrA-Zera[®], com que la inducció de l'autoprocessament i la solubilització dels CPs conformaven dos processos simultanis, el protocol de solubilització està descrit en un apartat posterior sobre la inducció del processament de MxeGyrA.

B. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de cèl·lules d'insecte Sf9, Sf21 i HighFive[™].

Els cossos proteics aïllats en una etapa de centrifugació prèvia, foren resuspesos seguint una relació de $4 \cdot 10^6$ de cèl·lules/mL en el tampó de solubilitzat optimitzat: Tris 20mM pH8, 2% deoxicolat, DTT 10mM.

Per tal de permetre una bona disgregació del cossos proteics, procedíem a sonicar breument durant 15s amb una amplitud del 10%, en cicles de 0,5s.

La solubilització tenia lloc mitjançant una incubació d'1 hora a 37°C, amb una agitació de 250 rpm.

Posteriorment, la fracció soluble era separada de la insoluble mitjançant una centrifugació a 16.000g, durant 10 min a temperatura ambient.

C. Solubilització de cossos proteics aïllats a partir de plantes de tabac.

La solubilització de cossos proteics provinents de planta es duia a terme mitjançant la resuspensió dels cossos proteics en un tampó Tris 20mM pH 9 (o Borat pH 10, segons el tipus de construcció), TCEP 5mM, β -mercaptoetanol 10mM, Inhibidors de proteases 1X (Complete™ – Roche). La relació de resuspensió biomassa processada/volum de tampó de solubilització variava entre un rang de 0,5 – 1g biomassa fresca/ mL, segons els nivells d'expressió i el tipus de proteïna expressada. Per ajudar a la resuspensió i homogeneïtat de la mostra de CPs resuspesos, es procedia a sonicar la mostra durant 30s, amplitud 10% i cicles de 0,5s (Branson Sonifier).

El procés de solubilització tenia una duració variable d'entre 2-16h a temperatura ambient, segons si la solubilització i la inducció de l'autoprocessament es donaven simultàniament o no.

Finalment, la fracció insoluble era descartada mitjançant una centrifugació a velocitat màxima, durant 10-15 min.

3.3.2.6 Inducció de l'autoprocessament mitjançant inteïnes induïbles.

3.3.2.6.1 Inteïna SspDnaB.

Es partia de mostra solubilitzada d'acord amb el protocol descrit anteriorment. L'activitat de la inteïna fou induïda amb un canvi de temperatura a 25°C i pH 7 durant 48 hores de diàlisi contra el tampó d'inducció del tall: Tris 20mM pH 7, NaCl 200mM, EDTA 1mM.

Posteriorment a la inducció de l'autoprocessament, la mostra era centrifugada a 16000g durant 10 min per tal de descartar la proteïna insoluble. Tant el sobrenedant com el botó generats, foren analitzats per immunoblot amb anticossos contra R8 i contra hGH.

3.3.2.6.2 Inteïna MxeGyrA .

Per tal de promoure l'autoprocessament mediat per la inteïna MxeGyrA en construccions de tipus POI-MxeGyrA-Zera, es partia d'una fracció de cossos proteics aïllats a partir de cèl·lules de mamífer, insecte o plantes de tabac seguint el protocol descrit per a cada hoste en apartats anteriors.

La mini-inteïna MxeGyrA modificada presenta una mutació puntual en el residu reactiu Asn 198 Ala, que bloqueja el tall al seu extrem C-terminal. D'altra banda., aquest mutant manté la Cys1 reactiva que li permet el tall en aquest punt en presència de grups tiol. Aquesta particularitat, juntament amb l'acumulació de proteïnes de fusió Zera® en cossos proteics, permet que la solubilització i la inducció del tall per MxeGyrA, siguin dos processos simultanis. A continuació es descriu el protocol optimitzat per cada un dels sistemes d'expressió emprats.

Inducció del tall per MxeGyrA a partir de cossos proteics provinents de cèl·lules CHO:

- A partir d'un flascó T75 amb cèl·lules CHO transfectades amb hGH-MxeGyrA-Zera, es recuperaven els cossos proteics per centrifugació a 1500 g.

- El botó de cossos proteics era resuspès en 2mL d'un tampó d'inducció i solubilització Tris 20mM pH 7, NaCl 200mM, EDTA 1mM, Triton X-100 0,5% i MESNA 50mM, mitjançant una breu sonicació 10% amplitud i cicles de 0,5s, durant 20s.

- Es deixava incubar a 25°C (RT), durant 16h, en un agitador orbital.

- Finalment, la mostra era centrifugada a màxima velocitat, durant 10 min, per tal de descartar la fracció insoluble. La proteïna autoprocessada hGH era recuperada a la fracció soluble.

Inducció del tall per MxeGyrA a partir de cossos proteics provinents de cèl·lules d'insecte:

- Els cossos proteics aïllats a partir de $6 \cdot 10^6$ cèl·lules d'insecte, eren resuspesos en 1,2mL d'un tampó de solubilització i autoprocessament específic d'aquest hoste: Tris 20mM pH 8, DOC 2%, DTT 100mM, Inhibidors de proteases 1X (Complete™ – Roche). Altres condicions reductores foren provades: DTT 100mM > β-mercaptoetanol 10% > MESNA 50mM > TCEP 50 mM.

- Sonicació de 30 s amb amplitud del 10% i cicles de 0,5 s.

- Incubació a 25°C (RT), durant 2-16h, en un agitador orbital.

- Centrifugació a màxima velocitat per descartar la fracció insoluble.

Inducció del tall per MxeGyrA a partir de cossos proteics provinents de planta de tabac:

- Els cossos proteics provinents de 5g de material fresc de *N. benthamiana* agroinfiltrada, eren resuspesos en 2mL d'un tampó Tris 20mM pH 9, TCEP 5mM, β-mercaptoetanol 10mM, Inhibidors de proteases 1X (Complete™ – Roche), mitjançant una breu sonicació de 30 s amb amplitud del 10% i cicles de 0,5s.

- Es deixava incubar a 25°C (RT), durant 16h, en un agitador orbital.

- Finalment, la mostra era centrifugada a màxima velocitat, durant 10 min, per tal de descartar la fracció insoluble. La proteïna autoprocessada hGH era recuperada a la fracció soluble.

3.3.2.7 Digestió de proteïnes de fusió Zera® amb Enteroquinasa comercial.

En el darrer apartat de resultats, es va dur a terme un anàlisi comparatiu entre dos sistemes de processament de proteïnes de fusió Zera®. Un dels sistemes emprats per tal d'alliberar la proteïna d'interès de l'element de fusió Zera® fou l'ús de l'enteroquinasa com a proteasa exògena.

La digestió de la proteïna de fusió Z-D4K-hGH per mitjà de l'enteroquinasa comercial EKmax™ (Invitrogen), es duia terme sobre mostra solubilitzada provinent de planta de tabac.

En la majoria dels casos, el tampó de solubilització on es trobava la proteïna de fusió resultava incompatible amb l'activitat de la proteasa, així que primerament es passava la mostra per una columna dessaladora de tipus PD10 (GE Healthcare), per canviar el tampó a 50 mM Tris-HCl pH8.0, seguint les instruccions de la casa comercial. Mitjançant els mètodes descrits en aquest

treball, la mostra era quantificada en aquest punt, per tal de terminar la concentració de proteïna de fusió a l'inici de la reacció.

La barreja de reacció es complementava amb 10 mM CaCl₂, 1% Tween-20 per tal de completar el tampó de digestió d'EK (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 1% Tween-20). Finalment, s'afegia el volum necessari d'EKmax™ seguint una relació de 20-80µg de proteïna de fusió/ Unitat d'enzim, a una concentració final de 1-5ng/µL. La barreja de reacció es deixava incubar durant un màxim de 3 hores, a 16°C en agitació suau per aconseguir un major rendiment de digestió.

Per aturar la reacció es procedia a la congelació immediata de la mostra per submersió en nitrogen líquid, o bé s'hi afegia un còctel d'inhibidors de proteases 1X Complete™ de Roche.

3.3.3 Detecció de l'activitat enteroquinasa (EK)

L'activitat enzimàtica de l'enteroquinasa fou fluoromètricament determinada utilitzant el substrat sintètic Gly-Asp-Asp-Asp-Lys-2-naftilamida (GD₄K-2NA de Sigma). El producte de reacció corresponent al fluoròfor alliberat 2-naftilamina, fou monitoritzat mitjançant espectrofotòmetre de fluorescència (RF-1501 *Spectrofluorophotometer*, Shimadzu Corp.) utilitzant el filtre d'excitació de 350nm, i una longitud d'ona d'emissió de 460nm. Per a la calibració es va utilitzar una solució estàndard de 2NA. Totes les mesures foren realitzades a temperatura ambient. Per a tots els assajos d'activitat de la proteasa vàrem emprar com a control positiu d'activitat l'enteroquinasa comercial Ekmax (Invitrogen).

Una unitat es defineix com la quantitat d'enzim necessari per a digerir 1µmol de GD₄K-2NA per minut, en les condicions de reacció descrites a la taula següent.

	Ekmax (Invitrogen)	EK produïda en CP
Tampó de reacció	70µL	70µL
1mM GD ₄ K-2NA	25µL	25µL
Solució enzimàtica	5µL (5U)	-
Volum total de reacció	100µL	100µL

El tampó de reacció va consistir en el mateix tampó de solubilització emprat per a la mostra produïda mitjançant la tecnologia Zera[®]: Tris-HCl 50mM pH8, β-mercaptoetanol 20mM, ± SDS 0,1%.

3.3.4 Purificació de proteïnes de fusió Zera[®] per cromatografia d'afinitat IMAC

El següent protocol fou emprat tant per a la purificació de proteïnes de fusió Zera[®], com per a la immobilització de la proteïna de fusió contenint la inteïna MxeGyra, per tal d'induir el tall en columna.

La resina emprada per a la cromatografia IMAC fou la Ni-NTA Superflow de Qiagen (cat. n° 1018244), per a tots els processos duts a terme en *batch*.

Protocol:

- El volum desitjat de resina Ni-NTA en suspensió al 50% en etanol al 30%, es transfereix en un tub Eppendorf (1,5mL) o a una columna buida amb filtre porós incorporat.

- Es neteja 2-3 vegades en un volum equivalent d'aigua MilliQ.

- Per a equilibrar la resina, s'usen 5 volums (rentats) amb tampó d'unió a la columna, que no ha de contenir EDTA ni agent reductor a concentracions elevades (< β -mercaptoetanol 20mM, <DTT 10mM). En el nostre cas vàrem emprar el tampó d'unió: Tris 20mM pH9, Imidazol 5mM, TCEP 5mM, NaCl 300mM.

- A continuació s'hi afegeix la mostra solubilitzada a purificar en el tampó d'unió, o similar. La relació entre quantitat de proteïna / volum de resina ve especificada per la casa comercial, essent la capacitat màxima d'unió de fins a 50mg/mL.

- S'incuba la resina amb la mostra a temperatura ambient durant un mínim de 15 fins a 60min.

- Per recuperar el *flow-through*, es centrifuga la resina durant 1 min a 300g, a 4°C.

- A continuació es fan 5 rentats d'un volum de resina amb tampó d'unió.

- En el cas que es tracti d'una inducció de l'autoprocessament, s'afegeix un volum de tampó d'unió amb β -mercaptoetanol 20mM, i es deixa incubar 16 hores a RT, en l'agitador orbital.

- Per tal d'eluir la proteïna de fusió Zera[®] unida a la resina, calen concentracions molt baixes de imidazol, ja que la unió no es dona per una cua d'histidines, si no pels residus histidina que hi ha en el domini repetitiu PPPVHL, orientades en el mateix pla. Així que en el tampó d'unió només calia afegir fins a Imidazol 50mM, i usar un volum petit per tal de concentrar la proteïna eluïda.

3.3.5 Purificació de l'hormona de creixement humana per RP-FPLC.

Aquesta fou la última etapa de purificació de la hGH obtinguda a partir de l'autoprocessament mediat per inteïnes.

Una de les avantatges que ofereix la tecnologia Zera[®] en la producció de proteïnes recombinants, rau en el grau d'enriquiment i puresa que s'adquireix en l'etapa de recuperació de cossos proteics. Aquesta facultat permet l'estalvi d'etapes intermèdies de purificació, afavorint que

en el major dels casos només sigui necessària una etapa cromatogràfica de *polishing*, per tal d'obtenir el grau de puresa requerit per a la seva aplicació.

Entre les tècniques de purificació semipreparatives disponibles, l'elecció del tipus de cromatografia de fase reversa entre HPLC i FPLC va venir donada per la capacitat de purificació de grans volums de la segona respecte de la primera, així com de la utilització de pressions més baixes i per la rapidesa del procés de la FPLC respecte l'HPLC.

Aquesta tècnica fou duta a terme a l'àrea de Serveis Comuns del Parc Científic de Barcelona en el Servei de Purificació de Proteïnes, amb l'ajuda de Jenny Colom.

Hem emprat la columna RPC-Source (Amersham Biosciences) de 3 mL acoblada al sistema ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences). Com a fase mòbil varem utilitzar el tampó 10mM acetat acètic pH4, 0,02% β -Mercaptoetanol i acetonitril (ACN), en un gradient de 2 a 70% ACN en 20 volums de columna i un flux de 1mL/min. Posteriorment, i per tal d'obtenir una purificació d'una resolució més alta, es varen canviar els paràmetres de gradient i volums de columna: de 40 a 70% ACN i 10 volums de columna, respectivament.

3.3.6 Determinació de l'activitat de l'hormona de creixement humana.

A. Cèl·lules de limfoma de rata Nb2-11

La línia cel·lular Nb2-11 fou establerta a partir d'un transplant de limfoma originalment desenvolupat en el timus i els nòduls limfàtics d'una rata mascle de la soca Noble (Nb), seguit d'un tractament perllongat amb estrògens.

Com a conseqüència, la proliferació d'aquesta línia cel·lular resulta dependent de prolactina (o altres lactògens) que actuen com a factor de creixement.

La resposta mitogènica de les cèl·lules és altament específica per a lactògens de mamífer i és mediada per part d'uns receptors cel·lulars de superfície específics.

Aquesta sèrie de característiques fan que aquesta línia cel·lular sigui apropiada per a l'assaig d'activitat *in vitro* d'hormones lactogèniques com les prolactines, lactògens de placenta o hormones de creixement de primats.

A.1. Manteniment de cèl·lules Nb2-11

Les cèl·lules Nb2-11 creixien en suspensió en medi Fisher (Gibco) complementat amb FBS 10% (Gibco), Sèrum de Cavall (HS de Gibco) 10%, Bicarbonat de sodi 0,075%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2mM i la combinació d'antibiòtics Penicil·lina (50U/mL) /Streptomycina (50 μ g/mL).

El cultiu es realitzava sembrant a una concentració de 12.000 cèl·lules/mL en flascons amb tapa airejada i en posició horitzontal, a 37°C, i en un ambient de CO₂ al 5%.

En aquestes condicions, les cèl·lules Nb2 es duplicaven cada 12-13 hores, i calia fer una sembra quan la concentració era pròxima a les 900.000 cèl·lules/mL.

Per al recompte de cèl·lules s'homogeneïtzava els cultiu amb ajuda d'una pipeta estèril de 5mL i es prenia una alíquota de 12µl per barrejar-la 1:2 amb el colorant Trypan Blue Stain (Invitrogen). Aquest colorant penetra a l'interior de les cèl·lules mortes, per tant, podíem determinar la viabilitat del cultiu en qüestió.

Les cèl·lules sanes de Nb2-11 presenten una morfologia típica de limfòcits, arrodonides i refringents.

A.2. Congelació de les cèl·lules – crioconservació de *stocks* cel·lulars

Per tal de mantenir un *stock* d'emmagatzematge a llarg termini de cèl·lules Nb2-11 congelades, es va emprar un medi de congelació format per medi HAM complet suplementat amb 10% de DMSO (Sigma). Per a tal efecte, les cèl·lules Nb2-11 havien de trobar-se a una densitat aproximada de 90.000 cèl·lules/mL, amb una viabilitat superior al 80%.

Aquest procediment consistia en resuspendre les cèl·lules prèviament centrifugades a 500 g durant 5 minuts, a una concentració de $2\text{-}4 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL en medi de congelació. Seguidament, alíquotes d'1mL eren transferides a criotubs de 1,8mL (Nunc), per a la seva congelació lenta mitjançant un bany d'isopropanol (Mr. Frosty - Nalgene). El procés de congelació gradual consistia en exposar seqüencialment les cèl·lules a -20°C durant 2 hores, a -80°C durant 12 hores, i finalment, al seu emplaçament final en el tanc de nitrogen líquid a -196°C.

A.3. Assaig de bioactivitat de rhGH - test de proliferació cel·lular.

Protocol:

Créixer les cèl·lules Nb2-11 fins a fase exponencial (aproximadament $9 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL) en medi de creixement.

Determinar el nombre de cèl·lules i la viabilitat del cultiu mitjançant la cambra de Neubauer i el colorant Tripan Blue.

Centrifugar $10\text{-}12 \cdot 10^6$ cèl·lules a 350g, 4 min a temperatura ambient.

Resuspendre les cèl·lules en medi per arrestar les cèl·lules a una concentració final de $2,5 \cdot 10^5$ cèl·lules /mL.

Incubar les cèl·lules a 37°C / 5% CO₂, durant 24 hores.

Realitzar 3 rentats amb medi d'inducció sense FBS, per tal d'eliminar les restes de lactògen provinent del FBS. Aquests rentats es realitzen mitjançant centrifugacions breus a 350g a temperatura ambient.

Resuspendre les cèl·lules en medi d'inducció, i comptar-les.

Diluir el cultiu cel·lular en medi d'inducció en presència de diferents concentracions de lactògen (ng de hGH). Preparar suspensió suficient per tal de plaquejar per triplicat cada tractament de l'assaig de proliferació. Les cèl·lules es plaquegen a raó de 100.000 cèl·lules/mL/pou en una placa multi-pous de 24 (Nunc).

Cal considerar triplicats d'un control positiu (en medi de creixement), i els d'un control negatiu (en medi d'inducció sense FBS).

Incubar-les a 37°C i 5% CO₂.

Cada 24, 48 i 72 hores, es retiren alíquotes cel·lulars de cada tractament, per triplicat, per tal de determinar el nombre de cèl·lules així com per determinar la seva viabilitat mitjançant l'assaig comercial Cell-Titer Blue (Promega), seguint les instruccions del fabricant i utilitzant 80µl de cultiu per cada 16µl de reactiu Cell-Blue. Amb aquesta finalitat s'empraven plaques de 96 pous amb les parets fosques i, després d'incubar-les 3 hores a 37°C, es procedia a fer lectures al fluorímetre de plaques *Microplate Fluorescence Reader* FL600 (BIO-TEK® Instruments, Inc.), a una longitud d'ona d'excitació de 530nm i d'emissió de 590nm.

3.3.7 Tècniques de validació del producte recombinant

3.3.7.1 Seqüenciació de l'extrem N-terminal per degradació d'Edman

Per tal de determinar l'autenticitat del producte purificat, la seqüenciació del N-terminal de la proteïna és una tècnica de validació que permet detectar si hi ha hagut proteòlisi en l'extrem més vulnerable de la proteïna. En aquest treball ha servit com tècnica de validació del producte d'interès, així com per tal de determinar el processament de la seqüència del pèptid senyal.

Per a la seqüenciació N-terminal, lliuràvem la mostra a la Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona, on disposen del seqüenciador Procise 492 cLC (Applied Biosystems).

Protocol de preparació de la mostra:

- Es resol la proteïna purificada i concentrada en un gel SDS-PAGE 10% de poliacrilamida.
- Les bandes proteiques es transfereixen a una membrana de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) pre-hidratada amb metanol, mitjançant transferència vertical en un tampó de transferència MES 10mM pH6, metanol 20% (v/v); o bé emprant el sistema semi-sec Iblot™ (Invitrogen®).

- Un cop transferida, la membrana es tenyeix en una solució de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,02%, metanol 40% i àcid acètic 5%, durant 20-30s.
- Destenyir la membrana en metanol 40% i àcid acètic 5%, durant 1 min.
- Fer 3 rentats de 5 min amb aigua destil·lada.
- Eixugar la membrana amb paper Whatman. En aquest punt, es pot guardar la membrana a -20°C.
- Identificar la banda d'interès i excisar-la mitjançant bisturí, i lliurar-la al servei d'anàlisi.

3.3.7.2 Determinació de la massa molecular per Espectrometria de Masses MALDI-TOF MS.

Aquesta tècnica fou emprada per tal de determinar la massa molecular exacta de la proteïna d'interès purificada. Tot i que no es tracta d'una tècnica d'identificació de proteïnes, permet validar el producte d'interès per comparació amb la massa molecular teòrica, o amb la corresponent massa molecular de la proteïna patró.

Cal partir d'una mostra molt pura, lliure de compostos ionitzables que puguin interferir en la lectura de l'espectre.

A partir de la mostra present en les fraccions d'elució de la purificació, es procedia a extreure les sals presents mitjançant una columna dessaladora PD-10 (GE Healthcare), o bé mitjançant diàlisi contra aigua desionitzada. La mostra era liofilitzada per tal de concentrar-la al màxim, abans de ser lliurada a la Plataforma de Proteòmica del Parc Científic de Barcelona. En aquest servei, la mostra era resuspesa en TFA 0,1% i co-cristal·litzada en una matriu orgànica d'HCCA (*α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*) 10mg/mL. Mitjançant una exposició a un pols de làser 5700, els analits es protonen i es desabsorbeixen en la fase gasosa. Mitjançant el detector TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), s'analitzen les intensitats els temps de vol dels analits i es generen els espectres de massa, representant la intensitat de detecció en funció de la relació massa/càrrega m/z de l'analit.

4. Resultats

CAPÍTOL 1: Producció d'Enteroquinasa **mitjançant la tecnologia Zera[®]**

CAPÍTOL 1: Producció d'Enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera®.

L'enteroquinasa, més correctament anomenada enteropeptidasa (EC 3.4.21.9), és una serina proteasa que intervé en el processos digestius de determinats mamífers. Aquesta proteasa és sintetitzada en les cèl·lules de la paret del duodè, i quan l'aliment provinent de l'estómac entra dins del intestí prim, les glàndules duodenals la comencen a secretar. La funció fisiològica de l'enteroquinasa està centrada en la conversió del trispsinògen a tripsina conformacionalment activa, la qual a la vegada, és responsable d'activar la cascada d'altres enzims pancreàtics involucrats en la digestió química dels aliments ingerits (Jenö *et al.*, 1987).

L'enteroquinasa és una proteïna heterodimèrica formada per una cadena pesada de 115 kDa i una cadena lleugera de 35 kDa unides entre elles per un pont disulfur. La cadena pesada permet que la proteasa s'ancori a la superfície de la paret del duodè afavorint l'exposició de la cadena lleugera cap al lumen de l'intestí. La subunitat catalítica de l'enteroquinasa la conforma únicament la cadena lleugera, presentant un centre actiu típic de serines proteasa compostat per la tríada catalítica Asp – Ser – His (Fig .4.1). El domini catalític de l'enteroquinasa bovina conté 9 residus cisteïna, els quals formen quatre enllaços disulfur intramoleculars, i conté 3 residus potencials de N-glicosilació (LaVallie *et al.*, 1993).

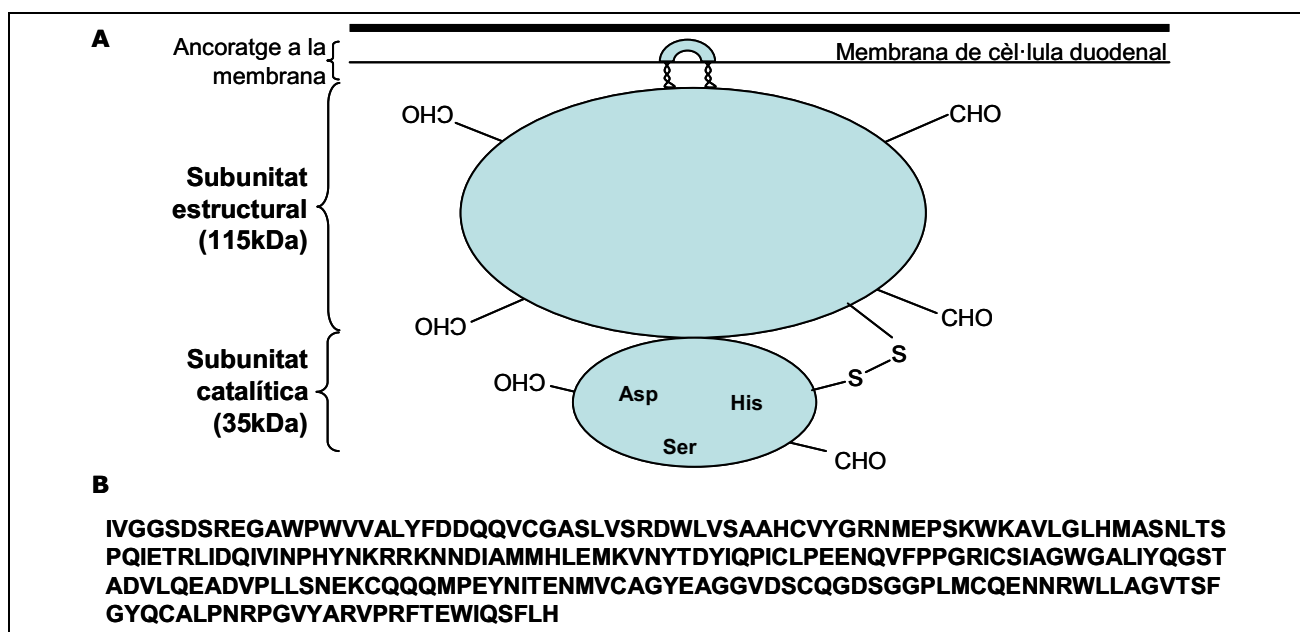


Figura 4.1. Característiques de l'enteroquinasa (EC 3.4.21.9). **A.** Esquema representatiu de l'enteroquinasa i de les seves propietats estructurals principals. **B.** Seqüència aminoacídica de la subunitat catalítica de l'enteroquinasa.

L'interès industrial per l'enteroquinasa ve donat pel seu alt grau d'especificitat vers la seqüència Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (D4K), la qual es troba en zones molt conservades de l'extrem N-terminal del trispsinògen de diferents espècies de mamífer. La predominança de residus carregats negativament en el lloc de tall, evita que es produeixi una autoactivació efectiva del trispsinògen per

part de la tripsina, afavorint una regulació de l'activitat proteolítica durant el procés de la digestió (LaVallie *et al.*, 1993). Degut a l'elevada especificitat que presenta l'enteroquinasa i a les condicions suaus de reacció que requereix, aquesta proteasa resulta una eina molt atractiva per al processament *in vitro* de proteïnes de fusió. De fet, com que l'enzim talla just després del residu Lys, s'allibera la proteïna d'interès sense cap residu afegit a l'extrem N-terminal, mantenint així l'activitat biològica de la proteïna d'interès (Kubitzki *et al.*, 2009).

Fins fa poc, moltes de les enteroquinases disponibles comercialment estaven basades en holoenzims purificats que provenien d'extraccions realitzades a partir d'intestí d'origen boví o porcí. Degut a que aquests recursos suposen un cost econòmic inviable per a una producció a mitjana o gran escala, la cerca d'alternatives de producció basades en enteroquinases recombinants ha estat de rellevant importància (Yuan i Hua, 2002).

La cadena lleugera de l'enteroquinasa bovina (*Bos taurus*), ha estat expressada en cèl·lules de mamífer COS (LaVallie *et al.*, 1993), a *E.coli* (Yuan i Hua, 2002 i Huang *et al.*, 2007) i a *Pichia pastoris* (Vozza *et al.*, 1996). Tot i així, la complexitat estructural de la proteïna, juntament amb les limitacions del sistema d'expressió emprat, han resultat en baixos nivells d'expressió, amb el consegüent augment del seu cost de producció (Song *et al.*, 2002).

En aquest primer capítol es presenten els resultats obtinguts de l'expressió de la subunitat catalítica de l'enteroquinasa de *Bos taurus*, mitjançant la tecnologia Zera[®]. L'objectiu principal fou la producció d'una proteasa funcional pròpia per al processament d'altres proteïnes de fusió Zera[®] produïdes mitjançant la tecnologia.

Per tal de facilitar la comprensió dels resultats, primer es detallen les estructures de les diferents construccions dissenyades, en segon lloc es descriuen els nivells d'expressió assolits i la capacitat d'acumulació de les diferents proteïnes de fusió en estructures de tipus cos proteic. Finalment, si els nivells d'expressió i acumulació en cossos proteics heteròlegs així ho permetien, es procedia a la recuperació de la proteïna d'interès i a la seva valoració per a determinar-ne la seva activitat.

L'ordre i estructuració descrits, han estat aplicats individualment per a cada un dels sistemes d'expressió estudiats. La producció d'enteroquinasa recombinant mitjançant la tecnologia Zera[®], es va dur a terme de forma transitòria en dos sistemes d'expressió diferents: cèl·lules de mamífer (CHO) i plantes de tabac (*N. benthamiana*).

Disseny i construcció de les proteïnes de fusió

El gen de l'enteroquinasa

El gen corresponent a la subunitat catalítica de l'enteroquinasa (EK) de *Bos taurus* conté 705 nucleòtids. Per tal d'expressar aquesta proteïna a planta de tabac, es va adaptar aquesta

seqüència a l'ús de codó propi de l'hoste vegetal. Per a tal finalitat, varem emprar l'eina bioinformàtica de traducció reversa derivada del servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) - <http://us.expasy.org>. A partir de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna d'interès, i de les freqüències d'ús de codó de l'espècie de planta de tabac *Nicotiana tabacum*, aquest programa va generar una seqüència de DNA construïda amb els codons que resultaven en una menor degeneració de la seqüència codificant.

En alguns casos, l'adaptació de la seqüència de DNA al model d'utilització de codons de l'espècie hoste pot arribar a suposar un increment en la taxa de traducció o un augment dels nivells d'acumulació de la proteïna recombinant (Kurland, 1991).

L'obtenció de la seqüència de DNA es va dur a terme per síntesi mitjançant 18 oligonucleòtids que encavalcaven un mínim de 20 nucleòtids entre ells (Fig. 4.2).



Figura 4.2. Optimització dels codons corresponents a la seqüència de nucleòtids de l'enteroquinasa segons el model d'ús de codó de planta de tabac. La síntesi del gen es va dur a terme per hibridació de 18 oligonucleòtids encavalcats (marcats en vermell).

El domini Zera®

Tal i com s'ha descrit en l'apartat corresponent a la introducció, la capacitat de retenció de la γ -zeïna al RE ve determinada per la regió de l'extrem N-terminal de la proteïna, la qual engloba diversos dominis rics en prolines (Geli *et al.*, 1994).

El domini Zera® és un pèptid sintètic basat en aquesta regió de la γ -zeïna, que inclou els 10 primers residus de la γ -zeïna, 8 repeticions de l'hexapèptid PPPVHL, i una seqüència de 30 aminoàcids que segueix un patró de tipus Pro-X (Fig. 4.3).

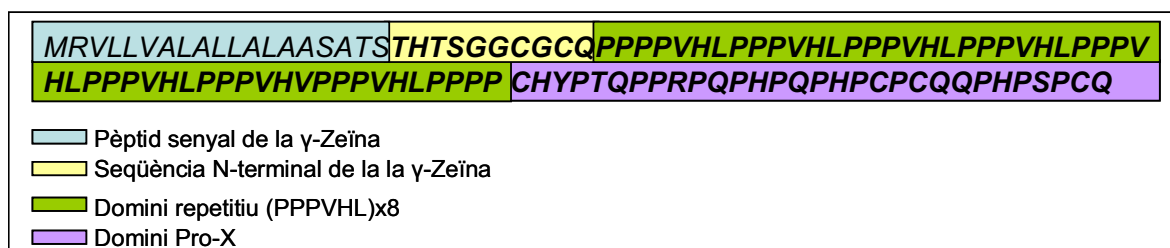


Figura 4.3. Esquema representatiu de la seqüència que conforma el domini proteic Zera®.

Les seqüències de DNA corresponents al domini Zera® que es varen emprar en les diferents proteïnes de fusió, provenien del clonatge del cDNA de determinades regions N-terminal de la γ -zeïna de blat de moro (*Zea mays*). En aquest cas, la composició dels codons de Zera® resultava adequada per a l'expressió heteròloga en plantes de tabac, tot i així, i tenint en compte que la producció també va ser destinada per a l'expressió en cèl·lules de mamífer, s'hauria de considerar la possibilitat d'adaptar la seqüència als codons més comuns emprats per l'espècie de mamífer en qüestió.

Totes les construccions emprades en aquest apartat de resultats contenen el pèptid senyal específic de la γ -zeïna (Fig. 4.3). Aquest pèptid senyal permet el direccionament del RNA missatger cap al RE, on rep les modificacions pertinents per a què la proteïna expressada segueixi la via de secreció.

Producció d'enteroquinasa recombinant mitjançant la tecnologia Zera®, en cèl·lules de mamífer CHO

Disseny i construcció de les proteïnes de fusió

La naturalesa dels aminoàcids de l'extrem N-terminal de la cadena lleugera de l'enteroquinasa juga un paper important en l'activitat catalítica de la proteasa. Estudis analítics sobre l'estructura tridimensional d'aquesta subunitat, mostren que la orientació de la Ile1 dirigida cap a l'interior de la proteïna, permet la interacció amb altres aminoàcids per ajudar a mantenir la conformació activa de la proteïna (Lu *et al.*, 1999). D'altra banda, estudis basats en la substitució d'aquest primer residu per qualsevol dels altres aminoàcids possibles mostren que l'únic mutant que

manté l'activitat respecte a la proteïna *wild type*, correspon a la substitució Ile 1→Val 1 (Song *et al.*, 2002). La suma d'aquests dos fets remarquen la importància que presenta l'extrem N-terminal per a la conformació i activitat d'aquesta proteasa, la qual podria veure's afectada per la fusió d'un element proteic en aquest extrem. Per tal d'evitar qualsevol inconvenient en l'activitat i funció de la proteasa, es varen dissenyar una sèrie de construccions on el domini Zera[®] es trobava a N- o a C-terminal de la proteïna d'interès. A la figura 4.4 trobem resumides de forma esquemàtica totes les construccions de l'enteroquinasa que varen ser utilitzades per a la seva expressió en cèl·lules de mamífer (cèl·lules CHO).

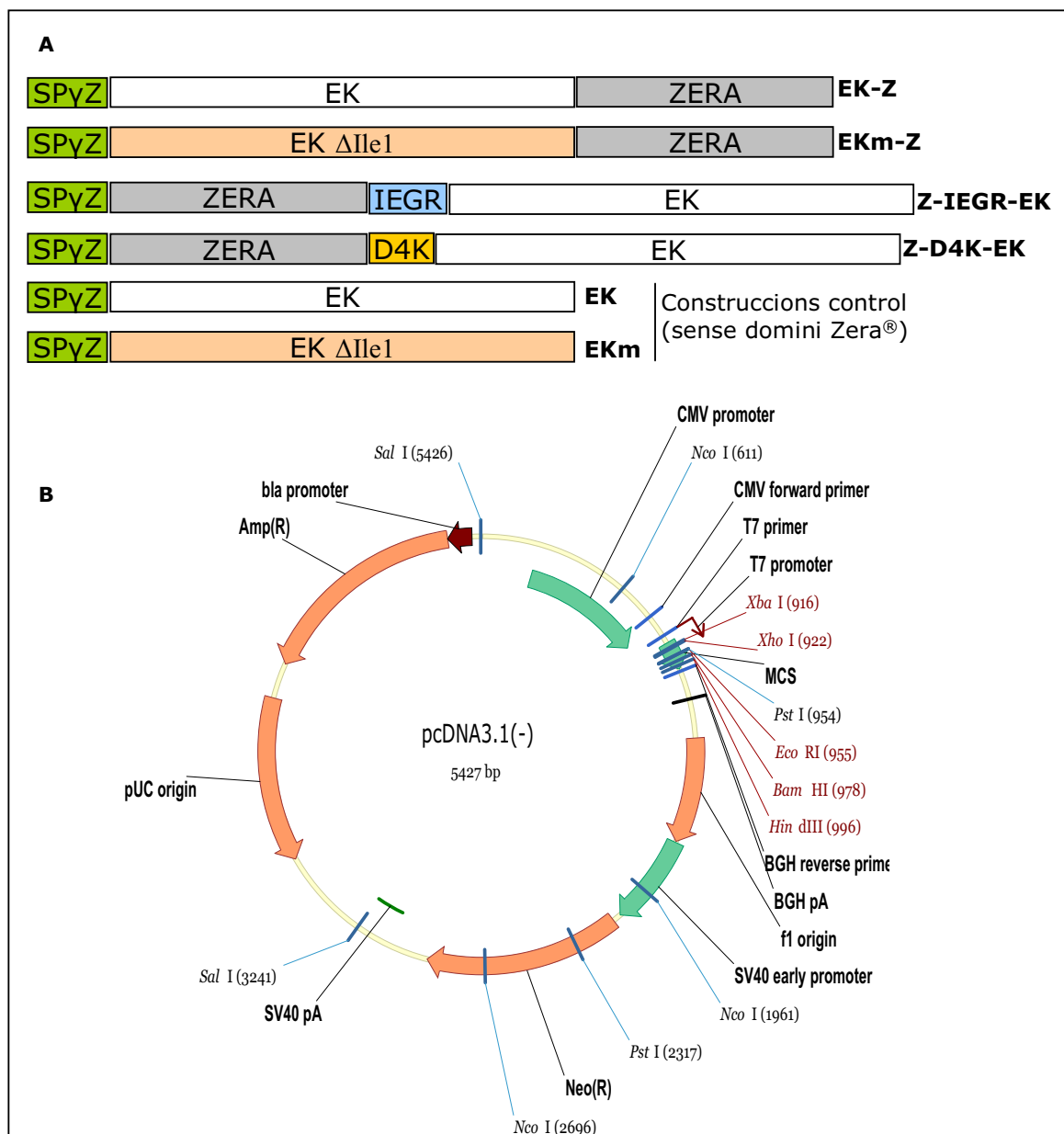


Figura 4.4. Estructura de les proteïnes de fusió expressades en cèl·lules de mamífer CHO. **A.** Construccions utilitzades per a la producció de l'enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera[®]. **B.** Vector de transferència utilitzat per a la transfecció de cèl·lules CHO, pcDNA3.1 (Invitrogen).

L'objectiu principal de l'estudi de les diferents construccions dissenyades fou el d'obtenir alts nivells d'acumulació d'enteroquinasa activa en cossos proteics heteròlegs.

Com a control de l'activitat es va partir d'una enteroquinasa truncada, a la qual se li va realitzar una deleció del primer residu Ile1. En base als resultats de Lu, 1999 i Song, 2002, aquest aminoàcid resulta essencial per a l'activitat de la proteasa, per tant, el mutant EK Δ Ile (EKm) esdevé inactiu.

Les construccions EK-Z i EKm-Z corresponen a les proteïnes de fusió on el domini Zera[®] va ser col·locat a l'extrem C-terminal. Amb aquesta disposició, l'extrem N-terminal de l'enteroquinasa es mantenia lliure i, malgrat tenir Zera[®] fusionat al seu extrem C-terminal, podia adoptar la conformació tridimensional que li permetria ser funcional.

Per contrapartida, les construccions Z-IEGR-EK i Z-D4K-EK varen ser dissenyades per permetre una activació de la proteasa, un cop la proteïna de fusió hagués estat processada mitjançant la proteasa exògena Factor Xa (Z-IEGR-EK), o bé mitjançant un autoprocesament promogut per l'enteroquinasa en fusió (Z-D4K-EK). Aquesta última estratègia es basa en resultats previs (Gasparian *et al.*, 2006 i Kubitzki *et al.*, 2009), en els quals s'havia demostrat la capacitat autocatalítica d'aquesta proteasa quan es troba en fusió a C-terminal.

Per últim, també es varen dissenyar les construccions corresponents a l'enteroquinasa de secreció sense el domini Zera[®]. La finalitat principal d'aquestes construccions fou la comparació de l'acumulació de proteïna recombinant secretada envers l'acumulada en cossos proteics heteròlegs. Addicionalment podrien ser utilitzades com a control en els assajos planejats d'activitat de la proteasa.

Les seqüències codificants per a les proteïnes de fusió dissenyades varen ser clonades en un vector d'expressió específic de cèl·lules de mamífer, el pcDNA3.1 (Invitrogen). Aquest vector conté una sèrie d'elements que permeten assolir alts nivells d'expressió de proteïna recombinant de forma eficient. D'entre ells, destaquen el promotor del citomegalovirus humà (hCMV), que és d'acció immediata, i permet alts nivells d'expressió proteica; i la senyal de poliadenilació de l'hormona de creixement bovina (bGH), que permet una terminació eficient de la transcripció. D'altra banda, el vector també conté el gen de resistència a la neomicina per tal de seleccionar les cèl·lules de mamífer transfectades, en el cas que sigui necessari establir una línia cel·lular d'expressió estable.

Transfecció transitòria de les proteïnes de fusió en cèl·lules d'ovari de hàmmster xinès (CHO)

Per a l'expressió de proteïnes recombinants en cèl·lules CHO es pot recórrer a la transfecció de DNA de forma transitòria o estable. Per a un anàlisi preliminar dels nivells d'expressió és habitual començar per la transfecció transitòria i, en funció dels resultats d'expressió i acumulació de proteïna recombinant, així com de les necessitats de producció d'aquesta proteïna, es pot

prosseguir amb la selecció de les cèl·lules transfectades per tal d'obtenir una línia estable d'expressió.

Existeixen diferents metodologies per a la introducció del DNA exogen a l'interior de la cèl·lula hoste. La transfecció de DNA mitjançant lipofecció és una de les més comuns i fou l'emprada en aquest estudi. Concretament, la lipofecció es va dur a terme mitjançant el kit de transfecció *Lipofectamine*[™] d'Invitrogen, un sistema basat en la formació de complexos entre lípids catiónics i el DNA d'interès (*Life Technologies*, 1999). La formulació liposomal d'aquest kit està formada per una barreja de lípids sintètics policationics (DOSPA) i lípids neutres (DOPE).

En determinades condicions aquoses, els lípids policationics formen liposomes unilamelars de mida oscil·lant entre 100 i 400 nm. La superfície d'aquests liposomes està carregada positivament, de forma que són atrets electrostàticament pels grups fosfat que formen part de la cadena de DNA i per la superfície carregada negativament de la membrana cel·lular. La unió espontània del DNA amb els liposomes és la que provoca la formació dels complexos que seran introduïts a l'espai intracel·lular mitjançant endosomes i lisosomes (Fig. 4.5). Cada complex associatiu entre DNA i lípid segueix una relació de 2 a 4 liposomes per cada plàsmid de 5kb (Felgner *et al*, 1987).

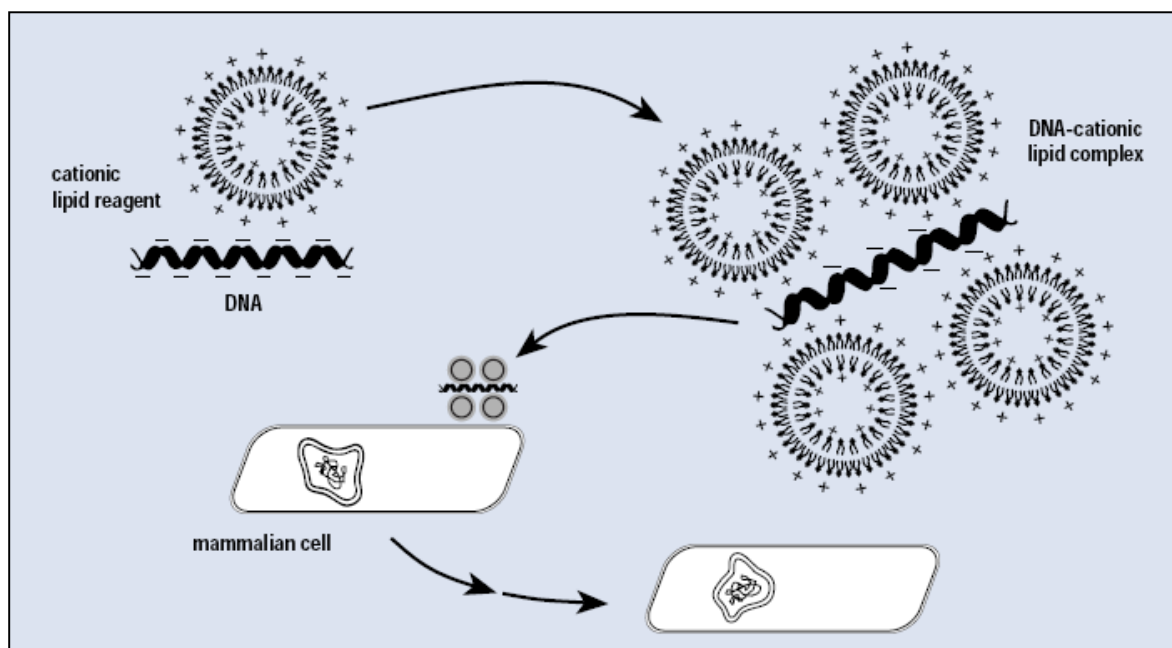


Figura 4.5. Lipofecció mitjançant lípids catiónics (Life Technologies, 1999).

La optimització de les condicions específiques de transfecció resulta essencial per tal d'obtenir una bona eficiència del procés. En general, una bona eficiència de transfecció s'assoleix amb una transfecció pròxima al 70-90% del total de cèl·lules cultivades en placa.

Per a la posada a punt de les condicions de transfecció amb proteïnes de fusió Zera[®], es va emprar una construcció formada per Zera[®]-DsRED. La DsRED és una proteïna de maduració ràpida provinent d'una variant de proteïna vermella fluorescent de *Discosoma sp.*

A partir de la corresponent construcció de DNA, es varen transfectar quantitats fixes de cèl·lules CHO adherents utilitzant diferents relacions de quantitat de DNA vers el volum de Lipofectamina. Per a l'estudi es varen emprar dues lipofectamines comercials diferents: *Lipofectamine Plus*[™] i *Lipofectamine 2000*[™] (Invitrogen). Al cap de 1, 2 i 3 dies post-transfecció es recollia part de la biomassa transfectada, i després d'una sèrie de rentats, les cèl·lules eren analitzades mitjançant un citòmetre de flux basat en un discriminador de la senyal fluorescent vermella emesa (FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*). D'entre els paràmetres mesurables d'interès, varem poder avaluar-ne la viabilitat cel·lular i el percentatge de cèl·lules transfectades (basat en la senyal fluorescent detectada). Els resultats obtinguts amb diferents ràtios µg DNA/ µl lipofectamine 2000, es troben representats en la figura 4.6, on podem comprovar que la màxima transfecció amb menor mortalitat cel·lular s'obté amb un ràtio 1:1,5, al cap de 2 dies post-transfecció. Els resultats utilitzant la Lipofectamine Plus no es mostren, degut a què, tal i com descriuen Ciccarone *et al.*, 1999, en aquest tipus cel·lular s'observen pitjors rendiments generals de transfecció.

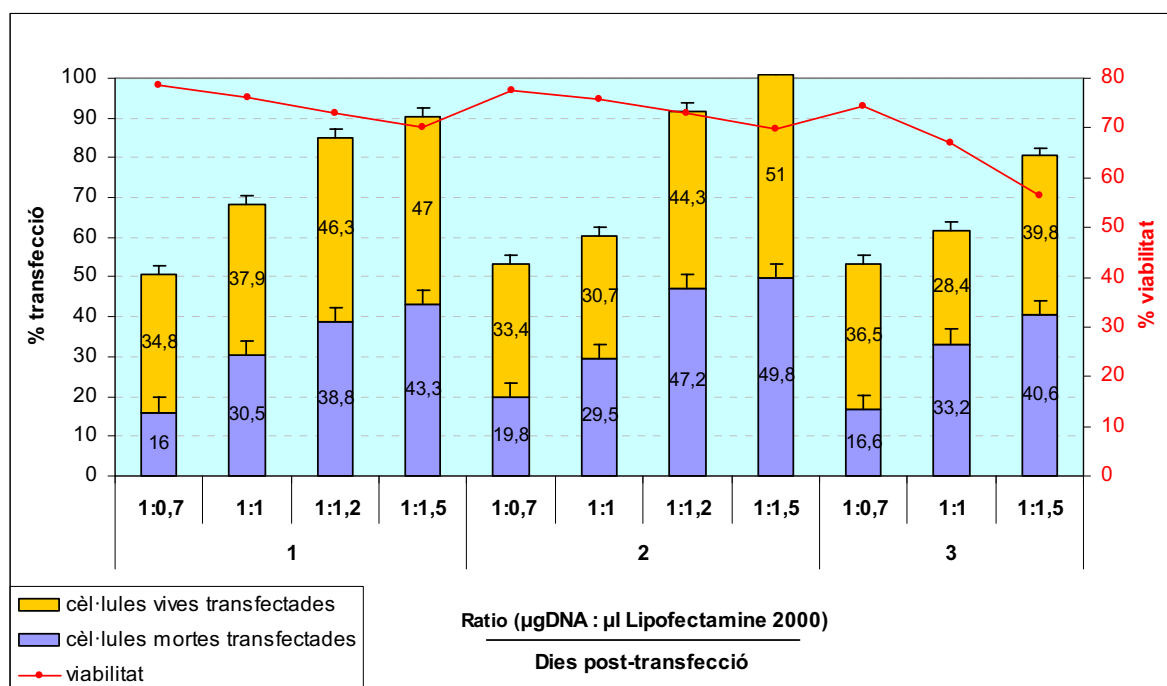


Figura 4.6. Anàlisi del rendiment de transfecció transitòria de cèl·lules CHO mitjançant lipofecció per *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen). Resultats obtinguts per citometria de flux amb cèl·lules transfectades amb la construcció de DNA de Zera[®]-DsRED.

L'estudi complet va realitzar-se mitjançant la corroboració per *Western Blot* de l'expressió de la proteïna Z-DsRED en extractes totals per a totes les condicions de transfecció provades (dades no mostrades). D'aquest resultat se'n extreu que les dades obtingudes a través del FACS, es troben

correlacionades amb els resultats obtinguts mitjançant la immunoquantificació de la senyal provinent del *Western Blot*.

Com podem observar, el principal inconvenient del mètode basat en la lipofecció és, apart del cost elevat dels lípids, el fet de que no tots els lípids funcionen en tots el tipus cel·lulars i que cal optimitzar l'assaig per a cada tipus cel·lular. Els paràmetres a ser optimitzables són bàsicament la relació entre lípid i DNA (relació de càrregues), la quantitat de DNA utilitzada, el temps d'exposició dels complexos DNA-lípid a les cèl·lules, i la presència o absència de sèrum durant la reacció.

Per a l'expressió transitòria de les proteïnes de fusió detallades en la fig. 4, es varen transfectar cèl·lules de mamífer de la soca CHO-K1 (ECACC), que deriva de l'epiteli d'ovari d'hàmsster xinès adult.

Expressió de les proteïnes de fusió EK-Z en cèl·lules CHO

Primerament es va procedir a la transfecció de les construccions EK-Z i EKm-Z, les quals havien de permetre l'expressió de la proteasa activa en fusió amb Zera[®].

L'anàlisi preliminar dels nivells d'expressió es va dur a terme mitjançant *Western Blot* sobre l'extracte cel·lular i sobre el medi de cultiu de les cèl·lules (Fig. 4.7).

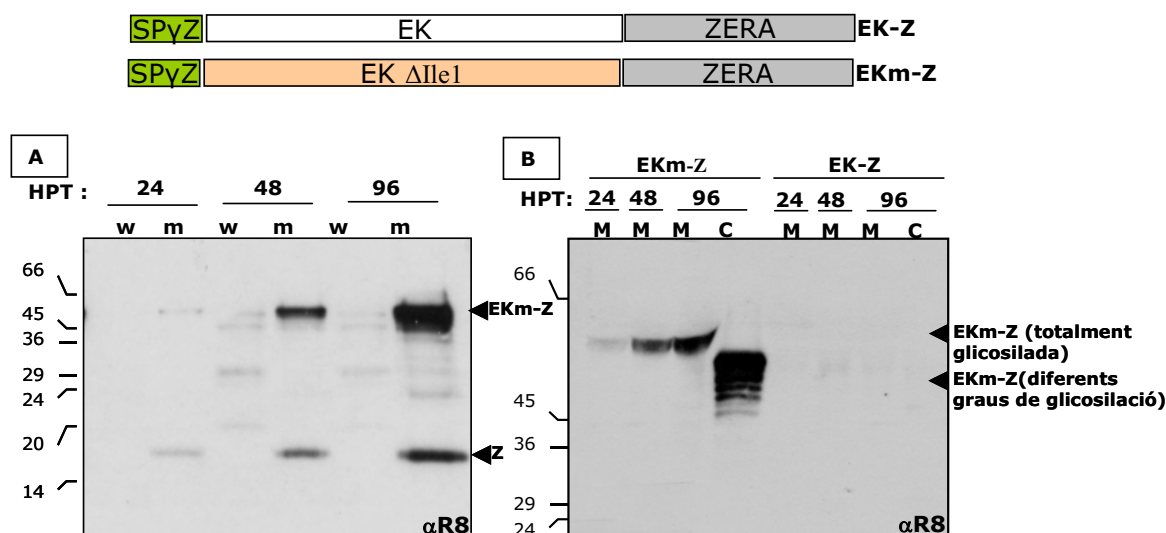


Figura 4.7. Comparació dels nivells d'expressió d'EK-Z i Ekm-Z en cèl·lules CHO. **A:** Anàlisi de l'expressió proteica a diferents hores post-transfecció (HPT). Els extractes cel·lulars representen l'equivalent a 5 μ g de proteïna total. w: construcció *wild-type*. m: construcció mutada deficient per la Ile1. **B:** Anàlisi comparatiu de la fusió secretada en diferents dies post-transfecció. M: fracció corresponent al medi de cultiu. C: 5 μ g de proteïna total de l'extracte. Immunoblots incubats amb anticòs α R8.

La recol·lecció del material transfectat es va dur a terme al cap de 24, 48, i 96 hores post-transfecció, prenent al·lquotes tant del material cel·lular com del medi de cultiu corresponent. Amb aquest anàlisi es volia determinar la variabilitat en els nivells d'expressió de proteïna recombinant al llarg del temps, un cop les cèl·lules han estat transfectades.

5µg de proteïna total per a cada extracte i condició varen ser analitzats per immunoblot utilitzant l'anticòs policlonal contra el pèptid sintètic format per les 8 repeticions de la seqüència PPPVHL (R8).

Tal i com es pot observar a la figura 4.7.A, el pes molecular de la proteïna de fusió detectada (EK-Z o EKm-Z) és aproximadament de ~55 kDa, mentre que el pes molecular teòric calculat és de 41 kDa. Aquestes diferències de pes molecular observades en la migració dels gels SDS-PAGE són degudes al grau de glicosilació de l'enteroquinasa, ja que la subunitat catalítica presenta 3 llocs potencials de N-glicosilació en els residus 64, 103 i 165 (LaVallie *et al.*, 1993).

Pel que fa a la banda inferior d'aproximadament 14kDa i immunoreactiva amb l'anticòs contra R8, es postula que podria tractar-se del domini proteic corresponent a Zera[®]. Aquest domini té un pes molecular teòric de 9,8 kDa, però degut a la seva estructura tridimensional la seva migració correspon a un pes molecular de 14kDa. La detecció d'aquesta banda en els extractes cel·lulars podrien explicar-se per la presència d'un producte de degradació inespecífic i minoritari, que ja ha estat prèviament observat en l'expressió d'altres proteïnes de fusió produïdes mitjançant la tecnologia Zera[®].

El resultat global ens mostra diferències evidents d'expressió entre les dues fusions. Curiosament, la construcció que presenta més expressió correspon a l'EK(Δ Ile1), essent el tercer dia post-transfecció el de màxima expressió. Pel cas de EK-Z, havent carregat la mateixa quantitat de proteïna total que pel corresponent mutant, no detectem cap banda immunoreactiva rellevant en cap de les diferents mostres analitzades. Arrel d'aquests resultats, varem procedir a fer les comprovacions de seqüència nucleotídica pertinents, per tal de comprovar l'absència d'errors que poguessin ser la causa dels resultats d'expressió obtinguts.

Per tal de completar l'anàlisi, també es varen analitzar per immunoblot les fraccions corresponents al medi de cultiu d'aquestes cèl·lules (Fig. 4.7.B). De nou, en aquesta figura podem observar diferències evidents d'expressió entre EK-Z i EKm-Z. En els carrils corresponents al medi de cultiu (M) s'hi observa part de la proteïna de fusió EKm-Z en la seva forma totalment glicosilada (única banda). Aquest fenomen indica l'existència de proteïna de fusió que no ha quedat retinguda en el reticle endoplasmàtic, i per tant, ha seguit la via de secreció cap al medi. Tot i així, es tracta d'una secreció d'EKm-Z clarament parcial i minoritària, ja que la majoria de la proteïna de fusió queda retinguda en l'espai intracel·lular.

Per tal de comprovar que la retenció a l'espai intracel·lular de les proteïnes de fusió EK-Z i EKm-Z és deguda a la seva acumulació en estructures de tipus cos proteic, es va procedir a realitzar un assaig immunocitoquímic sobre les cèl·lules transfectades amb les construccions corresponents. La finalitat d'aquest experiment fou la constatació de la capacitat del domini Zera[®] fusionat a EK

de promoure, primerament la retenció de la proteïna de fusió a RE, i posteriorment, la seva acumulació en estructures de tipus cos proteic heteròleg formades *de novo* a partir de RE.

La immunocitoquímica es va dur a terme mitjançant la incubació de les cèl·lules fixades amb l'anticòs policlonal primari contra R8, i l'anticòs secundari AlexaFluor[®] 488 per a permetre l'observació de les cèl·lules a través de microscòpia de fluorescència.

Les imatges obtingudes mostren un patró d'acumulació diferent per a les dues construccions (Fig. 4.8).

Tot i que part de la senyal fluorescent prové d'estructures en xarxa pròpies d'una expressió a reticle endoplasmàtic, les cèl·lules transfectades amb EKm-Z també presenten un puntejat immunoreactiu típic de cos proteic (CP). Mitjançant el programa de visualització i tractament d'imatges Corel Photo-Paint 9, es va poder estimar que la mida d'aquestes estructures de forma esfèrica, oscil·la entre els 0,5 i 1,3 μm . La mida mitjana del cossos proteics naturals és pròxima als 2 μm .

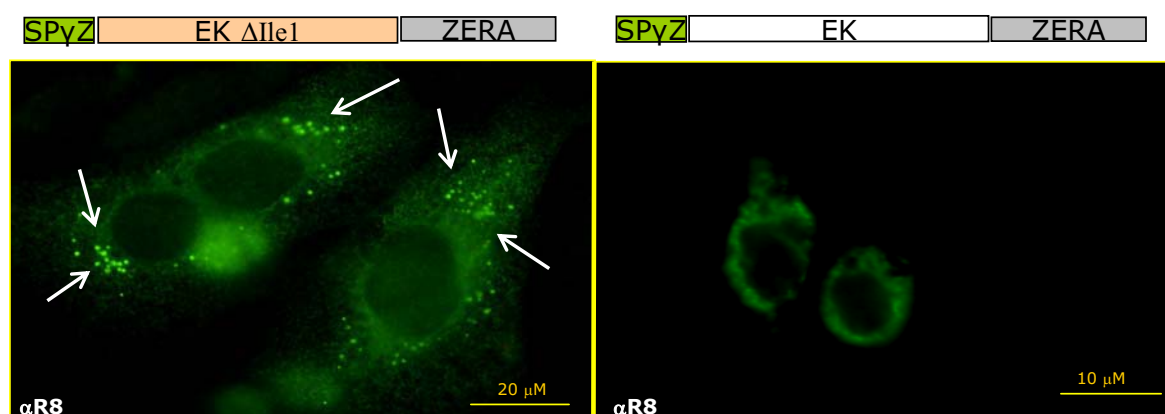


Figura 4.8. Immunofluorescència de cèl·lules CHO transfectades amb EKm-Z i EK-Z. Imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència sobre cèl·lules incubades amb anticòs contra R8. Cossos proteics indicats amb fletxes.

Per contra, en el cas de les cèl·lules transfectades amb la construcció EK-Z, no s'observa cap estructura ni patró típic de CP, mostrant més aviat un patró típic d'expressió a reticle endoplasmàtic. Aquesta observació es podria acabar de determinar mitjançant marcadors específics d'òrganul com les xaperones associades a reticle endoplasmàtic calnexina, calreticulina o BiP (de *Binding Protein*).

Una altra diferència remarcable entre les dues construccions assajades en aquest apartat, fa referència a la integritat de les cèl·lules en termes de manteniment d'estructures i unitat cel·lular. Per una banda, les cèl·lules que varen ser transfectades amb el DNA codificant per EKm-Z, presenten una morfologia més o menys definida, amb la fracció nuclear clarament delineada i la fracció citoplasmàtica previsible. Per altra banda, les cèl·lules que expressen EK-Z, presenten un

patró més atípic, on l'aspecte general és irregular, amb nuclis poc definits i fracció citoplasmàtica amb aspecte deteriorat.

Aquesta última observació podria estar correlacionada amb els nivells baixos d'expressió observats per a la proteïna de fusió EK-Z, i podrien estar indicant un efecte citotòxic de l'enteroquinasa *Wild-type* sobre la soca de cèl·lules CHO-K1 crescudes en les condicions descrites.

Cal remarcar que tota la senyal fluorescent detectada és deguda a l'expressió de la proteïna de fusió, ja que les cèl·lules transfectades amb el vector buit, no mostraven senyal fluorescent inespecífica (imatge no mostrada).

Els cossos proteics naturals presents en el gra dels cereals sedimenten a densitats elevades de sacarosa (Müntz, 1998). En el cas de blat de moro, els cossos proteics que contenen zeïnes sedimenten a densitats superiors a $1,2 \text{ g/cm}^3$ (Ludevid *et al.*, 1984), mentre que altres orgànuls subcel·lulars presenten una densitat inferior i, per tant, sedimenten a densitats més baixes. Aquestes propietats físiques són de gran utilitat per a l'anàlisi dels cossos proteics, ja que se'ls pot diferenciar d'altres compartiments cel·lulars segons la seva densitat.

L'estudi sobre la capacitat de formació i acumulació de cossos proteics heteròlegs que contenen la proteïna de fusió EKm-Z es va completar mitjançant la separació de les fraccions subcel·lulars per ultracentrifugació de l'homogenat cel·lular en un gradient de densitat de sacarosa (Fig. 4.9).

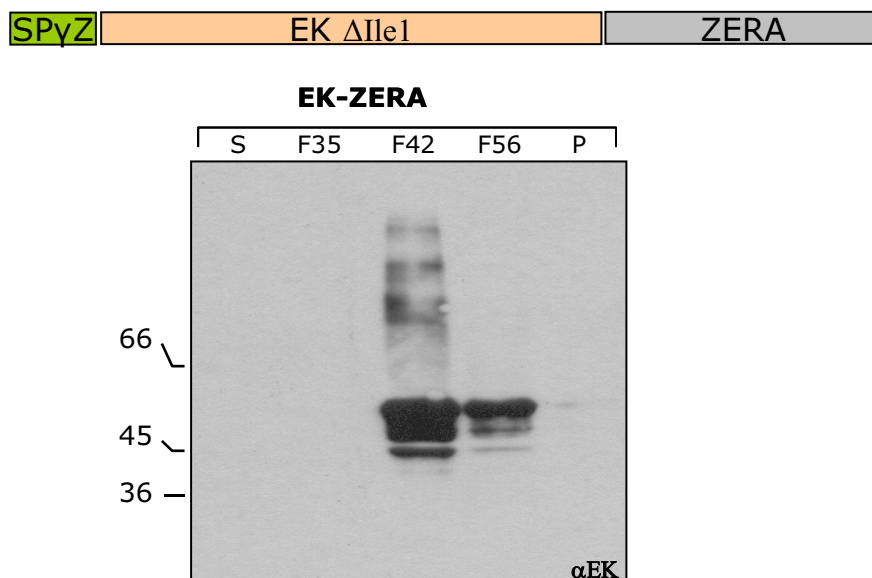


Figura 4.9. Localització subcel·lular de la proteïna de fusió Ekm-Z per gradient de densitat de sacarosa. Immunoblot incubat amb anticòs contra EK de les diferents interfases del gradient, carregades per equivalents de volum. S: sobrenedant. F35, F42 i F56 corresponen a les interfases del gradient, amb el percentatge de sacarosa de cada una de les fraccions. P correspon al pellet del gradient.

Les cèl·lules transfectades amb aquesta construcció varen ser homogeneïtzades i resoltes en un gradient discontinu format per coixins de diferent densitat: 1.04, 1.07, 1.11, 1.18 i 1.26 g/cm³, amb un contingut en sacarosa del 10, 19, 27, 42 i 56 % (p/p), respectivament.

Seguidament, i per tal de determinar la fracció subcel·lular on s'expressa i acumula la proteïna de fusió d'interès, es varen analitzar les diferents interfases per *Western Blot*. Com es pot apreciar a la figura 8, la proteïna de fusió Ekm-Z es troba repartida entre les interfases F42 i F56. Si bé majoritàriament es troba a la fracció F42, que comprèn densitats entre 1,15 i 1,19 g/cm³; part d'ella també es troba a la fracció F56 més densa, on els valors de densitat es troben entre 1,2 i 1,26 g/cm³. Aquests resultats, juntament amb els obtinguts anteriorment per immunocitoquímica, indiquen que Ekm-Z es troba acumulada en estructures de mida i tipus típics de cos proteic, que presenten un rang ampli de densitats diferents que oscil·len entre 1,15 i 1,26 g/cm³.

Finalitzada aquesta segona aproximació experimental, va quedar confirmada l'acumulació de la proteïna de fusió Ekm-Z en compartiments corresponents a cossos proteics heteròlegs de densitat variada en cèl·lules de mamífer CHO transfectades. Tot i així, tractant-se de la variant inactiva de l'enteroquinasa (Ekm), la seva producció mitjançant la tecnologia Zera[®] només va ser preliminar, per tal de demostrar que proteases amb característiques físico-químiques com l'enteroquinasa, poden ser acumulades en cossos proteics formats *de novo* promoguts per la fusió del domini Zera[®] a C-terminal de la proteïna.

Els baixos rendiments d'expressió de la proteïna de fusió EK-Z, juntament amb els resultats imprecisos de la immunocitoquímica realitzada sobre les cèl·lules que expressaven aquesta proteïna, varen resultar en conjunt insuficients per completar l'anàlisi, i resoldre l'homogenat d'aquestes cèl·lules per gradient de densitat. De fet, es va postular sobre un possible efecte citotòxic d'aquesta proteïna de fusió sobre la viabilitat de les cèl·lules, ja que l'estat fisiològic d'aquestes variava considerablement segons la construcció utilitzada per a la seva transfecció. Una de les hipòtesis fonamentades arrel dels resultats obtinguts en la primera part d'aquest apartat, justificava la citotoxicitat observada en les cèl·lules transfectades, amb l'activitat que presenta la proteïna de fusió EK-Z un cop era expressada a l'espai intracel·lular i abans de la seva acumulació en cossos proteics. Aquest fenomen podria explicar la raó de la baixa viabilitat cel·lular observada i dels baixos nivells d'expressió derivats, que resulten en la invalidesa de la producció d'enteroquinasa seguint aquesta estratègia. Tot i així, per tal de poder afirmar aquesta hipòtesi, caldria analitzar més exhaustivament la viabilitat cel·lular, amb el seguiment d'un marcador d'apoptosi i mort cel·lular.

El principal interès d'aquest primer apartat de resultats, va centrar-se en la producció d'una proteasa àmpliament utilitzada en el mercat biotecnològic, com l'EK, per a la producció de proteïnes recombinants expressades com a proteïnes de fusió Zera[®].

Degut a les particularitats estructurals i bioquímiques de l'enteroquinasa, que presenta un extrem N-terminal imprescindible per a la seva activitat (Lu *et al.*, 1999), primerament es varen dissenyar proteïnes de fusió amb Zera[®] a C-terminal per tal de no interferir o afectar negativament la bioactivitat de la proteasa. La primera sèrie d'aproximacions experimentals utilitzant les proteïnes de fusió EK-Z i EKm-Z, varen resultar en una ampliació dels coneixements sobre la compatibilitat de la producció de la proteasa amb la tecnologia Zera[®]. Després d'aquesta primera apreciació, l'objectiu es va centrar en la cerca de noves estratègies per permetre la producció d'EK activa com a proteïna de fusió Zera[®].

Expressió de les proteïnes de fusió Z-EK en cèl·lules CHO

La cerca d'alternatives per a la producció d'enteroquinasa recombinant, va desencadenar el disseny de noves construccions on Zera[®] es trobava posicionada a N-terminal de la fusió. Tot i que l'activitat de la proteasa es podria veure negativament afectada per aquest fet, basat en les experiències de Gasparian *et al.*, 2006 i Kubitzki *et al.*, 2009 es coneix la capacitat que presenta l'enteroquinasa per autoactivar-se quan és produïda en una fusió que conté una diana específica de reconeixement per a sí mateixa (D4K). Malgrat la disposició de l'enteroquinasa a C-terminal de la proteïna de fusió, sembla que existeix certa activitat mínima que permet el processament en *cis* o *trans* de proteïnes de fusió senceres, iniciant-se així una cascada d'activació general. Aquesta particularitat suposaria, a priori, una avantatge aplicable a la tecnologia Zera[®], ja que si l'autoprocessament té lloc a l'interior del cos proteic, l'EK alliberada dins d'aquest compartiment romandria de forma estable i innòcua dins la cèl·lula, fins al moment de la recuperació de la proteïna recombinant.

D'altra banda, la diana IEGR reconeguda per la proteasa Factor Xa, es va afegir a una de les construccions amb la finalitat de permetre un tall controlat *in vitro*, un cop la proteïna de fusió fos recuperada a partir dels cossos proteics heteròlegs.

Així doncs, la segona part corresponent a la sèrie experimental de producció d'EK activa mitjançant la tecnologia Zera[®], es basa en la producció de les construccions Z-IEGR-EK i Z-D4K-EK en cèl·lules de mamífer CHO (fig. 4.4). Ambdues construccions varen ser utilitzades per a transfectar transitòriament cèl·lules CHO-K1 mitjançant el mètode basat en la lipofectamina.

De nou, l'anàlisi preliminar dels nivells d'expressió es va dur a terme mitjançant *Western Blot* utilitzant l'anticòs contra R8 sobre l'extracte cel·lular (5µg de proteïna total) i sobre el medi de cultiu de les cèl·lules, al cap de tres dies de la transfecció (Fig. 4.10).

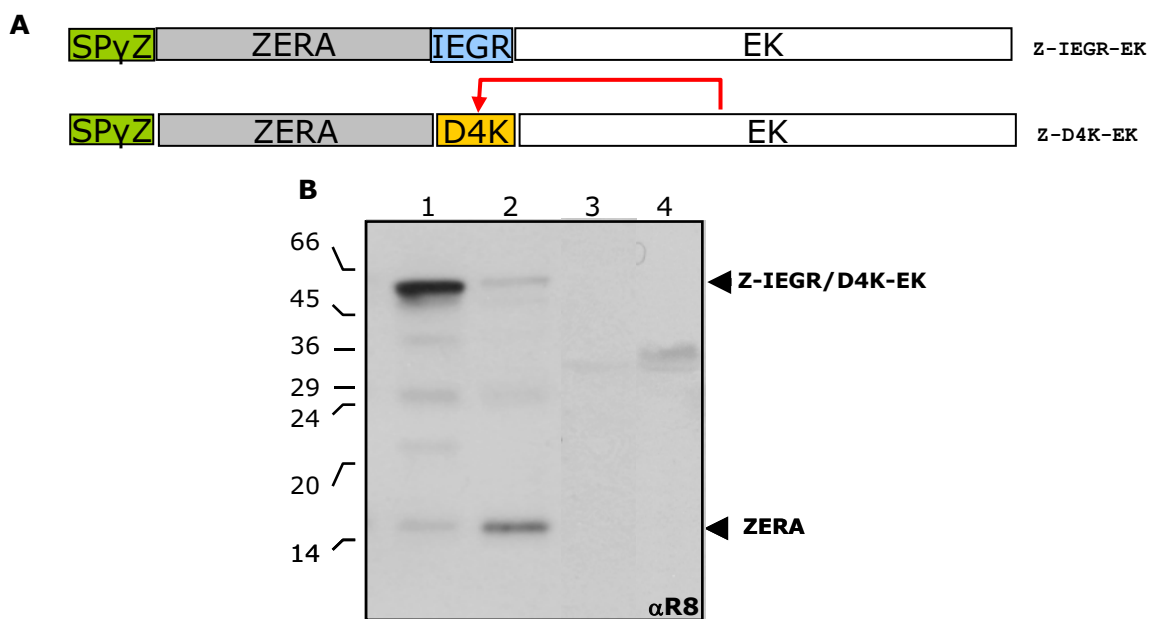


Figura 4.10. Expressió transitòria de proteïnes de fusió Zera®-EK en cèl·lules CHO.

A: Esquema de les construccions utilitzades per a la transfecció. **B:** Anàlisi de l'expressió proteica dels extractes cel·lulars i el medi. El carril 1 correspon a la construcció ZERA-IEGR-EK, i el carril 2 correspon a ZERA-D4K-EK. Els carrils 3 i 4 corresponen al medi de les dues construccions, en el mateix ordre. Immunoblot incubat amb l'anticòs contra R8.

La figura 4.10 permet fer una valoració comparativa no quantificada dels nivells d'expressió de proteïna recombinant obtinguts arrel de la transfecció d'ambdues construccions, posant en evidència les importants diferències d'expressió que existeixen entre elles. Per una banda, el marcatge immunoreactiu observat en el primer carril correspon a la proteïna de fusió Z-IEGR-EK (~55 kDa), d'altra banda, la construcció Z-D4K-EK (carril 2) presenta comparativament uns nivells generals notòriament més baixos. A més, en aquest segon carril, observem que la banda predominant no correspon a la fusió (~55 kDa), sinó que es tracta d'una banda de mida inferior (~14,5 kDa), que coincideix amb la mida esperable per al domini Zera® alliberat. Aquesta última observació podria ser indicatiu de certa presència d'autoprocessament mediat per l'EK fusionada a C-terminal de Zera®, tal i com van descriure Gasparian *et al.*, 2006 i Kubitzki *et al.*, 2009. Cal diferenciar aquest processament promogut per l'EK del tall inespecífic observat a la figura 6. En termes de proporció, observem que el possible autoprocessament de la figura 9 és predominant sobre el processament inespecífic de la figura 6, on la majoria de proteïna recombinant es troba en forma de proteïna de fusió sencera. A més, els baixos nivells d'expressió observats per Z-D4K-EK, juntament amb l'estat fisiològic general de les cèl·lules fan pensar novament en el possible efecte tòxic de la proteasa activa sobre la integritat cel·lular. Justament, els baixos nivells d'expressió obtinguts per a Z-D4K-EK no van permetre l'anàlisi de la localització cel·lular per gradient de densitat ni per immunocitoquímica de la proteïna de fusió recombinant o de l'EK alliberada.

Una hipòtesi que va sorgir arrel d'aquests resultats i que serà detallada en l'apartat de discussió, explicaria aquest conjunt d'observacions sobre l'estat integral de les cèl·lules i els nivells

d'expressió obtinguts per Z-D4K-EK, amb el fet que l'autoprocessament promogut per l'EK hagi tingut lloc prèviament a la formació de cossos proteics, de forma que la proteasa alliberada té un efecte tòxic sobre la viabilitat de les cèl·lules.

Davant de l'evidència de la inviabilitat d'aquesta estratègia per a la producció d'enteroquinasa recombinant activa en cossos proteics heteròlegs, els esforços es varen centrar en la recuperació d'EK potencialment activa a partir de la proteïna de fusió Z-IEGR-EK.

Per tal de determinar si la localització intracel·lular de la fusió Z-IEGR-EK es produïa en estructures denses de tipus cos proteic formades *de novo* en cèl·lules CHO, es va dur a terme una immunolocalització de la proteïna de fusió en cèl·lules transfectades, juntament amb un fraccionament subcel·lular per gradient de densitat de sacarosa (fig. 4.11).

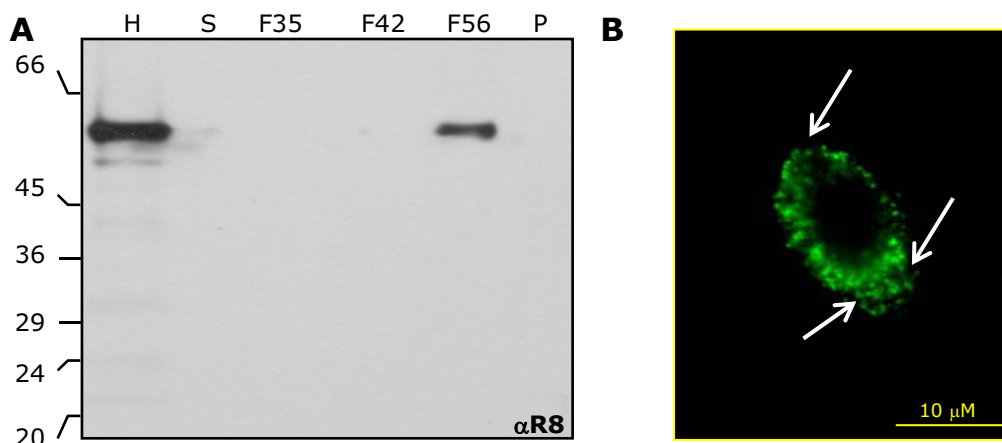


Figura 4.11. Acumulació de la proteïna de fusió Z-IEGR-EK a cos proteic. **A:** Gradient de densitat realitzat sobre l'homogenat cel·lular transfectat amb la fusió Z-IEGR-EK. H correspon a l'extracte cel·lular de partida. S:sobrenedant. F35, F42 i F56 corresponen a les interfases del gradient amb el percentatge indicat de sacarosa de cada una de les fases. P correspon al pellet del gradient. Immunoblot incubat amb anticòs contra R8. **B:** Imatge d'immunofluorescència de cèl·lules CHO transfectades amb ZERA-IEGR-EK, incubades amb anticòs contra R8. Cossos proteics marcats amb fletxes.

La immunocitoquímica va ser realitzada sobre cèl·lules CHO transfectades, fixades i incubades amb l'anticòs contra R8 (fig. 4.11.B). Les imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència mostren un patró d'expressió en xarxa típic de reticle endoplasmàtic i en estructures esfèriques típiques de cos proteic, la qual cosa indica que hi ha bon grau de proteïna de fusió que és acumulada en aquestes estructures heteròlogues.

L'anàlisi del gradient de densitat mitjançant *Western Blot* (fig. 4.11.A), ens indica que tota la proteïna recombinant Z-IEGR-EK expressada en aquestes cèl·lules es localitza a la fracció F56 corresponent a una densitat superior a $1,22 \text{ g/cm}^3$, coincidint amb la densitat típica dels cossos proteics naturals.

Aquesta comprovació va fer possible la continuació del procés de *downstream* de recuperació de la proteïna de fusió mitjançant l'aïllament dels cossos proteïcs, i la posterior digestió amb Factor Xa per permetre l'alliberament de la proteasa recombinant.

Obtenció de proteïna recombinant EK mitjançant la tecnologia Zera[®] en cèl·lules CHO.

Apart d'incrementar els nivells d'expressió de proteïna recombinant, la tecnologia Zera[®] suposa un avantatge important en les etapes relatives al procés de purificació, gràcies a l'elevada densitat que presenten els cossos proteïcs, permetent un alt grau d'enriquiment en la primera part del procés.

Malgrat això, el procés de purificació Zera[®] s'havia establert inicialment en plantes transgèniques de tabac, la qual cosa va significar la posada a punt del procés de *downstream* a partir de cèl·lules CHO transfectades, en termes d'homogeneïtzació, aïllament i solubilització de cossos proteïcs.

Per a l'homogeneïtzació de les cèl·lules CHO-K1, es varen utilitzar diferents eines físiques i químiques per tal d'aconseguir disgregar la membrana plasmàtica i alliberar el contingut cel·lular, malmetent el mínim possible el contingut en orgànuls i altres components del sistema endomembrana. Entre els mètodes físics que varen ser provats, destaquen la sonicació a baixa amplitud, l'homogeneïtzació mitjançant Potter *Elvehjem* douncer *de tefló*, la prensa de French, el politró a baixa potència, o el pas de la suspensió cel·lular a través d'agulles acoblades a xeringues de diferent longitud i diàmetre. Les tècniques físiques emprades per al trencament de les cèl·lules transfectades, varen ser analitzades i valorades mitjançant microscòpia òptica de camp clar. Quan el camp de visió d'aquestes cèl·lules oferia un percentatge pròxim al 80-90% de cèl·lules trencades amb implicació de membrana alterada, es considerava que el trencament era satisfactori. Aquestes condicions es varen assolir amb cert compromís, incubant les cèl·lules en un medi hiposmòtic i amb l'ajut mecànic de l'homogeneïtzador Potter *Elvehjem* douncer.

Seguidament, l'homogenat cel·lular era sotmès a una centrifugació a 1500g per permetre l'aïllament o recuperació de cossos proteïcs de la resta de proteïnes solubles i dels components cel·lulars menys densos.

Un cop havíem recuperat bona part de la fracció densa de cossos proteïcs heteròlegs, va ser necessària una etapa de neteja per tal de poder descartar el màxim de contaminants que havien co-sedimentat durant la recuperació i aïllament de cossos proteïcs. Amb aquesta finalitat es varen emprar combinacions de detergents suaus amb mètodes físics que permetien mantenir la mostra homogènia durant el transcurs del rentat. La valoració del rendiment de neteja es va realitzar per resolució en gels SDS-PAGE i tinció per precipitació de nitrat de plata de les mostres resuspeses en

els tampons corresponents i re-centrifugades a 1500g. Si en el sobrenedant es descartaven bona part de contaminants i la proteïna de fusió la recuperàvem més pura en el sediment, es considerava un bon rendiment de neteja de cossos proteics. Seguint aquestes pautes, el major rendiment d'aquesta etapa s'obtingué després d'una breu incubació a temperatura ambient de la fracció de cossos proteics en una solució a base de 1% Triton X-100, 1M NaCl, 50mM CaCl₂, 200mM MgCl₂, en tampó 50mM HEPES a pH7,4. L'addició de sals com el clorur de magnesi i de clorur de calci en el tampó de neteja, varen resultar clau per a obtenir obtenir millors rendiments de neteja.

La següent etapa en el procés de recuperació de la proteïna d'interès va tenir com a objectiu la solubilització del contingut proteic dels cossos proteics aïllats.

A diferència d'altres zeïnes presents en els cossos proteics naturals de blat de moro, la γ -zeïna és soluble en solucions aquoses en condicions reductores (Ludevid, et al. 1984). Aquest fet, aplicable també per a cossos proteics derivats Zera[®], permetia, en alguns casos, solubilitzar proteïnes de fusió en condicions poc o moderadament desnaturalitzants. Per a totes les proteïnes de fusió Zera[®] acumulades en cossos proteics, es provava una bateria de condicions de solubilització amb paràmetres d'anàlisi tals com el pH, temperatura, diferents tipus de detergent, presència de sals i diferents agents reductors. La figura 4.12.A mostra el resultat de dos dels processos més efectius de solubilització de Z-IEGR-EK a partir de cossos proteics aïllats en condicions hipotòniques. Tal i com es pot observar, la solubilització de cossos proteics més eficient va tenir lloc en presència de detergent SDS 0,1%. Tot i que també s'obtenen bons rendiments substituint aquest detergent per l'ajut mecànic mitjançant sonicació a baixa amplitud.

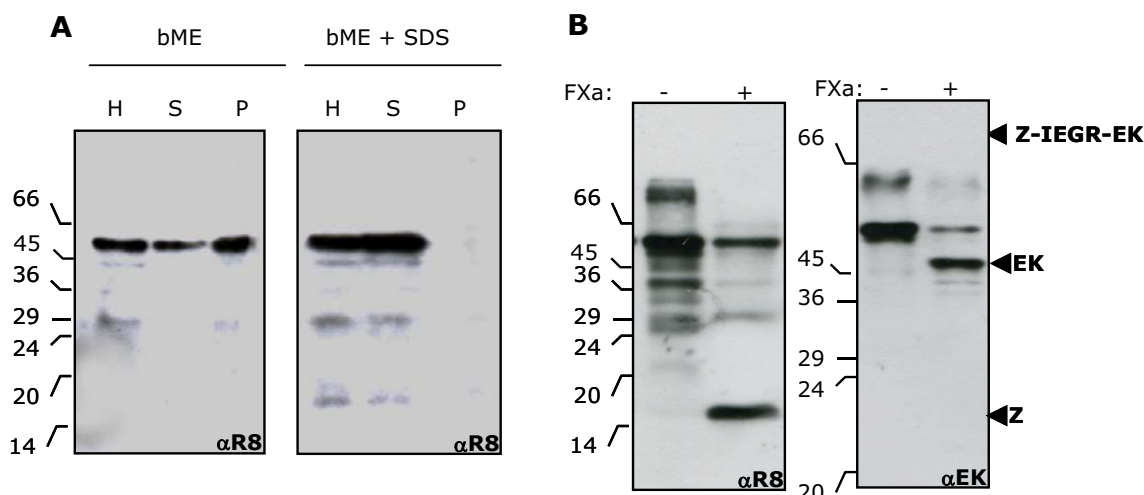


Figura 4.12. Solubilització i digestió de cossos proteics de Z-IEGR-EK. A: Solubilització en dos tampons diferents. A l'esquerra: tampó 50mM Tris pH7 i 20mM β -mercaptoetanol; a la dreta, el mateix tampó en presència de 0,1% SDS. Immunoblots incubats amb anticòs α R8. H: Proteïna total en cos proteic. S: fracció soluble. P: fracció insoluble. **B:** Digestió de 16h amb proteasa comercial Factor Xa de mostres solubilitzades amb SDS/ β -ME. Immunoblots incubats amb anticòs α R8 i α EK.

L'última etapa de recuperació de l'enteroquinasa produïda en fusió amb el domini Zera[®] va coincidir amb l'alliberament de l'EK mitjançant la digestió de la proteïna de fusió per l'acció de l'endoproteasa exògena FactorXa. Aquesta proteasa d'origen animal reconeix la diana IEGR, la qual no és present ni en la seqüència de l'EK, ni en el domini Zera[®] fusionat. L'elecció d'aquesta endoproteasa envers d'altres disponibles comercialment, va estar fonamentada pel fet de que aquesta talla a l'extrem C-terminal de la seva diana de reconeixement, sense deixar cap residu afegit a l'EK, evitant el possible efecte negatiu que aquesta addició pogués tenir sobre l'activitat de la proteasa.

La mostra solubilitzada de cossos proteics contenint la proteïna de fusió Z-IEGR-EK va ser dialitzada contra el tampó de digestió òptim per tal d'afavorir l'acció del FactorXa. Bàsicament aquesta etapa de diàlisi va ser necessària per a extreure l'agent reductor present al tampó de solubilització, ja que el Factor Xa està format per dues cadenes polipeptídiques unides covalentment per ponts disulfur.

La digestió es va dur a terme addicionant 2 unitats de Factor Xa (Qiagen) a la mostra solubilitzada de Z-IEGR-EK, incubant la reacció durant 3 hores a temperatura ambient. Tal i com s'observa a la figura 4.12.B, les condicions de digestió provades varen resultar en el processament de bona proporció de proteïna de fusió inicial. L'anàlisi de la digestió es va realitzar mitjançant *Western Blot* sobre les mostres prèvies i posteriors a la digestió, utilitzant ambdós anticossos: contra R8 i contra EK.

Tot i que la idea principal passava per la optimització de la digestió de la fusió Z-IEGR-EK amb Factor Xa, avaluant diferents tampons de digestió, concentracions de proteïna, temperatures i temps d'incubació, varem considerar que l'eficiència de tall obtinguda en aquest primer intent, ja resultava en una bona etapa de processament.

Paral·lelament a tots aquests estudis, i per tal d'obtenir els controls adequats en l'assaig d'activitat d'aquesta proteasa, també es varen dissenyar dues construccions sense Zera[®], on EK i EKm serien dirigides cap a la via de secreció (fig. 4.4). Aquests controls també ens havien de permetre analitzar de forma comparativa els nivells d'acumulació de proteïna recombinant en fusió amb Zera[®], *versus* els obtinguts mitjançant secreció. Amb aquesta finalitat, es varen analitzar en paral·lel per immunoblot amb anticòs contra EK, les fraccions equivalents als extractes cel·lulars (2,5µg de proteïna total), i fraccions sobrecarregades de medi de cultiu de les construccions corresponents a quatre proteïnes de fusió: EK-Z, Z-IEGR-EK, EK i EKm expressades a cèl·lules CHO (Fig. 4.13). Tal i com podem observar, els nivells assolits d'EK o EKm al medi de cultiu varen estar molt per sota del rang de concentració necessària per assajar amb relacions equivalents de la proteïna recombinant produïda, l'activitat de l'enteroquinasa produïda mitjançant els dos sistemes. Així doncs, per tal de tenir control positiu en l'assaig d'activitat, es va plantejar la

utilització d'un proteasa EK comercial, l'activitat de la qual ja havia estat provada amb anterioritat en la digestió d'altres proteïnes de fusió Zera[®].

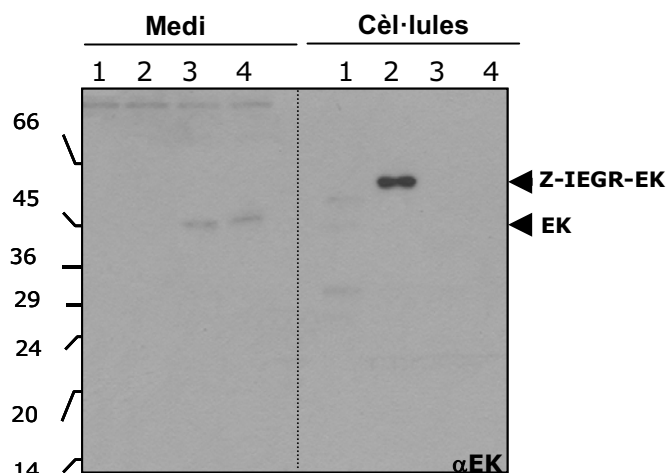


Figura 4.13. Efecte de Zera[®] sobre l'acumulació de la proteïna de fusió a l'espai intracel·lular. Carril **1**: fracció del medi i fracció corresponent a 2,5 µg de proteïna total de l'extracte cel·lular de la proteïna de fusió EK-Z, carril **2**: fraccions corresponents a Z-EK, carril **3**: fraccions corresponents a Ekm i **4**: fraccions corresponents a EK. *Western Blot* incubat amb anticòs contra EK.

Es pot concloure, per tant, que la fusió del domini Zera[®] a l'extrem N-terminal té un efecte positiu evident sobre la seva acumulació, oferint un clar avantatge sobre el sistema de producció basat en la secreció de la proteïna recombinant al medi de cultiu, i sobre la posició de Zera[®] a C-terminal.

Assaig d'activitat de l'enteroquinasa.

Si bé el següent pas òptim del procés de recuperació de la proteïna recombinant hagués estat la purificació de l'EK digerida, els nivells d'expressió proteica assolits en aquest hoste varen resultar limitants, amb el qual no va ser possible prosseguir amb les etapes d'aïllament i purificació de la proteasa.

Malgrat això, i tenint en compte la necessitat de determinar si l'EK produïda mitjançant la tecnologia Zera[®] era activa, vàrem creure convenient dur a terme assajos d'activitat enzimàtica preliminaris amb la mostra soluble i digerida sense purificar.

La quantificació de la mostra es va dur a terme per densitometria per *Western Blot*, per a cada una de les etapes de recuperació de la proteïna recombinant. Amb tot, aquests resultats no varen ser conclouents, amb el qual desconeixement de si la quantitat d'EK produïda entrava dins el rang de detecció de l'assaig resultava el major inconvenient.

La determinació del grau d'activitat de l'enteroquinasa està basada en un assaig fluorimètric que utilitza un substrat fluorogènic format pel pèptid G-D-D-D-D-K-β-naftilamida, que conté la

diana de reconeixement per la proteasa (Yuan i Hua, 2002). Quan aquest substrat sintètic és digerit per l'enteroquinasa s'allibera la β -naftilamida (2NA), produint un increment en els nivells de fluorescència. El seguiment al llarg del temps d'aquest increment de fluorescència mitjançant fluorimetria, permet definir paràmetres cinètics i enzimològics com la K_{cat} i la K_m de la proteasa (Grant i Hermon-Taylor, 1979).

L'assaig de l'activitat amb la mostra produïda es va dur a terme amb diferents quantitats de mostra solubilitzada provinent de les etapes anteriors, emprant els dos tampons de solubilització aplicats (SDS + β -mercaptoetanol i β -mercaptoetanol + sonicació). Segons el manual d'usuari de l'enteroquinasa utilitzada com a control positiu de l'assaig (EnterokinaseMax[™] d'Invitrogen[™]), ambdós solucions resultaven compatibles i no interferien amb l'activitat de l'enteroquinasa.

Com a control positiu varem emprar l'enteroquinasa comercial EKmax[™] en el mateix entorn que la mostra, per tal de comprovar que mantenia la seva activitat inalterada. Aquesta determinació va permetre excloure possibles interferències dels components de la solució sobre l'activitat de la proteasa, i també les causades per la presència de cúmuls de Zera[®] en la fracció analitzada.

Realitzades aquestes comprovacions, l'anàlisi de l'activitat de la mostra d'EK produïda no va mostrar cap indicatiu d'activitat en cap de les condicions d'assaig provades, confirmant que tant la purificació com la quantificació de l'enteroquinasa produïda són dos processos necessaris per a poder determinar l'activitat de la proteasa escaient en el rang de detecció de l'assaig. Com ja hem assenyalat anteriorment, aquests processos no varen poder ser realitzats per manca d'acumulació de proteïna recombinant en aquest hoste, per tant arribats aquest punt, la cerca d'alternatives de sistemes d'expressió va esdevenir el centre de la nostra atenció.

La posada a punt de la producció de proteïnes de fusió Zera[®] en plantes de tabac transformades mitjançant agroinfiltració, estava donant resultats molt prometedors per a altres proteïnes assajades al laboratori, amb el qual varen esdevenir les candidates ideals com a sistema d'expressió per intentar millorar els rendiments de producció de Z-EK obtinguts fins al moment a cèl·lules CHO.

Producció de proteïnes de fusió Zera[®] - EK en plantes de tabac (*N. benthamiana*)

La transformació transitòria en plantes de tabac es va dur a terme mitjançant agroinfiltració d'un cultiu d'*Agrobacterium tumefaciens* transformat amb les construccions d'interès, a través de xeringa, injectant sobre fulles de *Nicotiana benthamiana* de 4-6 setmanes crescudes en hivernacle (Torrent *et al.*, 2009b).

Les millors condicions d'agroinfiltració ja havien estat posades a punt amb anterioritat al laboratori, de forma que les variables immediates que podien afectar a l'agroinfiltració com el tipus de plasmidi binari, la soca d'*Agrobacterium* o la varietat de la planta del tabac, ja havien estat ajustades. El vector binari pCambia sota control del promotor constitutiu CaMV 35S, la soca

d'*Agrobacterium* EHA 105, i les fulles de plantes d'entre 4-6 setmanes de *N. benthamiana*, van ser paràmetres constants en totes les transformacions realitzades de les diferents proteïnes de fusió amb Zera[®]-EK.

D'altra banda, i per tal d'evitar problemes ja coneguts en aquests tipus de transformació derivats del silenciament del RNA (Koscianska *et al.*, 2005), totes les transformacions dutes a terme a *N. benthamiana* varen ser co-agroinfiltrades amb un inhibidor de silenciament HCPro (*Helper Component-Proteinase*). La HCPro és una proteïna multifuncional codificada en molts potivirus, que està involucrada en moltes accions que intervenen en la infecció viral de la planta, com per exemple la requerida per al manteniment de la replicació del genoma, el moviment a llarga distància dins de la planta hoste i el processament poliproteic dins de l'hoste (Llave *et al.*, 2000)

A la figura 4.14 hi trobem representades les diferents construccions amb Zera[®] i EK que es van provar per a la transformació transitòria de les plantes de tabac. Degut a que l'agroinfiltració és un sistema de transformació de plantes en la qual no hi ha integració del T-DNA en el genoma de la planta, es va creure més oportú utilitzar un vector amb alt nombre de còpies, com les versions 2300 i 5300 de pCambia, per permetre uns nivells d'expressió més alts.

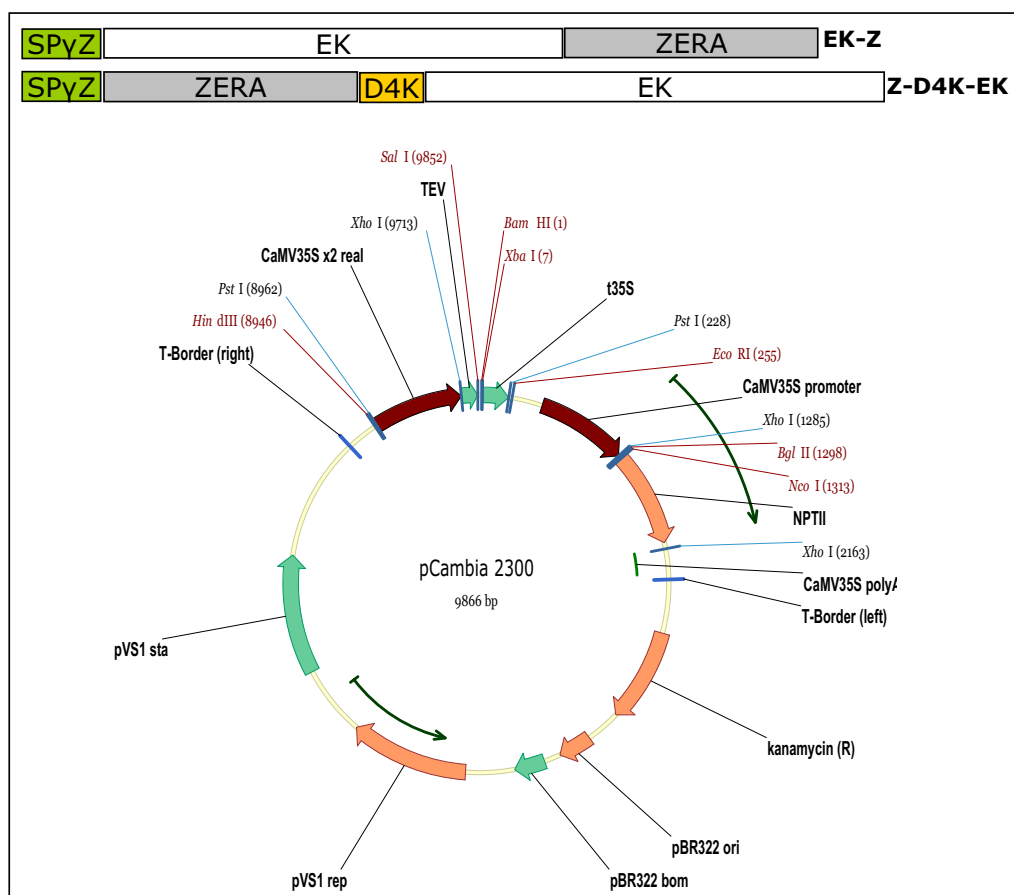


Figura 4.14. Estructura de les proteïnes de fusió expressades en plantes de tabac. Construccions utilitzades per a la producció de l'enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera[®]. Vector de transferència utilitzat per a la transformació transitòria de tabac.

En cada una de les agroinfiltracions realitzades es varen utilitzar un total de tres plantes per construcció, i tres fulles de la planta. Al cap de 6 dies post-agroinfiltració, procedia a la recollida del teixit vegetal agroinfiltrat, i al seu anàlisi dels nivells d'expressió mitjançant *Western Blot*.

La primera observació a l'hora de recollir la biomassa agroinfiltrada fou la necrosi que el teixit agroinfiltrat corresponent a les construccions EK-Z i Z-D4K-EK mostrava necrosi; mentre que una construcció control corresponent a una proteïna de fusió Zera[®] agroinfiltrada en paral·lel mostrava una aparença normal, similar a la observada per altres construccions Zera[®] (Fig. 4.15). Aquesta observació fou reiteradament observada en agroinfiltracions posteriors emprant aquestes mateixes construccions.

Malgrat aquest fet, es va prosseguir amb l'anàlisi dels nivells d'expressió per tal de tenir una certa valoració addicional de l'estat de degradació general de proteïnes i, sobretot, de la proteïna de fusió d'interès.

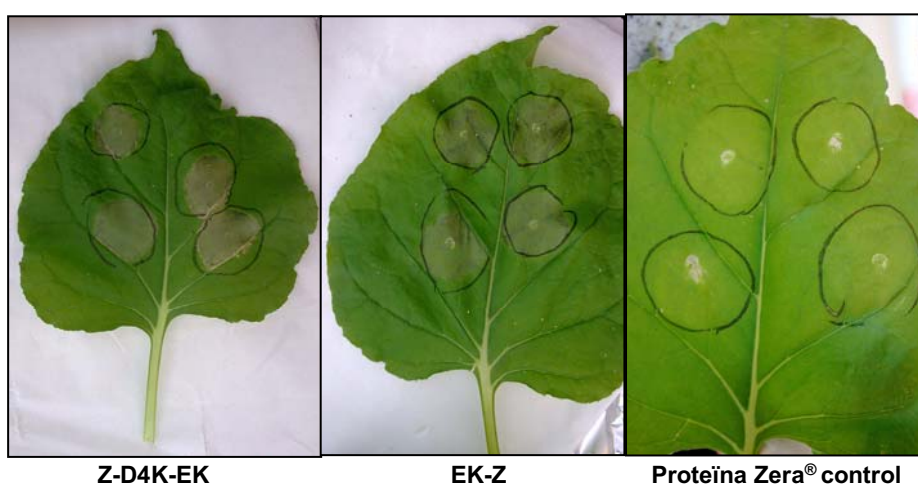


Figura 4.15. Expressió de diferents proteïnes de fusió Zera[®] amb EK a plantes de tabac. Imatges corresponents a fulles agroinfiltrades 6 dies després de la infiltració, amb les diferents construccions de Zera[®] i EK. Els cercles marcats indiquen l'àrea agroinfiltrada, i al centre el punt blanquinós indica el lloc d'injecció mitjançant xeringa.

L'anàlisi dels nivells d'expressió de les diferents proteïnes de fusió, mitjançant *Western Blot* sobre un extracte de 10µg de proteïna total provinent del teixit agroinfiltrat, indicava una degradació generalitzada marcada per l'absència de bandes immunoreactives de la mida de la proteïna de fusió o de Zera[®] (resultat no mostrat). Novament, aquest efecte podria ser provocat per la toxicitat de l'enteroquinasa produïda en fusió amb Zera[®] sobre el teixit vegetal.

La hipòtesi generada arrel dels resultats obtinguts de la transformació transitòria tant de cèl·lules CHO com de plantes del tabac, suggereix una activitat de l'enteroquinasa prèvia a la formació i acumulació de la proteïna de fusió recombinant en cossos proteics heteròlegs. En aquest cas, la possible activitat prematura de la proteasa recombinant produeix un efecte que resulta letal per a les a cèl·lules que l'expressen, amb el qual no té lloc l'efecte protector que podria

proporcionar la seva acumulació en compartiments tancats com els cossos proteics embolcallats per membrana derivada de reticle endoplasmàtic.

CAPÍTOL 2: Aplicació de sistemes basats en l'autoprocessament de proteïnes de fusió Zera[®].

CAPÍTOL 2: Aplicació de sistemes basats en l'autoprocessament de proteïnes de fusió Zera[®].

Els mètodes basats en l'autoprocessament de proteïnes de fusió ofereixen diversos avantatges respecte els mètodes convencionals que utilitzen proteases exògenes comercials per digerir-les.

Entre ells, destaquen la baixa presència de tall inespecífic, la reacció autocatalítica en absència de proteïnes exògenes, cofactors o fonts d'energia, la compatibilitat amb l'acció d'inhibidors de proteases, o la possibilitat d'acoblar el sistema d'autoprocessament a una etapa de purificació.

Molts dels sistemes basats en l'autoprocessament de proteïnes de fusió són protagonitzats per uns elements proteics anomenats inteïnes. La seva denominació prové del fet que en el seu estat natural, són capaces de portar a terme un *splicing* proteic post-traducciona, en el qual, tal i com ocorre amb l'*splicing* de RNA, dos fragments que flanquegen la inteïna (anomenats exteïnes) són units entre sí.

Aproximadament el 70% de les inteïnes conegudes resideixen en proteïnes hoste involucrades en la replicació i reparació de DNA. Aquests elements proteics normalment contenen entre 100 i 600 aminoàcids, i estan compostats per dos regions diferenciades: un domini de *splicing* proteic i un domini amb activitat endonucleasa (Sharma *et al.*, 2006).

Estudis basats en l'alineament de seqüències de diferents inteïnes, han permès identificar els residus conservats que estan involucrats en les reaccions de *splicing* en punts propers al lloc de tall. L'estructura general de qualsevol inteïna presenta residus Cys i Ser a N-terminal, i residus Asn i His a C-terminal. Els grups hidroxil, sulfhidril i amino són els grups reactius que intervenen en la sèrie de reaccions nucleofíliques que permeten l'*splicing*. El paper clau d'aquests aminoàcids catalítics ha resultat evident després d'observar l'efecte de la seva substitució puntual, sobre les reaccions coordinades de *splicing* proteic *in vivo* (Sharma *et al.*, 2006). La substitució de l'Asn present en l'extrem C-terminal de la inteïna per una Ala bloqueja l'autoprocessament en aquest extrem, però manté intacte el tall a l'extrem N-terminal de la inteïna. De la mateixa manera, la substitució de la Cys per Ala en N-terminal només permet el tall a C-terminal (Chong *et al.*, 1998 i Mathys *et al.*, 1999).

L'aplicació de les inteïnes en el camp biotecnològic de producció i purificació de proteïnes recombinants, ha estat possible mitjançant inteïnes modificades genèticament, l'acció de les quals pot ser induïda o regulada *in vitro* sota condicions controlables com l'addició d'agent reductor o el canvi gradual de temperatura i pH (Banki i Wood, 2005).

L'habilitat de controlar l'*splicing* proteic promogut per les inteïnes, i la seva aplicació en el camp de la purificació de proteïnes recombinants mitjançant elements d'afinitat fusionats, han estat comercialitzats a través del sistema IMPACT[®] de New England Biolabs (Beverly, MA). Aquest sistema de purificació utilitza diferents inteïnes modificades i induïbles, unides a un domini d'afinitat a quitines CBD (*Chitin Binding Domain*) (Sharma *et al.*, 2006).

Estudi i plantejament de l'aplicabilitat de les inteïnes a la tecnologia Zera[®].

En el primer capítol de resultats, els problemes de citotoxicitat derivats de la producció d'enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera[®] en dos sistemes hoste d'expressió diferents, han posat en evidència la inviabilitat de la producció pròpia d'EK per a la digestió de proteïnes de fusió Zera[®].

Per aquesta raó i de forma paral·lela, es varen desenvolupar noves estratègies encaminades a la digestió de proteïnes de fusió amb Zera[®]. Les inteïnes, amb el seu potencial d'aplicació a sistemes de purificació, varen resultar les eines de processament més atractives per a l'estudi de la seva aplicabilitat a la tecnologia Zera[®].

Per poder realitzar un estudi complet, i tractant-se d'una estratègia de processament en la qual la proteïna d'interès i la inteïna formen part de la mateixa proteïna de fusió, es va escollir una proteïna model que permetés un seguiment i traçabilitat senzills. L'hormona humana de creixement (hGH- *human Growth Hormone*) apart de ser una proteïna amb alt interès terapèutic, satisfà en major grau aquests requisits, i per tant fou escollida per a la valoració de les inteïnes com a mètode de processament de proteïnes de fusió Zera[®].

Inteïna SspDnaB

La inteïna SspDnaB és una mini-inteïna modificada de 18kDa que prové de la DNAB helicasa del cianobacteri *Synechocystis sp.* La seva modificació consisteix en l'eliminació del domini amb activitat endonucleasa, i en la substitució de la Cys1 per una Ala per tal d'evitar el tall en aquest punt. La seva activitat autocatalítica es manté gràcies al residu Asn154, la inducció de la qual es dona amb un canvi gradual de pH cap a valors pròxims a 7, i a una temperatura propera als 25°C (Sun *et al.*, 2005).

L'interès del següent estudi és el de determinar l'aplicabilitat de la inteïna SspDnaB a la tecnologia Zera[®] en diferents hostes cel·lulars, tot valorant els nivells d'expressió i l'eficiència de processament assolits en cada un d'ells. Concretament, es varen escollir dos sistemes d'expressió: un basat en cèl·lules de mamífer CHO, i l'altre basat en cèl·lules d'insecte Sf9.

El gen que codifica per la inteïna SspDnaB va ser adquirit comercialment a partir del vector pTWIN1 de NEB (*New England Biolabs*). Mitjançant l'amplificació d'aquest gen per PCR, es

varen poder afegir les dianes de restricció necessàries per al disseny de la construcció corresponent a la proteïna de fusió Z-DnaB-hGH.

Expressió de proteïnes de fusió Z-DnaB-hGH en cèl·lules CHO

Les cèl·lules transfectades amb aquesta construcció, varen ser recol·lectades 3 dies després de la transfecció per tal d'analitzar-ne l'expressió mitjançant 5µg d'extracte proteic total, resultats en un immunoblot incubat amb anticossos contra R8 i contra hGH (fig. 4.16).

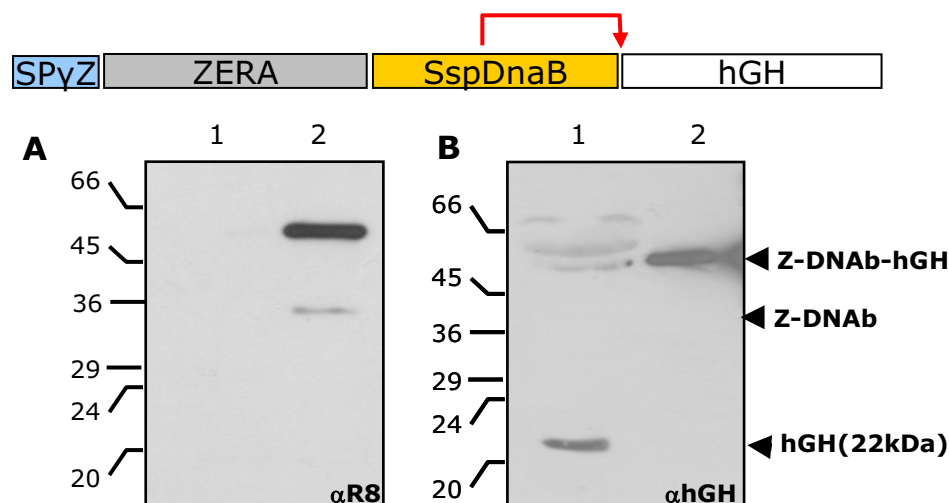


Figura 4.16. Expressió proteica de Zera®-SspDnaB-hGH en cèl·lules CHO transfectades transitòriament. **A:** Immunoblot utilitzant l'anticòs contra R8 **B:** Immunoblot incubat amb anticòs contra hGH. El carril 1 correspon a la fracció del medi, i el carril 2 a 5µg d'extracte proteic total.

A la fracció cel·lular mostrada a la figura 4.16.A, detectem una banda corresponent a la mida de la fusió sencera (56 kDa) i una banda de mida inferior, que té una mobilitat electroforètica corresponent al fragment Z-DnaB (35kDa). En l'immunoblot incubat amb l'anticòs anti-hGH (fig. 4.16.B), observem una banda de 22kDa corresponent a hGH a la fracció corresponent al medi de cultiu de les cèl·lules. Aquest anàlisi ens indica de l'existència de certa activitat autocatalítica *in vivo* que produeix la secreció de la hGH alliberada al medi extracel·lular. Si bé aquest fenomen té lloc de forma incontrolada *in vivo*, considerant la quantitat de proteïna de fusió intacta acumulada, podem afirmar que es tracta d'un processament minoritari. NEB és l'empresa que comercialitza aquesta inteïna com a part d'un sistema de purificació que ha estat dissenyat per a la seva aplicació en sistemes d'expressió basats en *E.coli*. Els manuals d'instruccions corresponents (IMPACT™-Twin -NEB), revelen que l'autoprocessament *in vivo* podria ser pal·liat modificant condicions d'expressió tals com la temperatura del cultiu o la concentració d'IPTG utilitzada per a induir l'expressió en aquests bacteris. De totes maneres, totes les mesures serien de caire pal·liatiu, sense assolir una inhibició total d'aquest fenomen. Tenint en compte que aquest processament fou minoritari, no es va modificar cap condició d'expressió en aquest hoste per tal de no alterar negativament els rendiments d'expressió assolits fins al moment.

Per tal de determinar si Zera[®] fusionat a la inteïna DnaB i a hGH, era capaç de promoure l'acumulació d'aquesta proteïna de fusió a cos proteic, es va resoldre l'extracte cel·lular en un gradient discontinu format per coixins de sacarosa del 10, 27, 35, 42 i 56% (p/p). Comparat amb els gradients realitzats quan expressàvem Z-EK, aquesta vegada havíem realitzat una substitució del coixí de 19 pel de 35% de sacarosa per tal de separar més eficientment els cossos proteics d' altres compartiments intracel·lulars. Així doncs, volums equivalents de les interfases resultants varen ser analitzades per *Western Blot* (fig 4.17).

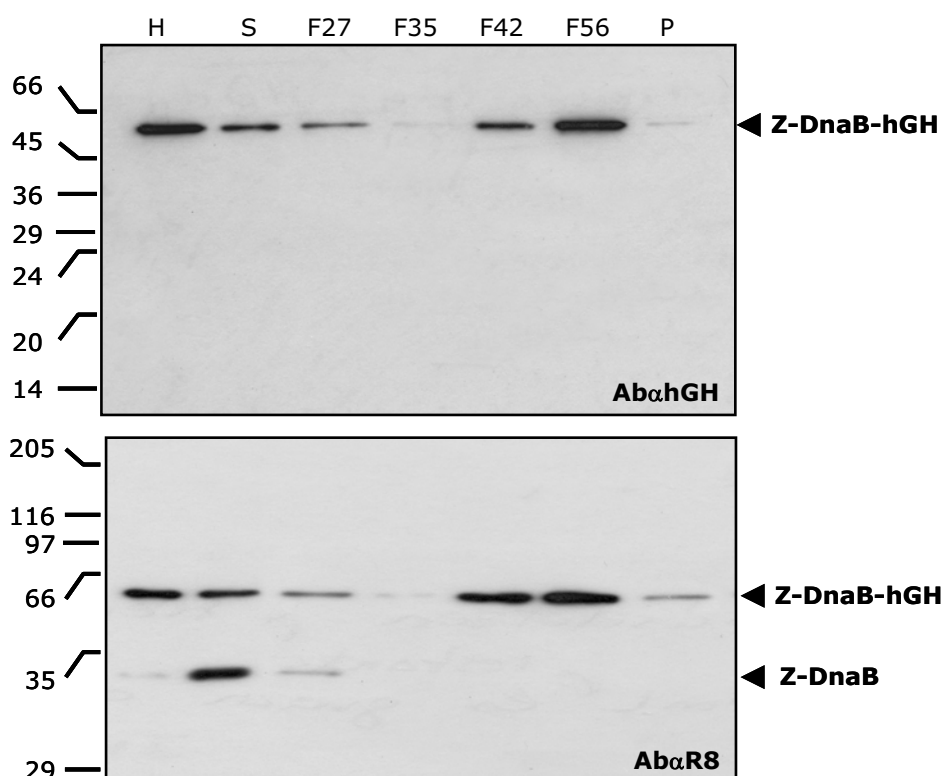


Figura 4.17. Gradient de densitat de sacarosa. Immunoblots incubats amb anticòs α R8 i α hGH. H correspon a l'extracte cel·lular de partida. S: sobrenedant. F35, F42 i F56 corresponen a les interfases del gradient, amb el percentatge de sacarosa de cada una de les fraccions. P correspon al pellet del gradient.

Els resultats ens mostren que la majoria de la proteïna de fusió es troba en les fraccions de major densitat (F42 i F56), corresponents a estructures denses de tipus proteic (densitat superior a $1,22 \text{ g/cm}^3$), tot i que també apareix una mínima part de fusió en la fracció soluble. A l'immunoblot incubat amb l'anticòs contra R8, detectem un dels productes d'autoprocessament *in vivo*, Z-DnaB en les fases solubles del gradient. Aquest fet ens podria indicar que l'autoprocessament *in vivo* té lloc sobre la proteïna de fusió soluble que no és acumulada a cos proteic. Com ja hem mostrat a la figura anterior, la banda corresponent a la hGH alliberada *in vivo* no la detectem en aquesta figura, perquè un cop processada segueix la via de secreció cap al medi.

L'acumulació de la fusió Z-DnaB-hGH a cos proteic també va ser corroborada mitjançant l'anàlisi de les cèl·lules transfectades per immunocitoquímica, utilitzant l'anticòs anti-hGH (fig. 4.18). Les imatges obtingudes per microscòpia òptica de fluorescència mostren un patró típic d'acumulació en estructures de tipus cos proteic. Tot i que s'aprecien mides molt diferents entre els cossos proteics, la mida predominant oscil·la entre 1-2µm.

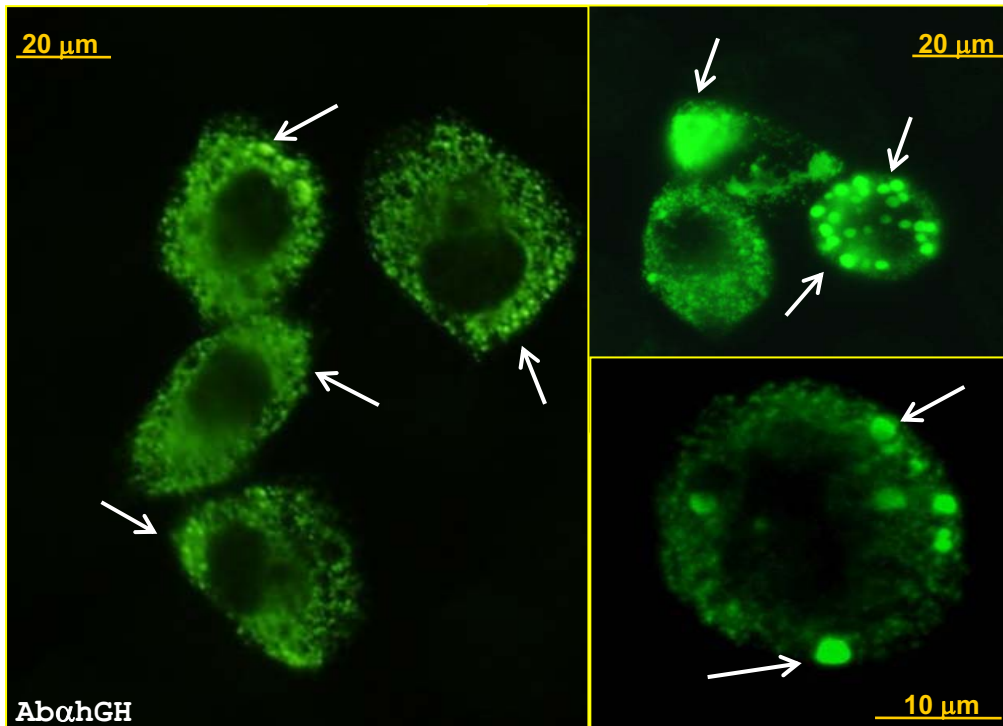


Figura 4.18. Immunofluorescència de cèl·lules CHO transfectades amb Z-DnaB-hGH. Incubació amb anticòs contra hGH. Imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència. Alguns cossos proteics estan marcats amb fletxes.

Per tal de comprovar que l'acumulació de la proteïna recombinant en cossos proteics heteròlegs és independent de la proteïna interès fusionada a C-terminal, es va voler repetir aquest estudi amb dues proteïnes fluorescentes: ECFP (*Enhanced Cyan Fluorescent Protein*) i DsRED (*Discosoma sp. RED*), ambdues posicionades a C-terminal. La figura 4.19 mostra el resultat de l'anàlisi comparatiu d'acumulació de Zera[®]-ECFP (A), d'ECFP d'expressió citoplasmàtica (B), i de Zera[®]-SspDnaB-ECFP (C i D), per microscòpia de fluorescència. Tal i com es pot observar, les construccions que contenen Zera[®] mostren un patró d'acumulació en estructures ben definides de tipus cos proteic, mentre que l'expressió control d'ECFP d'acumulació intracel·lular, mostra una senyal fluorescent de distribució citoplasmàtica uniforme.

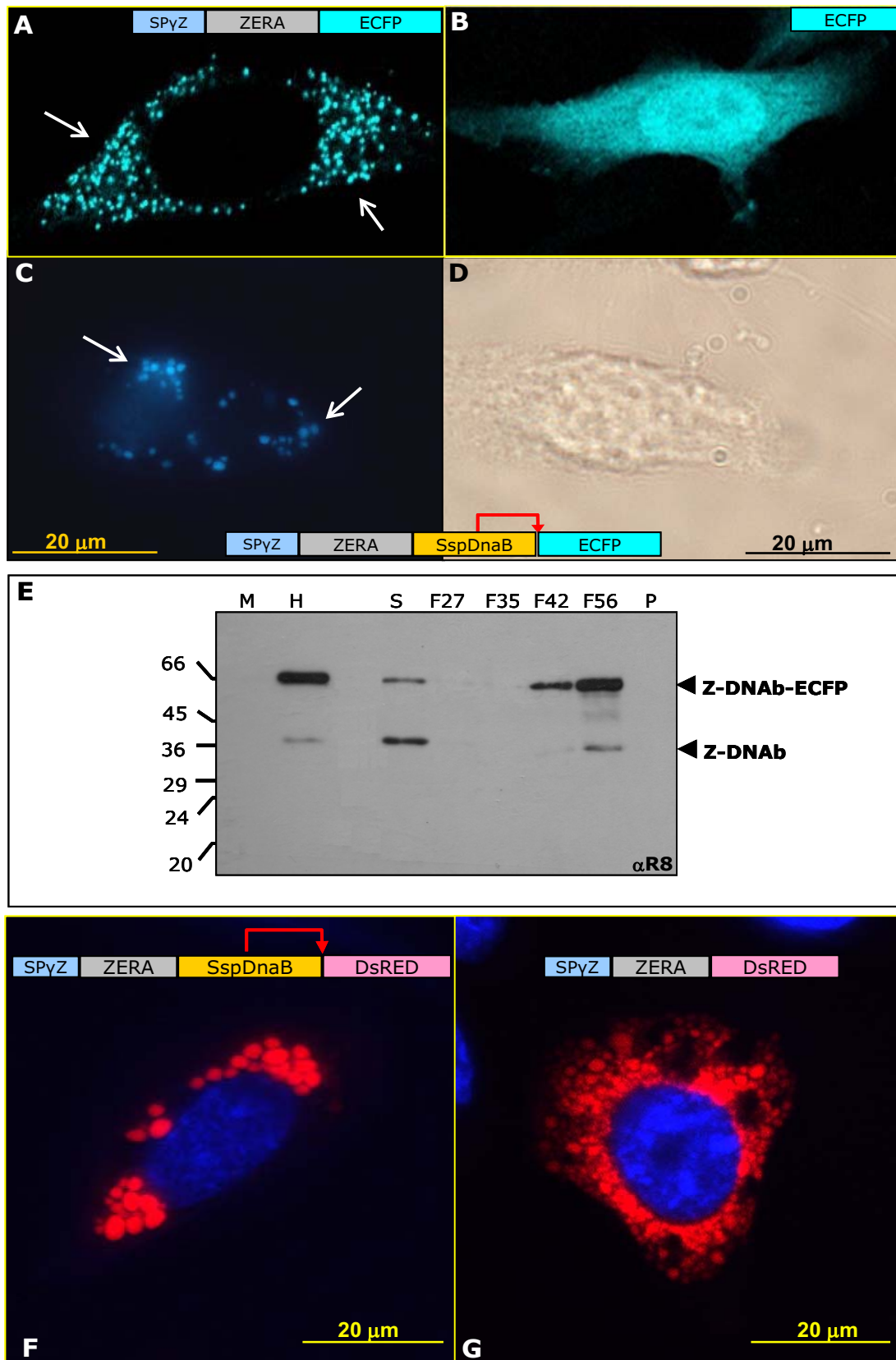


Figura 4.19 Acumulació de Zera[®]-SspDnaB-ECFP i Zera[®]-SspDnaB-DsRED en cèl·lules CHO transfectades. Imatges obtingudes mitjançant microscòpia de fluorescència sobre cèl·lules CHO transfectades. **A:** Expressió de SP_γZ-Zera[®]-ECFP. Algunes estructures de tipus cos proteic indicades amb fletxes **B:** Expressió de ECFP sense senyal de secreció. **C:** Expressió de SP_γZ-Zera[®]-SspDnaB-ECFP. Algunes estructures de tipus cos proteic indicades amb fletxes. **D:** Imatge de microscòpia de camp clar corresponent a C. **E:** Western Blot corresponent a les diferents fraccions del gradient de

densitat corresponent a Zera®-SspDnaB-ECFP. M: correspon a la fracció equivalent del medi de les cèl·lules. H: correspon a l'extracte cel·lular de partida. S: sobrenedant. F35, F42 i F56 corresponen a les interfases del gradient, amb el percentatge de sacarosa de cada una de les fraccions. P correspon al pellet del gradient. Immunoblot incubat amb anticòs contra R8. **F:** Expressió de SP_γZ-Zera®-SspDnaB-DsRED **G:** Expressió de SP_γZ-Zera®-DsRED. Els muntatges corresponents a les cèl·lules expressant DsRED varen ser tractats amb DAPI per tenyir els nuclis.

La imatge inferior (fig. 4.19.E), corresponent a l'anàlisi del gradient per *Western Blot*, mostra que la majoria de proteïna de fusió (~64 kDa) és acumulada a la fracció F56, i en menor grau a la F42. D'altra banda, hi ha una part minoritària de proteïna recombinant que roman a la fracció soluble (S), la majoria de la qual ha sofert autoprocesament *in vivo*. El corresponent immunoblot incubat amb l'anticòs contra ECFP donava resultats equivalents, però amb certa senyal inespecífica, amb el qual no es varen incloure en aquesta sèrie de resultats. Si bé observem certa proteïna de fusió en fraccions subcel·lulars solubles, aquesta representa una porció minoritària i podria ser deguda a altres factors relatius a la mida de la proteïna de fusió sencera, la solubilitat de la proteïna d'interès fusionada, o la presència de la inteïna com a linker entre Zera® i la proteïna d'interès en qüestió.

L'estudi comparatiu sobre la capacitat de formació de cos proteic en absència o presència de la inteïna a la proteïna de fusió final, també va ser analitzat mitjançant la transfecció a cèl·lules CHO, de dues noves construccions amb una altra proteïna fluorescent, la DsRED. Així, Zera®-DsRED i Zera®-DnaB-DsRED varen ser transfectades a cèl·lules CHO i analitzades 3 dies post-transfecció mitjançant microscòpia de fluorescència mitjançant el filtre adequat per detectar senyal fluorescent provinent de l'espectre vermell. Els nuclis d'aquestes cèl·lules varen ser tenyits amb DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) fluorescent, que interacciona específicament amb el DNA. Tal i com podem observar a les imatges 4.19.F i 4.19.G, ambdues construccions promouen la formació i acumulació de la proteïna recombinant en estructures de tipus cos proteic similars, sense distincions significatives en nombre i mida.

Amb el conjunt de resultats obtinguts i mostrats a la figura 4.19, podem concloure que la introducció de la inteïna SspDnaB a les proteïnes de fusió Zera® no altera la capacitat de formació de cos proteic, presentant una densitat i forma típiques d'altres proteïnes de fusió Zera® expressades en cèl·lules CHO. Aquest fet va ser constatat amb tres tipus de proteïnes d'interès diferents: hGH, ECFP i DsRED.

Obtenció de hGH recombinant a partir de la fusió de Zera®-DnaB-hGH acumulada en cossos proteics de cèl·lules CHO.

Un cop establert que la fusió Z-DnaB-hGH s'acumula en estructures de tipus cos proteic en cèl·lules CHO, els esforços es varen centrar en la recuperació de la proteïna recombinant mitjançant l'aïllament i solubilització dels cossos proteics.

L'aïllament de cossos proteics es va dur a terme per centrifugació directa a 1500g, durant 10 minuts a 4°C, seguint el protocol posat a punt en el primer apartat de resultats d'aquest treball. Sobre aquest sediment, es varen provar diferents condicions de solubilització per estudiar les compatibilitats d'alguns detergents amb l'activitat de la inteïna (fig. 4.20). Els agents solubilitzants que es varen emprar foren: Triton X-100 0,5%, SDS 0,1%, NDSB 195 (*Non-Detergent SulfoBetaine*) 1mM, i Triton X-114 5%, tots ells en un tampó Tris 20mM pH 8.5, NaCl 200mM, EDTA 1mM, i TCEP 1mM. Per permetre una desagregació i solubilització eficient, les mostres varen ser incubades a 37°C durant 2 hores. Després, i per tal de permetre la inducció de l'autoprocessament, les mostres varen ser dialitzades durant 16 i 48 hores contra el tampó d'inducció del tall: Tris-HCl 20mM pH 7.02, NaCl 200mM, EDTA 1mM, durant 48 hores, a 25°C.

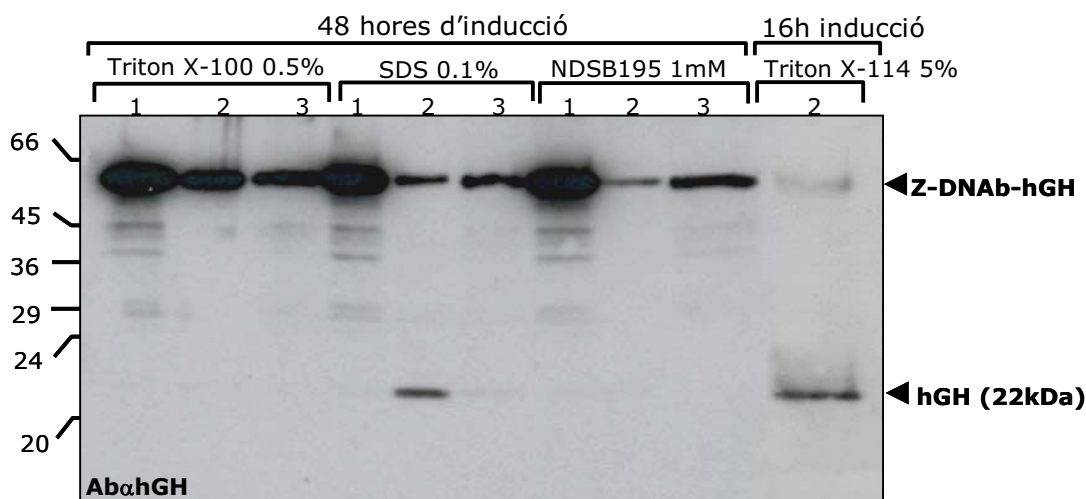


Figura 4.20. Inducció de l'autoprocessament de Zera®-SspDnaB-hGH provinent de cossos proteics aïllats i solubilitzats amb diferents detergents. Carril 1: Fusió abans d'induir i solubilitzar (sobrecarregat 4 vegades). Carrils 2 i 3: fracció soluble i insoluble (respectivament) de la fusió solubilitzada amb diferents detergents, i induïda durant 16 / 48 hores a pH7 i 25°C. Immunoblots incubats amb l'anticòs α hGH.

La figura 4.20 ens mostra el resultat de la solubilització i de la inducció en presència de diferents detergents o agents solubilitzants. El carril 1 correspon al material de partida abans de la inducció del tall (4 vegades sobrecarregat). Els carrils 2 i 3 corresponen a la fracció soluble i insoluble (respectivament) després de la inducció de l'autoprocessament. La fracció insoluble que queda després del tractament amb Triton X-114, no s'ha pogut resoldre en el gel de SDS-PAGE degut a l'excés de detergent present a la mostra. La banda inferior de 22 kDa correspon a la mobilitat electroforètica esperada per a la hGH alliberada. La detecció d'aquest producte en la fracció soluble només va donar-se en els tractaments de solubilització en presència de SDS i Triton X-114. Tenint en compte que la llargària d'ambdós processos d'inducció foren diferents, l'aparició del producte processat fou major en presència de Triton X-114. Aquest fet indica que l'activitat de la inteïna pot veure's alterada amb pretractaments de solubilització diferents. És important recalcar

que la conformació que adopta la inteïna és essencial per a desencadenament de les reaccions implicades en l'*splicing* proteic.

El càlcul de l'eficiència de l'autoprocessament fou determinat a partir de les intensitats de les bandes corresponents a les mostres induïdes i no-induïdes titrades en un gel SDS-PAGE i analitzades per *Western Blot* amb anticòs anti-hGH (imatge no mostrada). La imatge fou processada i quantificada mitjançant el programari QuantityOne (BioRad). El percentatge d'autoprocessament fou calculat a partir de la relació entre el producte d'autoprocessament (hGH) i la proteïna de fusió precursora (no induïda). Com a resultat, vàrem obtenir una eficiència pròxima al 5% en les condicions en les quals havíem emprat SDS per solubilitzar els cossos proteics. Pel cas del Triton X-114, els valors d'eficiència de tall obtinguts foren del 16%. Lluny de ser un valor aplicable a un procés de producció cost-efectiu, una explicació a aquests baixos rendiments radica en la sensibilitat que presenta aquesta inteïna pels residus adjacents al lloc d'autoprocessament (Mathys et al., 1999 i IMPACT™-TWIN versió 1.4- NEB).

Per tal d'assegurar-nos que la hGH processada no fou producte d'un processament inespecífic degut a l'acció d'altres proteases, es va dissenyar una construcció amb una inteïna SspDnaB no processable. Amb aquesta finalitat, l'Asn 154 crucial per l'auto-excissió, va ser substituïda per un residu Ala mitjançant mutagènesi dirigida per PCR. Tal i com està descrit en la literatura, aquesta substitució permet inhibir completament el processament a C-terminal de la inteïna (Mathys *et al.*, 1999). La construcció resultant Z-(N154A)DnaB-hGH fou transfectada en cèl·lules CHO en les mateixes condicions que les emprades per a Z-DnaB-hGH.

Les fraccions de cos proteic aïllades per centrifugació directa a 1500g, corresponents a les dues construccions: Z-(N154A)DnaB-hGH i Z-DnaB-hGH; varen ser solubilitzades en el tampó de solubilització Tris 20mM pH7, NaCl 200mM, EDTA 1mM, SDS 0,1% i TCEP 0,1mM a 37°C, durant 2 hores. L'activitat de la inteïna va ser induïda en paral·lel, mitjançant una incubació a 25°C en agitació durant 48 hores, de la mostra dialitzada contra el tampó d'inducció descrit anteriorment. Després de la inducció de l'autoprocessament, la mostra va ser centrifugada a 16000g durant 10 minuts, i el sobrenedant (1) i el pellet (2) varen ser analitzats per *Western Blot* amb anticòs anti-R8 i anti-hGH (fig. 4.21).

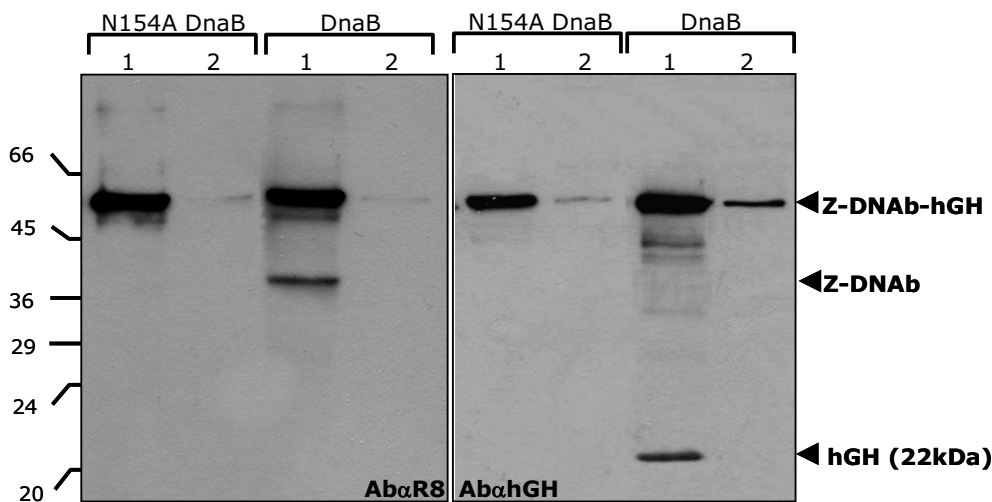


Figura 4.21. Efecte de la substitució N154A sobre l'activitat de la inteïna SspDnaB. La fracció de cossos proteïcs aïllats de les dues proteïnes de fusió: Z-DnaB-hGH i Z-(N154A)DnaB-hGH varen ser solubilitzades i induïdes per a l'autoprocessament de la inteïna DnaB. 1 correspon a la mostra soluble i induïda i 2 a la mostra insoluble i induïda. *Western Blot* utilitzant anticossos contra R8 (esquerra) i hGH (dreta).

Tal i com podem observar en aquesta figura, ambdues proteïnes de fusió varen ser solubilitzades, però només la fusió contenint la forma activa de la inteïna (Z-DnaB-hGH) va ser capaç d'autoprocessar-se i promoure l'alliberament dels productes hGH i Z-DnaB. L'absència d'activitat de processament en la mostra contenint la proteïna de fusió mutada (Z-(N154A)DnaB-hGH), demostra que l'autoprocessament observat per a Z-DnaB-hGH és degut a una activitat específica de la inteïna, i no degut a la presència d'una activitat proteasa endògena co-purificada durant l'aïllament de cossos proteïcs.

Podem concloure, per tant, que la inteïna SspDnaB resulta activa quan forma part de proteïnes de fusió Zera[®] expressades en cèl·lules CHO.

Tot i així, per tal de valorar el seu potencial respecte altres sistemes de processament existents, els nivells d'expressió assolits en aquest hoste no foren suficients per a prosseguir amb les següents etapes necessàries per a obtenir el producte pur, i valorar el rendiment del procés. Per aquesta raó, i arribat a aquest punt, fou necessària la cerca d'altres sistemes d'expressió alternatius que permetessin nivells d'acumulació superiors.

Expressió de proteïnes de fusió Zera-DnaB-hGH en cèl·lules d'insecte Sf9

L'interès del següent estudi fou el de determinar l'activitat autocatalítica de la inteïna SspDnaB en cèl·lules d'insecte, concretament de la línia cel·lular *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9), en el qual s'assoleixen elevats nivells d'expressió mitjançant la seva infecció per baculovirus recombinants.

La seqüència que codifica per la proteïna de fusió Z-DnaB-hGH, va ser clonada en el vector pBacPak8, en una regió no essencial per a la replicació del baculovirus, corresponent al gen de la polihedrina. A partir de la transferència del DNA d'interès en el genoma viral, es varen preparar

stocks de virus recombinant mitjançant tècniques d'amplificació de virus, descrites en l'aparat de materials i mètodes. Posteriorment a la titulació d'aquest virus, el monitoratge de l'expressió de la proteïna recombinant es va realitzar mitjançant el seguiment de l'expressió a diferents hores post-infecció i diferents MOI (*Multiplicity Of Infection*), per *Western Blot* amb anticòs anti-hGH (fig. 4.22).

A la fracció cel·lular corresponent a cèl·lules Sf9 infectades amb baculovirus recombinant Z-DnaB-hGH, detectem una banda immunoreactiva predominant corresponent a la mida de la fusió sencera (56 kDa), i una banda de mida inferior amb una mobilitat electroforètica corresponent a hGH (22kDa).

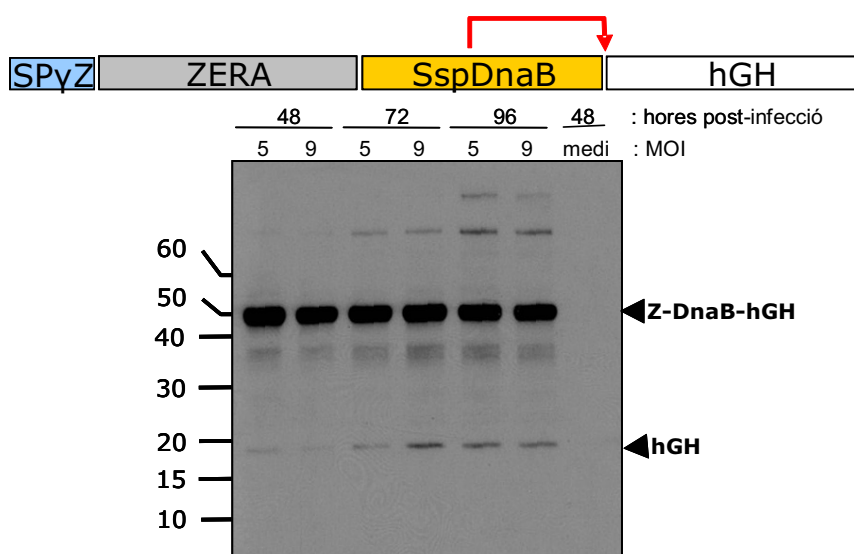


Figura 4.22 Expressió proteica de Zera®-SspDnaB-hGH a cèl·lules d'insecte (Sf9) infectades amb baculovirus recombinant. Immunoblot amb l'equivalent a 0,5 µg de proteïna total per a cada extracte, a diferent MOI i hores post-infecció. Detecció mitjançant anticòs contra hGH.

Tal i com podem observar a la figura 8, la presència d'autoprocessament *in vivo* és més evident a mesura que augmenta el temps post-infecció. Tot i que la proporció de hGH processada és molt minoritària, a l'hora de establir les millors condicions d'expressió, varem considerar la condició amb millors nivells d'acumulació i menor presència d'autoprocessament *in vivo*. Aquest estudi es va portar a terme mitjançant anàlisi densitomètric per Quantity One (BioRad) sobre totes les bandes immunoreactives, amb el qual es varen poder fixar les condicions de producció de Z-DnaB-hGH a MOI 5 i 72 hores post-infecció.

Un cop establertes les condicions de producció de Z-DnaB-hGH a cèl·lules Sf9, la següent comprovació va centrar-se en la localització i capacitat d'acumulació d'aquesta proteïna recombinant en cossos proteïcs heteròlegs.

La figura 4.23 correspon a la imatge obtinguda per microscòpia confocal de cèl·lules Sf9 infectades amb la proteïna de fusió, fixades i incubades amb l'anticòs primari anti-hGH i secundari

Alexa Fluor[®] 488. La imatge de l'esquerra correspon a la projecció global de les seccions òptiques d'1µm d'una de les cèl·lules infectades. A la dreta trobem la imatge correlativa obtinguda per microscòpia de contrast d'interferència diferencial (DIC). La senyal fluorescent detectada, ens indica la localització de la proteïna recombinant Z-DnaB-hGH en estructures de tipus cos proteic de mida aproximada a 0,5µm.

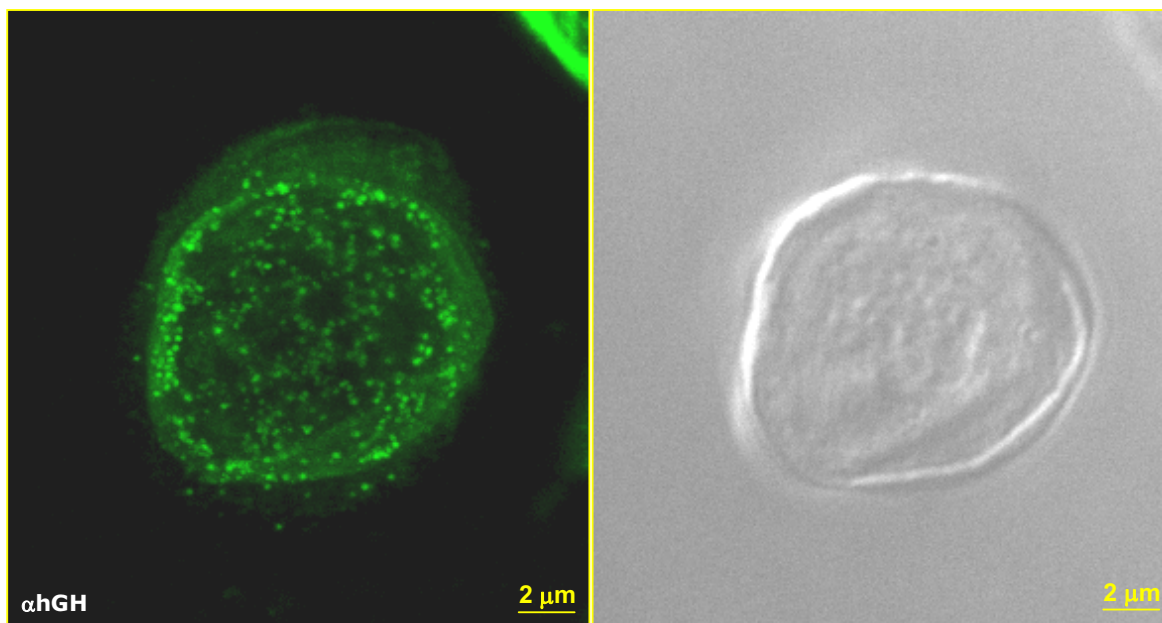


Figura 4.23. Anàlisi de l'acumulació de Zera®-SspDnaB-hGH en cèl·lules Sf9 mitjançant microscòpia confocal de fluorescència. Projecció total de seccions d'1µm corresponents a la immunocitoquímica realitzada amb anticòs contra hGH (esquerra). Imatge correlativa obtinguda per microscòpia DIC (dreta).

Per tal de determinar la densitat dels compartiments que acumulen Z-DnaB-hGH en cèl·lules Sf9, es va procedir a realitzar un gradient de densitat Optiprep[™]. Aquest compost està basat en una solució de Iodixanol que permet mantenir l'osmolalitat evitant que la diferència de soluts pugui malmetre l'estructura dels compartiments intracel·lulars. Així, l'homogenat cel·lular es va resoldre en un gradient discontinu amb coixins del 10, 18, 26, 32 i 50 % d'Iodixanol (p/v). Després de dues hores d'ultracentrifugació, volums equivalents de les interfases resultants, varen ser analitzats per *Western Blot* amb antisèrum de hGH (fig. 4.24.A). Els resultats ens mostren que la majoria de la proteïna de fusió recombinant es troba a una fracció densa del gradient (F32 – 1.19g/cm³), corresponent a la densitat típica dels cossos proteics naturals.

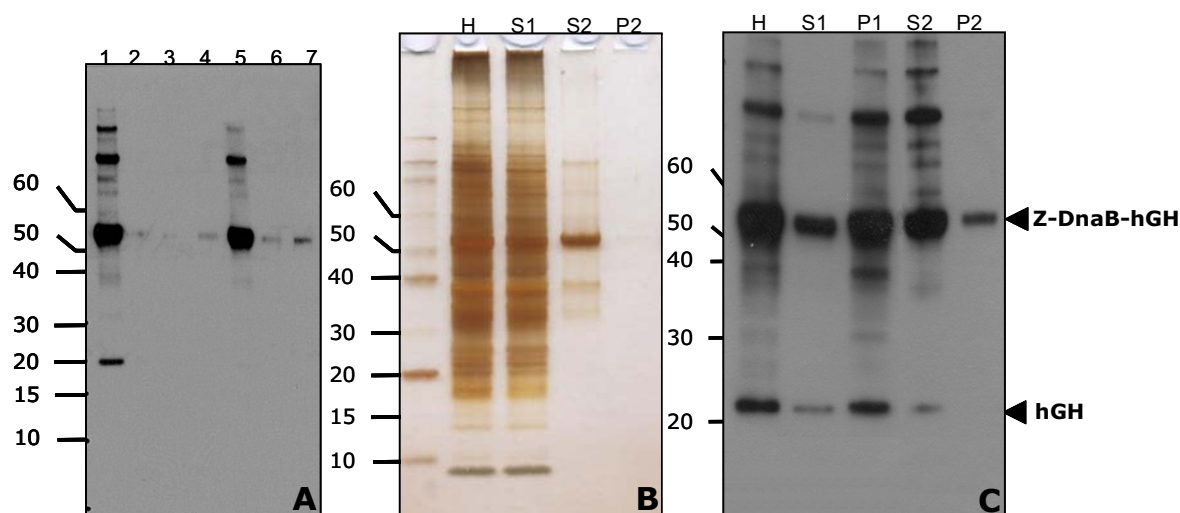


Figura 4.24. Procés de recuperació de cossos proteics Zera®-SspDnaB-hGH per gradient de densitat i centrifugació directa. A: Immunoblot de les interfases del gradient de densitat (anticòs contra hGH). 1 correspon a l'homogenat d'entrada al gradient. 2 al sobrenedant. 3, 4, 5, i 6, corresponen a les interfases amb el percentatge de iodixanol F18, F26, F32 i F50, respectivament. 7 correspon al pellet del gradient, format majoritàriament per debris cel·lulars. **B:** Tinció per nitrat de plata del procés sencer de recuperació de cossos proteics fins a solubilització. H correspon a l'homogenat cel·lular de partida. S1 al sobrenedant resultant de la baixada de cossos proteics per centrifugada directa, P1 correspon a la fracció de cossos proteics. S2 i P2 corresponen al sobrenedant i pellet, respectivament, de la solubilització dels cossos proteics **C:** Anàlisi del *downstream* per WB amb anticòs contra hGH.

Obtenció de hGH recombinant a partir de Zera®-DnaB-hGH en cèl·lules d'insecte Sf9.

Aquest nou sistema d'expressió basat en cèl·lules d'insecte permetia la formació i acumulació de proteïnes de fusió Zera® en estructures típiques de cos proteic amb uns nivells d'acumulació superiors als obtinguts en cèl·lules CHO. Tot i així, les etapes relatives a la recuperació de la proteïna d'interès havien de ser posades novament a punt, ja que l'elevada presència de baculovirus (10^6 - 10^9 ml⁻¹) provocava que l'entorn sobre el qual s'havia de purificar la proteïna recombinant, contingués elevades quantitats de proteïnes víriques i DNA addicionals (Bernard *et al.*, 1996).

Així, per a les etapes d'homogenització cel·lular i aïllament de cossos proteics, es varen emprar eines de cisellament mecànic combinades amb detergents per tal de recuperar el màxim de proteïna recombinant, amb la mínima presència de contaminants.

Els resultats obtinguts aplicant el procés de *downstream* posat a punt per a cèl·lules Sf9 infectades foren excel·lents, sobretot tenint en compte el grau d'enriquiment obtingut durant les dues etapes principals recuperació proteica: aïllament i solubilització de cossos proteics (fig. 4.24.B).

La figura 4.24.B i C ens mostra el resultat d'aplicar el procés de *downstream* descrit en l'apartat de materials i mètodes per a la proteïna de fusió Z-DnaB-hGH en cèl·lules Sf9. En la primera etapa corresponent a la recuperació de cossos proteics, observem certa pèrdua de proteïna de fusió en el sobrenedant (S1). Aquesta proporció de proteïna de fusió expressada en la fracció soluble no arriba a acumular-se en cos proteic. La fracció de cos proteic, altament enriquida, fou

solubilitzada fàcilment en presència de detergent deoxicolat 0,75% i de DTT 10mM, durant una hora, a temperatura ambient. Els carrils corresponents a S2 i P2 són resultat de separar la fracció soluble i insoluble (respectivament), després de l'etapa de solubilització.

Un cop vàrem obtenir la proteïna de fusió soluble, vàrem procedir a les primeres proves d'inducció del processament mitjançant un canvi de pH. El primer contratemps amb què vàrem topar, va ser la insolubilitat que presenta el deoxicolat a valors de pH inferiors a 7,5. Aquest detergent iònic de tipus sal biliar, interacciona fortament amb les proteïnes impossibilitant la seva extracció total del de la mostra solubilitzada. La cerca d'agents de solubilització alternatius tals com els detergents Triton X-100, Triton X-114 i SDS varen donar resultats desfavorables de solubilització (dades no mostrades). Davant d'aquesta nova situació, la única possibilitat disponible fou l'extracció del deoxicolat per diferents mètodes basats en el bescanvi de tampó, com les columnes dessaladores PD-10 (GE-Healthcare), la diàlisi o la dilució de la mostra; tots ells amb un tampó compatible amb l'activitat de la inteïna SspDnaB: Tris 50mM pH 7, NaCl 300mM, EDTA 1mM. De nou, ens vàrem trobar com a resultat amb una mostra insoluble, i per tant, amb una inducció del tall mínima o nul·la (dades no mostrades).

L'addició de components estabilitzadors com el glicerol, o certes sals, durant el procés de canvi de tampó a través de la columna dessaladora o la diàlisi, tampoc no varen ajudar al manteniment de la solubilitat de la mostra prèviament a la inducció de l'autoprocessament. Per tant, davant d'aquesta situació, i tenint en compte que al mateix temps s'estava provant l'aplicació d'una altra inteïna induïble per a l'autoprocessament de proteïnes de fusió, es va considerar oportú centrar els esforços en la optimització de les condicions d'activitat de la inteïna MxeGyrA, en tres sistemes d'expressió diferents.

Inteïna MxeGyrA

El primer sistema de purificació basat en inteïnes fou comercialitzat per *New England Biolabs* mitjançant un sistema d'expressió procariota en el qual s'utilitzaven inteïnes d'autoprocessament induïble per tal de separar la proteïna d'interès del domini d'afinitat CBD. D'entre les inteïnes utilitzades mitjançant aquest sistema, MxeGyrA és una inteïna modificada induïble en condicions reductores. Provenent d'una DNA girasa de *Mycobacterium xenopi* (Telenti *et al.*, 1997), aquesta inteïna de 21kDa, conté 198 aminoàcids dels quals els residus Cys1 i Asn198 resulten essencials per al *splicing* proteic.

La inteïna utilitzada en el següent estudi presenta una substitució N198A per tal de bloquejar el processament a C-terminal, mantenint-lo a N-terminal en presència d'agents reductors. Per tant, la utilització de la inteïna MxeGyrA aplicada a la tecnologia Zera[®] suposa el posicionament de la proteïna d'interès hGH a N-terminal, i del domini Zera[®] a C-terminal.

L'estudi es va centrar en l'anàlisi de l'acumulació de la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z en tres hostes cel·lulars d'expressió diferents: cèl·lules de mamífer CHO, cèl·lules d'insecte Sf9, i planta de tabac *N. benthamiana*.

Com en el cas de la inteïna SspDnaB, el gen que codifica per la inteïna MxeGyrA va ser adquirit comercialment a partir del vector pTWIN1 de NEB (*New England Biolabs*). Mitjançant l'amplificació d'aquest gen per PCR, es varen introduir les dianes de restricció necessàries per a la construcció corresponent a la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z.

Expressió de proteïnes de fusió hGH-GyrA-Z en cèl·lules CHO

La seqüència codificant per la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z va ser clonada en el vector de transferència pcDNA3.1 per a la transfecció transitòria de cèl·lules de mamífer CHO adherents. Els anàlisis d'expressió es varen realitzar a 3 dies post-transfecció mitjançant immunoblot sobre 5µg d'extracte proteic total (fig. 4.25). La figura 4.25.A mostra el resultat de la immunodetecció per *Western Blot* del medi i l'extracte cel·lular mitjançant anticòs anti-hGH.

Tal i com havíem observat en el cas de la inteïna SspDnaB, detectem una banda corresponent a la proteïna de fusió sencera (58 kDa) a la fracció cel·lular, mentre que a la fracció corresponent al medi de cultiu detectem la banda corresponent a hGH (22kDa) que ha estat autoprocessada i secretada *in vivo*. Les mateixes mostres analitzades amb anticòs contra R8 (fig. 4.25.B), mostren que tota la proteïna recombinant immunoreactiva per al domini Zera[®], es troba exclusivament a la fracció cel·lular, on detectem tant la proteïna de fusió sencera, com el producte d'autoprocessament *in vivo* format per GyrA-Z (35kDa).

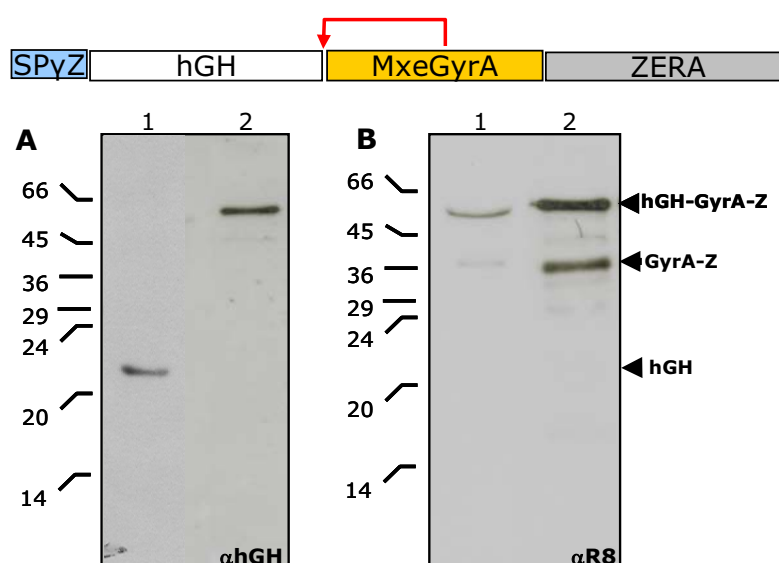


Figura 4.25. Expressió transitòria de hGH-GyrA-Z en cèl·lules CHO transfectades. **A:** Immunoblot utilitzant l'anticòs contra hGH **B:** Incubat amb anticòs contra R8. El carril 1 correspon a la fracció del medi, i el carril 2 a 5µg d'extracte proteic total.

L'estudi sobre la localització subcel·lular de la proteïna recombinant fou determinant per tal de conèixer el patró d'acumulació de la proteïna de fusió amb el domini Zera[®] posicionat a C-terminal. Com a les vegades anteriors, l'anàlisi es va dur a terme mitjançant tècniques immunocitoquímiques i de fraccionament subcel·lular per gradient de densitat (fig. 4.26). Tal i com mostra la imatge corresponent a l'anàlisi del gradient de densitat per *Western Blot* incubat amb anticòs anti-hGH (fig. 3.26.A), la majoria de la proteïna de fusió és acumulada a una de les fraccions més denses del contigut cel·lular (F56), corresponent a la densitat de 1,22 g/cm³ de compartiments com els cossos proteics.

Com ja s'havia observat amb la inteïna SspDnaB i amb la construcció control (sense inteïna), una petita part de la proteïna de fusió roman soluble i no forma cos proteic, cosa que podria reflectir el caràcter soluble que presenta la hGH, i que en menor grau pot induir a mantenir soluble a tota la proteïna de fusió de la que forma part.

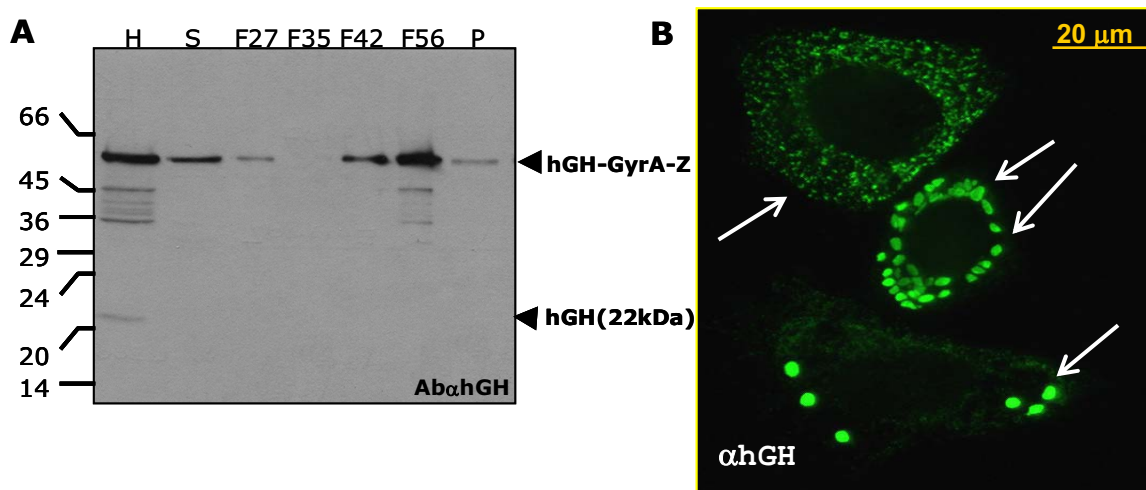


Figura 4.26. Cossos proteics recombinants de hGH-GyrA-Z. **A:** Gradient de densitat de sacarosa. Immunoblot incubat amb anticòs contra PI1. H correspon a l'extracte cel·lular de partida. S: sobrenedant. F35, F42 i F56 corresponen a les interfases del gradient, amb el percentatge de sacarosa de cada una de les fraccions. P correspon al pellet del gradient. **B:** Immunofluorescència de cèl·lules CHO transfectades amb hGH-GyrA-Z. Incubació amb anticòs contra hGH. Imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència. Alguns cossos proteics estan marcats amb fletxes.

La localització cel·lular de la proteïna hGH-GyrA-Z també va ser determinada per immunocitoquímica sobre cèl·lules adherents transfectades. La figura 4.26.B mostra algunes de les imatges obtingudes per microscòpia de fluorescència, en les quals hi podem detectar senyal fluorescent provinent d'estructures típiques de cos proteic. A la imatge superior d'aquesta figura, podem diferenciar un patró d'acumulació diferent en cada una de les cèl·lules identificades, presentant cossos proteics de mida i concentració diferent. Una de les hipòtesis que explicaria aquesta variabilitat en el patró d'acumulació de proteïna recombinant, podria raure en els diferents estadis de formació en què es troben els cossos proteics heteròlegs de cèl·lules diferents. Tot i que

el procés de formació i agregació de cossos proteics no és completament conegut, es té constància de la mida creixent que van adquirint els cossos proteics al llarg dels diferents estadis de formació (Conley *et al.* 2009). Una possible explicació de l'augment de mida d'aquestes estructures podria donar-se mitjançant la fusió de cossos proteics de mida més petita, que resulten en la formació de agregats més grans.

Demostrada l'acumulació de la proteïna de fusió en cossos proteics densos, el següent objectiu es va centrar en la seva solubilització i en la inducció de l'autoprocessament per alliberar hGH nativa.

Donat que tant la solubilització, com la inducció del tall per la inteïna MxeGyrA tenen lloc en condicions reductores, ambdues etapes es dugueren a terme simultàniament, amb el conseqüent estalvi d'etapes intermèdies dins del procés global de *downstream*.

Per tal d'obtenir el millor rendiment possible en els processos de solubilització i autoprocessament de la proteïna de fusió, es va realitzar un cribatge de condicions amb diferents additius. La figura 4.27.A mostra l'anàlisi de l'efecte d'algunes d'aquestes variables, com la presència o absència d'agent reductor i l'efecte de diferents detergents solubilitzants. Part de la mostra de partida va ser analitzada prèviament a l'etapa de solubilització/autoprocessament, per tal de controlar l'efecte produït per l'aplicació de cada variable en concret (carril1). Al cap de 16 hores de solubilització/inducció del tall a 25°C, les mostres foren centrifugades per separar la fracció soluble (carril 2) de la insoluble (carril 3), i analitzades per *Western Blot*. En l'immunoblot de la figura 4.27.A, comprovem que l'absència d'agent reductor i detergent, mantenen els cossos proteics insolubles i sense autoprocessar. Aquest control negatiu fou necessari per tal de controlar que l'agent reductor present en el tampó de càrrega SDS-PAGE no promogués la inducció del tall, donant com a resultat un fals positiu.

La presència d'agent reductor (50mM MESNA) en el tampó de solubilització/autoprocessament dels cossos proteics, promou la solubilització de bona part de la proteïna de fusió, així com la inducció del processament, amb alliberament de hGH. Aquest fet posa en evidència la necessitat de trencar els enllaços disulfur entre les cisteïnes del domini Zera[®], per tal de solubilitzar els cossos proteics.

La presència addicional de detergent en el tampó de solubilització afavoreix notablement la solubilització de la proteïna de fusió. El detergent no-iònic Triton X-100 en presència d'agent reductor és el que dóna més bons resultats en termes de solubilització i inducció de l'autoprocessament de hGH-GyrA-Z. Probablement, la presència d'una part de hGH processada en el material de partida sigui degut a l'efecte immediat del surfactant combinat amb la de l'agent reductor sobre la solubilització dels cossos proteics. El tractament amb detergent iònic SDS permet una solubilització completa dels cossos proteics, però l'activitat de la inteïna no es veu induïda

malgrat la presència d'agent reductor. Una possible explicació a aquest fet podria raure en què aquest detergent afecta a la conformació nativa de la proteïna de fusió, i el desplegament no permet que s'activi la reacció nucleofílica que inicia l'autoprocessament. Finalment, el tractament amb sulfobetaïna NDSB195 presenta un efecte solubilitzant minvat respecte els altres tractaments. La proteïna de fusió es troba repartida equitativament entre les fraccions soluble i insoluble, però a més, es detecta certa degradació proteica durant la incubació a temperatura ambient, com indica la devallada en la intensitat de la banda respecte el material de partida. Un fet observable en qualsevol dels tractaments, és que la hGH digerida es manté en la fracció soluble (no precipita), el qual suposa un indicatiu de que el seu plegament és estable.

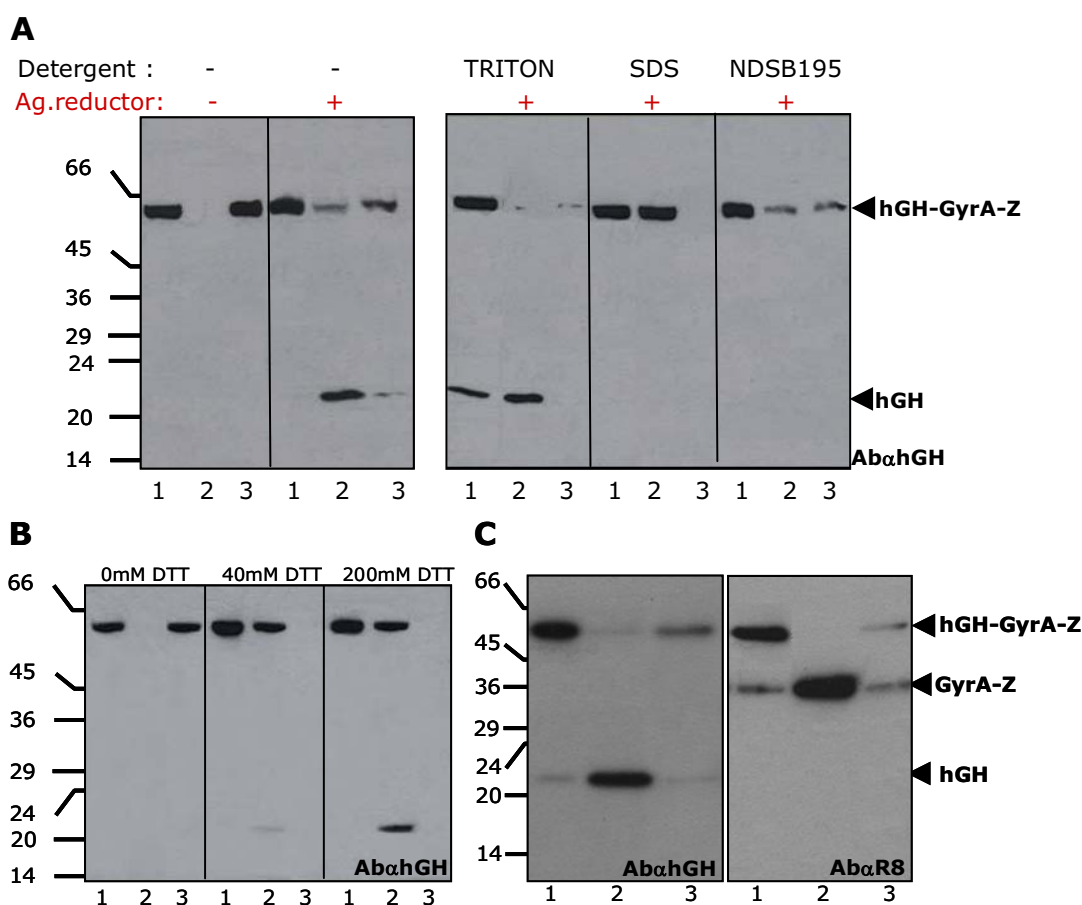


Figura 4.27. Inducció de l'autoprocessament de l'inteïna MxeGyrA en diferents condicions de solubilització i quantitats d'agent reductor. **A:** Cossos proteïcs aïllats i solubilitzats amb diferents agents solubilitzants, i en presència/absència d'agent reductor 50mM MESNA. **B:** Inducció del tall a diferents concentracions d'agent reductor DTT. **C:** Inducció del tall optimitzat amb les millors condicions de solubilització (Triton X-100 0,5%) i concentració d'agent reductor (50mM MESNA). Carril 1: Mostra de partida de cossos proteïcs prèviament a la solubilització i inducció del tall. Carrils 2 i 3: fraccions soluble i insoluble (respectivament) de la proteïna de fusió després d'una inducció de 16 hores a temperatura ambient, en cada una de les condicions indicades. Immunoblots incubats amb l'anticòs α hGH i α R8.

La inducció de l'autoprocessament mediat per la inteïna MxeGyrA també es va dur a terme en presència de diferents concentracions d'agent reductor (fig. 4.27.B). En aquest cas, es varen realitzar tractaments amb agent reductor DTT. Els cossos proteïcs aïllats per centrifugació, es varen

solubilitzar en presència de Triton X-100 0.5%, i de diferents quantitats d'aquest reductor: 0mM, 40mM i 200mM. La casa comercial recomana induir el tall en presència de 40mM DTT, però també varem voler determinar l'efecte d'un excés de DTT sobre l'activitat de l'autoprocessament. El resultat ens indica que s'obté una major proporció de producte autoprocessat en presència de 200mM DTT. Tot i així, aquesta concentració tant elevada d'agent reductor desestabilitza la conformació i naturalesa de moltes proteïnes que presenten interaccions de tipus pont disofre, i per tant, no és recomanable aplicar-l'ho com a protocol estàndard.

Per tal de fer una primera estimació del percentatge de tall obtingut a partir de la inducció de l'autoprocessament d'aquesta proteïna de fusió, es varen solubilitzar i induir cossos proteics aïllats per centrifugació a 1500g, en presència de Triton X-100 0,5% i MESNA 50mM. La inducció del tall es va dur a terme durant 16 hores a 25°C seguint les instruccions estandarditzades que ofereix la casa comercial. El resultat d'aquesta solubilització i inducció del tall es mostra a la figura 4.27.C. El carril 1 correspon a la mostra de partida abans de la solubilització i l'autoprocessament. Els carrils 2 i 3 corresponen a la fracció soluble i insoluble (respectivament) de la mostra després de la inducció del tall/solubilització.

Per tal de determinar l'eficiència de l'autoprocessament induït mitjançant aquest últim tractament, es va procedir a la quantificació de la intensitat de les bandes corresponents a hGH lliure, mitjançant l'anàlisi densitomètric que ofereix el software QuantityOne (BioRad). Segons aquest anàlisi, i agafant com a referència un valor del 100% per al material de partida, obtenim un percentatge de tall pròxim al 45%.

Malgrat que aquests valors preliminars indiquen un processament òptim per a la seva aplicació en processos de producció de proteïnes recombinants a gran escala, els nivells d'expressió assolits en aquest sistema requerien d'un anàlisi per *Western Blot* per tal de poder detectar la hGH sintetitzada, indicant que aquest hoste basat en cèl·lules CHO, no fou el ideoni per desenvolupar la producció de hGH fins a les etapes finals de purificació.

Expressió de proteïnes de fusió hGH-GyrA-Z a cèl·lules d'insecte Sf9

Per tal de poder millorar els valors de producció de hGH-GyrA-Z, ens vàrem proposar la seva síntesi mitjançant el sistema d'expressió de baculovirus (BEVS) en cultius de cèl·lules d'insecte.

A través de la infecció de cèl·lules d'insecte amb baculovirus recombinant s'obtenen elevats nivells d'acumulació, sobretot de proteïnes intracel·lulars.

El gen que codifica per hGH-GyrA-Z va ser clonat en el vector de transferència pBacPak8 per tal de permetre la co-transfecció de baculovirus mitjançant el sistema FlashBac (OET) descrit en l'apartat de material i mètodes. Un cop el DNA d'interès va ser inserit en el genoma viral, el

baculovirus recombinant va ser utilitzat per a la infecció de cèl·lules de la línia cel·lular d'insecte Sf9. El seguiment i valoració dels nivells d'expressió de la proteïna recombinant varen ser analitzats per *Western Blot* sobre extractes cel·lulars (0,5µg proteïna total) i sobre les fraccions del medi corresponents, a diferents hores post-infecció i emprant diferents graus de virulència regits per la MOI (*Multiplicity Of Infection*). Tal i com es pot observar a la figura 4.28, en totes les fraccions cel·lulars detectem una banda immunoreactiva amb l'anticòs contra hGH, que correspon a la proteïna de fusió sencera (58 kDa), i una doble banda de mida inferior (~22 kDa) que podria correspondre a variants de diferent mida de hGH autoprocessada *in vivo*. Aquest patró de bandes de hGH serà analitzat i detallat en apartats posteriors.

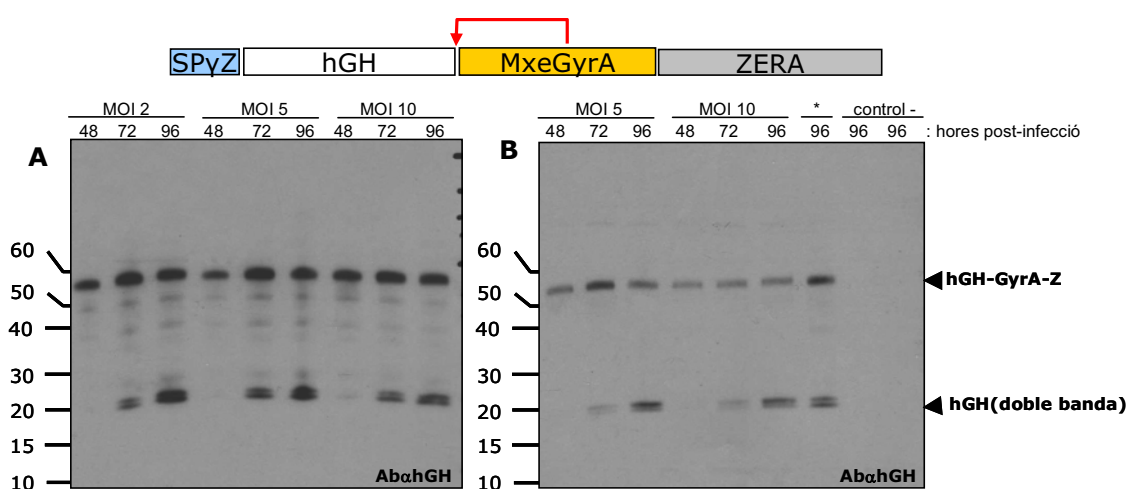


Figura 4.28. Expressió de hGH-MxeGyrA-Zera en cèl·lules Sf9 infectades a diferents MOI i analitzades a diferents hores post-infecció. A. Extractes cel·lulars (0,5µg de proteïna total) **B.** Fraccions corresponents al medi, excepte (*) que correspon a la fracció cel·lular MOI 10. Immunoblots incubats amb l'anticòs anti-hGH.

L'immunoblot corresponent a la figura 4.28.A mostra diferències importants d'expressió entre les condicions de producció testades. Els criteris que varen ser considerats per tal de definir les millors condicions de producció de proteïna recombinant es centraren en la màxima acumulació de proteïna de fusió i la mínima presència de producte d'autoprocessament *in vivo*. L'anàlisi densitomètric de la intensitat de senyal detectada per a cada un dels extractes, va revelar que les millors condicions de producció tenien lloc a MOI 5 i MOI 2, a 72 hores post-infecció. A la figura 4.28.B, hi trobem representats els nivells de proteïna recombinant presents en el medi de cultiu carregat per equivalents de volum respecte els extractes cel·lulars de la figura 4.28.A. Les pèrdues en aquesta fracció són considerables però, tenint en compte l'estat integral de les cèl·lules infectades, resulta normal que part de la proteïna sigui alliberada en el medi cel·lular.

L'acumulació de la proteïna de fusió recombinant a l'espai intracel·lular va ser determinada, com en ocasions anteriors, mitjançant gradient de densitat i immunofluorescència sobre cèl·lules Sf9 infectades.

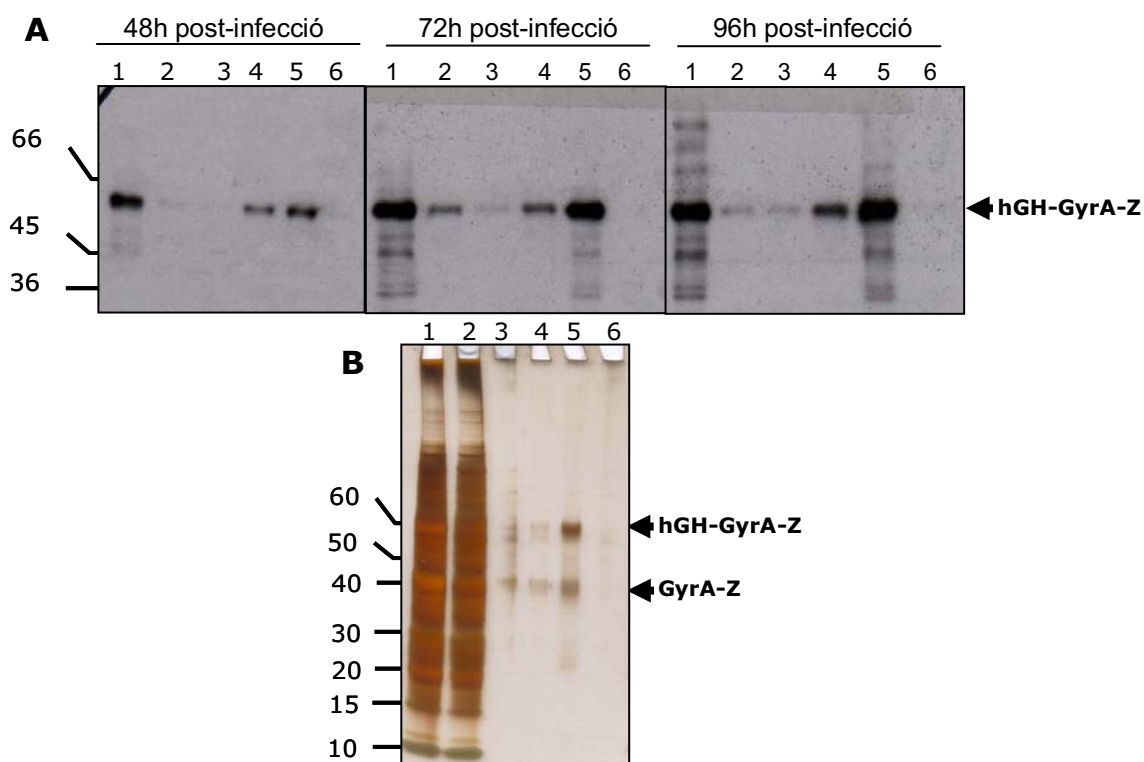


Figura 4.29. Gradients de densitat de iodixanol (Optiprep™) a diferents hores post-infecció de cèl·lules infectades amb hGH-GyrA-Z. A. Immunoblots incubats amb anticòs α hGH. **B.** Anàlisi del subfraccionament cel·lular per tinció del gel SDS-PAGE amb nitrat de plata. 1 correspon a l'extracte cel·lular de partida. 2 al sobrenedant. 3, 4 i 5 corresponen respectivament a F26, F32 i F50: les interfases del gradient, amb el percentatge de iodixanol de cada una de les fraccions. 6 correspon al pellet del gradient.

La figura 4.29.A mostra el resultat de l'aplicació de diferents homogenats cel·lulars recollits a diferents dies post-infecció en un gradient discontinu de densitat de Iodixanol (Optiprep™). Segons els immunoblots corresponents, podem concloure que la majoria de proteïna de fusió es troba acumulada a les fraccions subcel·lulars més denses (interfases F42 i F56) des de les etapes més primerenques de la infecció. La figura 4.29.B correspon a l'anàlisi per impregnació de nitrat de plata del gel SDS-PAGE corresponent al gradient de densitat, a partir de l'homogenat cel·lular a 3 dies post-infecció. Tal i com podem observar, el subfraccionament cel·lular i la separació proteica per densitat van resultar satisfactoris. L'enriquiment obtingut en la fracció densa F56, revela la nitidesa amb la qual podem identificar les bandes de mida corresponent a la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z, i al producte d'autoprocessament GyrA-Z.

Els resultats de la immunocitoquímica realitzada amb l'anticòs contra hGH es troben representats a la figura 4.30, la qual mostra les imatges de les projeccions globals de diferents cèl·lules observades per microscòpia confocal en seccions de 1 μ m. Les imatges mostrades a la part superior de la figura corresponen a l'observació de cèl·lules Sf9 no infectades, que han sofert el mateix tractament durant la immunodetecció de les cèl·lules infectades. Les dues imatges inferiors mostren una clara acumulació de la proteïna recombinant immunoreactiva per a hGH, en estructures de tipus cos proteic de mida variable compresa entre els 0,1 i 0,5 μ m.

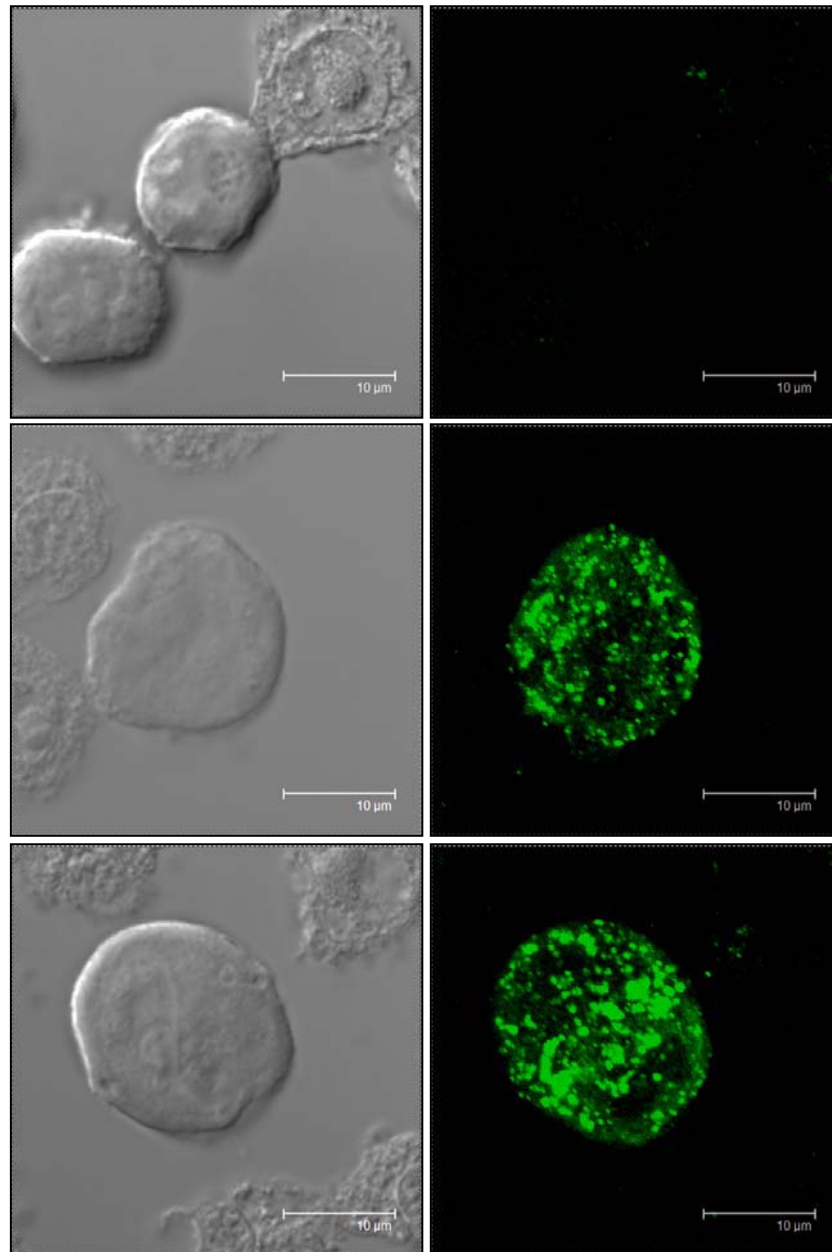


Figura 4.30. Immunofluorescència de cèl·lules Sf9 infectades amb hGH-GyrA-Z. Les imatges superior correspon a cèl·lules Wt no infectades. Incubació amb anticòs contra hGH. Imatges obtingudes per microscopia confocal de fluorescència (dreta), i les imatges de contrast correlatives, obtingudes per DIC (esquerra).

Recuperació de la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] acumulada en cossos proteics heteròlegs de cèl·lules d'insecte Sf9.

Les condicions de recuperació de cossos proteics a partir de cèl·lules d'insecte infectades ja havien estat posades a punt amb anterioritat quan havíem estudiat l'acumulació heteròloga de Zera[®]-SspDnaB-hGH en aquest sistema d'expressió. El procés global de producció de hGH, descrit a la figura 4.31, va ser aplicat en les mateixes condicions per a hGH-MxeGyrA-Zera[®] excepte en l'etapa de solubilització i inducció de l'autoprocessament, etapa en la qual les condicions varen ser adaptades per tal de permetre un major rendiment de l'autoprocessament mitjançant l'addició de la quantitat i tipus d'agent reductor necessaris.

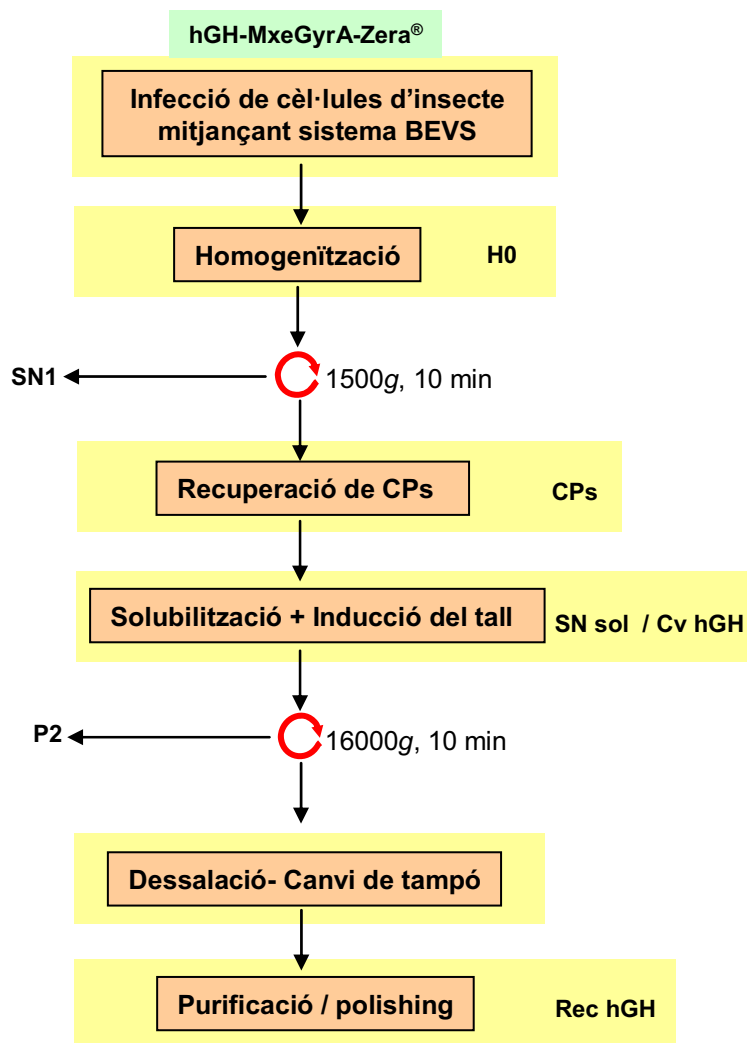


Figura 4.31. Diagrama de flux corresponent al procés de purificació de hGH expressada com a proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera® en cossos proteïcs heteròlegs provinents de cèl·lules d'insecte. H0, homogenat; SN1, sobrenadant dels cossos proteïcs; CPs, cossos proteïcs; SN sol/ Cv hGH, solubilització i autoprocessament de hGH; P2, fracció insoluble; Rec hGH, proteïna hGH purificada.

La figura 4.32 mostra el resultat del procés global de *downstream* optimitzat fins a l'obtenció de hGH autoprocessada, prèviament a l'etapa de purificació final. La primera etapa del procés, coincidint amb la recuperació de cossos proteïcs, va ser realitzada en presència del tampó Tris 10 mM pH 8, deoxicolat 0.1%, NaCl 1M i CaCl₂ 2mM, i sotmetent les cèl·lules a un procés d'homogeneïtzació mitjançant una breu sonicació. Després de la centrifugació a 1500g els carrils 2 i 3 corresponen al sobrenadant i sediment (respectivament) corresponents a l'etapa de recuperació de cossos proteïcs. Tal i com podem observar en la tinció de plata (figura 4.32.B), la fracció corresponent a cossos proteïcs (carril 4) suposa un elevat grau d'enriquiment de la proteïna recombinant en una sola etapa. Malgrat això, també observem pèrdues importants de proteïna recombinant en la fracció soluble (SN1), fet que podria ser degut al grau de solubilitat que presenta

hGH, i que podria influenciar en la solubilitat global de la proteïna de fusió sencera. Tanmateix, el control d'aquestes pèrdues de proteïna recombinant és important per tal d'identificar si el seu origen també pogués tenir relació amb la posició de Zera[®] a C-terminal.

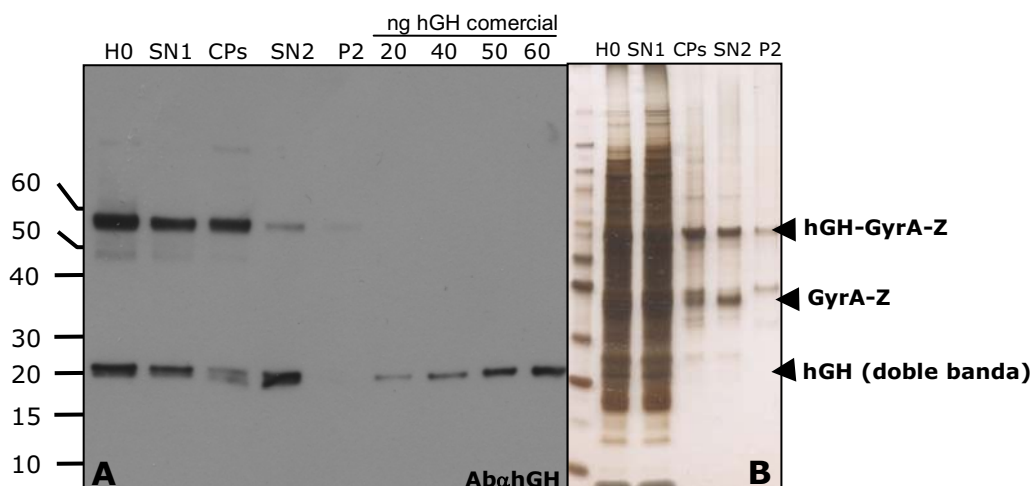


Figura 4.32. Inducció del tall de hGH-GyrA-Z en condicions reductores. A. Immunoblot amb incubació amb anticòs contra hGH. **B.** Tinció en plata de SDS-PAGE. H0, homogenat; SN1, sobrenedant de cossos proteïcs; CPs, fracció de cossos proteïcs; SN2, sobrenedant de la solubilització/autoprocessament; P2, fracció insoluble després de la solubilització/autoprocessament.

La solubilització i la inducció de l'autoprocessament van portar-se a terme simultàniament, aprofitant que les condicions reductores servien tant per solubilitzar cossos proteïcs com per induir el tall promogut per la inteïna MxeGyrA. Els cossos proteïcs aïllats van ser incubats en un tampó Tris 20mM pH 8, deoxicolat 2% i DTT 100mM, durant 16 hores a 25°C. Per últim, una centrifugació a màxima velocitat, va permetre la separació de la fracció soluble de la insoluble. Els carrils 3, 4 i 5 formen part de l'anàlisi d'aquesta etapa i corresponen a la mostra de partida de la solubilització (carril 3), la fracció soluble post-inducció de l'autoprocessament (carril 4); i la fracció insoluble (carril 5). El resultat mostra uns bons rendiments assolits, tant pel que fa a l'etapa de solubilització de cossos proteïcs, com a la de l'autoprocessament de la proteïna de fusió. En la posada a punt de les condicions d'autoprocessament de la inteïna MxeGyrA, es varen tenir en compte variables com la temperatura, el temps d'incubació, pH, detergents i la inducció en presència de diferents agents reductors, essent els resultats mostrats a la figura 4.32 els corresponents a les condicions optimitzades.

Purificació de rhGH expressada a cèl·lules d'insecte.

Un cop disposàvem de la mostra soluble i autoprocessada, per tal d'arribar a obtenir el producte rhGH pur, va ser necessària l'aplicació d'una etapa de purificació d'alta resolució. Durant les etapes prèvies de *downstream* havíem pogut enriquir considerablement el producte, de forma que no fou necessària cap etapa intermèdia de purificació i neteja abans de la fase final de

purificació. Aquest estalvi en etapes de prepurificació permet evitar les pèrdues de producte d'interès derivades de cada nou pas per columna cromatogràfica.

Així doncs, l'última etapa de purificació va consistir en separar la hGH d'altres proteïnes abundants presents en la mostra autoprocesada, tals com la proteïna de fusió sencera sense digerir, i el producte d'autoprocesament MxeGyrA-Zera (fig. 4.32.B, carril SN2).

Tipus de columna cromatogràfica	RESOURCE 3mL Reverse Phase (GE Healthcare)
Tampó A	Àc. acètic./Acetat 10mM pH4 / ACN 2% / β -Me 0,02%
Tampó B	Àc. acètic./Acetat 10mM pH4 / ACN 70% / β -Me 0,02%
Gradient de tampó B	50-100% en 10 CV (30mL)
Volum de les fraccions	1,5 mL
Característiques de la mostra	7mL de mostra soluble i autoprocesada hGH-GyrA-Zera, provinent de 24 milions de cèl·lules Sf9 infectades a MOI 5, 72 HPI.

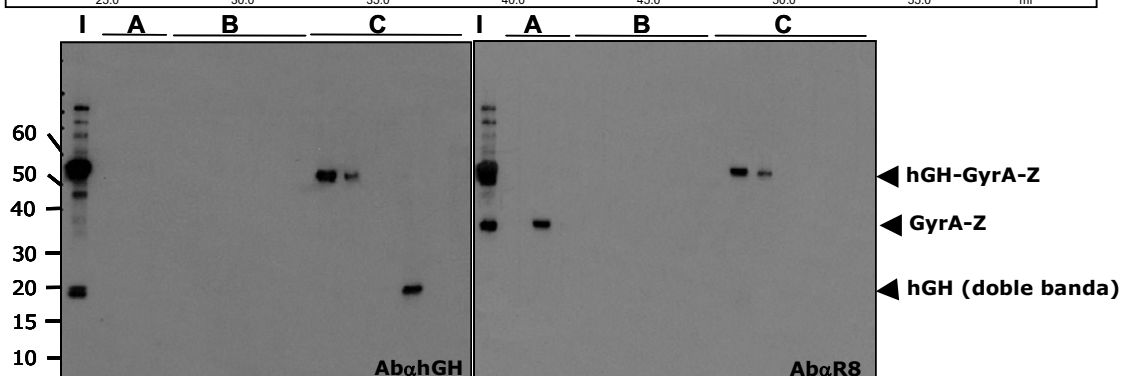
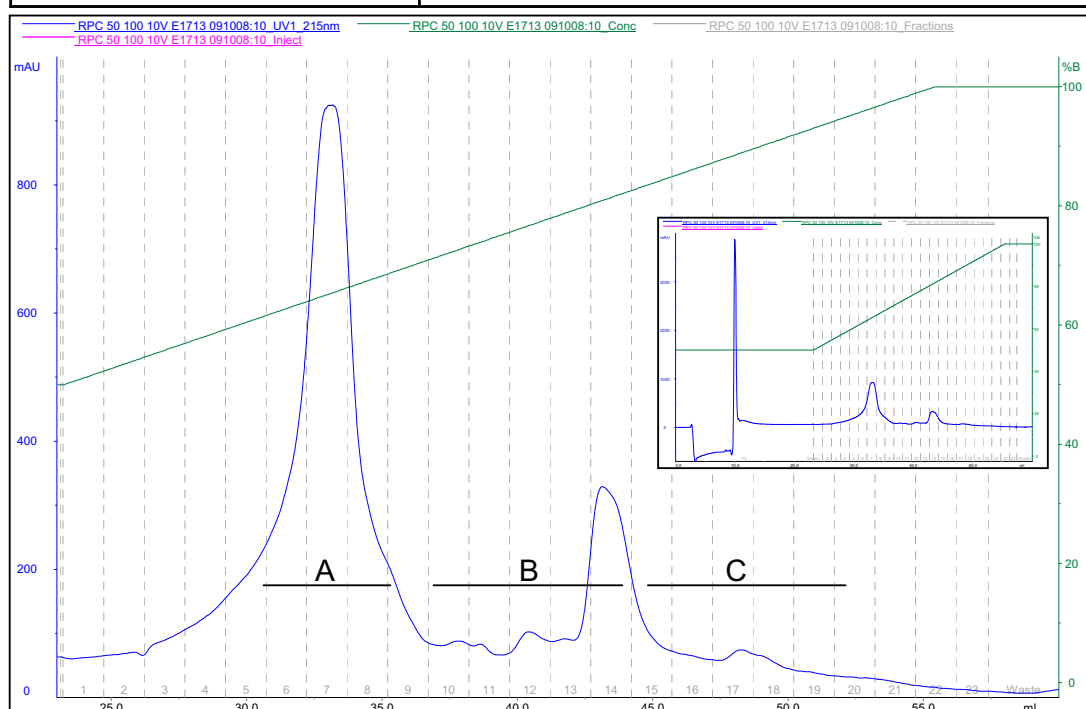


Figura 4.33. Purificació de hGH processada per RP-FPLC. Cromatograma de la purificació de hGH en una columna Resource-RPC de 3mL. Gradient continu de 40 a 70% d'acetonitril, en 30 minuts (10 CV). Anàlisi per immunoblot amb anticossos contra hGH i R8. I: input, mostra d'entrada a la columna. A: Fraccions 6 a 8. B: Fraccions 10 a 14. C: Fraccions 15 a 20.

La cromatografia líquida de fase reversa d'alta resolució, és la tècnica de purificació més àmpliament utilitzada en els processos de producció de proteïnes recombinants (Riggin *et al.*, 1987). Pel cas de hGH varem utilitzar el sistema basat en RP-FPLC (*Reverse Phase- Fast Protein Liquid Chromatography*) acoblat al sistema *ÄKTA Purifier 10*.

Com a solvent mòbil varem emprar acetat acètic 10mM a pH 4 i acetonitril. Les millors condicions de separació van ser obtingudes emprant un gradient continu de 40 a 70% d'acetonitril en 30 minuts (fig. 4.33). Els tres components principals de la mostra solubilitzada presenten un patró d'elució diferencial en tres pics destacats (A, B i C). L'anàlisi de tots 3 pics per *Western Blot* amb anticossos contra R8 i contra hGH permeten identificar l'elució de MxeGyrA-Zera en el pic A, i la de la fusió sencera i el producte hGH en les fraccions del pic C, separades entre elles per 2 fraccions. Pel que fa al pic B, només es pot afirmar que no es tracta de cap producte immunoreactiu derivat de la proteïna recombinant expressada, indicant que es tracta d'algun contaminant que fou co-purificat en les diferents etapes de *downstream*. La doble banda de prop de 20kDa identificada amb l'anticòs de hGH en la mostra d'entrada a la columna (*input*), sembla que coelueix en la mateixa fracció del pic C. La validació i anàlisi de les dues bandes detectades es discuteix a l'apartat següent.

Per tal de valorar l'eficiència del pas per la columna RPC, es va procedir a un anàlisi quantitatiu de la mostra d'entrada respecte el de sortida de la columna. De totes les fraccions on eluïa el producte hGH es va crear un *pool* i se'n varen resoldre diferents quantitats per analitzar per *Western Blot*, juntament amb diferents quantitats de material d'entrada a la columna (dades no mostrades). Els resultats del *Western Blot* varen ser valorats per densitometria mitjançant el programa informàtic Quantity One (BioRad). De les dades resultants se'n va extreure un valor de recuperació del producte hGH del 93,4%, el qual resulta un valor molt satisfactori i competitiu en qualsevol procés de purificació de proteïna recombinant.

Validació del producte hGH per espectrometria de masses i seqüenciació de l'extrem N-terminal

La presència d'una doble banda de la mida de hGH detectada després de l'autoprocessament induït sobre cossos proteics de cèl·lules d'insecte, va esdevenir un dels objectius principals d'estudi per tal de caracteritzar-ne la seva causa i origen.

Una de les hipòtesis formulades fonamentava l'aparició del doble producte degut a l'activitat proteasa endògena en cèl·lules Sf9. En aquest sistema d'expressió hi són descrites una gran varietat de proteases intracel·lulars que provoquen la degradació proteolítica extensiva de proteïnes recombinants heteròlogues (Martensen i Justesen, 2000; i Grosch i Hasilik, 1998). Malgrat que en les diferents etapes de *downstream* s'hi va incorporar la presència d'un còctel

d'inhibidors de proteases d'ampli espectre (Complete – Roche), certa activitat proteasa podria haver evadit l'efecte inhibitor, i acabar per actuar sobre la proteïna recombinant prop del lloc de tall de la inteïna. Per tal de comprovar el possible efecte proteasa, vàrem induir el processament a partir d'una proteïna de fusió purificada mitjançant RP-FPLC. Per evitar l'autoprocessament durant la solubilització de cossos proteics es va emprar TCEP que actua com agent reductor, però no trenca enllaços ester, amb el qual no promou l'activitat de la inteïna. Les fraccions de purificació corresponents a la proteïna de fusió no autoprocessada varen ser sotmeses a les condicions d'inducció de tall, i analitzades per *Western Blot* per evaluar el patró de bandes obtingut per hGH. Com a resultat, es va tornar a detectar la doble banda immunoreactiva, permetent descartar l'acció proteasa com a origen del doble producte.

Una altra explicació d'aquest fenomen podria ser derivat d'un mal processament promogut per la ineficiència de l'activitat de la inteïna, de manera que promogués l'autoprocessament en dos punts diferents de la seqüència d'aminoàcids. Aquesta hipòtesi va poder ser descartada quan la mateixa proteïna de fusió va ser utilitzada per a la transformació de plantes de tabac i de cèl·lules CHO (veure resultats dels altres apartats). La inducció de l'autoprocessament en aquests hostes va donar com a resultat una única banda immunoreactiva per a hGH.

Altrament, l'expressió d'un altre producte d'interès biofarmacèutic com l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) en la fusió EGF-GyrA-Z, també va resultar en l'aparició d'un doble producte immunoreactiu per EGF quan havíem induït l'autoprocessament en presència d'agent reductor. Ambdós factors indiquen que la presència del doble producte era degut a una raó intrínseca del sistema BEVS en cèl·lules d'insecte, i no d'un problema derivat del producte d'interès o de l'activitat pròpia de la inteïna.

A partir d'aquesta d'aquesta informació, la tercera hipòtesi es va basar en la possibilitat d'un mal processament del pèptid senyal durant la co-traducció del transcrit primari dirigit al reticle endoplasmàtic de la cèl·lula d'insecte. Aquest fet ha estat descrit en la literatura per a la producció d'altres proteïnes recombinants mitjançant el sistema BEVS (Ailor, *et al.* 1999a i b; Jarvis, *et al.* 1993; Ferrini, *et al.* 1995), en els quals el denominador comú era l'obtenció de rendiments limitats de secreció de proteïna recombinant, i la presència d'agregats en l'espai intracel·lular de proteïna recombinant amb el pèptid senyal intacte o mal processat. La raó per la qual ocorre aquest fenomen és atribuïble a una saturació de la maquinària de processament post-traduccional de les cèl·lules d'insecte infectades pel baculovirus.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi, i tenint en compte que només la proteïna ben processada segueix la via de secreció, es va realitzar un anàlisi del patró de bandes corresponent a la hGH que és autoprocessada *in vivo* i secretada al medi. Les cèl·lules Sf9 varen ser infectades amb baculovirus recombinant hGH-GyrA-Z a baixa MOI (3), per tal d'evitar la lisi cel·lular immediata.

Cada 8 hores es varen recollir mostres del medi de cultiu i del contingut cel·lular per a ser analitzades en paral·lel per *Western Blot*. L'estudi va venir acompanyat d'un control de integritat cel·lular per tinció de cèl·lules amb *Tripan Blue*, per tal d'assegurar que el contingut cel·lular no s'havia alliberat al medi com a resultat de la lisi cel·lular provocada per la infecció viral. Sobrecarregant la fracció del medi en el gel SDS-PAGE, varem poder detectar l'aparició d'una sola banda en aquesta fracció, mentre que a la fracció cel·lular corresponent s'hi detectava la doble banda. Aquest resultat fou un indicatiu preliminar de que el processament del pèptid senyal no era complet, i per tant, la proteïna recombinant era acumulada a l'espai intracel·lular. Per acabar de comprovar aquest resultat, fou determinant l'estudi de seqüenciació de l'extrem N-terminal, de cada un dels subproductes que representen la doble banda.

Per tal d'aconseguir una separació mínima de les bandes i així poder-les sotmetre a l'anàlisi del seu extrem N-terminal, es varen modificar les condicions de purificació per RP-FPLC referents a la llargària (volums de columna) i gradient d'acetonitril aplicades prèviament. Es va establir que les millors condicions de separació s'obtenien amb un gradient del 40 a 70% d'acetonitril, en 30 minuts (fig. 4.34).

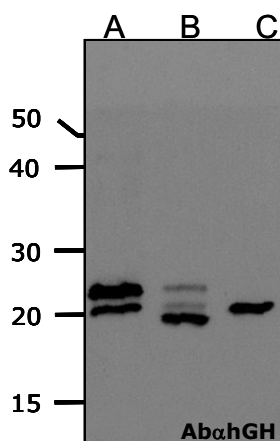


Figura 4.34. Separació de les bandes per RP-FPLC. Condicions: gradient de 40 -70% acetonitril en 10 volums de columna (30 min). A i B corresponen a 2 *pools* diferents de fraccions de purificació. C correspon a 20 ng de hGH comercial.

De forma complementària, també es varen començar a utilitzar gels d'electroforesi SDS-PAGE més resolutius amb un percentatge fix de poliacrilamida al 12,5%, per permetre una separació de bandes més eficient. Com a resultat, la figura 4.34 mostra l'anàlisi de dos *pools* de fraccions corresponents a la purificació dels productes immunoreactius per hGH mitjançant RP-FPLC. Tal i com podem observar, els *pools* A i B presenten un total de tres bandes, de les quals només la intermitja presenta una migració equivalent a la hGH comercial (carril C).

Per tal de confirmar la massa de cada un dels subproductes de hGH, es va analitzar una mostra resultant de barrejar els *pools* de purificació A i B de la figura 4.34, per MALDI-TOF (fig.

4.35). En l'espectre resultant vàrem obtenir tres pics d'intensitat moderada en la regió corresponent a la massa esperada per hGH (22,2 kDa). La massa de cada una de les tres bandes detectades fou de 21, 22,2 i 23,12 kDa, per tant, només un del subproductes presentava una massa concordant amb la teòrica de hGH, deduïda a partir de la seva seqüència d'aminoàcids. Com resulta evident, els altres dos productes de massa inferior i superior, presentaven residus delecionats i afegits, respectivament, respecte la seqüència de hGH.

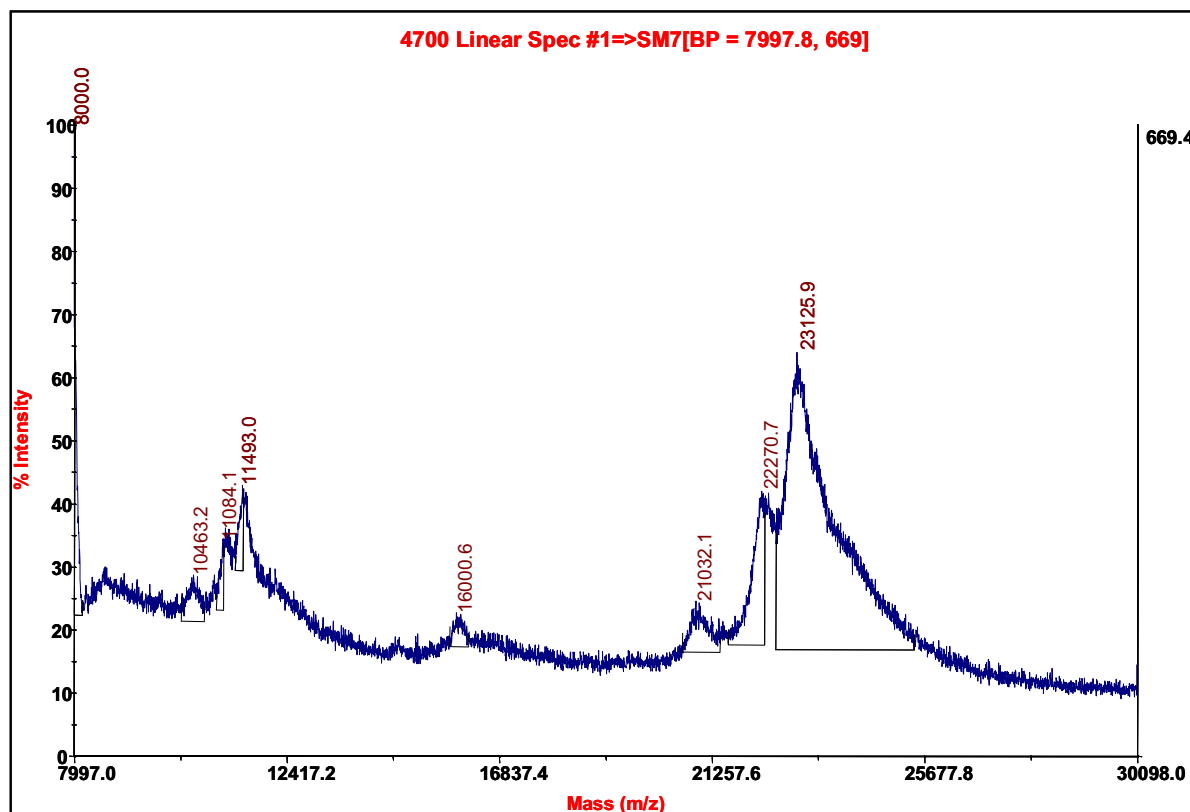


Figura 4.35. Espectre de Masses MALDI-TOF corresponent als subproductes de hGH purificats a partir de cèl·lules d'insecte.

L'estudi complet d'aquesta caracterització conclou amb els resultats de la degradació d'Edman aplicada a cada un dels tres productes obtinguts (fig. 4.36). La seqüenciació dels tres primers residus de l'extrem N-terminal, indiquen que la banda superior de 23,1 kDa conté una barreja de dos proteïnes amb l'extrem que comença o bé per una Ala (A) o bé per una Leu (L), seguit per dos residus addicionals que també contenen la mateixa parella d'aminoàcids. Com es pot comprovar a la seqüència d'aminoàcids corresponent a la proteïna de fusió sencera, l'única regió abundant en L i A consecutius, es troba a la zona central del pèptid senyal, indicant la presència d'un mal processament del pèptid senyal per a aquest producte.

La banda intermèdia de 22,2 kDa representa un sol tipus de proteïna amb un inici de seqüència formada pels residus F-P-T, coincidint amb el de la hGH.

Per últim, la banda inferior de 21 kDa està composta per una proteïna la seqüència de la qual comença amb els residus M-R-V. Aquest inici només coincideix amb el del pèptid senyal, posant en evidència l'absència de processament de la seqüència senyal. Malgrat que el pèptid senyal es manté intacte, la mida d'aquesta producte és menor que l'original, fet que només es podria explicar per la deleció d'un fragment proteic a C-terminal. Tot i que amb aquests resultats no podem explicar la raó per la qual detectem deleció a C-terminal d'aquest producte, el que sí podem concloure és que bona part de la hGH produïda a Sf9 mitjançant la fusió hGH-GyrA-Z, és aberrant degut a l'absència d'un correcte processament del pèptid senyal de la γ -zeïna. De fet, l'anàlisi densitomètric sobre la intensitat de senyal provinent de cada una de les tres bandes, han permès determinar la proporció mitja de cada un dels tres productes. El producte minoritari (15%) correspon al de la hGH *wild type*, mentre que més del 50% suposa el producte amb el pèptid senyal mal processat (23,1 kDa), i prop del 30% al producte amb el pèptid senyal intacte.

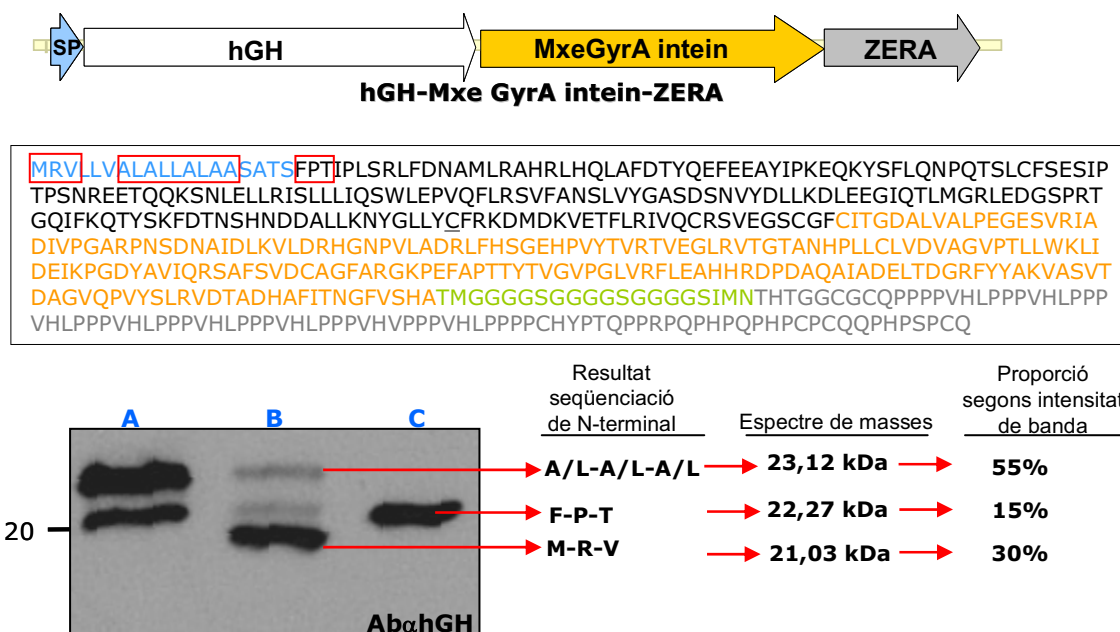


Figura 4.36. Validació de les diferents bandes immunoreactives de hGH provinent de l'autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA a Sf9, per seqüenciació de l'extrem N-terminal. A i B: pool de fraccions de purificació per RP-FPLC. **C:** 20 ng de hGH comercial. S'indiquen els resultats obtinguts de la seqüenciació N-terminal, l'associació de cada una a de les bandes a les masses obtingudes en el MALDI-TOF, i la proporció de cada una d'elles segons la intensitat de la banda.

Per tal d'intentar solucionar el problema, i basat en estudis previs realitzats per Jarvis *et al.*, 1993; es va voler estudiar la influència de diferents pèptids senyals en l'expressió i acumulació de la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z a Sf9.

Tot i que no hi ha cap pauta a seguir en l'elecció del pèptid senyal apropiat, es recomana utilitzar o bé el propi de la proteïna d'interès, o bé un pèptid de senyal homòleg del sistema hoste d'expressió. Per tant, es va provar el pèptid senyal específic per la hGH, i un pèptid senyal derivat d'insecte àmpliament utilitzat en sistemes de producció basats en BEVS, corresponent al pèptid

senyal de la prepromelitina d'abella. La figura 4.37 mostra el resultat de tres construccions hGH-GyrA-Z amb els tres pèptids senyals disponibles. Totes les proteïnes de fusió acumulades a l'espai intracel·lular de Sf9, varen ser tractades en paral·lel fins a l'etapa d'inducció de l'autoprocessament. Cada fracció solubilitzada i autoprocessada va ser analitzada per *Western Blot*, juntament amb mostres intercalades de hGH recombinant comercial i una mostra control de la proteïna Z-D4K-hGH acumulada a Sf9 i digerida *in vitro* amb enteroquinasa comercial. El resultat ens mostra un patró de senyal de bandes diferent per cada construcció amb pèptid senyal diferent. Per a la proteïna de fusió amb el pèptid senyal específic de la hGH, observem un marcatge amb mida clarament superior a la hGH comercial. La proteïna de fusió amb el pèptid senyal de la melitina, mostra una patró format per tres productes, dels quals el més predominant correspon a la proteïna de mida inferior. Aquesta banda va ser analitzada per seqüenciació de l'extrem N-terminal, donant com a resultat els residus M-K-F, els quals coincideixen amb l'inici del corresponent pèptid senyal.

1. **SPgZ**: pèptid senyal de la γ -Zeïna \rightarrow MRVLLVALALLALAASATS
2. **SPhGH**: pèptid senyal natiu de l'hGH \rightarrow MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA
3. **SPMe**: pèptid senyal de la melitina d'abella \rightarrow MKFLVNVALVFMVVYISYIYA

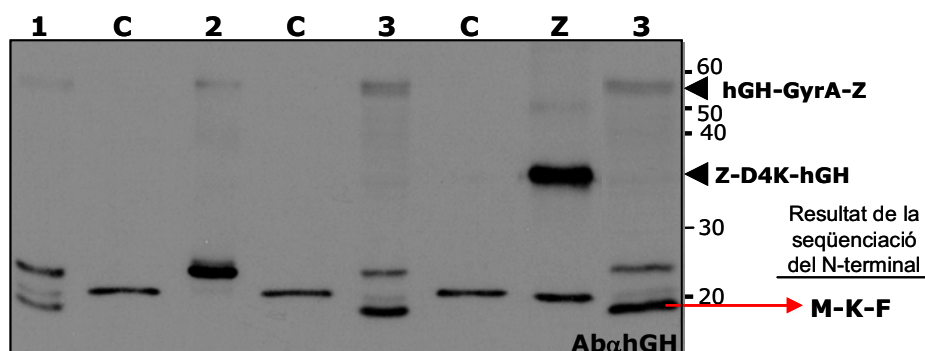


Figura 4.37. Efecte de diferents pèptids senyal sobre la correcta expressió i processament del pèptid senyal a cèl·lules Sf9. 1: pèptid senyal de la γ -Zeïna. 2: pèptid senyal específic de hGH. 3: pèptid senyal de la melitina d'abella. C: 20 ng de hGH comercial. Z: SPgZ-Zera-D4K-hGH expressada a Sf9. Immunoblot incubat amb anticòs contra hGH. S'indiquen els resultats obtinguts de la seqüenciació N-terminal de la banda inferior resultat de l'expressió de la construcció amb el pèptid senyal de la melitina.

Podem concloure, per tant, que cap dels pèptids senyals emprats en aquest estudi no permeten un correcte processament del pèptid senyal, malgrat sí observem un patró de bandes diferenciat per a cada un d'ells. D'altra banda, la digestió de la proteïna de fusió Z-D4K-hGH amb enteroquinasa comercial, dóna com a producte una única banda immunoreactiva per hGH que té la mateixa mida que la hGH comercial, indicant un correcte processament promogut per aquesta proteasa.

Un altre estudi realitzat per intentar sobrevenir aquest fenomen va consistir en l'expressió i acumulació de hGH-GyrA-Z en diferents línies establertes de cèl·lules d'insecte, com les Sf21 i les High FiveTM. Les línies Sf9 i Sf21 provenen de la mateixa línia cel·lular IPLBSF-21, derivada de teixit d'ovari de la fase de pupa de *Spodoptera frugiperda*, i són les més tradicionalment utilitzades

per a expressió de proteïna recombinant. La línia cel·lular High Five™ va ser desenvolupada per l'institut Boyce Thompson (Ithaca- Nova York), a partir de les cèl·lules d'ovari d'erugues de la col, *Trichoplusia ni* (Granados *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1992; i Wickham i Nemerow, 1993). Per a la realització d'aquest estudi es varen utilitzar per a l'expressió, dues construccions de hGH-GyrA-Z amb dos pèptids senyal diferents: el de la γ -zeïna, i el de la melitina. Els resultats d'aquest petit cribatge es mostren a la figura 4.38, on els diferents extractes cel·lulars varen ser analitzats per *Western Blot*, carregant volums equivalents i incubant la membrana amb anticòs contra hGH.

Aquest anàlisi posa en evidència que la manca de correcte processament del pèptid senyal suposa un problema generalitzat en el sistema d'expressió intracel·lular de qualsevol de les línies cel·lulars d'insecte provades, ja que el producte de l'autoprocessament hGH es troba representat en tots els casos per un patró multi-banda. Val a dir que aquest fenomen no només va ser observat en l'expressió d'aquesta proteïna de fusió, sinó que els mateixos resultats també varen ser obtinguts en el cas de l'expressió de hGH no fusionada (dades no mostrades).

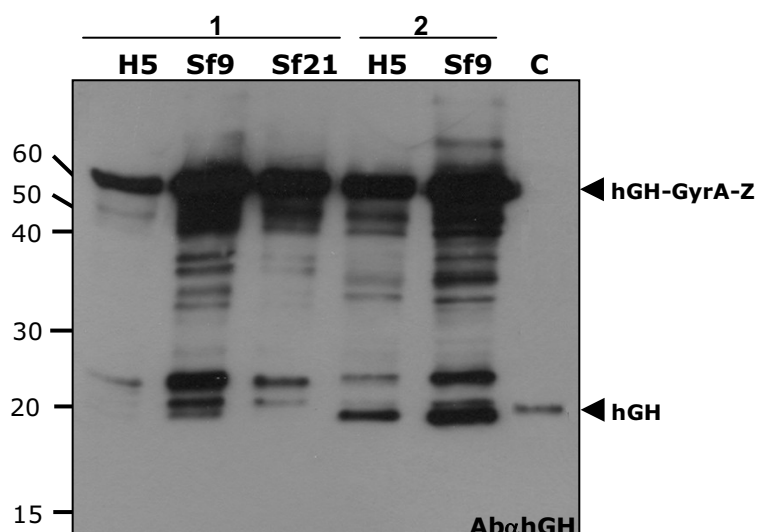


Figura 4.38. Efecte de la utilització de diferents línies cel·lulars d'insecte sobre la correcta expressió de hGH-GyrA-Z, amb dos pèptids senyal diferents. 1: construcció amb el pèptid senyal de la γ -Zeïna. 2: construcció amb el pèptid senyal de la melitina d'abella. C: 20 ng de hGH comercial. Immunoblot incubat amb anticòs contra hGH.

Arribat aquest punt, podem afirmar que el sistema d'expressió basat en la infecció de cèl·lules d'insecte mitjançant baculovirus recombinant, resulta inadequat per a l'acumulació correcta de hGH-GyrA-Z. Com descriurem posteriorment en l'apartat de discussió, altres alternatives per tal d'intentar assolir un correcte processament del pèptid senyal podien haver esdevingut el focus d'atenció per al seu desenvolupament i estudi, però com a objectiu prioritari i immediat es va establir el càlcul estimat dels costos de producció de hGH basats en aquest procés optimitzable.

Quantificació de la producció de rhGH en cèl·lules Sf9 (hGH-GyrA-Z i Z-D4K-hGH).

Malgrat que l'autenticitat del producte hGH autoprocessat a partir de la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z acumulada en cèl·lules Sf9, només es trobava representada en prop d'un 15% del total de producte digerit, s'ha de tenir en compte que aquest problema no va ser derivat de l'estratègia de processament emprada, sinó que les limitacions van esdevenir a nivell de *upstream* degut a la saturació de la maquinària que intervé en els processos post-traduccional d'aquest hoste. Arrel d'aquests resultats, vàrem considerar rellevant obtenir valors preliminars de quantificació de cada una de les diferents etapes de *downstream*, per tal d'estudiar la seva competència i idoneïtat com a sistema de tall envers als sistemes tradicionals que empen proteases exògenes en aquest hoste d'expressió.

Per a la quantificació dels processos de producció de proteïnes de fusió Zera[®] es varen emprar diferents metodologies, considerant les limitacions de cada una d'elles.

L'anàlisi densitomètric per *Western Blot* utilitzant com a proteïna estàndard altres proteïnes de fusió Zera[®] prèviament quantificades per anàlisi d'aminoàcids, presenten limitacions com l'acumulació d'errors derivats del procés resolució de proteïnes en gels SDS-PAGE, transferència de proteïnes i immunodetecció, la baixa reproductibilitat o inestabilitat de la proteïna utilitzada com a estàndard, o la incapacitat de quantificació de proteïna agregada en forma de multímers.

En els últims anys s'ha desenvolupat i posat a punt una tècnica de quantificació basada en ELISA-IMAC específica per a Zera[®], demostrant ser una metodologia fiable, reproduïble, i d'aplicació en la quantificació de proteïnes de fusió Zera[®], independentment del seu origen i de l'estat de puresa en què es trobi. L'estructura del domini Zera[®] (en concret del domini repetitiu PPPVHLx8) orienta les 8 histidines en un mateix pla, de forma que poden ser unides per afinitat a un metall divalent com el níquel o el coure. Per a la quantificació de proteïnes Zera[®] es varen utilitzar plaques de 96 pous amb el metall immobilitzat que, en condicions desnaturalitzants, presentava afinitat pel domini Zera[®].

La proteïna de fusió Zera[®] unida al metall era reconeguda amb l'anticòs contra R8, i es prosseguia amb el procés complet de detecció i monitoratge típics de la tècnica d' ELISA. La posada a punt de les condicions de quantificació varen permetre validar-la com a tècnica estàndard de quantificació dels processos de producció de proteïnes Zera[®], en qualsevol sistema hoste.

La hGH alliberada per autoprocessament o digestió fou quantificada mitjançant un kit de quantificació comercial basat en la detecció quimioluminiscent de la hGH activa mitjançant ELISA (Roche Diagnostics).

Per últim, la quantificació de proteïna total present en cada una de les etapes de *downstream* fou determinada pel mètode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*), emprant la BSA com a proteïna estàndard.

Les dades presentades a la taula 4.1 permeten comparar en termes de rendiment i puresa, dos processos de producció de hGH recombinant mitjançant la tecnologia Zera[®], emprant dos sistemes de tall diferents: la inteïna MxeGyrA (hGH-GyrA-Z) o bé l'enteroquinasa com a proteasa exògena comercial (Z-D4K-hGH).

Etapa de <i>downstream</i> del procés hGH-GyrA-Z	Proteïna total (µg prot/milió de cèl·lules)	Proteïna hGH (µg prot/milió de cèl·lules)	Rendiment de l'etapa (%)	Rendiment total (%)	Puresa (%)
Homogenat	313,06	32,39	100	100	10,34
Cossos proteics aïllats	108,3	21,27	65,67	65,67	19,6
lubilització i autoprocessament	51,2	9,53	44,81	29,42	18,61
Cromatografia RP-FPLC	La presència de subproductes immunoreactius per hGH va impossibilitar aquest anàlisi				

Etapa de <i>downstream</i> del procés Z-D4K-hGH	Proteïna total (µg prot/milió de cèl·lules)	Proteïna hGH (µg prot/milió de cèl·lules)	Rendiment de l'etapa (%)	Rendiment total (%)	Puresa (%)
Homogenat	306	79,62	100	100	26,02
Cossos proteics aïllats	99	43,42	54,53	54,53	43,85
Solubilitat	nd	33,73	77,68	42,36	nd
Columna PD-10	45,05	23,53	69,76	29,55	52,23
Digestió amb enteroquinasa	nd	5,50	23,37	6,91	nd
Cromatografia RP-FPLC	nd	4,60	83,63	5,78	>90%

Taula 4.1. Rendiment i puresa de dos processos de producció de hGH recombinant a Sf9, a partir de les proteïnes de fusió hGH-GyrA-Z (en verd) i Z-D4K-hGH (en groc).

La quantificació dels dos processos de producció de hGH al llarg de les diferents etapes de recuperació de la proteïna d'interès, ens varen permetre identificar diferències importants referents als nivells d'expressió d'ambdues proteïnes de fusió i a l'enriquiment obtingut de hGH. Pel cas de la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Z, els nivells d'expressió assolits foren fins a 2,5 vegades inferiors respecte als obtinguts per a la fusió Z-D4K-hGH en cèl·lules d'insecte. Aquest fet podria ser resultat de l'interferència de la inteïna MxeGyrA en l'acumulació de la proteïna de fusió, i/o d'un efecte de la posició del domini Zera[®] a C-terminal.

Pel que fa al rendiment dels dos processos fins a l'etapa posterior a la digestió o autoprocessament de la proteïna de fusió, les dades indiquen que el procés emprant la inteïna en fusió presenta un rendiment 4,3 vegades superior respecte al procés emprant l'enteroquinasa exògena, amb un rendiment d'autoprocessament del 44,8%. En el procés de producció emprant Z-D4K-hGH, les dades indiquen que el veritable coll d'ampolla del procés va resultar ser la digestió amb enteroquinasa, amb una eficiència de tall del 23,4%, el qual remarca la importància de la optimització d'aquesta etapa per tal d'augmentar el rendiment de producció.

Tot i que el rendiment global del procés de la inteïna fou superior al de l'enteroquinasa, el valor va ser calculat tenint en compte la suma d'intensitats de tots els subproductes immunoreactius per la hGH (seqüències no natives), per tant, no esdevingueren dades definitives per a la validació

del procés. Tanmateix, tenint en compte la ineficiència i les limitacions que presenta aquest hoste en termes de maquinària post-traducciona dedicada al processament del pèptid senyal, l'anàlisi cost efectiu mitjançant el programa SuperProTM (Intelligen Inc.) no va ser justificat, a l'espera d'una optimització de l'acumulació de la proteïna recombinant en aquest hoste. A l'apartat de discussió, es plantegen una sèrie d'estratègies i alternatives que podrien ser aplicades per tal de superar aquesta adversitat.

Expressió de proteïnes de fusió hGH-GyrA-Z a plantes de tabac *N. benthamiana*.

Un altre hoste d'expressió i acumulació de proteïna recombinant objecte del nostre estudi, foren les plantes de tabac *Nicotiana benthamiana*. En aquest apartat s'estudia la capacitat d'acumulació de la fusió hGH-GyrA-Z, analitzant la seva localització subcel·lular, el seu aïllament i recuperació per densitat diferencial.

La seqüència codificant per a hGH-GyrA-Z amb el pèptid senyal de la γ -zeïna, va ser clonada en un *cassette* d'expressió format pel promotor constitutiu 2xCaMV35S, la regió 5' no codificant del virus del gravat del tabac (TL) i el terminador 35S per a la seva expressió constitutiva en plantes de tabac, mitjançant el vector binari d'expressió pCambia 2300.

Per a la transformació transitòria de plantes de tabac es va escollir el mètode basat en la agroinfiltració mitjançant xeringa, o quan la necessitat de generar més biomassa ho requeria, mitjançant aplicació de buit sobre tot el teixit vegetatiu de la planta. Aquest mètode permet l'expressió de proteïna recombinant sense la integració del T-DNA en el genoma de la planta, amb el qual en poc temps, s'obté la biomassa necessària per a una producció de proteïna recombinant a escala de laboratori o superior.

L'anàlisi dels nivells d'expressió de hGH-GyrA-Z en planta de tabac, es va portar a terme mitjançant una valoració densitomètrica per *Western Blot* carregant diferents quantitats d'extractes proteics totals de les mostres agroinfiltrades (dades no mostrades).

Per tal de determinar la localització cel·lular de la proteïna recombinant, es va realitzar un fraccionament subcel·lular a partir d'un homogenat de fulla agroinfiltrada mitjançant un gradient discontinu de densitat d'Iodixanol (fig. 4.39). Els diferents coixins de densitat que formaven part del gradient consistien en solucions del 18, 26, 32 i 50 % (p/v) d'Iodixanol, les quals corresponien a densitats de 1.12, 1.15, 1.18 i 1.27 g/mL, respectivament.

Les cèl·lules de l'endosperma de blat de moro presenten cossos proteics derivats de reticle endoplasmàtic amb una densitat de 1.21-1.22 g/mL (Hurkman *et al.*, 1981; Galante *et al.*, 1983). Els resultats mostrats a la figura 4.39, indiquen una clara localització de hGH-GyrA-Z a la fracció F50, amb densitat típica dels cossos proteics naturals de gra de blat de moro. L'anàlisi equivalent del fraccionament subcel·lular per gel electroforètic tenyit amb Coomassie, mostra un alt grau de

separació i enriquiment proteic degut a la diferent densitat que presenten els diferents compartiments cel·lulars.

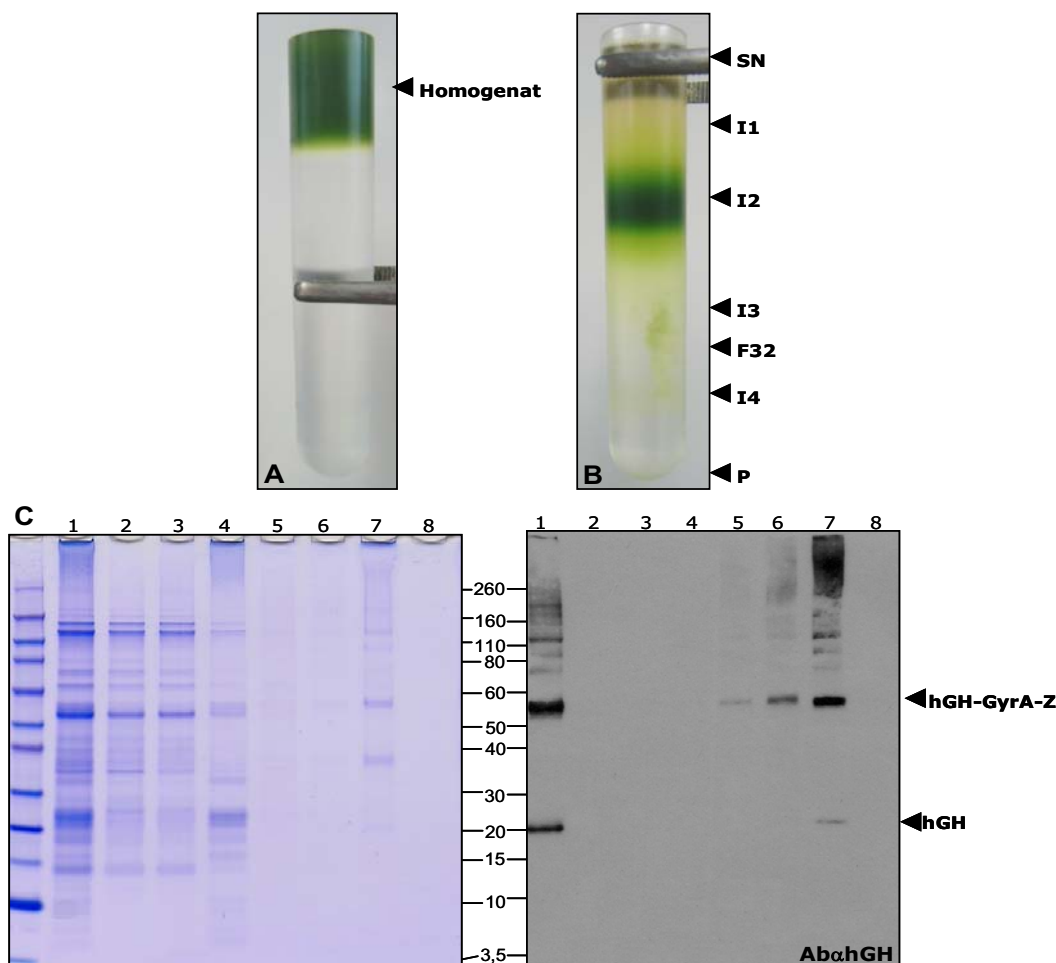


Figura 4.39. Localització de hGH-MxeGyrA-Zera[®] en cossos proteics de tabac mitjançant fraccionament subcel·lular per gradient de densitat. **A.** Gradient de solució d'Iodixanol (Optiprep[™]) amb l'homogenat de fulles de tabac carregat a la part superior. **B.** Imatge del gradient de densitat discontinu després de la ultracentrifugació. **C.** Anàlisi per tinció del gel SDS-PAGE amb *Coomassie* i immunodetecció per *Western Blot* amb anticòs contra hGH. 1 correspon a l'extracte cel·lular de partida. 2 al sobrenedant. 3, 4, 5, 6 i 7 corresponen respectivament a F18, F26, F32 i F50; les interfases del gradient amb el percentatge de Iodixanol- Optiprep[™] (pes/volum) de cada una de les fraccions. 8 correspon al pellet del gradient.

Recuperació de la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] acumulada en cossos proteics heteròlegs de planta de tabac *Nicotiana benthamiana*.

Un cop demostrada l'acumulació de la proteïna recombinant en estructures de tipus cos proteic, el següent objectiu es va centrar en les etapes d'aïllament de cossos proteics i recuperació de la proteïna de fusió per permetre els estudis d'inducció de l'autoprocessament.

A partir de la recol·lecció de la biomassa de planta de tabac transgènica, la primera etapa del procés consistia en esmicolar i triturar les fulles de tabac congelades o fresques, en un tampó d'extracció i amb l'ajut d'un trossejador i homogeneïtzador. Un cop disgregades les fibres, per tal d'expressar-ne el suc vegetal es procedia a filtrar l'extracte mitjançant un filtre de malla o teixit de

0,22 μ m. Malgrat l'aparença trivial de la tècnica d'aquesta etapa, la filtració no optimitzada podia comportar pèrdues importants de proteïna recombinant en les fibres vegetals. Seguidament, l'etapa corresponent a la recuperació de cossos proteics, es duia a terme mitjançant la centrifugació del filtrat a baixes revolucions (1500g). La major part de proteïna soluble és descartada en el sobrenadant, mentre que bona part de la proteïna de fusió Zera[®] és recuperada a la fracció de cossos proteics juntament amb altres orgànuls i components cel·lulars. Mitjançant una sèrie de rentats en presència de detergent no-iònic Triton X-100 1%, es solubilitzaven moltes proteïnes contingudes en aquests compartiments per disrupció de membranes lipídiques, amb el qual s'obtenia una fracció de cossos proteics més enriquida, sense comportar pèrdues majors.

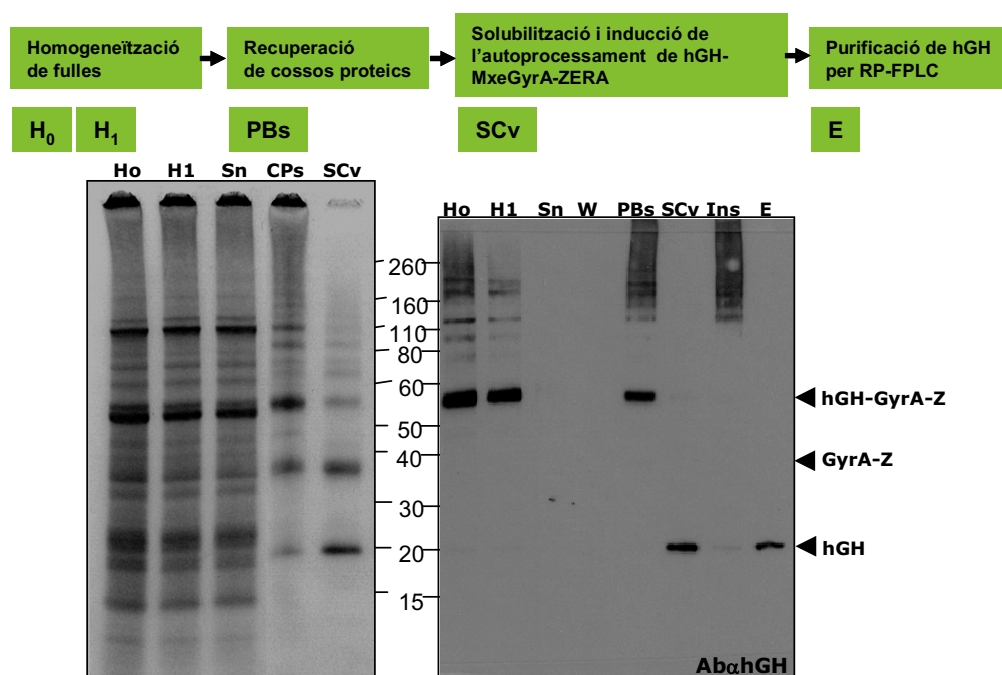


Figura 4.40. Anàlisi del procés sencer de *downstream* de cossos proteics contenint hGH-MxeGyrA-Zera[®] fins a l'etapa final de purificació de hGH. La imatge de l'esquerra correspon a l'anàlisi per tinció amb Coomassie del gel SDS-PAGE on s'hi han resolt totes les mostres que conformen les diferents etapes del procés. A la dreta, la imatge correspon a l'anàlisi per Western Blot incubat amb anticòs contra hGH, de les mateixes mostres del procés de *downstream*. Ho, correspon a l'homogenat. H1, a l'homogenat filtrat. Sn, al sobrenadant resultant de la centrifugació de CPs. W, al rentat de cossos proteics. PBs, al pellet de CPs. SCv, als CPs solubilitzats després de la inducció del tall promogut per la inteïna GyrA. Ins, a la fracció insoluble remanent després de la solubilització. E, a la fracció purificada de RP-FPLC corresponent a la hGH.

La figura 4.40 mostra el procés global del *downstream* per a la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®], amb totes les etapes principals resoltes i analitzades per SDS-PAGE i *Western Blot* amb anticòs contra hGH. A partir de l'homogeneïtzació de les fulles de planta de tabac, el procés de recuperació de rhGH consta de 4 etapes principals: homogeneïtzació de biomassa, recuperació de cossos proteics, solubilització i autoprocessament, i purificació de la proteïna recombinant. A escala de laboratori, partint de 100-200g de biomassa fresca de planta de tabac, el

procés global té una duració màxima de 2 dies sencers, els quals podrien ser optimitzats per a una producció a major escala.

Tal i com es pot observar a la figura 4.40, el grau d'enriquiment de rhGH al llarg del procés va anar augmentant significativament, fins al punt que només fou necessària una etapa final de purificació per tal d'obtenir valors de puresa de rhGH pròxims al 100%.

És important recalcar que en l'etapa de solubilització no fou possible solubilitzar bona part dels agregats en forma de multimers de proteïna de fusió, tal i com indica la seva detecció en la fracció insoluble (Ins) del procés.

La fàcil traçabilitat analítica de la fusió hGH-GyrA-Z a partir de la fracció de cossos proteics aïllats, va permetre l'agilització en la posada a punt de les condicions d'autoprocessament induït. Entre les variables i condicions que varen ser provades, es varen tenir en compte paràmetres com la temperatura, el temps d'inducció, rang de pH, presència de sals, tipus d'agent reductor, i altres components del tampó d'inducció no essencials per al processament.

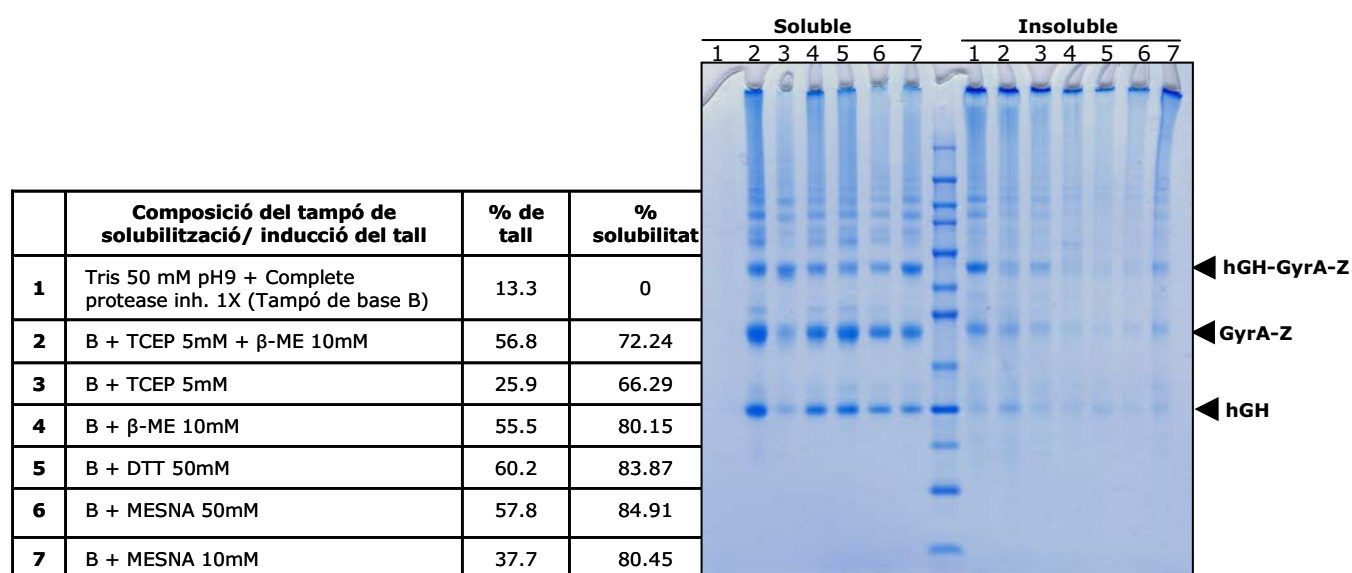


Figura 4.41. Efecte de diferents agents reductors sobre la solubilització de cossos proteics i l'autoprocessament de hGH-MxeGyrA-Zera[®]. Tinció en Coomassie del gel SDS-PAGE on s'han resolt les fraccions solubles i insolubles de cossos proteics aïllats de planta de tabac i solubilitzats amb els tractaments descrits a la taula, on també s'hi descriuen els rendiments de tall i de solubilització obtinguts en cada una de les condicions provades.

La figura 4.41 mostra un exemple de l'aplicació d'una bateria de tampons amb diferent tipus, concentració i combinacions d'agent reductor, que podien afectar al rendiment d'autoprocessament. Per a cada una de les condicions provades i basant-se en l'anàlisi densitomètric de cada una de les bandes identificades, es va calcular el percentatge de tall i de solubilització després de 16 hores d'inducció a 25°C, prenent com a base la mostra insoluble del tractament 1 en absència d'agent reductor. A partir d'aquestes dades se n'extreu que les millors condicions de solubilització i autoprocessament s'obtingueren en presència de DTT 50 mM, on el percentatge de

tall assolit fou pròxim al 60% i el de solubilització al 84%. Tot i així, podem concloure que tots els tractaments varen donar resultats similars amb percentatges de solubilització i d'autoprocessament elevats, excepte per als tractaments 3 i 7, on els rendiments d'autoprocessament obtinguts foren menors. Malgrat que l'objectiu principal de tot procés de producció d'una proteïna recombinant consisteix en assolir rendiments i valors d'eficiència elevats, també s'han de considerar els costos de producció per a una escala superior. Per aquesta raó, i tenint en compte que els valors d'eficiència de tall i solubilització no varen ser gaire dispars, es va escollir el tractament 4 com a tampó d'inducció d'autoprocessament de la proteïna hGH-GyrA-Z en plantes de tabac. L'elecció va estar fonamentada per la senzillesa de la composició d'aquest tampó, així com pels costos econòmics inferiors del β -mercaptoetanol en front als del DTT.

Purificació de rhGH autoprocessada mitjançant la inteïna MxeGyrA

L'última etapa del procés de producció de rhGH correspon a la seva purificació i separació d'altres proteïnes presents en la mostra autoprocessada. De nou, la cromatografia líquida de fase reversa d'alta resolució, va ser el mètode de purificació utilitzat per a l'obtenció del producte pur.

Un tampó a base d'acetat acètic a pH 4, β -mercaptoetanol 0,02%, i acetonitril va ser utilitzat com a solvent mòbil de la columna, amb el qual es varen establir que les millors condicions de separació s'obtenien amb un gradient del 30 al 70% d'acetonitril, en 60 minuts (20 CV) (fig. 4.42). Les fraccions col·lectades foren analitzades per SDS-PAGE impregnat amb nitrats de plata, per tal de determinar la presència de la banda corresponent a hGH i alhora determinar el seu grau de puresa. El resultat corresponent ens mostra una separació de hGH autoprocessada, de la resta de components proteics, obtenint un grau elevat de puresa pròxim al 100%.

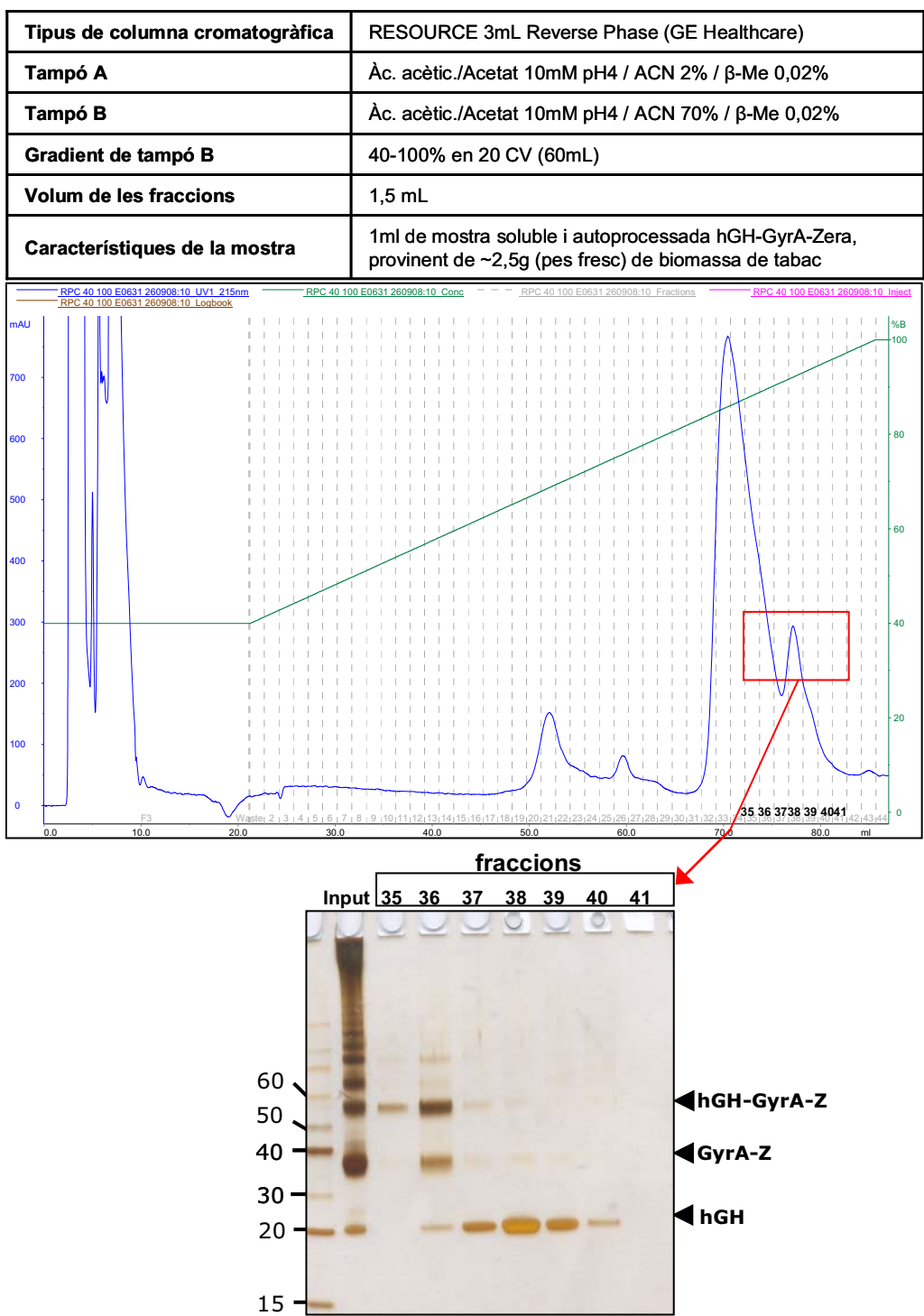


Figura 4.42. Purificació de la hGH autoprocessada per columna de fase reversa FPLC. Condicions de purificació emprades (requadre superior), cromatograma corresponent i anàlisi de les fraccions corresponents a l’elució de hGH per impregnació amb nitrat de plata.

El rendiment de la columna va ser avaluat mitjançant el càlcul del percentatge de recuperació de la hGH, considerant el material d’entrada a la columna respecte al de sortida. Aquest estudi es va dur a terme per *Western Blot*, carregant diferents quantitats de mostra d’entrada, i del *pool* de fraccions de sortida corresponents a la hGH pura. El resultat de l’anàlisi densitomètric mostra una recuperació pròxima al 65-70% de la proteïna d’interès pura, el qual suposa un mètode de purificació optimitzable, però suficient per a l’immediat interès d’aquest estudi.

Per tal de determinar l'especificitat del tall promogut per la inteïna MxeGyrA, es va procedir a la validació del producte d'interès hGH processat mitjançant espectrometria de masses. Aquesta tècnica ens va permetre determinar el pes molecular exacte de la proteïna purificada (22133Da), el qual fou quasi idèntic al de la proteïna esperada (espectre de masses no mostrat). Tot i que aquest anàlisi no permet determinar la seqüència d'aminoàcids de la hGH processada, la validació del producte va ser aprovada degut a la dificultat tècnica que suposa la validació requerida mitjançant una seqüenciació C-terminal de la proteïna.

Anàlisi de l'activitat biològica de la hGH produïda a planta de tabac com a proteïna de fusió autoprocessada per la inteïna MxeGyrA.

Per a poder afirmar que l'expressió en plantes de tabac suposava un sistema viable per produir rhGH activa mitjançant l'autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA, fou necessari confirmar que el producte obtingut era actiu.

L'activitat biològica de la hGH recombinant va ser determinada mitjançant un test de proliferació cel·lular de la línia Nb2 de limfoma rata (Gout *et al.* 1980), utilitzant un colorant per determinar la viabilitat cel·lular (*Cell Blue Assay*, de Promega). El creixement d'aquestes cèl·lules canceroses és dependent de la disponibilitat que tenen en el medi de prolactines com la hGH. Com a patró estàndard de l'assaig d'activitat es va utilitzar una rhGH comercial, expressada i purificada a partir d'*E.coli* (Anhui Anke Biotechnology Co.). El test consistia en un monitoratge del creixement cinètic de les cèl·lules que havien estat arrestades en les fases G₀/G₁ per privació de sèrum, i posteriorment exposades a diferents concentracions de hGH purificada. Com a control negatiu d'activitat, les cèl·lules varen ser cultivades en sèrum deficient en lactògen (sèrum de cavall).

Tal i com podem observar als resultats de l'assaig presentats a la figura 4.43, el creixement de les cèl·lules Nb2 en presència de diferents concentracions de hGH recombinant va ser comparable als del creixement observat en presència de la rhGH comercial produïda a *E.coli*.

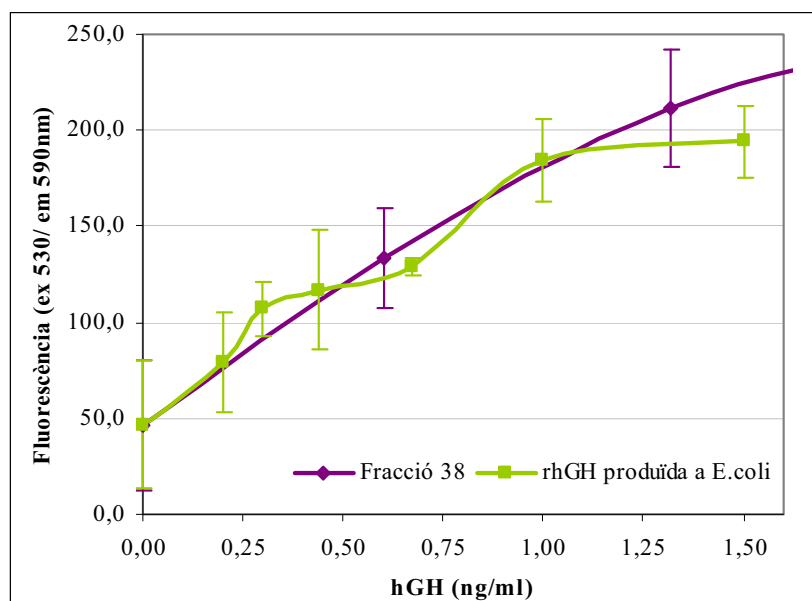


Figura 4.43. Anàlisi de l'activitat biològica de hGH, producte purificat provinent de l'autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA. L'activitat va ser determinada mitjançant el seguiment de la proliferació i creixement de la línia cel·lular Nb2 de limfoma de rata, exposades a diferents concentracions d'hormona. Com a mostra problema es va pendre la fracció 38 quantificada, provinent de la purificació per RP-FPLC. Com a control es va utilitzar hGH recombinant produïda a *E.coli* (Anhui Anke Biotechnology Co). Cada valor de la corba representa la mitjana d'experiments realitzats per triplicat.

En absència de lactògens en el medi (control negatiu) no es va detectar estimulació del creixement cel·lular, permetent una validació i fiabilitat dels resultats, que mostraren un percentatge d'activitat del 100% per a la fracció 38 corresponent al pic d'elució de rhGH processada i purificada a partir de hGH-GyrA-Z. Podem concloure, per tant, que l'autoprocessament promogut per la inteïna no té un efecte advers sobre l'activitat biològica de la hGH, permetent la seva aplicació en sistema de producció de proteïnes amb interès biomèdic.

**CAPÍTOL 3: Anàlisi comparatiu de diferents
sistemes de processament de proteïnes de fusió
Zera[®].**

CAPÍTOL 3: Anàlisi comparatiu de diferents sistemes de processament de proteïnes de fusió Zera[®].

Per tal de validar el sistema de tall posat a punt en el capítol anterior emprant la inteïna MxeGyrA per al processament de proteïnes de fusió Zera[®], fou necessari un estudi comparatiu en termes de cost-eficència del procés de recuperació d'una mateixa proteïna, emprant dos sistemes de processament diferents.

Tal i com s'ha descrit en el primer capítol de resultats, l'enteroquinasa és una de les proteases exògenes més àmpliament utilitzades en la producció de proteïnes recombinants de fusió, ja que presenta activitat específica en diferents condicions de reacció i, sobretot, perquè catalitza un tall net sense residus addicionals a la proteïna d'interès.

En aquest apartat es presenten el resultats obtinguts de la comparació de dos processos de producció de rhGH a partir de les fusions hGH-MxeGyrA-Zera[®] i Zera[®]-D4K-hGH, acumulades en cossos proteics de planta de tabac *N. benthamiana*.

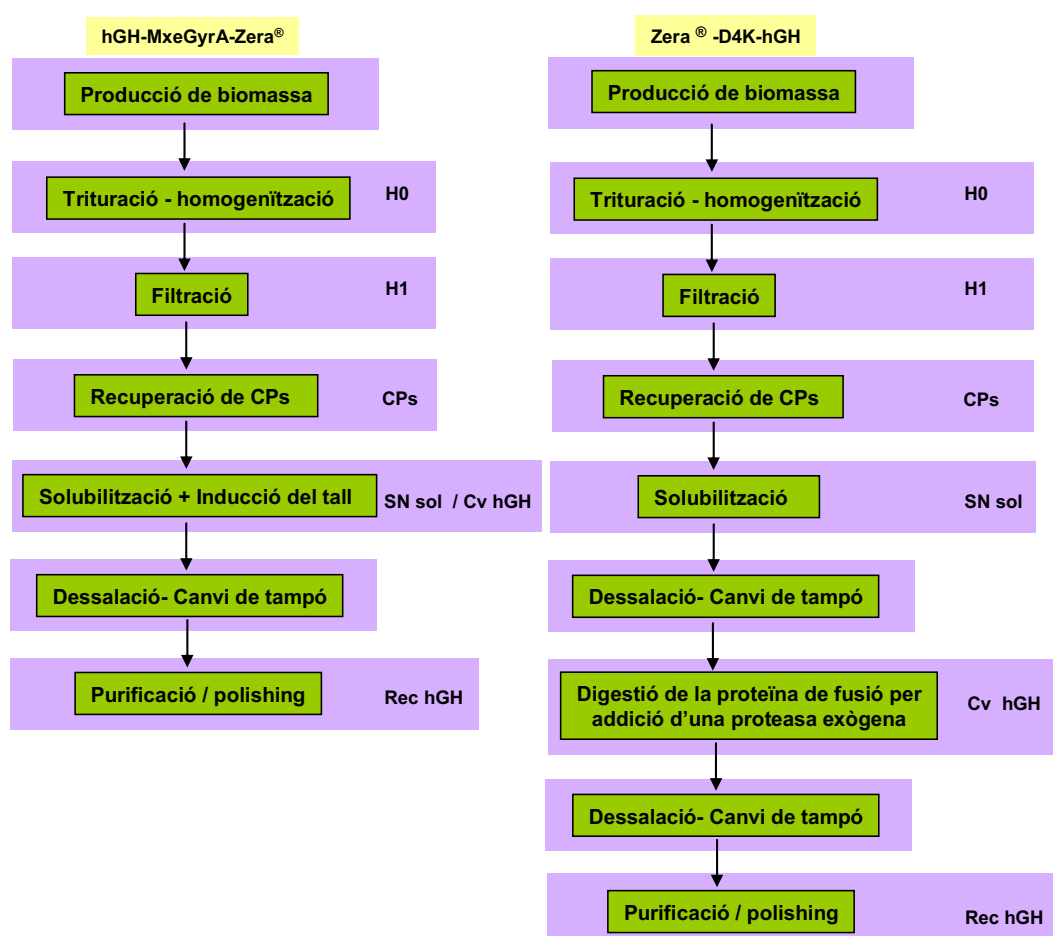


Figura 4.44. Diagrames de flux corresponents als processos de purificació de hGH provinents de dos proteïnes de fusió Zera[®] diferents, acumulades en planta de tabac (*N. benthamiana*). El diagrama de l'esquerra correspon a la proteïna de fusió que conté la inteïna GyrA, hGH-MxeGyrA-Zera[®]. El de la dreta, correspon al procés de *downstream* de la proteïna de fusió Zera[®]-D4K-hGH.

A la figura 4.44 s'hi troben representats els diagrames de flux corresponents a les etapes de recuperació de hGH a partir d'aquests processos, un mitjançant l'expressió de la proteïna de fusió convencional Z-D4K-hGH amb la diana de tall (D4K) per a l'enteroquinasa, i l'altra mitjançant la proteïna de fusió que conté la seqüència de la inteïna MxeGyrA. Ambdós processos consten d'etapes comuns fins a la recuperació dels cossos proteics, moment en el qual diferien els procediments de solubilització i digestió de la proteïna recombinant. La solubilització de cossos proteics de hGH-GyrA-Z es duia a terme simultàniament a la inducció de l'autoprocessament, en presència d'agent reductor i durant un mínim de 4 hores (màxim 16 hores d'incubació). D'altra banda, els cossos proteics de Z-D4K-hGH primer eren solubilitzats durant 2 hores en presència d'agent reductor, i posteriorment, les condicions del tampó de solubilització eren adaptades per a esdevenir compatibles amb l'activitat de l'enteroquinasa mitjançant l'ús d'una columna dessaladora. La digestió de Z-D4K-hGH per mitjà de la proteasa enteroquinasa comercial es duia a terme en una relació de 80µg de proteïna de fusió/ Unitat d'enzim, durant un màxim de 3 hores, a 16°C. Abans de l'última etapa de purificació, els productes de digestió provinents de cada un dels dos processos, cursaven el mateix tractament pel que fa a l'adaptació del tampó a les condicions d'unió a la columna cromatogràfica de fase reversa.

L'anàlisi electroforètic de les etapes que conformen cada un dels processos de *downstream* corresponents a les dues proteïnes de fusió Zera[®] es troba representat a la figura 4.45. De la seva observació se n'extreu que, a mesura que avança el procés de recuperació de hGH, s'obté un grau d'enriquiment més elevat, sobretot en les etapes corresponents a l'aïllament de cossos proteics i solubilització, marcades per la predominança de la proteïna recombinant respecte les endògenes recuperades en la mateixa fracció.

Malgrat que les mostres que representen l'homogenat i el filtrat (H₀ i H₁, respectivament) de l'extracte corresponent a hGH-MxeGyrA-Z foren carregats en menys quantitat, els nivells d'expressió assolits per ambdues proteïnes recombinants no foren suficients per identificar la banda relativa a la proteïna de fusió en aquestes fraccions. La traçabilitat dels productes recombinants només fou possible a partir de la fracció corresponent a la recuperació de cossos proteics, on la proteïna es troba més enriquida i concentrada.

Pel que fa a la solubilització dels cossos proteics, s'observa que la presència de poder reductor en el tampó de solubilització, fa augmentar de manera diferencial la solubilització de la proteïna de fusió Zera[®] acumulada a cos proteic. Altres proteïnes o components no proteics endògens que havien estat recuperats a la fracció de cos proteic foren descartats en la fracció insoluble (fracció no mostrada).

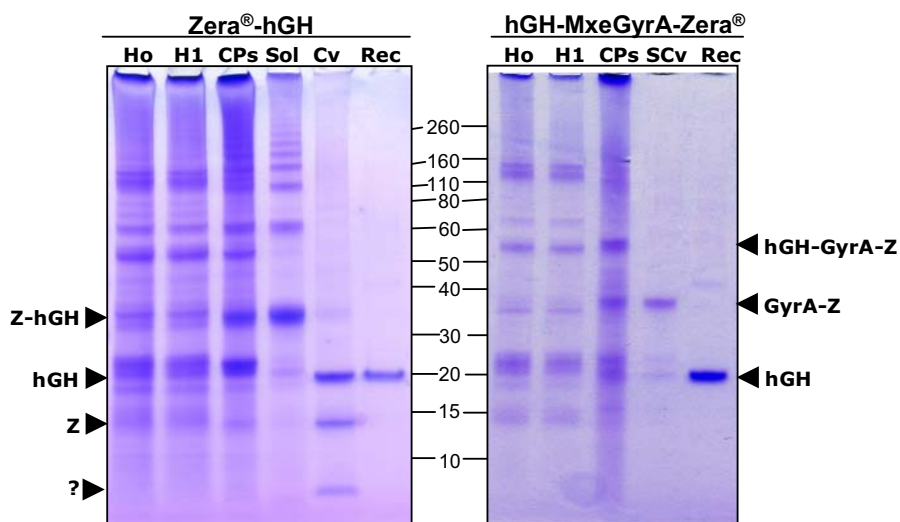


Figura 4.45. Anàlisi comparatiu dels processos de *downstream* corresponents a dues proteïnes de fusió Zera® amb metodologies de processament diferents. A l'esquerra el tall es dona per addició d'enteroquinasa, i a la dreta per autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA. Ho, correspon a l'homogenat. H1, a l'homogenat filtrat. CPs, al pellet de CPs. Sol, a la fracció soluble de CPs. Cv, a la fracció soluble de Zera®-hGH digerida amb EK. SCv, als CPs solubilitzats després de la inducció del tall promogut per la inteïna GyrA. Rec, a la fracció purificada de RP-FPLC corresponent a la hGH recuperada. Noteu, que en el procés de la inteïna es produeix l'estalvi d'una etapa del *downstream*.

L'etapa de digestió de Z-D4K-hGH amb enteroquinasa comercial fou optimitzada per tal d'obtenir major rendiment de tall en funció del temps. Tal i com es pot observar a la figura 4.45 (carril Cv), fruit d'aquesta reacció s'obtingué un producte addicional de digestió (pes molecular aproximat a 5kDa), que podria ser resultat d'un tall inespecífic degut a l'acció incontrolada de la proteasa. Per tal de reduir aquest efecte, es varen provar diferents condicions de reacció a temperatures més baixes i reaccions més curtes, amb la finalitat de mantenir el rendiment de tall i minimitzar la formació d'aquest subproducte.

Finalment, l'etapa de purificació per RP-FPLC (Rec), representada en la fracció amb el pic màxim d'elució de rhGH, va permetre obtenir la proteïna recombinant amb un elevat grau de puresa per ambdós processos, tal i com indica la presència d'una única banda de pes molecular aproximat a 22kDa, i d'una de 44kDa molt més tènue, que podria correspondre al dímer de la mateixa.

Quantificació global del procés de producció de rhGH a partir de hGH-GyrA-Zera® acumulada en planta de tabac.

Un cop establert el procés de recuperació de rhGH fins a la darrera etapa de purificació, el següent objectiu fou el de determinar la seva productivitat i cost efectivitat de producció.

Aquest estudi va consistir en l'obtenció de dades de quantificació globals de tot el procés de producció mitjançant el mètode d'autoprocessament basat en la inteïna MxeGyrA. D'altra banda, i per tal de comparar els diferents sistemes de processament, també es varen generar dades per

establir el model de cost per a la producció de Zera[®]-hGH processada mitjançant enteroquinasa, com a proteasa convencional de processament.

Etapa de <i>downstream</i> del procés hGH-GyrA-Z	Proteïna total (g prot/Kg FW)	Proteïna hGH (g prot/Kg FW)	Rendiment de l'etapa (%)	Rendiment total (%)	Puresa (%)
Homogenat (H ₀)	35,5	0,40	100	100	1,12
Homogenat filtrat (H ₁)	/	0,39	98	98	/
Cossos proteics aïllats (PBs)	6,16	0,29	74,36	72,5	4,70
Solubilització i autoprocesament (SCv)	0,8	0,17	58,62	42,5	26,25
Cromatografia RP-FPLC / hGH purificada	/	0,13	76,47	32,5	100

Etapa de <i>downstream</i> del procés Z-D4K-hGH	Proteïna total (g prot/Kg FW)	Proteïna hGH (g prot/Kg FW)	Rendiment de l'etapa (%)	Rendiment total (%)	Puresa (%)
Homogenat (H ₀)	52,5	3,2	100	100	6,09
Cossos proteics aïllats (PBs)	9,48	2,12	66,2	66,2	22,35
Solubilització (S)	1,76	0,86	40,57	22,45	48,75
Digestió amb enteroquinasa (Cv)	0,27	0,11	12,79	3,28	40,97
Cromatografia RP-FPLC / hGH purificada	/	0,05	45,45	1,76	100

Taula 4.2. Rendiment i puresa de dos processos de producció de hGH recombinant a planta de tabac *N. benthamiana*, a partir de les proteïnes de fusió hGH-GyrA-Z (en verd) i Z-D4K-hGH (en groc).

La metodologia emprada per a la quantificació de cada una de les etapes del *downstream* va estar basada en la tècnica específica per a proteïnes de fusió Zera[®] mitjançant ELISA-IMAC, i complementada amb la quantificació per *Western Blot* emprant com a estàndard una mostra de hGH-GyrA-Z quantificada per anàlisi d'aminoàcids.

Els resultats de la quantificació comparativa d'ambdós processos es troben resumits a la taula 4.2, on també s'hi troben els càlculs de rendiment i puresa de cada una de les etapes del procés.

A partir d'aquestes dades se n'extreu que el rendiment global de producció de rhGH fou superior en el procés on s'hi va emprar la inteïna MxeGyrA com a mètode de processament (32,5% envers 1,76%). El veritable coll d'ampolla per al procés de Z-D4K-hGH fou el de la digestió amb enteroquinasa, assolint-se un rendiment de tall pròxim al 13%. Aquest valor fou tant baix a resultes de la presència d'un tall inespecífic, el qual va ser minimitzat mitjançant temperatures més baixes, la reducció de la quantitat de proteasa i escurçant els temps de reacció. Tot i que el tall inespecífic no va poder ser eliminat, les condicions optimitzades es mostren a la figura 4.45, i són sobre les quals es varen generar les dades presentades a la taula 4.2.

Per contrapartida, el rendiment d'autoprocesament mediat per la inteïna MxeGyrA va ser pròxim al 60% per un temps de reacció de 16 hores i en condicions no desnaturalitzants. Malgrat la llarga durada de la reacció, no s'observaren productes secundaris derivats de tall inespecífic, ni de degradació proteolítica. Cal remarcar que l'activitat de la inteïna és compatible amb la presència

d'inhibidors de proteases en el tampó de reacció, i per tant, confereixen una avantatge afegida respecte a moltes de les proteases comercials existents.

D'altra banda, el fet que la solubilització i l'autoprocessament de hGH-MxeGyrA-Z conformin una sola etapa, suposa un efecte positiu sobre el rendiment global del procés (42,5% vers 25,7% de la solubilització de Z-D4K-hGH), indicant que ambdues activitats podrien ser mutuament afavorides i actuar de forma cooperativa o per retro-alimentació.

Finalment, les dades de puresa obtingudes al final del procés, indiquen que el producte rhGH obtingut mitjançant ambdós processos Zera[®], presentaven una puresa del 100%.

Els costos globals de producció de rhGH varen ser determinats mitjançant un programa de simulació i disseny de processos de producció industrial (SuperPro Designer[®] Software), que també permet identificar dins d'un mateix procés, els punts clau o colls d'ampolla, reduir els seus temps cíclics, o bé definir l'impacte ambiental o el tractament de residus generats durant el procés.

En el cas concret d'aquesta tesi, l'interès de l'aplicació d'aquest programa fou encaminat per a definir i comparar la productivitat, el cost i el rendiment global de recuperació de hGH per als dos processos descrits en planta de tabac, usant o bé l'enteroquinasa exògena, o bé la inteïna MxeGyrA per al processament de la proteïna de fusió Zera[®].

El programa informàtic SuperPro Designer requereix d'una definició prèvia del bioprocés escollit per a una producció mitjançant el sistema d'expressió establert. En el nostre cas, l'expressió en plantes de tabac, no requeria d'una plataforma extensa amb unitats de producció, així que el bioprocés fou definit a partir del processament de la biomassa transgènica recol·lectada, assumint que per a una producció a gran escala la generació de línies transgèniques estables seria un requisit imprescindible.

La recuperació de cos proteic a partir de volums grans (tones) de biomassa de tabac requeriria de 4 unitats de treball: trituració, filtració, homogeneïtzació i centrifugació (fig 4.46), les quals serien comuns als dos processos objecte del nostre estudi.

A partir de la recuperació de cos proteic i fins a la recuperació de la proteïna pura, pel cas del procés amb l'enteroquinasa, es requeririen 5 unitats de treball addicionals: solubilització, centrifugació, digestió amb enteroquinasa, purificació i concentració de la proteïna pura per diafiltració. El procés de la inteïna suposaria l'estalvi d'una unitat d'operació, el qual repercuteix en el cost global de producció (fig 4.46).

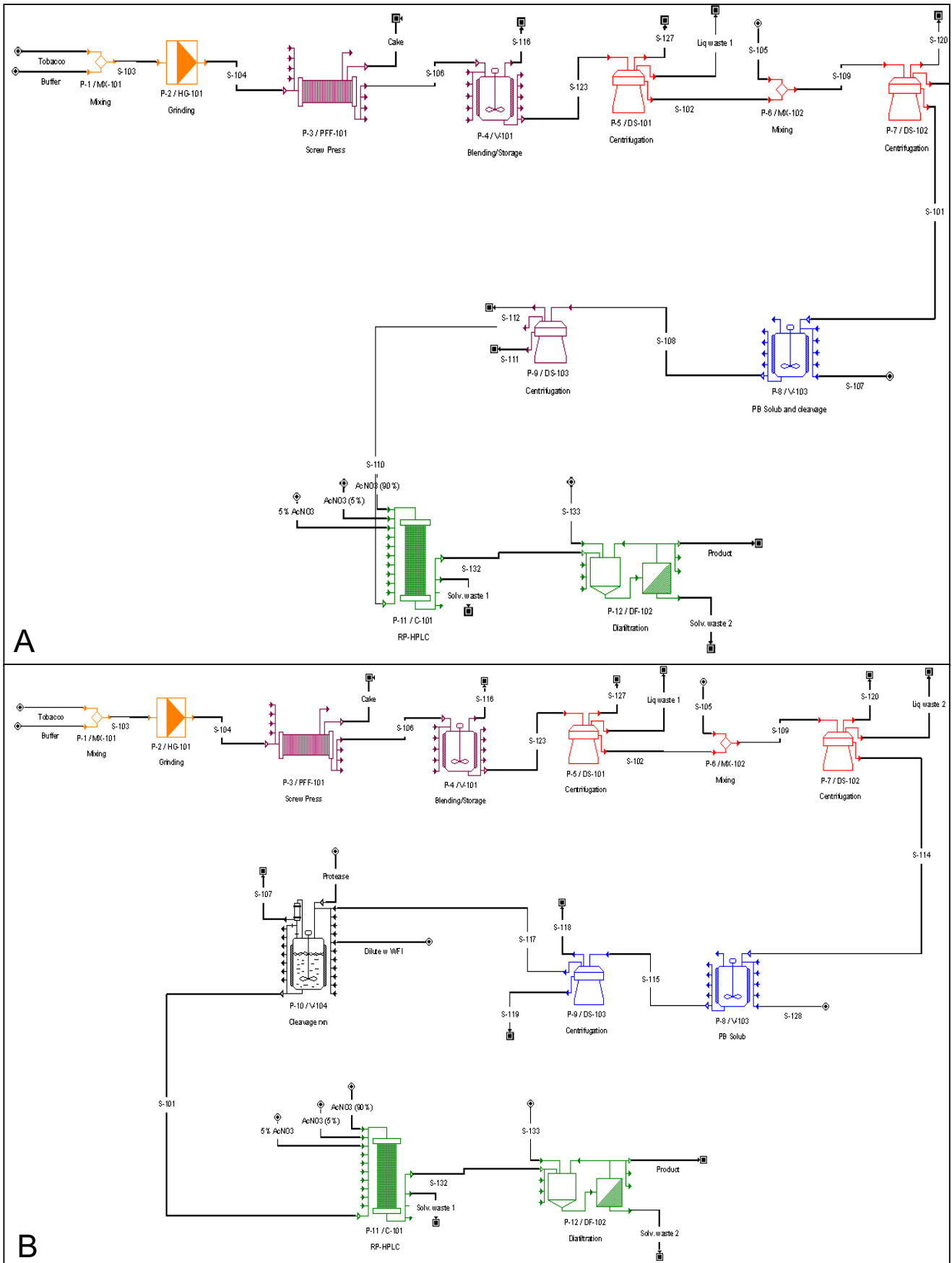


Figura 4.46. Diagrames de procés proposats per a la producció de rhGH en planta de tabac. El bioprocés fou definit a partir del tractament de la biomassa transgènica de tabac fins a l'etapa de recuperació de hGH purificada. **A:** Procés de producció de rhGH mitjançant la fusió hGH-GyrA-Z. **B:** Procés de producció de rhGH per acumulació de Z-D4K-hGH i digestió amb enteroquinasa. Noteu l'estalvi d'una unitat d'operació en el procés en el qual hi intervé l'activitat d'autoprocessament de la inteïna MxeGyrA.

Per tal d'establir el model de cost i poder realitzar una avaluació econòmica el més rigorosa possible, es varen tenir en compte una sèrie d'assumpcions fixes, tenint en compte els preus dels consumibles corresponents a l'any 2008 (taula 4.3). Val a dir que l'estudi cost econòmic per al procés de Z-D4K-hGH es va realitzar tenint en compte l'ús d'una enteroquinasa de baix cost (600\$/g d'enteroquinasa) produïda a gran escala, ja que si no fora així el cost per cada Kg de hGH hagués estat econòmicament inviable (fins a més de 1000 \$ per cada gram d'enteroquinasa). De la mateixa manera, pel cas de la inteïna no es varen tenir en compte els costos de l'obtenció d'una llicència d'ús de la MxeGyrA per a la producció del producte recombinant, tot i que la caducitat d'aquesta llicència està prevista per al 2012.

Producció de 100 Kg de hGH activa per any	Tecnologia Zera® - processament amb EK	Tecnologia Zera® - processament mitjançant la inteïna MxeGyrA
Nivells d'acumulació de hGH (g hGH/Kg biomassa fresca)	3	0,39
Rendiment del procés	3,5%	16%
Biomassa de tabac requerida (T)	949	1.580
% ACTIVITAT (vs hGH comercial)	>100%*	>100%*
COST TOTAL (\$/g)	167	208

Taula 4.3. Estudi comparatiu dels costos de producció de 100Kg de rhGH a plantes de tabac, utilitzant dues estratègies de processament diferents. L'estudi realitzat mitjançant el programa de simulació i disseny de processos de producció industrial (SuperPro Designer Software) atenent-se a sèrie d'assumpcions en base als costos i preus de l'any 2008. * Activitat determinada mitjançant un assaig de proliferació de cèl·lules Nb2 *versus* hGH recombinant produïda a *E.coli*.

Com a resultat d'aquest estudi, es varen obtenir una sèrie d'informes econòmics derivats de les simulacions amb el programari SuperPro designer, on es podien trobar resumits el llistat d'equips que intervenen en cada procés, els respectius preus, el cost dels operaris, la llista de matèries primes i material fungible, els càlculs del cost d'operació, així com l'anàlisi de rendibilitat del procés.

D'ells se'n extreu que el rendiment obtingut mitjançant el procés de la inteïna fou millor que mitjançant l'ús d'una proteasa exògena, arribant a assolir rendiments del 16%. D'altra banda, és important remarcar les diferències en els nivells d'acumulació de hGH en la biomassa de partida. La proteïna de fusió amb la inteïna MxeGyrA suposa una acumulació de hGH fins a 8 vegades menor que la corresponent a Z-D4K-hGH. Aquestes diferències importants d'acumulació van ser detonants per tal d'activar la cerca d'estratègies encaminades a millorar els nivells d'expressió i acumulació de hGH-GyrA-Z en plantes de tabac.

Optimització dels nivells d'expressió i acumulació de hGH-GyrA-Zera[®] en plantes de tabac.

Les diferències d'acumulació observades en plantes de tabac entre la proteïna de fusió Z-D4K-hGH i hGH-GyrA-Z, varen fer que el procés basat en inteïnes no presentés un valor afegit de producció significatiu envers a l'ús de proteases exògenes, sobretot des d'un punt de vista cost efectiu.

Alguns dels factors que podrien afectar al nivell d'acumulació de proteïna recombinant podrien resultar de l'efecte individual o d'una combinació de factors com la mida de la proteïna de fusió, la posició a C-terminal del domini Zera[®], la limitació a nivell de traducció degut a la seqüència nucleotídica no adaptada a l'ús de codó de les plantes de tabac, entre d'altres.

L'únic efecte que vàrem poder modificar per tal d'avaluar la seva repercussió directa sobre els nivells d'acumulació, fou l'adaptació de la seqüència de nucleòtids a l'ús de codó de la planta de tabac, duta a terme per la companyia Genearth AG mitjançant síntesi gènica.

La construcció resultant va ser utilitzada paral·lelament a la seqüència no adaptada, per a la transformació transitòria de plantes de tabac. L'anàlisi comparatiu dels nivells d'acumulació és mostrat a la figura 4.47, on dues quantitats diferents d'extracte proteic total provinent de les plantes agroinfiltrades amb les dues construccions varen ser resoltes i analitzades per *Western Blot*.

El resultat fruit de dues agroinfiltracions independents, no mostra diferències significants d'acumulació entre la construcció adaptada al codó de tabac, i la no adaptada, segons l'estudi densitomètric realitzat. Podem concloure que, malgrat que la seqüència de DNA hagi estat optimitzada per a l'expressió en aquest hoste, no hi ha un efecte evident sobre l'acumulació, i per tant, pot ser descartat com a possible efecte pel qual s'observi una davallada d'acumulació respecte a Z-D4K-hGH, en plantes de tabac.

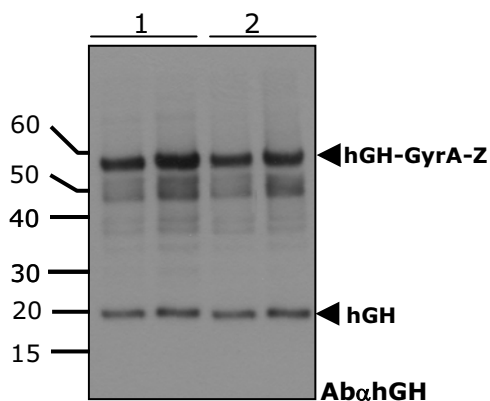


Figura 4.47. Estudi de l'efecte de l'adaptació de la seqüència nucleotídica a l'ús de codó de tabac sobre el nivells d'expressió de proteïna de fusió Zera[®]. Comparació dels nivells d'expressió de la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] amb la seqüència adaptada a l'ús de codó de tabac (1) i la no adaptada (2). Anàlisi per *Western Blot* amb anticòs contra hGH, a partir de 3 i 5µg de proteïna total provinents d'un extracció proteica total.

Aplicació de l'autoprocessament de la inteïna MxeGyrA en columna d'afinitat per Zera[®].

Resultats preliminars havien permès demostrar que el domini Zera[®], degut a la seva estructura d'hèlix poliprolina II que permet l'orientació de les histidines en un mateix pla, pot funcionar com a etiqueta (*tag*) d'afinitat en una columna IMAC (*Immobilized Metal Affinity Column*).

El primer pas havia consistit en determinar quin metall donava una millor eficiència de retenció de Zera[®]. A partir d'aquest estudi es va poder demostrar que, tot i que els diferents metalls tenien comportaments molt similars pel que fa a la purificació de Zera[®], les columnes IMAC de níquel mostraven millor retenció de la proteïna Zera[®].

La utilització d'aquest sistema es va dur a terme per a la purificació de diferents proteïnes de fusió Zera[®] provinents de diferents hostes d'expressió. En tots els casos es varen posar a punt les condicions d'entrada per tal d'optimitzar la interacció de Zera[®] amb el lligand, evitant la retenció d'altres proteïnes contaminants; les condicions de rentat, per tal d'eliminar el màxim possible de proteïnes inespecífiques; i les condicions d'elució per tal d'alliberar la proteïna d'interès més concentrada i amb un grau de puresa més elevat. El grau de recuperació i enriquiment resultat del pas per aquesta columna va assolir valors pròxims al 80%, fet el qual indica que la major part de la proteïna Zera[®] fou retinguda correctament i eluïda de forma eficient. Aquesta nova eina de la tecnologia va permetre assolir un grau de puresa comparable al que s'obtindria després d'una sèrie d'etapes a través de columnes cromatogràfiques, en altres estratègies de purificació en les quals no hi ha intervenció del domini Zera[®]. Per tant, el que s'aconseguia a nivell quantitatiu fou abaratir encara més el cost global de producció de proteïnes recombinants mitjançant Zera[®].

La immobilització de la proteïna hGH-MxeGyrA-Z en una columna d'afinitat, a més, podia permetre el processament en columna, de forma que la rhGH processada podia ser colectada en el *Flow-through*, lliure de la majoria d'impureses.

Amb aquesta finalitat, es varen posar a punt les condicions d'unió de la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z a una resina basada en partícules de Ni-NTA (*Nickel- Nitrilotriacetic acid*) agarosa i de inducció de l'autoprocessament en columna.

Per tal d'immobilitzar eficientment la proteïna de fusió a la resina de níquel, calia que aquesta fos soluble i estable en el tampó d'entrada a la IMAC. Degut a què la solubilització i la inducció de l'autoprocessament de la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Z tenien lloc simultàniament en presència d'agent reductor, calia trobar condicions que permetessin fer que aquestes etapes fossin independents i seqüencials. Per a tal efecte, es varen provar una bateria de condicions de solubilització que promoguessin el mínim autoprocessament possible, mitjançant diferents tipus de poder reductor. Les condicions de solubilització més òptimes s'obtingueren

incubant els cossos proteics en un tampó Tris 20mM pH9, TCEP 5mM i inhibidors de proteases (cocktail Complete 1X- Roche), durant 2 hores a temperatura ambient. En aquestes condicions s'assolia prop d'un 70% de solubilització de cossos proteics i prop d'un 25% de tall de hGH (veure fig. 4.42)

La figura 4.48 mostra el resultat del procés de recuperació de hGH autoprocessada mitjançant una columna d'afinitat per Zera[®], a la qual hi havíem immovilitzat la proteïna de fusió hGH-GyrA-Z solubilitzada.

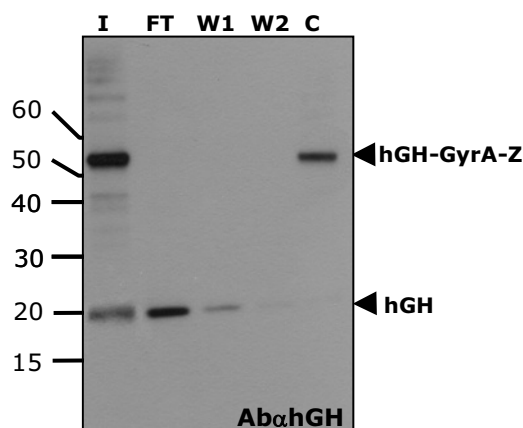


Figura 4.48. Inducció de l'autoprocessament en columna d'afinitat IMAC. Anàlisi per *Western Blot* de les diferents fraccions de la purificació per columna d'afinitat. I, correspon al material d'entrada. FT, al *flow-through* després de la inducció de l'autoprocessament. W1 i W2, corresponen a dos rentats consecutius de la columna. C, correspon a la fracció que roman unida a la resina. Immunoblot incubat amb anticòs contra hGH.

La rhGH processada durant l'etapa de solubilització, fou descartada juntament amb altres impureses presents en la mostra en el primer *Flow-through* posterior a l'etapa d'unió de la proteïna de fusió (mostra no representada en la figura 4.48). Després de successius rentats de columna, s'hi va afegir el tampó d'inducció de l'autoprocessament conenint β -mercaptoetanol 20mM, i es va deixar incubar amb la resina durant 16 hores a temperatura ambient. Com es pot observar, la rhGH autoprocessada fou recollida en la fracció no retinguda de la mostra (FT – *Flow-through*), indicant que no presenta afinitat per al metall de níquel. En canvi, els productes d'autoprocessament que contenien Zera[®], tant la fusió com el fragment corresponent a GyrA-Z, quedaven retinguts a la columna (C). El grau de puresa de la fracció corresponent al *Flow-through*, va ser comprovada per anàlisi d'aquesta fracció per electroforesi SDS-PAGE, mostrant una única banda corresponent a hGH en tot el carril (imatge no mostrada).

Amb aquest resultat podem concloure que la columna d'afinitat IMAC-Ni posada a punt per a les proteïnes de fusió Zera[®], presenta una utilitat afegida a l'estratègia de processament mitjançant inteïnes, ja que permet separar i purificar la proteïna d'interès hGH de la proteïna de fusió Zera[®], en

una sola etapa. Cal recordar, que degut a les propietats d'agregació i acumulació de Zera[®] en cúmuls de tipus cos proteic, l'etapa de purificació per RP-FPLC de la proteïna d'interès havia mostrat certa dificultat en la separació dels components proteics de Zera[®] en front de la proteïna d'interès hGH. Mitjançant el pas per aquesta columna, es simplifica per tant, l'etapa final de purificació i s'assoleixen rendiments i grau de puresa elevats de forma més pràctica i eficient.

Malgrat tot, el rendiment de l'autoprocessament de la proteïna de fusió immobilitzada fou menor que la duta a terme en solució (menys del 40% de tall en columna, vers el 60% de tall assolit en solució). Aquest fet indica la necessitat d'adaptar les condicions de tall en columna en termes de durada de reacció, renovació de tampó de processament, o bé l'ús de nous additius.

Un valor afegit a la introducció d'aquesta etapa de purificació en el procés global de *downstream* de proteïnes Zera[®], derivaria del seu potencial a ser aplicat a una escala superior a la del laboratori. Els resultats preliminars d'aquest projecte en desenvolupament mostren que l'eficiència i rendiment d'aquesta etapa són comparables als obtinguts a petita escala, indicant que la columna continua sent útil quan s'augmenta el volum de producció.

5. Discussió

ERA Biotech S.A. és una empresa biotecnològica dedicada al desenvolupament d'una tecnologia exclusiva basada en la producció de proteïnes i pèptids recombinants d'alt valor afegit. La síntesi de proteïnes recombinants s'assoleix mitjançant la seva fusió al domini Zera[®] propietat de la companyia, que confereix la propietat d'autoagregació mitjançant interaccions amb sí mateix, alhora que també s'associa a la membrana del reticle endoplasmàtic, formant cossos proteics d'elevada densitat. El domini Zera[®] prové de la proteïna de reserva del blat de moro γ -zeïna, i s'ha demostrat que intervé en la formació de cossos proteics, tant en blat de moro, com en diferents hostes eucariotes heteròlegs (Geli *et al.*, 1994). La fusió de Zera[®] a una proteïna d'interès provoca l'agregació i acumulació de la proteïna de fusió en un orgànul similar al cos proteic típic del gra de determinats cereals, que emmagatzemen grans quantitats de proteïnes de reserva. La tecnologia Zera[®] treu profit de l'alta densitat d'aquests orgànuls sintetitzats *de novo*, per a la recuperació i purificació de la proteïna d'interès.

Qualsevol procés de producció de proteïnes recombinants està format per dues fases principals: una etapa de síntesi de la proteïna d'interès (*upstream*), i una de recuperació i purificació de la mateixa (*downstream*). Per a la producció de proteïnes recombinants a gran escala, l'etapa de *downstream* esdevé la més costosa, representant en molts casos el 60-80% del cost total de producció (Hearn i Acosta, 2001). Tot i que aquests costos poden resultar acceptables per a productes terapèutics d'alt valor afegit, el desenvolupament de productes biotecnològics més genèrics, requereix estratègies de manufactura més cost-efectives (Banki *et al.*, 2005).

En el cas de les tecnologies basades en proteïnes de fusió, una proporció important d'aquest cost prové de l'etapa de processament per tal d'alliberar el producte d'interès del domini de fusió. Tradicionalment s'han emprat proteases comercials exògenes que presenten una elevada especificitat per a una diana de reconeixement afegida en la seqüència de la proteïna de fusió, com per exemple l'enteroquinasa o el factor Xa, entre d'altres. Aquestes eines però, presenten varies limitacions en termes de cost i eficiència, comproment el seu ús en processos de producció a escala superior. L'elevat cost de les proteases comercials és degut principalment a l'existència d'una gran demanda, juntament amb la manca o absència d'altres proteases d'origen no-mamífer que presentin una eficiència similar a les provinents de mamífer (Kühnel *et al.*, 2003).

La utilització d'aquestes proteïnes amb activitat proteasa sovint presenta altres inconvenients, alguns d'ells deriven de l'obtenció de baixos rendiments de digestió degut a impediments estèrics que impossibiliten el reconeixement de la diana de tall per part de la proteasa, o bé en la impossibilitat de que el centre actiu de la proteasa adquireixi la conformació activa, fent que la reacció no pugui ser duta a terme de forma completa i eficient. Altrament, els rendiments de la reacció catalítica també poden veure's alterats per modificacions en les condicions de digestió, que alhora poden resultar incompatibles amb l'activitat o plegament de la proteïna d'interès.

En el present treball s'han desenvolupat dues estratègies principals per al processament de proteïnes de fusió Zera[®]. Per una banda, la producció d'enteroquinasa fusionada a Zera[®] per tal de permetre la producció d'aquesta proteasa a baix cost. Per altra banda, l'aplicació de mecanismes basats en l'autoprocessament d'inteïnes induïbles, per tal d'assolir l'alliberament del producte d'interès sense la necessitat d'addicionar cap proteasa exògena.

Producció d'enteroquinasa mitjançant la tecnologia Zera[®] a cèl·lules de mamífer i plantes de tabac.

L'enteroquinasa bovina és una proteasa heterodimèrica formada per una cadena pesada i una lleugera unides entre sí per un pont disulfur. La subunitat catalítica la conforma exclusivament la cadena lleugera, i per tant, és la porció de la proteasa que s'utilitza per a la seva producció recombinant. Aquest fragment, d'aproximadament 26kDa, presenta 3 asparagines N-glicosilades i 4 ponts disulfur intracatenaris, els quals resulten essencials per a què adopti la seva conformació activa (La Vallie *et al.*, 1993).

La producció d'enteroquinasa fusionada a Zera[®] es va dur a terme de forma transitòria en cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès (CHO) i en plantes de tabac *Nicotiana benthamiana*.

Generalment, la posició del domini Zera[®] a N- o C- terminal en la proteïna de fusió, depèn del grau d'afectació que pot tenir sobre la funcionalitat de la proteïna d'interès. Pel cas de l'EK la conformació que adopta el seu extrem N-terminal és essencial per a la seva activitat, per tant, la fusió de Zera[®] fou preferible a l'extrem C-terminal. De fet, el residu Ile1 de l'EK és responsable de les interaccions necessàries per mantenir l'estructura terciària de la proteïna (Lu *et al.*, 1999), per tant, el mutant deficient per a aquest residu no permet que la proteïna resultant adopti la conformació activa, resultant un control d'activitat imprescindible en els processos de producció d'aquesta proteasa recombinant.

El grau d'expressió obtingut per les proteïnes de fusió EK-Zera[®] i EKm-Zera[®] (Ile1 deficient) expressades a cèl·lules CHO va resultar notòriament diferent, assolint nivells superiors en el cas de la proteasa mutada. Tenint en compte que les dues proteïnes només difereixen en la presència o absència del primer residu d'EK, és un fet poc probable que les diferències d'acumulació observades siguin conseqüència d'un fenomen a nivell transcripcional, sinó més aviat es tracti d'un efecte citotòxic derivat de l'activitat enteroquinasa *wild type* produïda en fusió amb Zera[®] (EK-Z). Aquest aspecte fou corroborat mitjançant tècniques d'immunodetecció per fluorescència, en els quals es va poder copsar les diferències en l'estat integral de cada una de les cèl·lules transfectades amb una o altra construcció. L'estat deteriorat de les cèl·lules transfectades amb la construcció EK-Zera[®], fou indicatiu de que els nivells d'expressió baixos podien venir justificats pels efectes citotòxics provocats per la proteasa potencialment activa. Contràriament, les

cèl·lules transfectades amb la proteïna de fusió mutant (Ekm-Z), mostraven una integritat completa i, com comentarem més endavant, la presència de cossos proteics de diferent mida en l'espai citoplasmàtic.

La producció d'enteroquinasa recombinant no ha resultat efectiva en molts hostes on s'ha provat la seva expressió. A *E. coli* per exemple, el rendiment assolit ha estat pròxim als 8µg d'EK recombinant per cada gram de sediment cel·lular (Collins-Racie *et al.*, 1995), indicant la incapacitat de l'hoste per a produir proteïnes abundants en ponts disulfur. Rendiments superiors varen ser aconseguits en cèl·lules de llevat metilotròfic *Pichia pastoris*, 25mg EK per cada litre de cultiu (Vozza, *et al.*, 1996), però tot i així, comparant aquest resultat amb l'obtingut amb d'altres proteïnes expressades a *P. pastoris*, el rendiment encara va resultar relativament baix. Altres hostes on s'ha provat l'expressió d'EK no han mostrat millors resultats, indicant que tant la complexitat de la proteïna, com l'efecte tòxic que en pot derivar, resulten en una producció minvada (Svetina *et al.*, 2000 i Colussi i Taron, 2005). L'EK es tracta, per tant, d'una de les convencionalment anomenades proteïnes difícils d'expressar (DEP- *Difficult to Express Proteins*), i l'estratègia inicial de produir-la en fusió amb el seu extrem N-terminal lliure (EK-Z), no va esdevenir la millor opció per assolir el nostre objectiu.

Tot i així, i veient que amb la versió mutada sí que s'assolien nivells òptims d'expressió en cèl·lules CHO, vàrem considerar adient determinar l'acumulació subcel·lular de la proteïna de fusió EKm-Z. D'aquesta manera podíem comprovar que proteïnes recombinants amb característiques complexes com l'EK, podien ser acumulades en estructures de tipus cos proteic formades com a conseqüència de la fusió del domini Zera[®] a C-terminal. Els experiments de localització subcel·lular de la proteïna EKm-Z realitzats, donen evidència que la proteïna de fusió és capaç de formar cossos proteics derivats de reticle endoplasmàtic. En primer lloc, la immunolocalització realitzada a través del microscopi de fluorescència ens indicava la presència d'unes estructures que podrien correspondre per mida i forma, als cossos proteics heteròlegs observats per altres proteïnes de fusió Zera[®] en aquest hoste. En segon lloc, el fraccionament subcel·lular per gradient de densitat de les cèl·lules transfectades, va mostrar que EKm-Z s'acumula en una fracció de densitat propera a la que presenten els cossos proteics naturals del gra de blat de moro.

Així doncs, encara que la determinació exacta de la localització de EKm-Z requeriria una immunolocalització a través de microscopi electrònic, totes les dades experimentals obtingudes fins al moment indiquen que, malgrat que Zera[®] es trobi situat a C-terminal en la proteïna de fusió, EKm-Z és capaç de quedar retinguda a RE i formar cos proteic en cèl·lules de mamífer. De fet, altres proteïnes de fusió Zera[®] expressades en cèl·lules CHO mostraven estructures electro-denses envoltades de membrana de RE rugós, induïdes per l'element fusionador Zera[®] (Torrent *et al.*, 2009a).

Donada la inactivitat inherent del mutant EKm, deficient per a la Ile1, varen sorgir noves aproximacions de producció d'EK com a proteïna de fusió Zera[®] basades en el canvi de posició d'EK a C-terminal de la proteïna de fusió. Degut a les particularitats estructurals i funcionals d'aquesta proteïna, aquesta nova disposició podria suposar un bloqueig en l'efecte citotòxic de la proteasa, ja que la seva activitat restaria inhibida pel fet de presentar un element fusionat a N-terminal. Per tal de recuperar l'EK nativa i potencialment activa, també es va planejar introduir una diana específica de tall entre el domini Zera[®] i EK, generant dues construccions noves: una que permetés un tall controlat mitjançant la proteasa exògena Factor Xa, i l'altra que permetés un autoprocessament promogut per la pròpia EK produïda en fusió. Amb aquests experiments es volia provar la capacitat d'autoprocessament descrita per Gasparian *et al.*, 2006 i Kubitzki *et al.*, 2009 en els quals es descriu l'habilitat autocatalítica de l'enteroquinasa quan és produïda com a proteïna de fusió a C-terminal.

Els resultats obtinguts a partir de l'expressió d'ambdues proteïnes de fusió varen mostrar diferències importants d'acumulació, resultant molt minoritària la de Zera[®]-D4K-EK respecte la de Zera[®]-IEGR-EK. Aquest efecte induïa a pensar en l'efecte citotòxic que podria estar-se produint com a conseqüència de l'autoprocessament de la proteasa activa, afectant a la integritat cel·lular i de retruc, als nivells d'expressió.

La comprovació d'aquesta hipòtesi també va ser efectiu mitjançant l'expressió de la proteasa de secreció (control sense Zera[®]), amb la qual també es varen detectar uns nivells d'acumulació de proteïna recombinant al medi molt baixos comparats amb els obtinguts en l'espai intracel·lular per Zera[®]-IEGR-EK. Les diferències d'acumulació observades entre Zera[®]-IEGR-EK i l'EK de secreció foren tant significants, que va resultar impossible acumular suficient EK secretada per a la seva utilització com a control en l'assaig d'activitat planejat per a etapes posteriors.

Després de demostrar l'acumulació de Zera[®]-IEGR-EK en estructures de tipus proteic, aquesta proteïna de fusió va esdevenir la única opció disponible de producció d'enteroquinasa potencialment activa mitjançant la tecnologia Zera[®]. Tenint en compte que aquest sistema d'expressió eucariota s'estava posant a punt per a l'acumulació de proteïna recombinant en cossos proteics heteròlegs, va resultar evident la necessitat posterior d'estudiar la recuperació d'aquestes estructures denses. Com s'ha demostrat en aquest treball, l'optimització d'aquestes etapes de *downstream* a partir de cèl·lules CHO transfectades, va permetre assolir un elevat grau d'enriquiment de proteïna recombinant en dues úniques etapes del procés de recuperació (fig. 5.1)

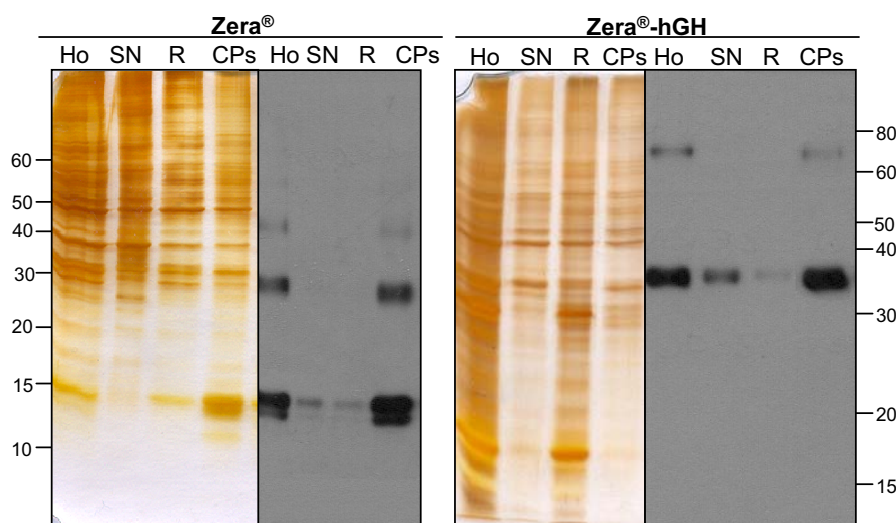


Figura 5.1. Anàlisi del procés de *downstream* fins a la recuperació de CPs en cèl·lules de mamífer CHO. Com a proteïnes model es varen emprar Zera®-hGH i Zera®. Ho, correspon a l'homogenat. SN CPs, al sobrenedant de CPs. R al rentat de CPs i CPs a la fracció final de CP. Gels SDS-PAGE tenyits per precipitació de nitrat de plata. Immunodetecció amb Anti-R8 (domini repetitiu de Zera®).

Tot i que l'estratègia d'expressar EK en fusió amb el domini Zera® afavoreix l'acumulació eficient de la proteasa, també comporta la incorporació d'una etapa addicional corresponent al processament de la proteïna de fusió mitjançant la proteasa exògena Factor Xa. Aquesta construcció ens ha permès demostrar que l'efecte citotòxic és el responsable de la baixa expressió d'EK en cèl·lules CHO. Tenint en compte que l'elevat cost de la proteasa Factor Xa provoca un encariment notable dels costos globals de purificació, es fa evident que aquesta estratègia per a la producció a una escala superior no resultava la més idònia. De fet, les altres estratègies dissenyades volien evitar aquesta necessitat de proteasa exògena, ja fos per la fusió de Zera® a C-terminal, com per l'autoprocessament de l'EK amb la introducció d'una diana pròpia de reconeixement. Ambdues estratègies varen resultar en baixos nivells d'expressió i en una alteració de la integritat de les cèl·lules transfectades, indicant un efecte tòxic de la proteasa produïda en forma activa. Aquests fets podrien suposar que l'activació de l'enteroquinasa i, per tant, el seu efecte tòxic sobre les cèl·lules, és degut a que l'EK era activa abans de la seva acumulació i encapsulació a l'interior dels cossos proteïcs. Cal recordar que un dels possibles avantatges postulats que ofereix la tecnologia Zera® mitjançant l'encapsulació de proteïnes, és justament evitar qualsevol efecte nociu que aquestes puguin causar sobre la cèl·lula hoste però, si l'activació o l'efecte tòxic de les proteïnes d'interès té lloc prèviament a l'acumulació a CP, es fa evident la pèrdua d'aquest potencial.

Amb la única proteïna de fusió amb la qual no vàrem observar aquest efecte tòxic va ser amb Zera®-IEGR-EK, perquè Zera® a N-terminal bloqueja l'activitat de la proteasa, i l'EK no es podia autoprocessar per l'absència de la diana per a sí mateixa.

La digestió amb Factor Xa, va permetre l'alliberament de l'EK amb una eficiència de tall prou bona. De fet, l'interès immediat no fou tant el de posar a punt les condicions de digestió, sinó la de determinar el grau d'activitat de la proteasa produïda.

Les pèrdues de proteïna recombinant que impliquen el pas per qualsevol columna cromatogràfica, així com els nivells insuficients d'acumulació de Zera[®]-IEGR-EK en cèl·lules CHO, no van permetre seguir el procés normal de recuperació d'EK fins a la seva purificació. Per tant, i per tal de posar a punt l'assaig d'activitat basat en la utilització del substrat fluorogènic GD4K- β -naftilamida, es varen dur a terme les primeres proves i la posada a punt de l'assaig amb les mostres solubilitzades i digerides sense purificar de Z-IEGR-EK. Malgrat provar diferents condicions d'assaig i volums de mostra, totes les mostres problema assajades resultaren inactives, mentre que el control positiu amb la mateixa matriu que la mostra, presentava la seva activitat inalterada. Arrel d'aquests resultats es poden evidenciar diferents fets: el primer, i probablement el més important, és la limitació d'acumulació de proteïna recombinant en cèl·lules CHO. En general, aquesta limitació és bastant comuna en sistemes d'expressió eucariotes basats en cèl·lules de mamífer, però si a més, considerem que el sistema emprat estava basat en cèl·lules adherents transfectades mitjançant una lipotransfecció per lípids catiónics, podem copsar la necessitat de la cerca de línies cel·lulars òptimes per a l'expressió i acumulació de proteïnes Zera[®]. Actualment, un dels projectes de més rellevància que s'està portant a terme al laboratori està centrat en el desenvolupament i optimització d'una o varies línies cel·lulars d'origen mamífer, per permetre uns nivells d'acumulació de proteïnes de fusió Zera[®] competitiu amb els altres sistemes que existeixen al mercat actual. El segon fet que s'evidencia amb aquests resultats i que deriven d'aquest primer, indica que una correcta quantificació de la proteasa produïda és necessària per a acotar les condicions d'assaig. Donat que la quantificació prenent com a patró l'EK comercial ha esdevingut imprecisa i inefectiva, probablement fora més apropiat haver-se basat en una quantificació més fiable prenent un sistema basat en ELISA de Níquel desenvolupat un temps posterior a la finalització d'aquest projecte (veure apartat de resultats de les inteïnes). El tercer fet que se'n extreu d'aquests resultats, podria justificar que l'EK produïda en fusió amb Zera[®], presentés un mal plegament des de l'inici o durant les diferents etapes de *downstream*, resultant en la producció d'una proteasa inactiva. Pel cas de l'EK comercial produïda en llevat *P. pastoris*, la proteasa recombinant és secretada al medi, i per tant no requereix de cap etapa de *refolding*. Pel que fa al patró de glicosilació, no sembla que sigui determinant per a la seva activitat. Tot i que no es pot assegurar que el patró de glicosilació obtingut en cèl·lules de mamífer sigui l'adequat per mantenir la proteasa activa, els resultats de producció d'aquesta proteïna en llevat, no indiquen que hi hagi interferències de funcionalitat dependents del grau de glicosilació de la proteasa (Voza et al., 1996).

Tanmateix, els resultats d'activitat obtinguts per Zera[®]-IEGR-EK en cèl·lules de mamífer no resultaren concloents, ja que per manca de proteïna recombinant suficient no vàrem poder determinar el grau d'activitat d'EK respecte la proteasa comercial produïda a *P. pastoris*.

Efecte tòxic d'EK en diferents hostes de producció.

Una possible alternativa de producció d'EK mitjançant la tecnologia Zera[®] fou emprant el sistema d'expressió en plantes de tabac. Els resultats d'expressió i acumulació de proteïnes Zera[®] en plantes de tabac (*N. benthamiana*) mitjançant agroinfiltració estaven donant resultats molt atractius per a la producció de proteïnes d'interès encapsulades a l'interior de cossos proteics heteròlegs. Així, va resultar idoni provar l'expressió de dues construccions (EK-Zera[®] i Zera[®]-D4K-EK) on, gràcies als resultats obtinguts a CHO, teníem indicis de certa activitat proteasa. Es va voler analitzar si en un hoste vegetal era possible produir i acumular EK en cos proteic, impedit l'efecte tòxic de la proteasa.

Emprant els controls tècnics d'agroinfiltració adequats, ambdues construccions agroinfiltrades provocaven necrosi al teixit agroinfiltrat al cap de 6 dies post-infiltració. La conclusió immediata a què ens va portar aquest resultat, va ser que la proteasa expressada en fusió amb el domini Zera[®], tenia un efecte mortal sobre el teixit cel·lular on va ser agroinfiltrat. Els controls indicaven que la necrosi no derivava de l'efecte de l'agrobacterium transformant o de qualsevol altre variable tècnica, ja que el procediment amb altres construccions Zera[®] s'havia dut de forma paral·lela. L'exercici i anàlisi complet dut a terme per triplicat, ens va indicar de la inviabilitat d'aquest sistema d'expressió per a l'acumulació de les dues proteïnes de fusió Zera[®]-EK provades en aquest hoste. Novament, quedava demostrada la dificultat de producció d'una proteasa de característiques tant complexes com les de l'enteroquinasa, i amb l'efecte nociu que provoca la seva activitat sobre dos tipus cel·lulars diferents.

Paral·lelament, la proteïna de fusió Zera[®]-IEGR-EK també va ser produïda en cèl·lules d'insecte Sf9, al ser candidata en un procés de crivellat de proteïnes difícils d'expressar (DEP) fusionades al domini Zera[®] (resultats no mostrats). La seva producció va resultar inviable, ja que l'anàlisi del perfil proteic corresponent a l'extracte cel·lular indicava la presència d'una forta degradació generalitzada, posant novament en evidència la incapacitat de producció d'aquesta proteasa mitjançant la tecnologia Zera[®] i els medis disponibles en el moment.

En el primer capítol de resultats ha quedat demostrat que la tecnologia Zera[®] no va permetre la producció d'una proteasa tòxica de característiques pròpies com l'EK en cap dels sistemes d'expressió provats, invalidant així la hipòtesi inicial o objectiu d'aquest apartat.

De forma simultània a l'obtenció d'aquests resultats, s'havien estat estudiant i desenvolupant altres sistemes de processament per a proteïnes de fusió Zera[®]. Aquests sistemes estaven basats en l'autoprocessament promogut per inteïnes, les quals permeten evitar l'addició d'una proteasa exògena amb el conseqüent estalvi econòmic i energètic.

Alternatives basades en l'autoprocessament induïble de proteïnes de fusió Zera[®].

Com hem vist en el primer apartat de resultats d'aquest treball, els mètodes clàssics que utilitzen proteases externes no només suposen un cost econòmic elevat, sinó que la seva producció recombinant esdevé complexa depenent de la seva naturalesa i efecte sobre les cèl·lules hoste del sistema de producció. A posteriori, altres problemes que solen interferir a nivell del processament són la baixa especificitat de la proteasa, o la baixa eficiència de la reacció enzimàtica degut a impediments estèrics o incompatibilitats degudes a les exigències de les condicions de digestió, entre d'altres.

El descobriment, a principis dels anys 90, dels elements de *splicing* proteic anomenats inteïnes va suposar un avenç important en aquest camp biotecnològic, ja que va implicar un canvi de concepció i procediment de les etapes de purificació i digestió de proteïnes recombinants produïdes en fusió. De fet, arrel de la seva aplicació en sistemes de producció, la necessitat d'un tall proteolític va quedar totalment eliminada, permetent la purificació de la proteïna recombinant nativa en una etapa cromatogràfica. Durant aquesta última dècada, l'estructura i les propietats d'aquests elements autoprocessables han estat investigades per diferents grups de recerca, donant com a resultat un valor acadèmic i industrial en l'aplicació de les inteïnes (Wang *et al.* 2009).

Amb la finalitat d'aprofitar els avantatges que ofereixen les inteïnes per a la producció de proteïnes de fusió Zera[®], es varen expressar diferents tipus de inteïnes fusionades al domini Zera[®] i a l'hormona humana de creixement (hGH) com proteïna model de la tecnologia. L'estudi també va ser completat amb l'anàlisi de l'acumulació de proteïnes de fusió contenint la seqüència de la inteïna en diferents sistemes hoste d'expressió. Essencialment els hostes de producció varen ser les cèl·lules de mamífer CHO, les cèl·lules d'insecte Sf9 i les plantes de tabac.

Zera[®]-SspDnaB-hGH en cèl·lules CHO.

La prova de concepte emprant la inteïna SspDnaB en proteïnes de fusió Zera[®] es va dur a terme en cèl·lules de mamífer CHO. Tenint en compte que aquesta inteïna és aplicada generalment per a proteïnes recombinants expressades en sistemes procariotes, fou d'especial interès determinar l'acumulació i localització de la proteïna de fusió Zera[®]-DnaB-hGH en sistemes d'expressió superiors. A partir d'aquests estudis, es va poder comprovar que aquesta proteïna de fusió, malgrat haver incorporat la seqüència proteica de la inteïna de 18 kDa, indueix la formació de cossos

proteics heteròlegs a cèl·lules CHO. L'elevada densitat i la mida d'aquests orgànuls són els que permeten diferenciar-los d'altres elements intracel·lulars.

Per tal de demostrar que altres proteïnes fusionades a la inteïna DnaB i a Zera[®] induïen la formació de cos proteic a CHO, noves construccions amb proteïnes marcadores com DsRED i ECFP foren transfectades i observades al microscopi. Fruit d'aquest estudi, es va poder comprovar la presència d'un patró d'acumulació a cos proteic molt similar a l'observat per hGH, ampliant el ventall de proteïnes acumulades a cos proteic en cèl·lules CHO.

Tot i que els nivells d'expressió Zera[®]-DnaB-hGH a cèl·lules CHO no varen arribar a ser quantificats, el marcatge immunoreactiu detectat mitjançant *Western Blot* va ser suficient per poder continuar amb el procés d'anàlisi de les etapes de *downstream*. Si bé en qualsevol sistema de producció recombinant, la determinació dels nivells d'expressió és molt important, cal recalcar que l'estudi dut a terme en aquest treball fou de caire analític.

Per mitjà d'aquest anàlisi es va poder determinar la presència de cert autoprocessament *in vivo*, provocant que la hGH alliberada continués la via de secreció al medi, mentre que el fragment proteic corresponent a Zera[®]-DnaB quedava retingut a la cèl·lula. El fraccionament subcel·lular per gradient de densitat de les cèl·lules transfectades, va permetre'ns determinar que l'autoprocessament *in vivo* té lloc a partir de la proteïna de fusió que roman soluble a l'espai intracel·lular, indicant que en la proteïna de fusió no agregada a cos proteic, la inteïna pot adoptar la conformació activa i promoure l'autoprocessament.

L'activitat autocatalítica de la mini-inteïna modificada SspDnaB és induïda com a conseqüència d'un canvi de pH i temperatura cap a valors pròxims a pH7 i 25°C però també hi poden influir altres factors com determinats residus adjacents al lloc de tall de la inteïna (Mathys *et al.*, 1999). Mitjançant estudis de mutagènesi dirigida s'ha pogut comprovar que certs residus presents en la regió corresponent a les exteïnes naturals, tenen un paper important en les reaccions de *splicing* i d'autoprocessament, presentant cada un dels mutants estudiats, diferents graus de processament *in vivo*. Per tal de tenir el màxim control sobre l'autoprocessament amb aquesta inteïna, s'ha vist que certs mutants amb substitucions del residu A154 per L, K o P, permeten reduir substancialment l'activitat del tall *in vivo*.

Tenint en compte que l'autenticitat de la seqüència és imprescindible per a productes amb aplicacions terapèutiques, o que poden ser essencials per a l'activitat de certes proteïnes recombinants, es va descartar la modificació dels primers residus de la proteïna d'interès, essent la resta de variables que poden afectar l'autoprocessament objectiu del nostre estudi.

Un cop demostrada l'acumulació de la proteïna de fusió Zera[®]-DnaB-hGH en cossos proteics heteròlegs, es varen estudiar les eficiències de tall obtingudes en un rang de condicions de

pH i temperatures diferents, així com l'efecte de certs additius com detergents iònics i no iònics, o la presència en el tampó d'inducció de certes sals que podrien ajudar en termes de solubilitat proteica, i en la desagregació dels cossos proteics. Cal tenir en compte que per tal de permetre l'autoprocessament sempre fou necessari una etapa de solubilització de cossos proteics, ja que, altrament la inteïna no podia adoptar la conformació activa que li permet promoure les reaccions d'autoprocessament (dades no mostrades).

Fruit d'aquests estudis varem poder determinar que hi ha certes condicions que resulten incompatibles amb l'activitat de la inteïna SspDnaB. Així, certs detergents no iònics com el Triton X-100 o altres components específics per a la recuperació de proteïnes de membrana com les sulfobetaïnes no basades en detergent NDSB195 (Vuillard *et al.*, 1995) no ajuden a que la inteïna adquireixi la conformació necessària per permetre l'autoprocessament, malgrat que sí permeten cert grau de solubilitat de la proteïna de fusió. D'altra banda, el detergent iònic SDS al 0,1% va permetre aquesta activitat, malgrat que només s'assolissin valors d'eficiència de tall pròxims al 5%. El detergent que va proporcionar millors resultats d'autoprocessament va ser el tractament amb Triton X-114, un detergent no iònic que permet una separació proteica bifàsica, degut a la seva característica baixa temperatura de terbolesa (*cloud point*) compatible amb una extracció de proteïnes nativa (Wang i Coppel, 2002). El percentatge de tall assolit en aquestes condicions va arribar a ser del 16 %, posant en evidència que les condicions de tall per a aquesta inteïna han de ser suaus, per tal de no distorsionar la conformació proteica que fa que tinguin lloc les reaccions químiques de processament.

D'altra banda també es varen realitzar estudis de inducció de processament a un rang de pH entre 5 i 8, i de temperatures entre 4 i 37°C. La millor eficiència de processament va tenir lloc a valors de pH pròxims a 6,5 i a una temperatura de 25°C.

Un dels inconvenients màxims fruit de la utilització d'aquesta inteïna, fou el temps llarg de inducció necessari per a obtenir un rendiment pròxim al 20% de tall, de fins a 48-50 hores. A la literatura s'han descrit casos com el de la producció recombinant de la proteïna de classe 1 PorA de *N. meningitidis* mitjançant la inteïna SspDnaB, en la qual es requerien fins a 5 dies d'inducció de l'autoprocessament a pH7 i temperatura ambient (Humphries *et al.*, 2002). O pel cas de l'EGF, on es necessitaven més de 12 hores de inducció contínua (Esipov *et al.*, 2008). Aquestes llargues incubacions suposen un gran inconvenient, sobretot per a una producció a gran escala i per proteïnes sensibles i inestables en aquestes condicions.

Per tal de determinar que l'autoprocessament observat fou producte de l'acció de la inteïna DnaB i no d'una acció inespecífica per part de proteases endògenes, varem comprovar que el mutant N154A SspDnaB presentés el tall a C-terminal bloquejat respecte a la inteïna *Wild type* (Mathys *et al.*, 1999). Com a resultat vàrem obtenir que, sota les condicions d'autoprocessament

posades a punt, només la proteïna de fusió Zera[®]-DnaB-hGH resultava processada, indicant que el tall és conseqüència de l'acció específica de la inteïna SspDnaB.

Malgrat el rendiment de tall obtingut, i la posada a punt d'aquesta inteïna com a nou mètode de processament per a proteïnes de fusió Zera[®], els nivells d'expressió eren generalment baixos per a totes les proteïnes de fusió provades, sobretot si els comparem amb d'altres sistemes de producció que s'estaven posant a punt, com les plantes de tabac o les cèl·lules d'insecte.

Davant d'aquesta situació i, tenint en compte que actualment s'està portant a terme un projecte dedicat exclusivament al desenvolupament i posada a punt d'una línia cel·lular de mamífer òptima d'expressió de proteïnes Zera[®], varem estimar necessari provar el sistema basat en l'autoprocessament promogut per la inteïna SspDnaB en cèl·lules d'insecte.

Zera[®]-SspDnaB-hGH en cèl·lules d'insecte Sf9.

Els estudis realitzats fins al moment al laboratori d'ERA Biotech, havien permès concloure que el sistema d'expressió basat en cèl·lules d'insecte era compatible amb la tecnologia Zera[®]. De fet, en micrografies obtingudes per microscopi electrònic sobre cèl·lules Sf9 infectades amb Zera[®]-EGF i immunolocalitzades amb anticòs contra EGF, aquestes cèl·lules presenten en el seu citoplasma uns orgànells d'uns 0,2µm, embolcallats de membrana i que contenen proteïna immunoreactiva per a EGF, mostrant un patró d'acumulació típic d'estructures de tipus cos proteic (Torrent *et al.*, 2009a).

Un cop establertes les millors condicions de producció, a diferents MOI i temps d'incubació post-infecció, pel cas de Zera[®]-DnaB-hGH, la caracterització de la seva acumulació a l'espai intracel·lular va realitzar-se tant per immunolocalització mitjançant microscòpia confocal, com per gradient de densitat d'Iodixanol. El resultat d'ambdues tècniques ens ha permès confirmar l'acumulació de Zera[®]-DnaB-hGH en estructures denses amb patró típic d'acumulació a cos proteic. La mida general dels cossos proteics de Sf9 resulta més petita que la mitjana dels cossos proteics heteròlegs en planta de tabac o en cèl·lules CHO, indicant que la mida d'aquestes estructures no és una propietat universal en tots els hostes, sinó que és un caràcter adaptat a les característiques i capacitats de cada tipus cel·lular.

Tanmateix, el factor més important a tenir en compte fou el de precisar el grau d'acumulació de proteïna recombinant respecte als nivells assolits en altres sistemes d'expressió. Mitjançant l'ús de baculovirus per a la infecció de cèl·lules d'insecte, es solen assolir nivells d'acumulació de proteïna recombinant molt elevats degut a que el gen de la proteïna d'interès està precedida per un promotor viral fort, fent que els nivells d'acumulació de proteïna recombinant puguin arribar a representar entre el 25-50% del total de proteïnes cel·lulars. A més, un cop establert el baculovirus recombinant i, tractant-se d'una transformació de la cèl·lula hoste per infecció viral, la velocitat de

producció proteica és molt ràpida i homogènia (Sridhar *et al.*, 1994). La comparació dels nivells d'acumulació de Zera[®]-DnaB-hGH, entre els hostes CHO i Sf9, ens va permetre corroborar que l'acumulació és més elevada en Sf9. D'altra banda, i per tal de poder valorar l'efecte de la inteïna sobre els nivells d'acumulació en un mateix hoste, també es va comparar el grau d'acumulació de Zera[®]-DnaB-hGH respecte Zera[®]-hGH, expressats en cèl·lules Sf9. Arrel d'aquest resultat varem podem comprovar que Zera[®]-hGH s'acumula prop de dues vegades més que la proteïna de fusió que conté la inteïna. Aquesta informació ens indica que la presència de la seqüència *linker* corresponent a SspDnaB (de 154 aminoàcids) entre Zera[®] i hGH, té cert grau d'interferència sobre la capacitat de producció i/o acumulació en aquest hoste.

D'altra banda, tenint en compte que la proteïna de fusió Zera[®]-DnaB-hGH és d'aproximadament 55kDa, i prenent les dades d'expressió de totes les proteïnes expressades amb Zera[®], es pot observar una devallada en els nivells d'acumulació en proteïnes d'elevat pes molecular. És possible que la capacitat d'agregació del domini Zera[®] es vegi afectat per proteïnes d'interès que presenten un pes molecular superior a 60kDa.

La posada a punt d'aquest sistema de producció de proteïnes de fusió Zera[®] ens ha permès establir un protocol estàndard d'homogeneïtzació cel·lular i recuperació de la proteïna d'interès. Els millors resultats els vàrem obtenir homogeneïtzant les cèl·lules en un medi hipertònic i l'ajuda mecànica d'una sonicació suau; i solubilitzant els cossos proteics en presència d'un detergent de tipus sal biliar com el deoxicolat (DOC). Cap dels detergents de la bateria de caràcter més suau que vàrem provar, va donar resultats d'enriquiment tant satisfactoris com el DOC.

La inducció de l'autoprocessament mitjançant un canvi de pH i temperatura va ser duta a terme en un ampli ventall de condicions que havien estat descrites en la literatura com a compatibles amb la conformació que ha d'adquirir la inteïna SspDnaB per ser activa i promoure l'autoprocessament. Donat que el DOC és insoluble a valors de pH inferiors a 7.5, es van seguir diferents estratègies per tal d'evitar aquestes condicions, mitjançant canvis de tampó per extreure el màxim possible de detergent, o mitjançant l'ús de detergents alternatius que si bé no eren tan efectius en termes de solubilització, almenys permetessin determinar si aquesta inteïna presentava activitat en aquest hoste. Entre ells, també es va utilitzar infructuosament la solubilització bifàsica amb Triton X-114, que havia donat resultats satisfactoris en les mostres provinents de cèl·lules CHO. Davant d'aquesta sèrie de resultats negatius, podem concloure que l'activitat de la inteïna a SspDnaB és molt dependent del grau de solubilització de la proteïna de fusió d'interès que la conté, i sensible a certs agents solubilitzants que són incompatibles amb la conformació que adopta per a promoure el tall. Tractant-se de la mateixa seqüència que va ser utilitzada per a la transformació de cèl·lules CHO, on sí que varem detectar activitat per aquesta inteïna, també resulta probable que les

condicions d'acumulació o el correcte plegament de la proteïna de fusió no permetin que aquesta inteïna sigui activa en aquest hoste.

hGH-MxeGyrA-Zera[®] és acumulada en estructures de tipus cos proteic, en cèl·lules CHO, cèl·lules d'insecte Sf9 i plantes de tabac.

L'altra mini-inteïna estudiada per a la seva aplicabilitat a la tecnologia Zera[®] va ser la inteïna derivada de la DNA girasa A de *Mycobacterium xenopi* (MxeGyrA). Aquesta inteïna forma part d'un element natural de *splicing* proteic de 198 aminoàcids, al qual se li ha extret 222 aminoàcids que corresponen al domini central amb activitat endonucleasa, sense afectar la seva capacitat de *self-splicing* (Telenti *et al.*, 1997).

En presència de grups tiol presents en agents reductors com el DTT o el β -mercaptoetanol, la inteïna MxeGyrA modificada i comercialitzada com a sistema de purificació de proteïnes, és capaç de promoure el processament mitjançant una sèrie de reaccions nucleofíliques. Resultat d'aquest autoprocesament, s'allibera la proteïna d'interès amb la seva seqüència primària intacta i sense residus exògens afegits. D'altra banda, en el cas que la inteïna es trobi fusionada a un *tag* d'afinitat, aquest mecanisme també permet la immobilització de la proteïna de fusió per tal de processar i purificar el producte d'interès en una única etapa de *downstream* (Barnard *et al.*, 2005).

A diferència de l'anterior mini-inteïna descrita, el mecanisme d'autoprocesament mediat per la inteïna MxeGyrA està dissenyat per a què el tall tingui lloc en el seu extrem N-terminal, per tant, el domini Zera[®] es trobava posicionat a C-terminal de la proteïna de fusió.

L'estudi de l'autoprocesament de la proteïna hGH-GyrA-Zera[®] es va dur a terme mitjançant la seva expressió en tres hostes diferents: cèl·lules CHO, cèl·lules d'insecte i plantes de tabac. La transformació transitòria en els tres sistemes d'expressió, permeté determinar l'acumulació de hGH-GyrA-Zera[®] en el compartiment subcel·lular tant per immunolocalització mitjançant microscòpia de fluorescència, com per ultracentrifugació de l'homogenat cel·lular en gradient de densitat discontinu. Tot i que la immunocitoquímica no fou realitzada sobre les fulles agroinfiltrades de tabac, el resultat del doble anàlisi realitzat en els altres dos hostes, indicava que la proteïna hGH-GyrA-Zera[®] era acumulada en estructures de tipus cos proteic d'elevada densitat; corroborant que, malgrat que Zera[®] es trobi a C-terminal i tot i la presència de la inteïna MxeGyrA actuant com a *linker* de 18 kDa, el domini Zera[®] segueix induint la formació *de novo* de cossos proteics heteròlegs.

Arrel del resultat de les immunocitoquímiques realitzades en cèl·lules CHO i Sf9, es va poder determinar que, malgrat la diferent mida d'ambdós tipus cel·lulars, la mida dels cossos proteics heteròlegs formats en cèl·lules CHO podia arribar a resultar entre 4 i 10 vegades superior a la mida observada dels cossos proteics de cèl·lules Sf9. Tot i que no hi ha una demostració empírica

per tal d'explicar aquest fenomen, aquestes dades podrien suggerir que el tipus d'acumulació a cos proteic en cèl·lules CHO podria ser resultat de la fusió de cossos proteics de mida més petita.

D'altra banda, el nombre de cossos proteics per cada cèl·lula fou major en el cas de les cèl·lules d'insecte Sf9, el qual podria explicar les diferències importants en els nivells d'expressió assolits en aquest hoste. Tot i així, aquest conjunt d'observacions s'hauria d'acabar de complementar amb estudis comparatius d'expressió i acumulació de diferents proteïnes de fusió Zera[®] en els dos sistemes hoste d'expressió, en estadis completament comparables.

La inteïna MxeGyrA presenta activitat induïble d'autoprocessament quan és expressada en fusió amb hGH i Zera[®] en cèl·lules CHO

La inducció de l'autoprocessament de hGH-GyrA-Zera[®] acumulada en cossos proteics de cèl·lules CHO, va ser duta a terme en diferents condicions de temperatura, tipus de detergent, temps de incubació i tipus d'agent reductor. El millor rendiment de processament calculat mitjançant anàlisis densitomètrics, va resultar en un tall del 50% després d'una incubació de la mostra en un tampó contenint 0,5% Triton X-100 i 50 mM MESNA. El MESNA (àcid 2-mercaptoetansulfònic) és un agent reductor semblant al β -mercaptoetanol, que conté un grup tiol nucleofílic que permet l'excisió de la proteïna d'interès mitjançant la producció d'un enllaç tioester estable al seu extrem C-terminal (Bastings *et al.*, 2008). Tot i que el seu ús està indicat especialment per a dur a terme reaccions de lligació de proteïnes *in vitro* (IPL- *Intein-mediated Protein Ligation* – Xu i Evans Jr., 2001), els bons resultats obtinguts en l'eficiència de tall de hGH-GyrA-Zera[®], varen fer que s'establissin aquestes condicions optimitzades per al processament de proteïnes de fusió Zera[®] mitjançant la inteïna MxeGyrA en cèl·lules CHO.

La inteïna MxeGyrA presenta activitat induïble d'autoprocessament quan és expressada en fusió amb hGH i Zera[®] en cèl·lules d'insecte Sf9.

La demostració de l'acumulació de proteïnes Zera[®], com la fusió hGH-GyrA-Zera[®], en estructures de tipus cos proteic formades *de novo* en cèl·lules d'insecte, resulta complexa, ja que cal distingir-los dels agregats perinuclears densos que s'observen quan s'infecten cèl·lules Sf9 per a l'expressió de proteïnes per secreció. Aquestes partícules intracel·lulars poden ser resultat d'una combinació de proteïnes d'origen viral amb proteïna recombinant agregada en l'espai intracel·lular degut a un defecte del mecanisme de secreció (Shridar *et al.*, 1994). Malgrat això, mitjançant estudis d'immunodetecció per microscòpia electrònica, s'ha pogut identificar la diferència bàsica que rau entre aquests agregats intracel·lulars insolubles i els cossos proteics derivats de la fusió de Zera[®], degut a la presència de la membrana provinent de RE que embolcalla el cos proteic (Torrent *et al.*, 2009a).

La posada a punt de les condicions d'inducció de l'autoprocessament en aquest hoste varen permetre definir el tampó que resultava en el millor rendiment de tall. En aquest cas, els millors resultats foren obtinguts mitjançant una incubació durant 15 hores, a temperatura ambient, en presència de 100mM DTT i 2%DOC. Tot i que l'eficiència de tall va ser pròxima al 45-50%, la detecció de varies bandes immunoreactives per a hGH amb migracions lleugerament diferents, indicaven la presència d'una sèrie de productes no desitjats. Tot i que es podia concloure que la inteïna MxeGyrA era aparentment activa en fusió amb Zera[®] i hGH acumulada en cossos proteics de cèl·lules Sf9, els següent estudis es varen centrar en determinar la naturalesa d'aquests talls inespecífics, ja que el conjunt d'aquests subproductes no podien ser considerats per al càlcul de l'eficiència global del procés de producció de rhGH.

La detecció d'aquest patró multi-bandes posterior a l'autoprocessament induït podia ser resultat de: (1) la degradació de hGH per presència de proteases endògenes, (2) l'autoprocessament inespecífic promogut per la inteïna MxeGyrA, i (3) el mal processament del pèptid senyal per part de la peptidasa de senyal de la cèl·lula hoste. Per a cada una d'aquestes teories, es varen dur a terme una sèrie d'experiments per tal de confirmar-ne la seva validació o, per contra, la seva exclusió. Tal i com hem descrit en l'apartat de resultats, fruit d'aquests estudis, la primera i segona hipòtesis varen quedar fermament descartades, mentre que la tercera hipòtesi va anar adquirint més solidesa.

El mal processament del pèptid senyal en cèl·lules d'insecte ha estat descrit en diferents ocasions en la literatura (Ailor i Betenbaugh, 1999; Jarvis *et al.*, 1993 i Ferrini *et al.*, 1995), en moltes d'aquestes referències, l'origen comú del seus estudis es basaven en l'observació general d'uns nivells baixos de secreció de certes proteïnes recombinants, i per la presència d'agregats proteics insolubles intracel·lulars.

Els pèptids senyal són seqüències curtes d'aminoàcids disposades a l'extrem N-terminal de polipèptids per permetre el seu direccionament, o bé cap a la maquinària de translocació de la membrana cel·lular per tal de ser secretades, o bé cap al reticle endoplasmàtic on seran seguidament plegats, processats i modificats abans d'arribar al seu emplaçament final. Aquestes seqüències contenen entre 15 a 30 aminoàcids, i s'hi poden distingir tres regions més o menys definides: a N-terminal hi ha una regió curta de residus amb càrrega positiva, seguida d'una regió de 10-20 residus hidrofòbics i a la regió C-terminal hi trobem 2 residus de mida petita en les posicions -1 i -3 del lloc de tall per peptidases. Sovint, quan el pèptid senyal no és processat adequadament, la proteïna resultant no adquireix el plegament apropiat ni els subseqüents processaments post-traduccionals, de forma que roman agregada i insoluble a l'interior de la cèl·lula (Ailor *et al.*, 1999). Una de les raons que podrien justificar aquest fenomen, és atribuïble al fet de que la maquinària cel·lular de processament post-traduccional és limitada. El sistema d'infecció viral per AcNPV, aprofita els mecanismes cel·lulars disponibles i, a partir de les 24 hores post-infecció, provoca una inhibició del

gens involucrats en l'expressió de proteïnes endògenes de la cèl·lula hoste. Per aquesta raó moltes de les funcions del RE de la cèl·lula hoste es veuen afectades en la fase tardana de la infecció, quan la maquinària cel·lular ja es troba severament compromesa degut a la naturalesa lítica del baculovirus (Shridar *et al.*, 1994).

Per tal de corroborar aquest resultat fou necessari l'anàlisi de la seqüència N-terminal de cada un dels subproductes. L'aplicació de tècniques cromatogràfiques de fase reversa va permetre la separació de cada un d'ells per tal de poder-los validar i identificar mitjançant la seqüenciació del seu extrem N-terminal. Arrel d'aquest estudi, vàrem poder determinar que dos dels tres subproductes identificats, presentaven la totalitat o part del pèptid senyal de la γ -zeïna no processat. La banda intermèdia de 22kDa, que suposava el 15% del total de la intensitat de senyal detectada per rhGH, presentava la mida i la seqüència N-terminal coincidents amb la hGH nativa.

Per tal de determinar la compatibilitat del pèptid senyal de la γ -zeïna en sistemes d'expressió basats en cèl·lules Sf9, la mateixa comprovació fou duta a terme per a proteïnes de fusió amb Zera[®] a N-terminal contenint el pèptid senyal de la γ -zeïna, i produïda de forma paral·lela en cèl·lules d'insecte. L'anàlisi per seqüenciació de l'extrem N-terminal d'aquesta proteïna va donar com a resultat una única proteïna amb un inici de seqüència T-H-T, coincidint amb el de Zera[®] i, per tant, amb el pèptid senyal correctament processat.

El resultat d'aquest últim anàlisi indica de la importància de la seqüència adjacent al pèptid senyal per al reconeixement del lloc de tall per part de peptidases de l'hoste. Tenint en compte que el pèptid senyal de la γ -zeïna es pot considerar com el nadiu respecte al domini Zera[®], vàrem considerar oportú el disseny d'una estratègia basada en la substitució del pèptid senyal heteròleg de la γ -zeïna, per dos pèptids senyals diferents: el pèptid senyal de la melitina d'abella i el pèptid senyal nadiu de la hGH (Das *et al.*, 2000).

En estudis anteriors s'havia pogut comprovar que la producció de propaïna de planta en cèl·lules d'insecte es veia millorada mitjançant la substitució del pèptid senyal nadiu, pel pèptid senyal de la prepromelitina d'abella (Tessier *et al.*, 1991 i Jarvis *et al.*, 1993). Per tant, existia la possibilitat que per a la producció de hGH-GyrA-Zera[®], també es veiessin millorades les eficiències de producció segons el pèptid senyal emprat.

De fet, la prolactina humana (PRL), que pertany a la mateixa família que la hGH, va ser produïda satisfactòriament en cèl·lules d'insecte Sf9 i High-Five, mitjançant l'ús del seu propi pèptid senyal de secreció (Das *et al.*, 2000). En aquest cas, es va comprovar que la proteïna recuperada del medi de cultiu presentava un correcte processament del pèptid senyal, malgrat que s'observava un patró proteic de PRL en doble banda en l'espai intracel·lular. L'estudi de la caracterització d'aquesta doble banda no fou realitzat, atribuint-la a modificacions post-traduccionals de la proteïna.

El diferent patró de bandes immunoreactives per rhGH obtinguts mitjançant l'expressió de hGH-GyrA-Zera[®] amb diferents pèptids senyal foren resultat del seu mal processament, indicant que les substitucions per pèptids senyals, ja siguin derivats d'insecte o nadius respecte la proteïna adjacent, no sempre ajuden a millorar l'eficiència de producció de proteïnes heteròlogues.

Aquests mateixos resultats també van ser obtinguts per Jarvis *et al.*, 1993, mitjançant la utilització d'una bateria més àmplia de pèptids senyals diferents. Aquest estudi posa en evidència que la limitació de producció de proteïna recombinant en aquest hoste podria trobar-se en la saturació de la maquinària cel·lular implicada en els processos post-traduccionals que inclouen el processament del pèptid senyal, el correcte plegament de la proteïna i les posteriors modificacions prèvies a l'acumulació o secreció definitives.

Altres estratègies que s'han emprat per tal de millorar la producció proteica en aquest hoste inclouen la coexpressió amb xaperones i foldases de RE (Ailor i Betenbaugh, 1997 i Haseman i Capra, 1990), la coexpressió de peptidases bacterianes (Laprise *et al.*, 1998), i altres enzims involucrats en els processos post-traduccionals (Ailor i Betenbaugh, 1999), o la utilització de diferents soques o cèl·lules d'insecte d'espècies diferents (Wickham *et al.*, 1992 i Shridar *et al.*, 1994).

La darrera alternativa emprada per tal d'evitar el mal processament del pèptid senyal, fou la utilització de diferents línies cel·lulars d'insecte per la producció de hGH-GyrA-Z. Amb aquesta finalitat, es varen emprar dues línies cel·lulars comercials que habitualment s'utilitzen per a la producció de proteïnes recombinants, les Sf21 (*Spodoptera frugiperda* 21), i les High-Five derivades de *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4). Aquestes últimes s'ha descrit que poden arribar a expressar entre 5 i 10 vegades més que les cèl·lules Sf9 (Davis *et al.*, 1992), tot i que la naturalesa i de la proteïna hi juga un paper important.

La fusió hGH-GyrA-Zera[®] va ser produïda paral·lelament emprant dos pèptids senyals diferents en les tres línies cel·lulars disponibles, seguint les indicacions de cultiu i manteniment de la casa comercial. L'anàlisi d'expressió dels diferents extractes cel·lulars continuaven mostrant la presència de mal processament del pèptid senyal, amb la conseqüent detecció de més d'un subproducte immunoreactiu per a hGH. Malgrat que la proporció de bandes resultava diferent per a cada condició i hoste, la presència de múltiples bandes immunoreactives evidenciava la incapacitat del correcte processament en cèl·lules d'insecte. Pel que fa als nivells d'expressió, no s'observaren millores significants amb la utilització de les dues línies noves, de forma que tots els experiments posteriors varen ser duts a terme en la línia cel·lular Sf9.

Malgrat que finalment no es va poder obtenir la proteïna d'interès correctament processada en termes de pèptid senyal, disposàvem de dades comparatives interessants entre el procés emprant l'enteroquinasa com a proteasa exògena, *versus* les obtingudes mitjançant les inteïnes com a

sistema de tall. Es va procedir a una valoració del rendiment i puresa d'ambdós processos en les primeres etapes de *downstream* fins a l'etapa de digestió. Malgrat que la quantificació del procés amb la inteïna no és del tot acurada degut a que s'hi inclogueren els productes no desitjats, a grans trets, podem concloure que els nivells d'expressió foren fins a 2,5 vegades superiors per a Zera[®]-D4K-hGH que per hGH-MxeGyrA-Zera[®]. Aquestes diferències podrien ser resultat de l'efecte que presenta Zera[®] a C-terminal o bé a l'efecte de la presència de la inteïna sobre el grau d'acumulació de proteïnes recombinants. D'acord amb altres exemples de producció desenvolupats a ERA Biotech, la posició del domini Zera[®] a N-terminal s'ha vist que afavoreix l'acumulació de la proteïna de fusió a cos proteic en detriment de la fusió a C-terminal. Tot i així, aquestes dades s'haurien d'acabar de confirmar amb altres proteïnes de fusió de característiques físico-químiques diferents, ja que la mida o la conformació que adopta la proteïna de fusió, també hi juguen un paper important en el grau d'acumulació a cos proteic.

D'altra banda, pel que fa al rendiment de recuperació hGH, podem afirmar que en l'etapa posterior al processament, s'obtingué un rendiment total major emprant la inteïna que amb l'enteroquinasa.

Les dades de quantificació obtingudes per a ambdós processos indicaven que el procés emprant la inteïna en fusió presentava un rendiment de producció 5,3 vegades superior respecte al procés emprant l'enteroquinasa exògena. L'eficiència de l'etapa d'autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA fou del 44,8%, que comparat amb el 23,4% de rendiment de l'etapa de digestió amb EK de la proteïna de fusió Z-D4K-hGH, posa en evidència la importància de la optimització dels sistemes de processament per tal de minimitzar l'afectació sobre el rendiment de producció.

Una conclusió més generalitzada sobre el valor d'aquesta sèrie experimental en cèl·lules d'insecte, haurà d'esperar futurs estudis que permetin conèixer les millors condicions de producció per tal d'afavorir el processament post-traducciona l en cèl·lules d'insecte. Idealment, aquests estudis haurien de centrar-se en l'aplicació d'estratègies ja descrites (Ailor i Betenbaugh, 1999), encaminades a afavorir que aquest processament sigui correcte, ja sigui amb la coexpressió de peptidases bacterianes, o de foldases o xaperones de reticle endoplasmàtic.

La inteïna MxeGyrA presenta activitat induïble d'autoprocessament quan és expressada en fusió amb hGH i Zera[®] en plantes de tabac *Nicotiana benthamiana*.

Generalment, els sistemes de processament basats en inteïnes solen aplicar-se per a la purificació de proteïnes expressades a *E. coli* (Fong *et al.*, 2010), però com hem vist, la seva utilització en altres hostes com les cèl·lules de mamífer, les d'insecte o les plantes, també han resultat satisfactòries (Evans *et al.*, 2005). A plantes de tabac, s'ha descrit la producció del pèptid antimicrobià SMAP-29 mitjançant la proteïna de fusió SMAP-inteïna-CBD expressada a l'apoplast.

Segons aquesta referència, la purificació de SMAP per cromatografia d'afinitat a través del domini CBD (*Chitin Binding Domain*), venia precedida a la inducció de l'autoprocessament en presència d'agents nucleofílics, el qual va permetia la recuperació de la proteïna lliure en una fracció pura. Tot i això, el rendiment global del procés de producció fou molt baix degut a la baixa acumulació de proteïna recombinant (Morassutti *et al.*, 2002).

La plasticitat que presenta el RE vegetal permet l'acumulació de grans quantitats de proteïna exògena de forma estable, incrementant els nivells d'expressió assolits per secreció (Wandelt *et al.*, 1992).

Així, l'últim hoste en el qual es va explorar l'expressió i acumulació de la fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] foren les plantes de tabac *N. benthamiana* agroinfiltrades amb una soca d'*Agrobacterium tumefaciens*, per permetre la seva transformació transitòria.

El silenciament de RNA és un mecanisme de defensa natural que han desenvolupat les plantes i altres sistemes eucariotes per combatre paràsits moleculars, com transposons o determinats virus (Lakatos *et al.* 2004). En plantes, el mecanisme rep el nom de silenciament gènic post-transcripcional (PTGS), i es tracta d'un procés complex en el qual intervenen diferents vies de regulació-activació, iniciades per la formació de dsRNA. Quan s'utilitzen les plantes per a la producció de proteïnes recombinants, el sistema PTGS de la planta identifica el transcrit del transgèn i se n'acaba ressentint l'expressió del producte.

Per contrarestar aquest sistema de defensa, els virus de plantes produeixen supressors de silenciament, que interfereixen la regulació gènica mediada pel silenciament i la biosíntesi de smRNA (small RNA) de la planta (Soitamo *et al.*, 2011), i els hi permeten proliferar en el seu hoste específic.

L'expressió de proteïnes recombinants en planta es veu significativament afavorida mitjançant la co-expressió del gen exogen i el del supressor de silenciament. En alguns casos els nivells d'expressió de proteïna recombinant han arribat a augmentar fins a 50 vegades en presència de supressor (Voinnet *et al.*, 2003).

Per a l'expressió de hGH-MxeGyrA-Zera[®] en plantes de tabac, es van coagroinfiltrar plantes de tabac *N. benthamiana* amb el supressor de silenciament gènic HC-Pro de potyvirus. S'ha demostrat que la proteïna HC-Pro interacciona amb el proteasoma 26S de la cèl·lula vegetal inhibint la seva activitat RNA endonucleasa (Soitamo *et al.*, 2011)

Tot i que les condicions de coagroinfiltració de plantes i recuperació de cossos proteics ja estaven posades a punt en el moment del inici d'aquesta sèrie experimental (Torrent *et al.*, 2009b), totes les etapes de *downstream* posteriors varen ser adaptades a les condicions òptimes per permetre la inducció de l'autoprocessament promogut per la inteïna MxeGyrA.

La localització subcel·lular de hGH-MxeGyrA-Zera[®] en plantes de tabac va ser demostrada per subfraccionament cel·lular mitjançant gradient de densitat. Els antecedents existents per a múltiples proteïnes de fusió Zera[®] (Torrent *et al.*, 2009a), així com els resultats obtinguts arrel del subfraccionament subcel·lular, foren suficients per confirmar la seva acumulació en cossos proteics de densitat compresa entre 1,21 i 1,23 g/cm³. De totes formes, per tal de confirmar aquest fet, seria necessari un estudi definitiu sobre la morfologia i distribució de la proteïna en el teixit vegetal transformat mitjançant immunodetecció per microscòpia de fluorescència confocal o per microscòpia electrònica.

L'estudi sobre la recuperació de hGH-MxeGyrA-Z en cossos proteics heteròlegs, es va dur a terme paral·lelament amb el d'una construcció anàloga que contenia la diana de tall per a l'enteroquinasa entre Zera[®] i hGH. La comparació d'ambdós processos de *downstream* fins a la recuperació de hGH pura, fou determinant per establir competències entre els diferents sistemes de processament, en termes de cost i rendiment de producció.

L'anàlisi electroforètic d'ambdós processos va donar com a resultat un grau de recuperació i enriquiment de hGH molt elevat derivades de l'elevada acumulació a l'interior de compartiments de tipus cos proteic. De fet, la recuperació de la fracció de cossos proteics d'alta densitat mitjançant baixes revolucions de centrifugació, va permetre descartar la gran majoria de proteïnes solubles present en l'extracte.

La utilització del sistema de tall basat en la inteïna MxeGyrA aplicat a la tecnologia Zera[®] va permetre l'estalvi d'una de les etapes de *downstream*, ja que la solubilització i la inducció del tall es duïen a terme de forma simultània en presència de poder reductor. En l'etapa d'inducció del tall promogut per la inteïna es varen provar diferents condicions de inducció per agents reductors, rangs de pH i temperatura. Resultat d'aquest anàlisi qualitatiu vàrem poder determinar que les millors condicions de tall i de solubilització, juntament amb el menors costos de producció, s'obtenien amb l'addició de β -mercaptoetanol 10mM en el tampó de solubilització i inducció del tall, proporcionant un rendiment del tall pròxim al 60%.

D'altra banda, la digestió mitjançant enteroquinasa exògena va resultar en un processament inespecífic, promovent l'aparició d'un subproducte addicional que deriva en una disminució circumstancial del rendiment del processament.

La purificació de rhGH a partir de la fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] expressada a *Nicotiana benthamiana*.

La purificació de proteïnes recombinants en plantes representa la major part dels costos de producció (Menkhaus *et al.*, 2004). En plantes de tabac, la presència de compostos fenòlics dificulten enormement l'obtenció d'un producte pur. En aquest treball, molts dels compostos

contaminants de la matriu vegetal foren descartats en la primera etapa de *downstream* degut a les característiques hidrofòbiques i amfipàtiques del domini Zera[®]. Tot i així, la presència de productes resultants del tall proteic, juntament amb la de certs compostos no proteics provinents de l'hoste recuperats i co-purificats durant les etapes de *downstream*, feien necessària una etapa de purificació per cromatografia de fase reversa.

L'amfipicitat i l'elevada capacitat d'autoagregació del domini Zera[®] fan molt difícil la seva purificació o eliminació en una columna cromatogràfica, ja que s'observa un arrossegament important al llarg de tot el procés cromatogràfic, implicant uns nivells de purificació molt baixos. Tant les columnes d'intercanvi iònic com les d'interacció hidrofòbica (HIC) van mostrar aquest tipus de comportament, fent disminuir considerablement el rendiment del procés. La matriu de la cromatografia de fase reversa presenta adsorbents substituïts amb lligands hidrofòbics, de manera que es necessiten solvents no polars per a l'elució de la proteïna unida a la resina. Aquests solvents orgànics com l'acetonitril, fan que les proteïnes es trobin en un ambient desnaturalitzant, i per tant, que l'efecte dels agregats derivats de Zera[®] en la seva purificació es vegi mitigat.

L'elecció del tipus de cromatografia de fase reversa entre HPLC i FPLC va venir donada per la capacitat de purificació de grans volums de la segona respecte de la primera, així com de la utilització de pressions més baixes i per la rapidesa del procés de la FPLC respecte l'HPLC. Com a resultat varem obtenir un grau de puresa de hGH pròxim al 100% i una recuperació del 70-75%.

A partir del cromatograma i mitjançant la utilització del fluorímetre, varem poder determinar que el pic majoritari previ a l'elució de hGH corresponia a un pigment que era excitat a 450 nm i presentava un pic d'emissió a 600 nm. Amb aquestes característiques, probablement es tractessin de restes de pigment com la clorofil·la, que va ser arrossegat al llarg del procés fins a l'etapa de purificació. Malgrat tot, en l'optimització de l'etapa de purificació per cromatografia de fase reversa, varem aconseguir eliminar aquest compost, obtenint la puresa de hGH desitjada.

Una etapa de cromatografia d'afinitat per Zera[®] posterior a la inducció de l'autoprocessament de la inteïna MxeGyrA, facilita l'etapa final de purificació.

El domini Zera[®], gràcies a la seva estructura de tipus hèlix de poliprolina II presenta afinitat per a certs metalls de transició com el ferro, el cobalt i el níquel. Aquesta particularitat confereix la possibilitat d'augmentar l'eficiència de les etapes de purificació de proteïnes produïdes amb la tecnologia Zera[®], mitjançant una cromatografia amb metall immobilitzat (IMAC).

L'objectiu fou realitzar una cromatografia de tipus IMAC prèvia a l'etapa final de purificació per cromatografia de fase reversa per tal de permetre'ns assolir un elevat grau de puresa del producte d'interès. Tot i que cada pas per columna cromatogràfica suposa certes pèrdues de

producte associades al rendiment de cada columna, cal remarcar que per obtenir la mateixa puresa, altres sistemes no dependents de Zera[®] requeririen de 3 ó 4 columnes cromatogràfiques.

En el decurs d'aquest estudi es van posar a punt les condicions per tal de permetre separar l'etapa de solubilització de cossos proteics, de la inducció de l'autoprocessament per la inteïna mitjançant l'ús de TCEP com a agent reductor. Com a resultat d'aquesta etapa cromatogràfica, vàrem obtenir en el *Flow-through* de la columna, la hGH lliure de qualsevol impuresa relativa a Zera[®].

L'eficiència de tall en columna fou significativament més baixa que la que tenia lloc en solució, fins a un 20% menys de producte processat. Malgrat això, les condicions de purificació resten per a ser optimitzades, en termes de durada de la reacció, renovació del tampó d'inducció del tall, o provar altres resines de tipus IMAC, que permetessin l'ús d'altres agents reductors com el DTT.

Amb la fracció de hGH pre-purificada per IMAC, l'etapa final de purificació per cromatografia de fase reversa fou notablement millorada, amb el qual queda comprovada la idoneïtat de la columna IMAC com a etapa de purificació previ a l'etapa de *polishing* final.

En definitiva, podem afirmar que aquesta etapa de purificació emprant hGH-MxeGyrA-Zera[®], ha contribuït en l'estandardització del protocol per a la purificació de proteïnes Zera[®] mitjançant columna IMAC a escala de laboratori. Més recentment, també es va desenvolupar i posar a punt aquest sistema per a una purificació de proteïnes a escala superior, emprant columnes de major capacitat, demostrant que malgrat l'augment de volum, es tracta d'una etapa escalable i reproducible.

La rhGH produïda com a part de la fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] és tan activa com la produïda de forma recombinant a *E.coli*.

La bioactivitat de la rhGH purificada va ser avaluada *in vivo* en un sistema validat i posat a punt en cèl·lules de limfoma de rata de la línia Nb2, el creixement de les quals requereix la presència de lactògens com les prolactines de les quals forma part hGH. Per a dur a terme aquest assaig es va emprar una hGH estàndard recombinant produïda a partir d'*E.coli* (Anhui Anke Biotechnology Co., Ltd.).

El monitoratge del creixement d'aquestes cèl·lules en presència de diferents quantitats de rhGH de planta i bacteri, ens ha permès determinar que l'obtinguda a partir de plantes és tan activa com la produïda a *E.coli* o, en alguns casos lleugerament superior. Per aquests assajos també s'han provat altres rhGH comercials provinents d'altres fabricants, els quals han donat resultats similars.

Aquest assaig és el que de forma generalitzada s'utilitza per demostrar l'activitat de prolactines recombinants com la hGH, de forma que podem concloure que la hGH produïda en plantes en forma de hGH-MxeGyrA-Zera[®], és 100% activa i funcional.

Valoració econòmica de la producció de rhGH a gran escala. Simulació mitjançant el programa SuperPro Designer™

Dins de la indústria biofarmacèutica cada cop més competitiva, per tal de valorar la sortida a mercat de nous productes potencials, es requereix d'un bon disseny del procés de producció, no només en aspectes tècnics, sinó sobretot en termes de viabilitat econòmica. Recentment, els simuladors informàtics com SuperPro Designer (Intelligen Inc.), han ajudat en bona part a definir la rendibilitat i viabilitat cost-econòmica de plantes de bioproducció a escala industrial (Varadaraju *et al.*, 2011). Aquest programa, a més, també permet identificar colls d'ampolla, punts claus de reducció de costos, o bé avaluar l'impacte ambiental degut als residus generats durant el procés de producció.

Mitjançant l'ús d'aquest *software* es varen definir les unitats bàsiques operatives del procés de producció de rhGH en plantes de tabac, mitjançant els dos sistemes de processament analitzats en aquest treball: inteïna MxeGyrA i enteroquinasa comercial. Altrament, també es requeria d'informació i paràmetres bàsics sobre els recursos tècnics necessaris per a una producció fixa de proteïna.

En base als preus de mercat establerts per a l'any 2008, es van generar dos processos virtuals de producció de 100kg de hGH recombinant pura, que van requerir de certes suposicions o adaptacions de producció per tal de mantenir la viabilitat d'ambdós processos a escala industrial.

Així, el preu de cost de l'enteroquinasa exògena utilitzada per a la digestió de Zera[®]-D4K-hGH, va ser introduït assumint el cost d'una producció externa de proteasa a gran escala, ja que el seu cost comercial de fins a 1000\$ per gram de proteïna, donava com a resultat un cost global i una rendibilitat inviàbles.

Per altra banda, el cost de la llicència d'utilització de la inteïna MxeGyrA (de *New England Biolabs*) per a finalitats comercials, no va poder ser determinat en el decurs d'aquest estudi, de forma que tampoc vam poder introduir un valor que ens permetés establir un cost de producció ajustat. Malgrat tot, la caducitat de la llicència d'ús comercial de la inteïna està prevista per al 2012, amb el qual el sistema esdevindria lliure per al ús comercial.

El resultat d'aquest anàlisi ens va permetre determinar de forma orientativa que, per a uns costos de producció de hGH similars (al voltant de 200\$/g de proteïna), la rendibilitat del procés fou superior mitjançant la utilització de la inteïna com a mètode de processament de proteïnes de fusió Zera[®].

Els baixos nivells d'expressió obtinguts per a la proteïna de fusió hGH-MxeGyrA-Zera[®] en planta de tabac, esdevingueren bona part responsables de que els costos no resultessin inferiors per aquest procés, posant en evidència la necessitat d'una optimització en aquest punt.

L'adaptació de hGH-MxeGyrA-Zera[®] a l'ús de codó de tabac no millora el grau d'acumulació en aquest hoste.

Diferents factors o la combinació d'alguns d'ells, podrien explicar la diferència d'expressió observada entre Zera[®]-D4K-hGH i hGH-MxeGyrA-Zera[®]. Entre ells, podria afectar la mida de la fusió total, la posició del domini Zera[®] a C-terminal, la presència de la inteïna actuant com a *linker*, o la conformació tridimensional de la proteïna. A nivell de *upstream*, i tenint en compte que certs components del plàsmid com el promotor, el terminador i les regions 5' UTR no codificants són comuns per a les dues construccions, el factor que podria tenir una major influència sobre l'expressió podria tractar-se de la seqüència de nucleòtids no adaptada a l'ús de codó de la planta de tabac (Maclean *et al.*, 2007).

La seqüència nucleotídica utilitzada fins al moment per a la construcció hGH-MxeGyrA-Zera[®] presentava la regió codificant per a la inteïna no adaptada per a l'expressió en aquest hoste i, per tant, podria significar la raó per la qual detectem nivells d'expressió inferiors.

En alguns casos s'ha descrit que les diferències en els mecanismes d'expressió entre organismes procariotes i eucariotes poden provocar una baixa o nul·la expressió de la proteïna d'interès malgrat es trobin sota control d'un promotor fort (de Maagd *et al.*, 1999). Les plantes tendeixen a presentar una C o G en la tercera base del codó, mentre que en organismes procariotes aquesta posició l'ocupen majoritàriament A i T (Wada *et al.*, 1992). Modificant la seqüència de nucleòtids per a adequar-la a l'expressió en plantes pot suposar un possible augment de la taxa de traducció del transcrit, i en definitiva, l'obtenció de nivells més elevats d'acumulació de proteïna.

Per a l'adaptació de la seqüència de hGH-MxeGyrA-Zera[®] a *Nicotiana tabacum*, varem encarregar a l'empresa Geneart AG, la síntesi del gen en base a l'ús de codó d'aquesta espècie. A més, també varem ser eliminades regions inestables dels transcrits susceptibles a ser degradades (seqüències *killer*) com el motiu AUUUA, o altres regions crítiques per a la correcta expressió de la proteïna.

El gen sintètic resultant, va ser clonat en el vector binari de transformació de plantes i, de forma paral·lela a la construcció no adaptada a l'ús de codó, varem ser transformades transitòriament a *Nicotiana benthamiana*. L'anàlisi no va mostrar diferències significatives en els nivells d'expressió obtinguts entre les dues construccions. Podem concloure doncs, que l'adaptació de la seqüència de hGH-MxeGyrA-Zera[®] a l'ús de codó d'aquest hoste no té un efecte significatiu sobre els nivells d'expressió assolits. Caldrà fixar-se en d'altres factors per tal de millorar els nivells

d'expressió assolits fins al moment. Així, per exemple, una de les variables de consideració que podria influir sobre els nivells d'acumulació de la proteïna d'interès seria l'estudi de l'efecte de diferents inhibidors de *silencing*.

És evident que hi ha certs factors que no poden ser alterats o modificats per a millorar el nivells d'expressió de hGH-MxeGyrA-Zera[®], com la mida o la posició del domini Zera[®], però actualment s'estan duent a terme estudis d'acumulació de proteïnes de fusió amb variants del domini Zera[®] que, en resultats preliminars, presenten la capacitat de millorar l'acumulació de proteïnes de fusió de fins a 10-15 vegades més que amb el Zera[®] convencional (dades no mostrades).

Si aquests resultats s'acaben de confirmar, suposaria un avenç important per a la tecnologia Zera[®], sobretot per les proteïnes d'expressió limitada (DEP - *Difficult to Express Proteins*) i per les proteïnes que requereixin de la fusió del domini Zera[®] a C-terminal, com és el cas de hGH-MxeGyrA-Zera[®].

6. Conclusions

Dels resultats que s'exposen en aquest treball se'n poden extreure les següents conclusions:

1. La producció mitjançant la tecnologia Zera[®] de proteïnes recombinants amb efecte citotòxic com l'enteroquinasa, resulta nociva per al sistema hoste d'expressió emprat, no permetent la seva acumulació a cos proteic i afectant a la viabilitat cel·lular.

Es posa de manifest que la tecnologia Zera[®] no és aplicable per a la producció d'aquest tipus de proteases tòxiques en cèl·lules de mamífer, d'insecte o plantes de tabac.

2. Els estudis d'acumulació de proteïna recombinant realitzats sobre cèl·lules de mamífer CHO transfectades amb les construccions Zera[®]-IEGR-EK, Ekm-Zera[®], Zera[®]-DnaB-hGH i hGH-GyrA-Zera[®]; els realitzats sobre cèl·lules d'insecte Sf9 infectades amb les construccions Zera[®]-DnaB-hGH i hGH-GyrA-Zera[®]; i els realitzats sobre plantes de tabac transformades amb la construcció hGH-GyrA-Zera[®]; indiquen una acumulació en orgànuls cel·lulars densos equivalents als CPs de blat de moro tant per fraccionament subcel·lular en gradients de densitat com per immunofluorescència.

Aquests resultats corroboren estudis previs en els quals es demostrava la capacitat del domini Zera[®] per induir la formació de CP en cèl·lules o teixits heteròlegs.

3. De l'anàlisi d'expressió i acumulació de les diferents proteïnes de fusió Zera[®] estudiades, se n'extreu que la posició del domini Zera[®] a N- o C- terminal de la proteïna de fusió no afecta significativament al grau d'acumulació i recuperació de la proteïna d'interès en cossos proteics heteròlegs.

La versatilitat del domini Zera[®] també ha quedat demostrada per la capacitat d'acumulació en cossos proteics de les proteïnes de fusió Zera[®]-DnaB-hGH i hGH-GyrA-Zera[®] tot i la presència de la inteïna corresponent com a seqüència *linker*.

4. L'activitat d'autoprocessament induïble mitjançant un canvi de temperatura i pH de la inteïna SspDnaB, posa de manifest que Zera[®]-DnaB-hGH recuperada a partir de cos proteic de cèl·lules CHO, adopta el plegament compatible amb la seva funció. L'eficiència de tall obtinguda fou variable segons el rendiment de solubilització i del tipus de tractament provat, esdevenint el 16% el valor màxim d'eficiència obtingut.

L'absència d'activitat de processament de la proteïna de fusió mutada (Zera[®]-(N154A)DnaB-hGH) demostra que l'autoprocessament observat per a Zera[®]-DnaB-hGH és degut a una activitat específica de la inteïna, i no degut a la presència d'una activitat proteasa endògena.

Els resultats de la baixa eficiència d'autoprocessament obtinguts mitjançant la inteïna SspDnaB, suggereixen una certa incompatibilitat dels residus pròxims al lloc de processament. Els requeriments de determinats residus nucleòfils en les posicions +1 i +2 de la proteïna d'interès resulten estrictes per a l'activitat d'aquesta inteïna.

5. La inducció de l'autoprocessament de la inteïna MxeGyrA en condicions reductores és efectiva en cossos proteïcs aïllats i solubilitzats a partir de cèl·lules de mamífer i de plantes de tabac transgèniques. L'eficiència de tall en condicions reductores és pròxima al 50% en cèl·lules CHO, i del 60% en planta de tabac.
6. De l'estratègia emprada per a l'autoprocessament de hGH-GyrA-Zera[®] expressada en cèl·lules d'insecte, se n'obté una eficiència d'autoprocessament del 50%. Tot i això, l'eficiència del procés fou molt baixa degut a la presència d'un mal processament del pèptid senyal durant el procés co-traducciona que té lloc a RE. Tot i els esforços per circumcidat aquest efecte, com el canvi de pèptid senyal o de la línia cel·lular d'insecte, el pèptid senyal no fou correctament processat, deixant obertes altres alternatives o mecanismes d'acció que ho podrien evitar.
7. De l'anàlisi comparatiu de simulació de producció a gran escala de rhGH emprant els processos posats a punt en plantes de tabac per hGH-GyrA-Zera[®] i per Zera[®]-D4K-hGH, se n'extreu que el cost de producció 100Kg de proteïna esdevindria pràcticament idèntic per ambdós processos. Malgrat que el rendiment del procés de hGH-GyrA-Zera[®] esdevé 4,5 vegades superior, les diferències en els nivells d'expressió fan necessària més quantitat de biomassa per a obtenir la mateixa quantitat de producte.
8. D'acord amb l'estudi sobre la optimització de la seqüència de hGH-GyrA-Zera[®] a l'ús de codó de la planta de tabac, no hi ha indicis d'una millora significativa en els nivells d'expressió. Altres recursos per explorar serien l'ús de diferents promotors, supressors de silenciament gènic, altres soques d'agrobacterium o un estudi sobre els nivells de transcripció (mRNA).
9. La immobilització de hGH-GyrA-Zera[®] en una columna d'afinitat IMAC permet la simultaneïtat de l'autoprocessament amb la purificació de rhGH nativa en una sola etapa cromatogràfica, sense necessitat de recórrer a condicions de purificació desnaturalitzants. El compromís a que s'arriba és degut a una davallada en el rendiment del tall, el qual podria ser optimitzat modificant les condicions de immobilització i inducció del processament.

7. Bibliografia

- Achmüller, C., Kaar, W., Ahrer, K., Wechner, P., Hahn, R., Werther, F., Schmidinger, H., Cserjan-Puschmann, M., Clementschitsch, F., Striedner, G., Bayer, K., Jungbauer, A., Auer, B.** 2007. N(pro) fusion technology to produce proteins with authentic N termini in E.coli. *Nat. Methods.* 4 : 1037-1043.
- Adrio, J.L., Demain, A.L.** 2010. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng. Bugs.* 1(2) : 116-131.
- Aggarwal, S.** What's fueling the biotech engine – 2007. 2008. *Nature Biotechnology.* 26 (11) : 1227-12.
- Ailor E., Pathmanathan, J., Jongbloed, J.D.H., Betenbaugh, M.J.** 1999a. A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 255(2) : 444-450.
- Ailor, E., Betenbaugh, M.J.** 1997. Overexpression of a cytosolic chaperone to improve solubility and secretion of a recombinant IgG protein in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 58 : 196-203.
- Ailor, E., Betenbaugh, M.J.** 1999. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Op. In Biotech.* 10 : 142-145.
- Ailor, E., Pathmanathan, J., Jongbloed, J.D.H., Betenbaugh, M.J.** 1999. A bacterial signal peptidase enhances processing of a recombinant single chain antibody fragment in insect cells. *Biochem. & Biophys. Res. Com.* 255(2) : 444-450.
- Aldridge, S.** 2006. Downstream processing needs a boost. *Gen. Eng. News.* 26(1) : 1-51.
- Alvarez, M.L., Topal, E., Martin, F., Cardineau, G.A.** 2009. Higher accumulation of F1-V fusion recombinant protein in plants after induction of protein body formation. *Plant Mol. Biol.* 72(1-2) : 75-89.
- Amitai, G., Callahan, B.P., Stanger, M.J., Belfort, G., Belfort, M.** 2009. Modulation of intein activity by its neighboring extein substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106 : 11005-11010.

- Andersen, D.C., Krummen, L.** 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Op. Biotech.* 13 : 117-123.
- Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J.** 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Prot. Expr. & Purif.* 48(1) : 1-13.
- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., Possee, R.D.** 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 202 : 586-605.
- Banki, M.R., Gerngross, T.U., Wood, D.W.** 2005. Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using *in vivo* polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Science.* 14 : 1387-1395.
- Banki, R.M., Wood, D.W.** 2005. Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up. *Microb. Cell Fact.* 4 (32).
- Barnard, G.C., McCool, J.D., Wood, D.W., Gerngross, T.U.** 2005. Integrated recombinant protein expression and purification platform based on *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10) : 5735-5742.
- Bastings, M.M.C., van Baal, I., Meijer, E.W., Merks, M.** 2008. One-step refolding and purification of disulfide-containing proteins with a C-terminal MESNA thioester. *BMC Biotech.* 8 : 76.
- Bernard, A.R., Lusti-Narasimhan, M., Radford., K.M., Hale, R.S., Sebille, E., Graber, P.** 1996. Downstream processing of insect cell cultures. *Cytotechnology.* 20 : 239-257.
- Blissard, G.W., Wenz, J.R.** 1992. Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* 66 : 6829-6855.
- Bosch, D., Stiekema, W.** 1999. Toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4(1) : 9-13.

- Brun, A., Bárcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J.M., Le Gall-Reculé, G., Ortego, J., Dixon, L.K.** 2011. Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res.* 157 : 1-12.
- Cabra, V., Arreguin, R., Galvez, A., Quirasco, M., Vazquez-Duhalt, R., Farres, A.** 2005. Characterization of a 19 kDa α -Zein of high purity. *J. Agric. Food Chem.* 53 : 725-729.
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., Xu, M.Q.** 1997. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene.* 192 : 271-281.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, E.J., Liao, W., Xu, M-Q., Benner, J.** 1998. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. 26 (22) : 5109-5115.
- Ciccarone, V., Chu, Y., Schifferli, K., Pichet, J-P., Hawley- Nelson, P., Evans, K., Roy, L., Bennett, S.** Lipofectamine™ 2000 Reagent for rapid, efficient transfection of eukaryotic cells. 1999. *Focus.* 21(2) : 54-55.
- Coleman, C.E., Herman, E.M., Takasaki, K., Larkins, B.A.** 1996. The maize gamma-zein sequesters alpha-zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. *Plant Cell.* 8 (12) : 2335-2345.
- Collins-Racie, L.A., McColgan, J.M., Grant, K.L., DiBlasio-Smith, E.A., McCoy, J.M., LaVallie, E.R.** 1995. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. *Bio/Technology.* 13 : 982-987.
- Colman, A.** 1998. Production of therapeutic proteins in the milk of transgenic livestock. *Biochem. Soc. Symp.* 63 : 141-147.
- Colussi, P.A., Taron, C.H.** 2005. *Kluyvermyces* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K.lactis*. *Appl. & Environ. Microbiol.* 71(11) : 7092-7098.

- Conley, A.J., Joensuu, J.J., Menassa, R., Brandle, J.E.** 2009. Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions. *BMC Biology*. 7 : 48.
- Conley, A.J., Joensuu, J.J., Richman, A., Menassa, R.** 2011. Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotech. J.* doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00596.x.
- Dale, C., Allen, A., Fogarty, S.** 1999. *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm.* 12(11) : 36-42.
- Dartar, R.V., Cartwright, T., Rosen, C-G.** 1993. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology*. 11 : 349-357.
- Das, T., Johns, P.W., Goffin, V., Kelly, P., Kelder, B., Kopchick, J., Buxton, K., Mukerji, P.** 2000. High-level expression of biologically active human prolactin from recombinant baculovirus in insect cells. *Prot. Expr. & Purif.* 20 : 265-273.
- Davis, T. R., Trotter, K. M., Granados, R. R., and Wood, H. A.** 1992. Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation and secretion. *Bio / Techonology*. 10 : 1148-1150.
- Demain, A.L., Vaishnav, P.** 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27 : 297-306.
- Denman, J., Hayes, M., O'Day, C., Edmunds, T., Bartlett, C., Hirani, S., Ebert, K.M., Gordon, K., McPherson, J.M.** 1991. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology (NY)*. 9(9) : 839-843.
- Elbehri, A.** 2005. Biopharming and the food system: examining the potencial benefits and risks. *AgBioForum*. 8(1) : 18-25.
- Elleuche, S., Pöggeler, S.** 2010. Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 : 479-489.

- Escribano, J.M., Perez-Filgueira, D.M.** 2009. Strategies for improving vaccine antigens expression in plants: fusion to carrier sequences. Ed. by Gomord V. and Faye L. Springer Verlag, Heidelberg. 483 : 275-287.
- Esipov, R.S., Stepanenko, V.N., Chupova, L.A., Boyarskikh, U.A., Filipenko, M.L., Miroshnikov, A.I.** 2008. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr. Purif.* 61(1) : 1-6.
- EuropaBio 2006.** 2006. Biotechnology in Europe: 2006 a comparative study. Critical I comparative study for EuropaBio.
- Evans, Jr., T.C., Xu, M-Q., Pradhan, S.** 2005. Protein splicing elements and plants: from transgene containment to protein purification. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 : 375-392.
- Fang, L., Sun, Q.M., Hua, Z.C.** 2004. Expression of recombinant chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization. *Acta Bio. Bioph. Sinica.* 36(7) : 513-517.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M.** 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(21) : 7413-7417.
- Ferrini, J-B., Martin, M., Taupiac, M-P., Beaumelle, B.** 1995. Expression of functional ricin B chain using the baculovirus system. *Eur. J. Biochem.* 233 : 772-777.
- Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Twyman, R. M.** 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Op Plant Biology.* 7 : 152-158.
- Fong, B.A., Wu, W-Y., Wood, D.W.** 2010. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. *Trends in Biotechnol.* 28(5) : 272-279.
- Furger, A., Jungi, T.W., Salomone, J.Y., Weynants, V., Roditi, I.** 2001. Stable expression of biologically active recombinant bovine IL-4 in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 508(1) : 90-94

- Galante, E., Vitale, A., Manzocchi, L., Soave, C., Salamini, F.** 1983. Genetic control of a membrane component and zein deposition in maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.* 192 : 316-321.
- Gasparian, M.E., Ostapchenko, V.G. Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P.** 2006. Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain. *Biochemistry (Moscow)*. 71(2) : 113-119.
- Geli, M. I., Torrent, M., Ludevid, M.D.** 1994. Two structural domains mediate two sequential events in γ -zein targeting: protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation. *The plant cell.* 6 : 1911-1922.
- Gogarten, J.P., Senejani, A.G., Zhaxybayeva, O., Olendzenski, L., Hilario, E.** 2002. Inteins: structure, function, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 : 263-287.
- Goldstein, D.A., Thomas, J.A.** 2004. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM med.* 97 : 705-716.
- Gomez-Casado, E., Gomez-Sebastian, S., Núñez, M.C., Lasa-Covarrubias, R., Martínez-Pulgarín, S., Escribano, J.M.** 2011. Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr. Purif.* 79 : 35-43.
- Gomord, V., Chamberlain, P., Jefferis, R., Faye, L.** 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends in Biotechnol.* 23 : 559-565.
- Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L.** 1980. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas. *Cancer Res.* 40(7) : 2433-2436.
- Granados, R.R., Guoxun, L., Derksen, A.C.G., McKenna, K.A.** 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64 : 260-266.
- Grant, D.A.W., Hermon-Taylor, J.** 1979. Hidrolysis of artificial substrate by enterokinase and trypsin and the development of a sensitive specific assay for enterokinase in serum. *Biochim. Biophys. Acta.* 567 : 207-215.

- Grosch, H-W., Hasilik, A.** 1998. Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus expression systems. *BioTechniques*. 24 : 930-934.
- Haseman, C.A., Capra, J.D.** 1990. High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system. *PNAS*. 87 : 3942-3946.
- Hearn, M.T., Acosta, D.** 2001. Applications of novel affinity cassette methods: Use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *J. Mol. Recognit.* 14 : 323-369.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., Fischer, R.** 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*. 22(11) : 1415-1422.
- Houdebine, L-M.** 2009. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases*. 32 : 107-121.
- Huang, L., Ruan, H., Gu, W., Xu, Z., Cen, P., Fan, L.** 2007. Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37 : 205-217.
- Hukman W.J., Smith L.D., Richter J., Larkins, B.A.** 1981. Subcellular compartmentalization of maize storage proteins in *Xenopus* oocytes injected with zein messenger RNAs. *J. Cell. Biol.* 89 : 292-299.
- Humphries, H.E., Christodoulides, M., Heckels, J.E.** 2002. Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 26 (2) : 243-248.
- Illangovan, U., Ton-That, H., Iwashara, J., Schneewind, O., Clubb, R.T.** 2001. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98 : 6056-6061.
- Jarvis, D.L., Summers, M.D., Garcia, A., Bohlmeier, D.A.** 1993. Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *J. Biol. Chem.* 268 (22) : 16754-16762.

- Jenkins, N., Curling, E.M.** 1994. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb. Technol.* 16 : 354-364.
- Jenny, R.J., Mann, K.G., Lundblad, R.L.** 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa.. *Prot. Expr. & Purif.* 31 : 1-11.
- Jenö, P., Green, J.R., Lentze, M.J.** 1987. Specificity studies on enteropeptidase substrates related to the N-terminus of trypsinogen. *Biochem. J.* 241 : 721-727.
- Karg, S.R., Kallio, P.T.** 2009. The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology Advances*. In press, doi:10.1016/j.biotechadv.2009.07.002
- Kenoutis, C., Efrose, R.C., Swevers, L., Lavdas, A.A., Gaitanou, M., Matsas, R., Iatrou, K.** 2006. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *J. Virol.* 80 : 4135-4146.
- Keränen, S., Penttilä, M.** 1995. Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Op. Biotech.* 6 : 534-537.
- Kogan, M. J., Dalcol, I., Gorostiza, P., López-Iglesias, C., Pons, M., Sanz, F., Ludevid, M.D., Giralt, E.** 2001. Self-assembly of the amphipathic helix (VHLPPP)₈. A mechanism for zein protein body formation. *JMB.* 312 : 907-913.
- Kogan, M. J., Dalcol, I., Gorostiza, P., López-Iglesias, C., Pons, R., Pons, M., Sanz, F., Giralt, E.** 2002. Supramolecular properties of the proline-rich γ -zein N-terminal domain. *Biophysical J.* 83 : 1194-1204.
- Koscianska, E., Kalantidis, K., Wypijewski, K., Sadowski, J., Tabler, M.** 2005. Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology.* 59 : 647-661.
- Kovaleva, E.S., O'Connell, K.P., Buckley, P., Liu, Z., Davis, D.C.** 2009. Recombinant protein production in insect larvae: host choice, tissue distribution, and heterologous gene instability. *Biotechnol. Lett.* 31 : 381-386.

- Kubitzki, T., Minör, D., Mackfeld, U., Oldiges, M., Noll, T., Lütz, S.** 2009. Application of immobilized bovine enterokinase in repetitive fusion protein cleavage for production of mucin 1. *Biotechnol. J.* 4 : DOI 10.1002/biot.200900049.
- Kubitzki, T., Noll, T., Lütz, S.** 2008. Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilised enzyme in fusion protein cleavage. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31 : 173-182.
- Kühnel, B., Alcantara, J., Boothe, J., van Rooijen, G., Moloney, M.** 2003. Precise and efficient cleavage of recombinant fusion proteins using mammalian aspartic proteases. *Protein Engineering.* 16(10) : 777-783.
- Kurland, C.G.** 1991. Codon bias and gene expression. *FEBS Lett.* 285(2) : 165-169.
- La Vallie, E.R., Rehemtulla, A., Racie, L.A., Di Blasio, E.A., Ferenz, C., Grant, K.L., Light, A., Mc Coy, J.M.** 1993. Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 268 (31) : 23311-23317.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J.** 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *The EMBO J.* 23 : 876-884.
- Langer, E.S.** 2009a. Trends in capacity utilization for therapeutic monoclonal antibody production. *mAbs.* 1(2) : 151-156.
- Langer, E.S.** 2009b. *Pharmaceutical Survey | Biopharma Faces the Future | Pharmaceutical Manufacturing.* Putman Media, Inc.
- Laprise, M-H., Grondin, F., Dubois, C.M.** 1998. Enhanced TGF β 1 maturation in High Five cells coinfecting with recombinant baculovirus encoding the convertase furin/pace: improved technology for the production of recombinant proproteins in insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 58 : 85-91.
- Larkins, B.A., Hurkman, W.J.** 1978. Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* 62 : 256-263.

- Lending, C.R., Larkins, B.A.** 1989. Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell*. 1 : 1011-1023.
- Li, Y.** 2010. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. *Biotechnol. Lett.* 33(5) : 869-881.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., Tan, S.** 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Prot. Expr. & Purif.* 41 : 98-105.
- Life Technologies.** 1999. Guide to eukaryotic transfections with cationic lipid reagents. 2nd Ed. Life Technologies , Inc., Rockville, Md.
- LifeSensors Inc.** 2004. Split SUMO gene fusion technology. New methods for enhancing protein expression and purification in eukaryotes. SUMOTM Pro. White Paper. LifeSensors, Inc. Malvern, PA.
- Light, A., Fonseca, P.** 1984. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 259 (21) 13195-12198.
- Liu, L., Spurrier, J., Butt, T.R., Strickler, J.E.** 2008. Enhanced protein expression in the baculovirus/insect cell system using engineered SUMO fusions. *Protein Expr. Purif.* 62 : 21-28.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C.** 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *PNAS.* 97(24) : 13401-13406.
- Llop-Tous, I., Madurga, S., Giralt, E., Marzabal, P., Torrent, M., Ludevid, M.D.** 2010. Relevant elements of a maize γ -zein domain involved in protein body biogenesis. *J. Biol. Chem.* 285 (46) : 35633-35644.
- Llop-Tous, I., Ortiz, M., Torrent, M., Ludevid, M.D.** 2011. The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants. *PLoS ONE.* 6(4) : e19474.

- Lu, D., Fütterer, K., Korolev, S., Zheng, X., Tan, K., Waksman, G., Sadler, J.E.** 1999. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide. *J. Mol. Biol.* 292 (2) : 361-373.
- Ludevid, M.D., Bastida, M., Llompert, B., Marzábal, P., Torrent, M.** 2006. International Patent number WO2006/056484.
- Ludevid, M.D., Torrent, M., Martínez-Izquierdo, J.A., Puigdomenech, P., Palau, J.** 1984. Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Plant Molecular Biology.* 3 : 227-234.
- Maclean, J., Koekemoer, M., Olivier, A.J., Stewart, D., Hitzeroth, I.I., Rademacher, T., Fischer, R., Williamson, A.L., Rybicki, E.P.** 2007. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J. Gen. Virol.* 88 : 1460-1469.
- Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O.A., Drinker, M., Weeks, S.D., Butt, T.R.** 2004. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struc. & Funct. Genom.* 5 : 75-86.
- Mao, H.** 2004. A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Prot. Expr. Purif.* 37 : 253-263.
- Marek, M., van Oers, M.M., Devaraj, F.F., Vlak, J.M., Merten, O-W.** 2010. Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals. *Biotech. Bioeng.* 108(5) : 1056-1067.
- Martensen, P.M., Justesen, J.** 2000. Specific inhibitors prevent proteolytic degradation of recombinant proteins expressed in High Five™ cells. *BioTechniques.* 30 : 782-792.
- Mathys, S., Evans Jr., T.C., Chute, I.C., Wu, H., Chong, S., Berner, J., Liu, X-Q., Xu, M-Q.** 1999. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C- terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation. *Gene.* 231 : 1-13.

- Menkhaus, T.J., Bai, Y., Zhang, C., Nikolov, Z.L., Glatz, C.E.** 2004. Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnol. Prog.* 20(4) : 1001-1014.
- Meyer, V.** 2008. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotech. Adv.* 26 : 177-185.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G.P., Blissard, G.W.** 1996. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* 70 : 4607-4616.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., Marchetti, S.** 2002. Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett.* 519 : 141-146.
- Müntz, K.** 1998. Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol.* 38 : 77-99.
- Murges, D., Kremer, A., Knebel-Morsdorf, D.** 1997. Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* 78 : 1507-1510.
- O’Callaghan, P.M., James, D.C.** 2008. Systems biotechnology of mammalian cell factories. *Brief. Functional Genomics & Proteomics.* 7(2) : 95-110.
- Olczak, M., Olczak, T.** 2006. Comparison of different signal peptides for protein secretion in nonlytic insect cell system. *Anal. Biochem.* 359 : 45-53.
- Osicka, R., Procházková K., Sulc, M., Linhartová, I., Havlíček, V., Sebo, P.** 2004. A novel “clip-and-link” activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J Biol. Chem.* 279 : 24944-24956.
- Paal, M., Heel, T., Schneider, R., Auer, B.** 2009. A novel Ecotin-Ubiquitin-Tag (ECUT) for efficient, soluble peptide production in the periplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories.* 8 : 7.

- Paulus, H.** 2000. Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem.* 69 : 447-496.
- Perler, F.B., Adam, E.** 2000. Protein splicing and its applications. *Current Op. In Biotech.* 11 : 377-383.
- Pollock, D.P., Kutzko, J.P., Birck-Wilson, E., Williams, J.L., Echelard, Y., Meade, H.M.** 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods.* 231(1-2) : 147-157.
- Raghavan, R., Minnick, M.F.** 2009. Group I Introns and Inteins: Disparate origins but convergent parasitic strategies. *J. Bacteriol.* 191(20) : 6193-6202.
- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M.A., Fasel, N., Reymond, C.D.** 1998. Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74(2) : 95-103.
- Rayder, R.A.** Expression systems for process and product improvement. 2008. *Bio. Proc. Internat.* 6 : 4-9.
- Riggin, R.M., Dorulla, G.K., Miner, D.J.** 1987. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for characterization of biosynthetic human growth hormone. *Anal. Biochem.* 167 : 199-209.
- Rohrmann, G.F.** 1986. Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* 67 : 1499-1513.
- Sambrook, J., Russell, D.W.** 2000. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., Pelham, H.R.** 1990. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell.* 61 : 1349-1357.
- Shahravan, S.H., Qu, X., Chan, I-S., Shin, J.A.** 2008. Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Prot. Expr. & Purif.* 59(2): 314-319.

- Sharma, A. K., Sharma, M. K.** Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. 2009. *BiotechnolAdv.* In press, doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.06.004
- Sharma, S.S., Chong, S., Harcum, S.W.** 2006. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E.coli*. 125 : 48-56.
- Shen, A., Lupardus, P.J., Morell, M., Ponder, E.L., Sadaghiani, A.M., Garcia, K.C., Bogyo, M.** 2009. Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag. *PLoS One*. 4 : e8119.
- Shridar, P., Awasthi, A.K., Azim, C.A., Burma, S., Habib, S., Jain, A., Mukherjee, B., Ranjan, A., Hasnain, S.E.** 1994. Baculovirus vector-mediated expression of heterologous genes in insect cells. *J. Biosci.* 19(5) : 603-614.
- Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J.** 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*. 3 : 2156-2165.
- Soitamo, A.J., Jada, B., Lehto, K.** 2011. HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biol.* 11 : 68.
- Song, H-W., Choi, S-I., Seong, B.L.** 2002. Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: effect of N-terminal modification. *Arch. Biochem. Bioph.* 400(1) : 1-6.
- Stadlmayr, G., Mecklenbräuker, A., Rothmüller, M., Maurer, M., Sauer, M., Mattanovich, D., Gasser, B.** 2010. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *J. Biotechnol.* 150(4) : 519-529.
- Summers, M.D., Smith, G.E.** 1978. Baculovirus structural polypeptides. *Virology*. 84(2) : 390-402.
- Sun, Z., Chen, J., Yao, H., Liu, L., Wang, J., Zhang, J., Liu, J-N.** 2005. Use of SspdnaB derived mini-intein as a fusion protein partner for production of recombinant human brain natriuretic peptide in *Escherichia coli*. *Prot. Exp.& Purif.* 43 : 26-32.

- Svetina, M., Krasevec, N., Gaberc-Porekar, V., Komel, R.** 2000. Expression of catalytic subunit of bovine enterokinase in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. J. Biotech. 76 : 245-251.
- Telenti, A., Southworth, M., Alcaide, F., Daugelat, S., Jacobs Jr., W.R., Perler, F.B.** 1997. The *Mycobacterium xenopi* GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein. J. Bacteriol. 179(20) : 6378-6382.
- Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Khouri, H.E., Laliberte, F., Vernet, T.** 1991. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. Gene. 98(2) : 177-183.
- Torrent, M., Geli, M.I., Ruiz-Avila, L., Canals, J.M., Puigdomènech, P., Ludevid, M.D.** 1994. Role of structural domains for maize γ -zein retention in *Xenopus* oocytes. Planta. 192 : 512-518.
- Torrent, M., Llopart, B., Lasserre-Ramassamy, S., Llop-Tous, I., Bastida, M., Marzabal, P., Westerholm-Parvinen, A., Saloheimo, M., Heifetz, P.B., Ludevid, M.D.** 2009a. Eukaryotic protein production in designed storage organelles. BMC Biology. 7 : 5.
- Torrent, M., Llop-Tous, I., Ludevid, M.D.** 2009b. Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. Methods in Mol. Biology, Recombinant proteins from plants. Ed. by Gomord V. and Faye L. Springer Verlag, Heidelberg. 483 : 193-208.
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A., Gingeras, T.R.** 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Res. 15 (9), 3859-3876.
- Ukropcová, D., Sturdík, E.** 2011. Biotechnology commercialization in the world. Acta Chimica Slovaca. 4(1): 115-125.
- Van Oers, M.M., Vlak, J.M.** 2007. Baculovirus genomics. Curr. Drug Targets. 8(10) : 1051-1061.
- Varadaraju, H., Schneiderman, S., Zhang, L., Fong, H., Menkhaus, T.J.** 2011. Process and economic evaluation for monoclonal antibody purification using a membrane-only process. Biotechnol. Prog. DOI 10.1002/btpr.639.

- Verdoes, J.C., Punt, P.J., Stouthamer, A.H., van den Hondel, C.A.** 1994. The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene. *Gene*. 145(2) : 179-187.
- Vergis, J.M., Wiener, M.C.** 2011. The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. *Prot. Expr. & Purif.* 78 : 139-142.
- Vitale, A., Ceriotti, A.** 2004. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interest? *Plant Physiology*. 136 : 3420-3426.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.** 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33(5) : 949-956.
- Voza, L.A., Wittwer, L., Higgins, D.R., Purcell, T.J., Bergseid, M., Collins-Racie, L.A., LaVallie, E.R., Hoeffler, J.P.** 1996. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*. 14 : 77-81.
- Vuillard, L., Braun-Breton, C., Rabilloud, T.** 1995. Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification. *Biochem. J.* 305 : 337-343.
- Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T., Ikemura, T.** 1992. Codon usage tabulated from GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* 20 Suppl, 2111-2118.
- Walsh, G.** Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. 2005. *Trends in biotechnology*. 23(11) : 553-558.
- Wandelt, C.I., Khan, M.R., Craig, S., Schoeder, H.E., Spencer, D., Higgins, T.J.** 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *Plant J.* 2 : 181-192.
- Wang, L., Coppel R.L.** 2002. Triton X-114 phase partitioning for antigen characterization. *Methods Mol. Med.* 72 : 581-585.

- Wang, L., Kang, J.H., Kim, K.H., Lee, E.K.** 2009. Expression of intein-tagged fusion protein and its applications in downstream processing. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010. 85 : 11-18.
- Waugh, D.S.** 2010. TEV protease FAQ. Macromolecular Crystallography Laboratory. National Cancer Institut. Frederick.US. http://mc11.ncifcrf.gov/waugh_tech/faq/tev.pdf
- Wickham, T.J., Davis, T., Granados, R.R., Shuler, M.L., Wood, H.A.** 1992. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol. Prog.* 8 : 391-396.
- Wickham, T.J., Nemerow, G.R.** 1993. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression vector. *Biotechnol. Prog.* 9 : 25-30.
- Wood, D.W., Wu, W., Belfort, G., Derbyshire, V., Belfort, M.** 1999. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nat. Biotechnol.* 17 : 889- 892.
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., Colman, A.** 1991. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*. 9(9) : 830-834.
- Xu, M.Q., Evans, T.C. Jr.** 2001. Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins. *Methods.* 24 : 257-277.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G.** 2007. Select what you need : A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. of Biotechnology.* 127 : 335-347.
- Yuan, L-D., Hua, Z-C.** 2002. Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. & Purif.* 25 : 300-304.