

NOMBRE: **PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

PROFESOR RESPONSABLE: **Manuel Cifuentes Rueda (Universidad de Málaga)**

PROFESORES PARTICIPANTES:

Manuel Cifuentes Rueda (Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga)

Pilar María Arrabal García (Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga)

Rick Visser (Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga)

Juan Carlos Aledo Ramos (Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga)

DESCRIPTORES

Sistemas de expresión de proteínas en organismos procariontes y eucariontes. Vectores de expresión.

OBJETIVOS DEL APRENDIZAJE

Conocer los fundamentos y la metodología más avanzada para la expresión de proteínas en organismos uni y pluricelulares.

N^a DE CREDITOS ECTS: 3

TIPO: Optativo (orientación investigadora)

SECUENCIA: 2^a trimestre

CARÁCTER: Teórico / aplicado

DESARROLLO: Presencial

BLOQUES TEMATICOS

Tema 1. Proteínas de interés industrial. Extremoenzimas. Ingeniería de proteínas: diseño racional vs evolución dirigida. Mutagénesis dirigida. Mutagénesis al azar. Métodos recombinantes y no recombinantes. Relación entre estructura primaria y actividad. Bases de datos en relación a la ingeniería de proteínas. Metagenómica. Estabilidad de proteínas. Cambio de puentes de disulfuro. Sensibilidad a proteasas. Mejora simultánea de varias propiedades.

Tema 2. Introducción. Expresión en *E. coli*: promotores y vectores de expresión más utilizados. Solubilidad y estabilidad de las proteínas: cuerpos de inclusión y su manipulación. Expresión y purificación de proteínas fusionadas a His o GST.

Tema 3. Introducción a la expresión de proteínas en levaduras. Expresión en *Saccharomyces cerevisiae*: promotores, vectores y secreción de proteínas. Expresión en *Schizosaccharomyces pombe*: promotores y vectores. Expresión en *Pichia pastoris*: metabolismo, promotores y vectores. Expresión de proteínas en hongos filamentosos: generalidades.

Tema 4. Expresión de proteínas en plantas. Las plantas como biofactorías. Sistemas de transferencia genética. Modificaciones post-traduccionales. Producción de proteínas terapéuticas. Producción de anticuerpos en plantas. Producción de vacunas: “vacunas comestibles”. Plantas transgénicas como alimentos funcionales. Bioseguridad.

- Tema 5.* Expresión de proteínas recombinantes en sistemas libres de células y ovocitos de *Xenopus laevis*. Fundamentos, características, protocolos y ejemplos.
- Tema 6.* Expresión de proteínas recombinantes en células de insecto infectadas por baculovirus. Obtención de baculovirus recombinantes. Plásmidos donadores. Tipos de promotores. Tipos de células de insecto, características y aspectos básicos de su cultivo. Protocolos de trabajo. Estrategias para mejorar la productividad. Escalado de la producción de proteínas: expresión en larvas y cultivos en masa.
- Tema 7.* Sistemas de expresión en células de mamíferos. Introducción, características. Expresión transitoria vs permanente. Tipos de vectores. Líneas celulares usuales y aspectos básicos de su cultivo. Protocolos de trabajo. Los baculovirus como vectores de expresión en células de mamíferos. Cultivos en masa. Los animales como factorías de proteínas recombinantes.

BIBLIOGRAFIA BASICA

- Glick B.R., Pasternak J.J. (2003). Molecular Biotechnology. 3rd. Edition. ASM Press. Washington (USA).
- Dalby, P.A. (2003) Optimising enzyme function by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 500-505
- Dingermann T. (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol. J.* 3, 90–97
- Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. (1994) D.R. O'Really, L.K. Miller and V.A. Luckow. Oxford University Press, Oxford.
- Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. (2007) David W. Murhammer. Series: Methods in Molecular Biology. Volume No.: 388. Print ISBN: 978-1-58829-537-8.
- Nobeli, I; Favia, AD; Thornton, JM. (2009) Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nature Biotech.* 27, 157-167.
- Barak, Y; Nov, Y; Ackerley, DF; Martin A (2008) Enzyme improvement in the absence of structural knowledge: a novel statistical approach. *ISME J.* 2, 171-179.
- Dueber, JE; Mirsky EA; Lim WA (2007) Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control. *Nature Biotech.* 25, 660-662.
- Yin et al, (2007): Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J of Biotech*, vol 127(3): 335-347
- Recombinant Protein Purification Handbook, Principles and Methods. GE Healthcare
- *pET System Manual*, 11th Edition. Novagen.
- Gene Expression Systems. Using Nature for the Art of Expression. (1999) Edited by: Joseph M. Fernandez and James P. Hoeffler. Elsevier . ISBN: 978-0-12-253840-7

EVALUACIÓN

- Trabajo personal o en equipo con un valor de hasta el 30% de la nota y prueba escrita con un valor e hasta el 70% de la nota.
- La calificación del trabajo personal o en equipo se guardará solo durante un curso académico.