



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 311**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04735027 .7**

96 Fecha de presentación : **27.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1639373**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Un método para detectar colonias celulares que expresan una variante soluble de una proteína objetivo.**

30 Prioridad: **02.07.2003 GB 0315525**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.12.2009**

73 Titular/es: **Pär Nordlund**  
**Roslagsgatan 47**  
**113 54 Stockholm, SE**  
**Tobias Cornvik**

72 Inventor/es: **Nordlund, Pär;**  
**Cornvik, Tobias;**  
**Dahlroth, Sue-Li y**  
**Knaust, Rose-Marie**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 331 311 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## ES 2 331 311 T3

### DESCRIPCIÓN

Un método para detectar colonias celulares que expresan una variante soluble de una proteína objetivo.

5 La invención se refiere a un método para la detección sistemática de moléculas de proteína, en particular a métodos para identificar proteínas solubles y para detectar colonias que expresan una proteína soluble tomada como objetivo.

10 La producción de proteínas puras o semi-puras es importante en muchos programas de investigación y desarrollo comerciales y académicos. A menudo tales proteínas se producen de manera recombinante. Las proteínas recombinantes pueden constituir productos (por ejemplo enzimas para uso en ensayos biomédicos o en procesos industriales) y también se utilizan en el proceso de desarrollo de fármacos. En los procesos de desarrollo de fármacos, estas proteínas a menudo se utilizan para estudios estructurales (en los que se emplean métodos tales como RMN y cristalografía de rayos X), y en estudios bioquímicos o biofísicos de la proteína tomada como objetivo. En la investigación académica, se utilizan proteínas expresadas de manera recombinante para caracterización bioquímica, biofísica y estructural. 15 Adicionalmente, la secuenciación del genoma humano ha revelado ahora muchos objetivos potenciales para expresión recombinante para elucidar la función de productos génicos.

20 Tradicionalmente, las proteínas recombinantes se producen mediante la sobreexpresión de un gen de interés. Sin embargo, muchas proteínas se agregan (por ejemplo en cuerpos de inclusión) cuando se sobreexpresan y fracasan en plegarse en su conformación nativa. Tales agregados de proteína deben disolverse y replegarse correctamente antes de que se puedan utilizar en muchos de los métodos anteriormente mencionados. Sin embargo replegar proteínas a partir de cuerpos de inclusión normalmente da como resultado rendimientos de proteínas muy bajos y a menudo no es posible determinar si la proteína aislada está, de hecho, correctamente plegada.

25 Para mejorar los rendimientos de las proteínas obtenidas, es por lo tanto importante para las proteínas tener una alta solubilidad. Varios estudios han mostrado ahora que la solubilidad de la proteína puede aumentarse sustancialmente mediante sustituciones de aminoácidos en posiciones particulares. Se han creado proteinotecas mutantes de las proteínas tomadas como objetivo para seleccionar las que han aumentado la solubilidad y por lo tanto son capaces de ser altamente expresadas. De hecho, las proteínas que son insolubles de manera natural, se pueden mutar y expresar 30 en forma soluble. El procedimiento de mutar proteínas para aislar/detectar variantes solubles es conocido en la técnica como evolución dirigida. Están disponibles varios métodos de mutagénesis que incluyen mutagénesis de centros específicos, truncamiento de los extremos de la secuencia, uso de una enzima exonucleasa e introducción de un casete aleatorizado de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos.

35 Además se deben examinar sistemáticamente las proteinotecas mutantes para detectar el clon(es) recombinante(s) que contiene(n) variantes solubles. Se han descrito varios métodos de búsqueda sistemática, que seleccionan proteínas con solubilidad aumentada. Maxwell *et al.* (Protein Science, 1999, 8, 1908-1911), describen un ensayo sencillo para evaluar la solubilidad usando proteínas de fusión de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), este se basaba en el principio de que las células que expresan fusiones de una proteína insoluble a CAT exhiben disminución de la resistencia 40 al cloranfenicol comparadas con fusiones con proteínas solubles. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el dominio central catalítico silvestre (insoluble) de la integrasa del VIH y una variante soluble con sustituciones de aminoácido en posiciones F185. No se llevaron a cabo experimentos de selección en una proteinoteca usando esta criba, y los autores suponen que pueden surgir un gran número de falsos positivos. Por lo tanto, está claro que se requieren cribas más fiables para proteínas solubles.

45 Otro grupo, Waldo *et al.* (Nature Biotechnology, 1999, 17,691-695), ha desarrollado una criba de proteínas solubles utilizando proteínas con fusiones terminales del extremo N a proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). Waldo *et al.* demostraron que el plegamiento correcto del dominio de la proteína GFP (y por lo tanto su capacidad para fluorescer) está directamente relacionado con la robustez del plegamiento y la evitación de la formación de cuerpos de inclusión de la proteína de interés. 50

Sin embargo, se ha informado como no perfecta la correlación publicada entre la solubilidad sin fusión y la fluorescencia de fusión de la GFP, en la que la solubilidad puede ser tanto sobrestimada como subestimada. Generalmente, se reconocerá que las técnicas que se basan en las propiedades de una proteína fusionada a un resto indicador no siempre 55 darán una buena indicación de cómo se comportará la proteína objetivo libre de su socio de fusión.

60 Peabody y Al-Bitar (Nucleic Acids Research, 2001, 29, N° 22 e113 1-7) desarrollaron una criba de proteínas solubles, en la que colonias de bacterias recombinantes se recubrieron con gel de agarosa. Las proteínas difundieron desde las colonias a través del gel de recubrimiento en función del peso molecular. Las variantes solubles que difundieron más rápido dieron manchas de diámetros más grandes de mayor intensidad que las variantes insolubles. La difusión tarda 24 horas y por lo tanto este método no es adecuado para el cribado de alto rendimiento.

65 En Knaust y Nordlund (Analytical Biochemistry, 2001, 297, 79-85), se desarrolló una criba para proteínas solubles utilizando filtración de células lisadas en cultivo en placas de 96 pocillos. Se cultivaron bacterias recombinantes en placas de agar y a continuación se utilizaron para inocular medios en placas de 96 pocillos. Los cultivos se cultivaron, se lisaron y se filtraron. Las proteínas solubles se pasaron a través de un filtro a una placa de microtitulación, las bacterias recombinantes positivas se identificaron mediante cribado de los filtrados por el método de transferencia Western.

## ES 2 331 311 T3

Aunque este método probó ser fiable para la detección de proteínas solubles, también consumía mucho tiempo para procesar gran número de clones recombinantes debido a las muchas etapas de pipeteo necesarias.

5 Los presentes inventores han desarrollado ahora un método de cribado que puede procesar un gran número de bacterias recombinantes en un período corto de tiempo.

Sorprendentemente, se ha encontrado que la lisis de células y la filtración de lisados se puede llevar a cabo directamente sobre las colonias de células, eliminando por lo tanto el requerimiento de cultivar colonias en cultivos y las múltiples etapas de pipeteo implicadas en esta técnica.

10 La presente invención es por lo tanto capaz de operar sobre gran número de variantes, es barata y tiene una alta fiabilidad para predecir variantes solubles.

Así, se describe un método de tratar una o más colonias de células, método que comprende:

- 15 (a) someter las colonias celulares a condiciones que son capaces de causar la lisis de las mismas; y
- (b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que solo permiten pasar proteínas solubles a través del filtro.

20 Además, se describe un método de detectar una o más colonias que expresan una proteína soluble tomada como objetivo, en el que la selección tiene lugar sobre la base de la capacidad de la proteína de interés de pasar a través del filtro.

25 Particularmente se describen métodos en los que la proteína objetivo es una proteína de membrana. Una proteína de membrana es una que está asociada con una de las membranas de una célula, y puede encontrarse o dentro de la membrana o unida a ella. La membrana puede ser una membrana intracelular o la membrana celular externa. Preferentemente la membrana es una membrana intracelular, y más preferentemente es una membrana intracelular de *E. coli*.

30 Los métodos detectan proteínas solubles y colonias que expresan variantes solubles de una proteína dada. Las proteínas de membrana se consideran generalmente insolubles y por lo tanto las proteínas de membrana tomadas como objetivo serán las que sean capaces de ser transformadas en solubles, convenientemente esta solubilización se puede conseguir sometiendo a la proteína a mutagénesis, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 4.

35 También se describe un método de seleccionar una o más colonias que expresan una proteína soluble no enzimática tomada como objetivo. Las proteínas "no enzimáticas" son proteínas que no poseen por si mismas actividad enzimática y no son capaces de catalizar una reacción bioquímica. Las proteínas "no enzimáticas" tomadas como objetivo se pueden fusionar a otras proteínas, por ejemplo etiquetas tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés), que tienen actividad enzimática.

40 Preferentemente este método se utiliza como un método de cribado para identificar colonias que expresan proteínas solubles. El filtro a través del cual pasan las proteínas, actúa como la criba, es decir la identificación de las colonias que expresan proteínas solubles tiene lugar como resultado directo de si proteína objetivo ha pasado a través del filtro o no.

Así, también se describe un método de determinar si una colonia celular expresa una variante soluble de una proteína objetivo o no, método que comprende:

- 50 (a) someter dicha colonia celular a condiciones que son capaces de causar la lisis de la misma;
- (b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que solo permiten pasar proteínas solubles a través del filtro; y
- 55 (c) detectar la proteína objetivo que ha pasado a través del filtro.

En la etapa (c) se detecta la proteína tomada como objetivo y la presencia de la proteína objetivo indica que la colonia celular correspondiente produce una variante soluble de esa proteína tomada como objetivo. Preferentemente, la proteína objetivo no se detecta sobre la base de su propia actividad enzimática. Sin embargo, la detección puede tener lugar sobre la base de la actividad enzimática de una etiqueta fusionada a la proteína objetivo de interés, por ejemplo peroxidasa de rábano picante, G-S-T o luciferasa. Además, la etiqueta puede participar como sustrato en un método de detección enzimático, siendo las etiquetas de His particularmente adecuadas a este respecto. Por ejemplo, se puede utilizar INDIA Sonda de His-HRP (Pierre, Rockford IL, USA) para la detección en la que la proteína objetivo de interés o está etiquetada con poli-histidina o es rica en histidina y donde la proteína objetivo se detecta mediante un derivado activado con Níquel de peroxidasa de rábano picante que se une a etiquetas de His. Alternativamente, se utiliza un método de detección no enzimático (es decir, no catalítico), (es decir, ningún método basado en conversión del sustrato).

## ES 2 331 311 T3

Preferentemente la detección se basa en la afinidad de la unión entre la proteína objetivo y un resto de detección, por ejemplo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o “affibody” (socio de unión a proteína no basado en Ab). Tales métodos permiten el análisis rápido y fiable de una amplia variedad de moléculas tomadas como objetivo, incluidas las que no poseen por sí mismas ninguna actividad catalítica.

5

La presente invención proporciona un método de identificar una colonia celular que expresa una variante soluble de una proteína objetivo, método que comprende:

10

(a) someter dicha colonia celular a condiciones que son capaces de causar la lisis sin desnaturalización de la misma;

(b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que solo permiten pasar proteínas solubles a través del filtro; y

15

(c) detectar la proteína objetivo que ha pasado a través del filtro, en donde la proteína objetivo no se detecta sobre la base de su propia actividad enzimática.

20

Como se discute más abajo, las proteínas en el filtrado se ubican sobre un soporte sólido, por ejemplo una membrana de captura, y por lo tanto es una cuestión sencilla correlacionar las proteínas tomadas como objetivo identificadas en el filtrado con colonias celulares individuales cuando se analiza al mismo tiempo más de una colonia celular. Típicamente se analizan simultáneamente 50 o más, 200 o más o incluso 1000 a 2000 o más colonias.

25

Como se utiliza en la presente memoria, el término “colonia” o “colonias” describe un grupo restringido de células, normalmente derivado de una única célula o un pequeño grupo de células, que crecen en un medio sólido o semi-sólido. Las colonias se pueden formar a partir de cualquier tipo de célula que pueda hacerse que exprese proteínas recombinantes y que pueda crecer sobre medios sólidos y semi-sólidos. Por ejemplo, las colonias pueden estar formadas de células procariotas por ejemplo bacterias, o eucariotas por ejemplo levaduras, eucariotas unicelulares tales como *Leishmania*, células de insecto o células de mamífero o líneas celulares. Preferentemente las colonias están formadas de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*, *Streptomyces lividens*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Picla pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccaromyces pombe*.

30

Los medios sólidos o semi-sólidos utilizados para cultivar colonias consisten típicamente en medios de cultivo con la adición de 0,1% o más de agar. Más preferentemente, los medios sólidos o semi-sólidos contienen por lo menos 0,2%, por ejemplo por lo menos 1% o por lo menos 1,5% de agar. Las “colonias” no abarcan células cultivadas en cultivo líquido.

35

La etapa de lisis de la presente invención se puede llevar a cabo químicamente o de otra manera utilizando reactivos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo urea, tampones o detergentes que contienen lisozima. El grado de lisis deber ser suficiente para permitir que las proteínas de la célula pasen libremente fuera de la célula. Típicamente, cuando se trata con proteínas de unión a membrana, la lisis se lleva a cabo en presencia de detergentes o sustancias anfífilas, por ejemplo Triton X-100 o dodecilmaltósido, para liberar la proteína de la membrana. La etapa de lisis es no desnaturalizante, permitiendo a las proteínas retener una conformación nativa, es decir conformación correctamente plegada, o conformación similar a la nativa, esto se refiere en la presente memoria como “lisis natural”. La etapa de lisis se puede llevar alternativamente a cabo mediante congelación descongelación de las colonias. Más preferentemente, la lisis se lleva a cabo utilizando tanto el tampón de lisis natural como la congelación descongelación de las colonias. Preferentemente, el tampón de lisis natural contiene lisozima, por ejemplo a 50-750  $\mu\text{g/ml}$ , más preferentemente a 100-200  $\mu\text{g/ml}$ . La ADNasa (desoxirribonucleasa) también se puede encontrar en el tampón de lisis natural preferentemente a 250-750  $\mu\text{g/ml}$ . El tampón de lisis natural puede contener, por ejemplo Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, lisozima (200  $\mu\text{g/ml}$ ) y ADNasa I (750  $\mu\text{g/ml}$ ).

50

Típicamente, las colonias se expondrán a la mezcla (tampón) de lisis durante 15-60 minutos, preferentemente alrededor de 30 minutos. La etapa de congelación descongelación preferentemente se repite, es decir se llevan a cabo dos o más ciclos, preferentemente 3 o más ciclos de congelación descongelación. En una realización preferida la lisis se consigue mediante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de lisis y tres x 10 minutos de congelación descongelación.

55

Típicamente, el porcentaje de células lisadas en una colonia durante la etapa de lisis es 5-50%. Las colonias que se van a lisar contienen preferentemente por lo menos  $10^4$  células por ejemplo por lo menos  $10^5$ , por lo menos  $10^6$ , por lo menos  $10^7$  o por lo menos  $10^8$  células. El tamaño de tales colonias es típicamente 0,1-3  $\text{mm}^2$ , preferentemente 0,2-2  $\text{mm}^2$  y más preferentemente 0,25-1  $\text{mm}^2$ . Sin embargo, se apreciará que el presente método se podría utilizar para cribar un amplio intervalo de tamaños de colonias.

60

Una proteína “seudo-natural” o una proteína “natural” se refiere a una proteína soluble intracelular, extracelular o de membrana en la que la proteína exhibe una conformación pseudo-nativa y funciones similares o idénticas a la proteína que se da de manera natural. Las proteínas “naturales” o “seudo-naturales” se expresan en forma soluble y/o están correctamente plegadas. Las proteínas de membrana pseudo-naturales no tienen que estar presentes libres en disolución, pero pueden estar presentes en vesículas de membrana más que en cuerpos de inclusión. Así, las proteínas “seudo-naturales” no son generalmente insolubles, no están presentes en cuerpos de inclusión, no están agregadas o

65

## ES 2 331 311 T3

mal plegadas. De acuerdo con los métodos de la presente invención, son las proteínas solubles que son capaces de pasar a través del filtro y así separarse de las proteínas insolubles. Como se describe en la presente memoria, esto permite la identificación de colonias que expresan proteínas solubles, por ejemplo por el uso de técnicas de transferencia. La correlación entre la solubilidad y el plegamiento correcto, es decir nativo o pseudo-nativo, significa que el método es capaz de separar proteínas con su conformación nativa de proteínas mal plegadas/agregadas.

Así, se puede definir una proteína “soluble” con referencia a la posesión de una conformación nativa o pseudo-nativa. Además, se puede describir una proteína soluble como una proteína que permanece en el sobrenadante después de la lisis celular y centrifugación de la misma. La centrifugación se puede llevar a cabo a por lo menos 1000 g, preferentemente a por lo menos 3000 g, preferentemente a por lo menos 10000 g y más preferentemente a alrededor de 20000 g. La centrifugación puede llevarse a cabo a 100000 g. La duración de la centrifugación puede ser desde 1 minuto (típicamente por lo menos 10 minutos) a por lo menos 1 hora, donde la duración requerida generalmente disminuye según aumenta la fuerza centrífuga. Las condiciones particularmente adecuadas para proporcionar solamente proteínas solubles en el sobrenadante resultante incluyen 10 minutos a 100000 g, 30 minutos a 3000 g o 15 minutos a 20000 g. Siendo especialmente adecuados 15 minutos a 20000 g según se describe en los Ejemplos.

Algunas proteínas que pasan a través del filtro no corresponderán exactamente a ninguna proteína que se da de manera natural. Por ejemplo se puede generar una proteínoteca basada en una proteína objetivo para identificar mutantes relacionados con mejor solubilidad en un sistema de expresión dado comparada con una proteína problemática tomada como objetivo. En estas circunstancias es apropiado considerar que los mutantes solubles tienen una conformación “pseudo-nativa”.

La etapa de filtración de la invención se puede llevar a cabo utilizando membranas de filtro estándar para la filtración de muestras biológicas. Los filtros tendrán típicamente un tamaño de poro de 0,015  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 0,35 a 1,2  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 0,45 a 1,2  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 0,45 a 0,8  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, los filtros tienen tamaños de poro por debajo de 4,0  $\mu\text{m}$ , típicamente por debajo de 2,0  $\mu\text{m}$ , más preferentemente por debajo de 1,0  $\mu\text{m}$ . Para varios tipos de células, en particular bacterias por ejemplo *E. coli*, un tamaño de poro óptimo puede ser 0,1-1,5  $\mu\text{m}$ . Para células eucariotas, los tamaños de poro preferidos pueden ser mayores. Se apreciará que los filtros se fabrican y comercializan tienen un tamaño de poro particular pero el proceso de fabricación puede ocasionalmente dar como resultado unos poros un poco más pequeños o más grandes; los tamaños mencionados, que se refieren al diámetro, son así los tamaños de poro más comunes de un filtro dado. Aunque se hace referencia a un intervalo de tamaños de poro potenciales, cualquier filtro individual tendrá normalmente un tamaño de poro designado, por ejemplo 0,45  $\mu\text{m}$ . Los filtros adecuados son polypro Super y GH (de Pall) y Nucleopore (de Whatman).

Se apreciará que tipos diferentes de células pueden requerir el uso de filtros con tamaños de poro diferentes, debido por ejemplo a sus diferentes tendencias a albergar proteínas agregadas, agregados que también pueden tener propiedades variables en tipos de células diferentes. La selección de un filtro adecuado está dentro de la competencia de un experto en este campo. Por ejemplo, es posible seleccionar un tamaño de poro adecuado utilizando un conjunto de proteínas de prueba para el tipo celular deseado e investigando su comportamiento con filtros de diversos tamaños de poro. A continuación, tales datos se deben comparar con los datos de centrifugación como se muestra en el Ejemplo 1.

Preferentemente el filtro se superpone sobre las colonias para levantar las colonias/proteínas de los medios de cultivo sólidos o semi-sólidos (Figura 1). Alternativamente, los filtros se podrían poner sobre los medios de cultivo y sembrar las células directamente sobre el filtro, a continuación el filtro podría simplemente despegarse con las colonias ya sobre él. Preferentemente, el levantamiento de las colonias desde su medio de cultivo se puede llevar a cabo antes de la etapa de lisis. Por lo tanto la lisis se puede llevar a cabo directamente sobre las colonias sobre un filtro. El filtro con las colonias pegadas se puede tratar con el tampón de lisis (Figura 2) o superponer sobre otras membranas/filtros tratados con el tampón de lisis.

La filtración se lleva a cabo después de la lisis, es decir es el lisado el que es filtrado. Se apreciara sin embargo que la filtración y lisis pueden tener lugar simultáneamente a la hora de considerar a toda una colonia ya que algunas células pueden sufrir lisis antes que otras y por lo tanto pueden filtrarse antes o al mismo tiempo que se lisan otras. Preferentemente, las proteínas que pasan a través del filtro se sujetan sobre un soporte sólido, por ejemplo una membrana de captura, para permitir la criba/detección de cualquier proteína de interés y a continuación permitir la identificación de las colonias que expresan tales proteínas. Tales membranas de captura típicamente pueden contener nitrocelulosa. Preferentemente, la detección de la proteína objetivo no es sobre la base de su propia actividad enzimática. Sin embargo la detección puede tener lugar sobre la base de la actividad enzimática de una etiqueta fusionada a la proteína objetivo o cuando la etiqueta actúa como sustrato en un método de detección enzimático. Se apreciará sin embargo que el primer filtro que separa proteínas solubles de insolubles actúa como la criba esencial para esta invención. En una realización preferida, a las proteínas simplemente se las deja pasar a través del filtro, posiblemente como resultado de una acción capilar activa. En otra realización, se puede aplicar fuerza para ayudar a la filtración. La fuerza se puede aplicar verticalmente sobre el papel de filtro, en la que tales fuerzas pueden incluir la aplicación de presión o vacío.

La membrana de captura puede fijar las proteínas solubles de las colonias individuales y sus posiciones sobre la membrana de captura se pueden comparar a continuación con el filtro que lleva las colonias originales. Así, a partir de la mancha de transferencia de filtración de colonias, es posible rastrear e identificar las colonias originales que expresan las proteínas solubles de interés sobre el medio de cultivo. Para ayudar en el proceso de identificar clones que expresan proteínas solubles, se pueden utilizar controles positivos. Estas se ven claramente en las manchas de transferencia de

## ES 2 331 311 T3

filtración de colonias finales y pueden permitir que la membrana/mancha de transferencia sea correctamente orientada con las colonias originales (Figuras 7 y 8). Por lo tanto después de la etapa de cribado, un soporte sólido tal como una membrana de captura permite la fácil identificación de las colonias que expresan las proteínas solubles de interés.

5 En otra realización, el filtro con las colonias pegadas se puede poner con el lado de las colonias hacia abajo sobre un material empapado en tampón de lisis. A continuación se puede colocar una membrana de captura (nitrocelulosa) sobre la parte de arriba del filtro con colonias y encima de esta se pueden colocar varias capas de papel de filtro (y toallitas de papel) (Figura 3a). A continuación se puede aplicar fuerza a la parte de arriba de este “sándwich” e idealmente transferir el tampón vertido alrededor de la parte de abajo para facilitar la filtración y la transferencia de  
10 proteínas a la membrana de captura.

En otra realización el filtro se pone con el lado de las colonias hacia arriba sobre una membrana de captura y se aplica vacío para “tirar” de la proteína a través del papel de filtro y sobre la membrana de captura (Figura 3b).

15 En la práctica, la lisis y filtración pueden tener lugar convenientemente en una etapa global, por ejemplo durante la aplicación de condiciones capaces de causar lisis (por ejemplo 3 periodos de congelación descongelación), el lisado celular se filtra y captura sobre una membrana de captura.

Se describe un método de separar proteínas solubles de insolubles, método que comprende:

- 20 (a) someter a una o más colonias de células a condiciones que son capaces de causar la lisis de las mismas;
- (b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que solamente permiten pasar proteínas solubles a través del filtro, generando así un filtrado que contiene proteínas solubles. De acuerdo con este  
25 método, la mayoría o todas las proteínas insolubles fracasarán al pasar a través del filtro y por lo tanto tiene lugar la separación de proteínas solubles de las insolubles. Se apreciara por lo tanto que el filtro a través del cual las proteínas solubles y las colonias a partir de las cuales se producen.

De particular interés es un método de separar proteínas originadas por membranas solubles de insolubles.

30 Los métodos descritos también pueden incluir la detección de una proteína de interés después de la filtración. Las proteínas de interés se pueden detectar utilizando diversas etiquetas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo etiqueta de histidina, etiqueta VS, etiqueta T7, etiqueta FLAG o cualquier secuencia de proteína corta para la que está disponible un anticuerpo específico, glutatión-S-transferasa, tiorredoxina, proteína verde fluorescente y proteína unida a maltosa. Las etiquetas son preferentemente de entre 1-100 aminoácidos de longitud, preferentemente entre 1-70, 2-50, 1-30, o 1-20 aminoácidos de longitud. Más preferentemente las etiquetas pueden ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud, por ejemplo las etiquetas de His son generalmente de 6 aminoácidos de longitud.

40 Las etiquetas se pueden unir a una proteína de interés generalmente mediante la expresión de tales proteínas como proteínas de fusión. Como tales, se prefieren las etiquetas cortas, para permitir a las proteínas de interés mantener una conformación pseudo-nativa. Además, se prefieren las etiquetas del extremo terminal C, aunque también se usan etiquetas de His del extremo terminal N. Las proteínas de interés también se pueden detectar utilizando anticuerpos, monoclonales o policlonales, dirigidos a una etiqueta o directamente a la proteína de interés (expresada como tal o como una fusión).

45 Las proteínas también se pueden detectar si se exhibe una actividad enzimática, por ejemplo las etiquetas de fusión que poseen actividad enzimática incluyen proteína verde fluorescente, peroxidasa de rábano picante y glutatión-S-transferasa. Además las proteínas se pueden vía etiquetas de fusión que actúan como el sustrato en métodos de detección enzimáticos. Preferentemente las proteínas objetivo no se detectan sobre la base de su propia actividad enzimática.  
50 Si lasa diferentes colonias son, cada una, representativas de una variante particular de una proteínoteca generada, las proteínas de interés típicamente serán los miembros solubles de la proteínoteca. Por lo tanto, convenientemente los miembros de la proteínoteca se expresarán como fusiones con una etiqueta pequeña para ayudar a la detección o se pueden utilizar anticuerpos de los miembros de la proteínoteca.

55 Los filtrados de proteínas solubles se pueden utilizar además en ensayos para probar la actividad bioquímica de la proteína de interés. En una realización, en el filtrado simultáneamente se puede buscar sistemáticamente la presencia/cantidad de una proteína soluble de interés (por ejemplo usando una etiqueta y un anticuerpo dirigido a ella) y la actividad de esa proteína usando el ensayo adecuado. Si se realiza tal ensayo será (preferentemente) además de un método de detección de variantes solubles, por ejemplo un método basado en la unión por afinidad.

60 Tras la identificación de una colonia positiva (es decir una que expresa una proteína objetivo en forma soluble), tales colonias se pueden cultivar y aislar la proteína soluble o total para transferencia Western si se requiere la confirmación de los resultados de la criba. Tales clones se pueden utilizar para la sobreexpresión de la proteína de interés para muchos propósitos diferentes, por ejemplo estudios estructurales para elucidar la secuencia de la proteína.

65 Los métodos descritos son de utilidad en la separación de proteínas solubles e insolubles y para la detección de colonias que producen proteínas solubles. Las proteínas solubles a menudo se pueden expresar en cantidades más grandes y se pueden utilizar en técnicas tales como RMN/cristalografía de rayos X para la genómica estructural. Los

## ES 2 331 311 T3

métodos descritos también se pueden utilizar para cribar genotecas de ADNc para clones particulares que expresan proteínas solubles. Se pueden cribar las variantes solubles de una proteína particular para, por ejemplo, una proteína de membrana.

5 Los métodos descritos también se pueden utilizar para cribar colecciones de vectores y colecciones compuestas de diferentes cepas o bacterias de expresión. Muchos vectores de expresión estándar proporcionan poca expresión de proteína debido a la variación de la secuencia en las regiones promotoras, sitios de iniciación de la traducción y proteínas indicadoras. Se puede seleccionar la secuencia más eficaz para la expresión de la proteína soluble aleatorizando estas regiones y variando las proteínas indicadoras.

10 Un ejemplo de aleatorización de estas regiones se muestra en un estudio reciente en el que se demostró que los sitios de iniciación de la traducción en vectores pueden variar drásticamente dependiendo del contexto de la secuencia (Zhelyabovskaya *et al.* Nucleic acid research. 2004). Estudios de diferentes proteínas de fusión del extremo terminal N han mostrado una gran variación en los niveles de expresión de proteína y la solubilidad. Se piensa que la región  
15 entre el codón de iniciación (ATG) y el gen clonado de interés es importante para el nivel de expresión de proteína soluble.

Otra manera de aumentar el nivel de expresión de proteína soluble es variar las cepas de expresión. Hay varias cepas de expresión comerciales, que se pueden mezclar y seleccionar la cepa o bacteria más eficaz con el método de transferencia de filtración de colonias (CoFi-blot). Incluso en 1943 se sabía que tenían lugar aleatoriamente mutaciones espontáneas en un cultivo bacteriano en crecimiento exponencial. Era evidente que los mutantes en los cultivos en crecimiento surgían independientemente de los agentes ambientales, en lugar de ser generados por cualquier agente. Al expresar las proteínas objetivos se puede ver una variación en los niveles de expresión y la solubilidad entre bacterias y se piensa que alguna de las diferencias puede ser resultado de diferencias en el genotipo de la bacteria.  
25 Para aumentar la tasa de mutación genómica y tratar así de mejorar la expresión y solubilización se pueden tratar incluso más cepas de expresión con agentes mutágenos y seleccionar proteínas solubles de alta expresión utilizando la técnica de transferencia de filtración de colonias.

La filtración se lleva a cabo de manera tal que la mayoría de proteínas que pasan a través del filtro, en particular la  
30 mayoría de una proteína o proteínas objetivo que pasan a través del filtro, están en forma soluble. Por lo tanto el filtro actúa como la criba de detección para esta invención, permitiendo identificar las colonias que expresan las proteínas solubles tomadas como objetivo.

Se pueden mutar genes/ADNc/regiones de codificación que codifican una proteína de interés para producir variantes de esa proteína con diferentes grados de solubilidad. Estos mutantes se pueden producir en un sistema de expresión, en el que las variantes más solubles se pueden seleccionar utilizando las etapas de lisis y filtración de los presentes métodos llevados a cabo sobre colonias transformadas. Los genes/ADNc/regiones de codificación se pueden transformar o transfectar dentro de sistemas de expresión en vectores/constructos, tales como plásmidos, vectores virales, cósmidos y YACs (siglas en inglés de cromosomas artificiales de levaduras). Tales vectores pueden contener secuencias reguladores y otros elementos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen/ADNc/región de codificación se puede  
40 poner bajo el control de un promotor en un vector. Los promotores utilizados son generalmente capaces de expresar la proteína de interés en un anfitrión particular. En una realización específica, el promotor utilizado es inducible es decir se puede controlar la expresión de la proteína de interés. Tales promotores/sistemas inducibles incluyen lac, en el que la inducción de la expresión se controla mediante la adición de IPTG, y tet on/off, en el que la inducción de la  
45 expresión se controla por la presencia/ausencia de tetraciclina, y otros son conocidos en el campo.

Se conocen muchos métodos diferentes de mutagénesis en la técnica que se pueden emplear para crear una protei-  
noteca de variantes de una proteína de interés. Los procedimientos posibles incluyen truncamiento de la secuencia, uso  
50 de una enzima exonucleasa, introducción de un casete aleatorizado o mutagénesis dirigida. Para el truncamiento, el número de nucleótidos eliminados puede ser menor de 2000, preferentemente menor de 1000, y más preferentemente menor de 800. La introducción de un casete aleatorizado para la mutagénesis preferentemente utiliza un casete que contiene menos de 100 nucleótidos.

La mutagénesis se lleva a cabo preferentemente en varias copias de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica  
55 una proteína de interés de manera que se pueda cribar un conjunto diferente de secuencias mutadas, aumentando por lo tanto la probabilidad de identificar una proteína pseudo-natural con mejor solubilidad. Se prefiere preferentemente el uso de mutagénesis al azar en la que no hay ningún conocimiento previo de que mutaciones particulares pueden rendir una variante soluble.

60 Las proteínotecas se pueden crear donde la región de codificación se ha mutado aleatoriamente y donde se han generado constructos de diversa longitud mediante reacciones de borrado de una base o reacciones de cebado aleatorio.

Además, los vectores se pueden mutar aleatoriamente (o colecciones de vectores), preferentemente en la región del promotor, etiquetas del extremo N o C o en el origen de replicación y los anfitriones se pueden mutar aleatoriamente,  
65 por ejemplo mediante desactivaciones génicas al azar o a partir de colecciones preseleccionadas de cepas. Los métodos de la invención se pueden utilizar, por lo tanto, para cribar directamente la expresión de proteína soluble a partir de un número limitado de genes (transfiriendo células con solo genes clonados) o para cribar un gran número de genes por ejemplo a partir de genotecas de expresión de ADNc.

## ES 2 331 311 T3

Se puede desarrollar un kit para su uso en los métodos descritos más arriba que comprende:

- (a) un filtro que tiene tamaños de poro que solamente permiten pasar proteínas solubles a través del filtro;
- (b) una membrana de captura; y opcionalmente
- (c) reactivos para su uso en la lisis natural de las colonias de células.

Como se ha discutido más arriba, (b) es preferentemente una membrana de nitrocelulosa y (c) preferentemente incluye uno o más componentes de un tampón de lisis natural según se describe en la presente memoria. Los filtros y membranas de captura adecuados también se discuten en la presente memoria. Opcionalmente el kit también contiene (d) medios de detección, por ejemplo socios de unión por afinidad, para la proteína objetivo de interés. Tales kits se pueden utilizar para detectar colonias que expresan una variante soluble de una proteína de membrana.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes en los que:

La Figura 1 muestra un método de despegar/levantar colonias del medio de cultivo sólido/semi-sólido utilizando un filtro;

La Figura 2 describe un procedimiento para obtener la lisis de colonias, en el que el filtro con las colonias se pone con el lado de las colonias hacia arriba sobre nitrocelulosa y el filtro se empapa en tampón de lisis natural; después de la lisis de las colonias, las proteínas solubles pueden pasar a través del filtro a la membrana;

La Figura 3a muestra una realización de la invención en la que se emplea el método "sándwich". Un filtro con las colonias se pone con el lado de las colonias hacia abajo sobre filtros empapados en tampón de lisis. Encima de esto se pone nitrocelulosa y encima de esta papel de filtro y toallitas de papel. A continuación se aplica una fuerza;

La Figura 3b muestra otra realización de la invención en la que un filtro con colonias se pone con el lado de las colonias hacia arriba sobre una membrana de nitrocelulosa en una columna con tampón. A continuación se aplica vacío para ayudar a la filtración;

La Figura 4a muestra una transferencia de filtración de colonias para la proteína total para todos los 48 constructos diferentes utilizados para cribar las proteínas solubles de 24 proteínas de *E. coli*;

La Figura 4b (i) muestra una transferencia de filtración de colonias de los 48 constructos (24 proteínas de *E. coli* diferentes con una etiqueta de His del extremo N o una etiqueta FLAG), en la que se pueden ver las colonias positivas (por lo tanto solubles); (ii) muestra una tabla que describe los niveles de expresión de cada proteína en la transferencia de colonias, donde estos niveles se compararon con los valores de la transferencia de centrifugación (se predijo 71% en la categoría correcta y solamente 8% fueron falsos positivos o falsos negativos);

La Figura 4c (i) muestra una transferencia en mancha para los mismos 48 constructos, en la que se han aislado por centrifugación las fracciones de proteínas solubles; (ii) muestra una tabla que describe los niveles de expresión de cada proteína en la transferencia de centrifugación.

La Figura 5 muestra los resultados de una transferencia en mancha en comparación con el número de clones etiquetados GST positivos obtenidos cuando se utiliza tampón de lisis natural o desnaturalizante;

La Figura 6 muestra una presentación esquemática del proceso de Borrar-Una-Base; el plásmido se lineariza mediante digestión con endonucleasa en dos únicos sitios de restricción introducidos en el cebador de clonación (2); las enzimas se eligen de manera tal que uno deja a 3' sobresaliendo protegido de la digestión ExoIII y una deja 5' que es susceptible a la digestión; se retiran muestras procedentes de la digestión ExoIII a intervalos de tiempo (3) y se añaden a tubos que contienen Nucleasa S1, que quita el resto de las colas monocatenarias (4); el plásmido se religa (5) y se transforma en una cepa clonada de *E. coli* (6, 7); a continuación se recupera la colección a partir de la cepa clonada y se transforma en una cepa de expresión y se criba para expresión soluble;

La Figura 7a muestra ejemplos de cuatro transferencias de filtración de colonias diferentes; dos transferencias que son de la colección RORa y dos de la colección SOCS-2; en las fotos se indican los puntos de tiempo en los que se retiraron las alícuotas; los puntos de tiempo más tardíos no contienen ninguna o muy pocas colonias juzgadas como positivas; esto es debido al hecho de que los constructos en estos puntos de tiempo corresponden a proteínas que tienen su inicio dentro de un dominio;

La Figura 7b muestra RORA 5-8 minutos en más detalle, donde se localizan los controles positivos y algunos ejemplos de colonias juzgadas como positivas/solubles;

La Figura 8 muestra controles positivos que se añaden a una colección en placa; los controles positivos formarán colonias positivas y pueden servir como puntos de referencia para ayudar a identificar otras colonias positivas que expresan la proteína soluble;

## ES 2 331 311 T3

La Figura 9 muestra la transferencia Western de las fracciones de proteína solubles de los 24 clones diferentes tomados de una criba de colonias por filtración de la colección RORa; las células se cultivaron en cultivos líquidos y se lisaron utilizando congelación-descongelación; el material insoluble se sedimentó usando centrifugación a 20000 g durante 15 minutos; + indica que el clon se juzgó como soluble a partir de la criba; - indica que el clon se juzgó como insoluble a partir de la criba;

La Figura 10 muestra la transferencia Western de ocho clones identificados como solubles a partir de la criba por filtración de colonias de una colección SOCS-2; las células se cultivaron en cultivo líquido y se lisaron utilizando congelación-descongelación y el material insoluble se sedimentó utilizando centrifugación a 20000 g durante 15 minutos; todos los ocho clones muestran expresión de proteína soluble;

La Figura 11 muestra una presentación esquemática de la organización del dominio de la proteína de RORa y SOCS-2; los círculos verdes muestran la posición de inicio de los clones identificados como solubles en la criba por filtración de colonias de las colecciones; es interesante que las posiciones de inicio de estos clones están todas localizadas entre las fronteras del dominio.

La Figura 12 muestra la transferencia de filtración de colonias para una proteína de membrana integral de *E. coli* que se predijo que contenía 13 segmentos transmembrana (permeasa de aminoácidos) en a) tampón de lisis natural (como en el Ejemplo 1) b) tampón de lisis desnaturante (+ Urea 8M) c) + Triton X-100 (1%) d) dodecilmaltósido (5 mM).

Las Figuras 13a y 13b muestran las transferencias de filtración de colonias de las colecciones de mutación de dos proteínas (a y b) de membrana diferentes de *E. coli*. Se recogieron las colonias positivas y sus alrededores para posterior análisis.

Las Figuras 14a y 14b muestran las transferencias en mancha hechas de las fracciones solubles de clones cogidos de las transferencias de filtración de colonias de las Figuras 13a y 13b. La proteína natural (WT, por sus siglas en inglés) no mutada se incluyó en las transferencias. Se puede ver un aumento en la expresión de la proteína de membrana comparada con la WT entre varios de los clones de ambas proteínas (a y b).

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Criba para variantes solubles*

Se utilizaron 24 proteínas de *E. coli* en dos vectores de expresión diferentes, etiqueta de His del extremo N o etiqueta FLAG, con características de solubilidad conocidas para probar el procedimiento de transferencia de Filtración de Colonias (CoFi blot). El método utiliza una reacción con anticuerpos para la detección de la proteína soluble, y por lo tanto es aplicable universalmente a cualquier proteína que contenga una etiqueta adecuada, u otro resto polipeptídico de fusión, contra la que se pueda generar anticuerpos.

##### *Materiales y métodos*

**Materiales:** Los productos químicos eran de ICN (Costa Mesa, CA, USA) o Sigma-Aldrich Suecia (Estocolmo, Suecia), si no se indica lo contrario. Los oligonucleótidos para PCR se adquirieron de Invitrogen.

**Clonación de clones recombinantes de *E. coli*:** Los fragmentos de ADN que codificaban las 24 proteínas diferentes de *E. coli* se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. coli* mediante PCR, utilizando cebadores específicos. Los productos de la PCR se clonaron utilizando el sistema Gateway (Invitrogen) en dos vectores de expresión basados en pET que contienen una etiqueta de His del extremo N o una etiqueta FLAG del extremo N. Todos los constructos tienen una etiqueta de His del extremo C utilizada para la detección.

**Expresión a pequeña escala de los clones de prueba:** Para las pruebas de expresión de control, los plásmidos se transformaron recientemente en la cepa B121 (DE3) de *E. coli*, se cogieron colonias individuales y se cultivaron durante toda la noche en medio LB (Difco, Detroit, MI, USA) a 37°C mientras se agitaba a 250 rpm. Para la expresión de prueba, se inoculó 1:10 1 ml de LB con el cultivo de toda la noche y se cultivó a una OD600 de aproximadamente 0,6. Los cultivos se indujeron por adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y se cultivaron durante otras 4 h en un agitador vibrador que funcionaba a 250 rpm a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 2000 g.

**Cultivo en placas de medio LB:** Células recién transformadas a partir de 48 constructos diferentes (24 proteínas diferentes en dos vectores de expresión) se dispusieron en dos placas de LB que contenían antibióticos apropiados a 37°C. Las colonias se transfirieron a una membrana de filtro Durapore con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA, USA) aplicando suavemente la membrana de filtro sobre la parte superior de la placa de LB, poniendo así la membrana de filtro en contacto con las colonias. Por medio de este procedimiento la mayoría de las

## ES 2 331 311 T3

colonias se transfirieron a la superficie de la membrana de filtro. A continuación las membranas de filtro se transfirieron con el lado de las colonias hacia arriba a nuevas placas de LB que contenían IPTG dando como resultado la expresión inducida. Después de 4 horas la membrana de filtro que contenía las colonias se sometió a lisis. El procedimiento descrito se hizo para dos membranas en paralelo, una para ser utilizada para la detección de proteínas solubles y una para ser utilizada para detectar proteína total, es decir la suma de la proteína agregada y la proteína soluble.

*Lisis de las colonias y transferencia a la membrana de detección:* La lisis para proteína total se hizo poniendo una de las membranas de filtro en la parte superior de un “sándwich de lisis y detección” constituido por una membrana de nitrocelulosa Protran BA 45 (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y un papel 3MM (Whatman) empapado en tampón de lisis desnaturante (Urea 8M, Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM). Las colonias se someten a este tratamiento durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la lisis bajo condiciones no desnaturantes la segunda membrana se puso sobre un sándwich similar empapado en tampón de lisis natural que contenía Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, lisozima (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  = 2,35 Unidades/ml) y ADNasa I (750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  = 487,5 Unidades/ml). A continuación el “sándwich de lisis y detección” se congela a  $-80^\circ\text{C}$  durante 10 minutos y se descongela durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Este procedimiento de congelación/descongelación se repite 3 veces.

*Ensayo de solubilidad, transferencias en mancha:* Para los ensayos de solubilidad, los sedimentos celulares procedentes de los cultivos de expresión a pequeña escala se resuspendieron en tampón de lisis que consistía en Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, lisozima (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  = 2,35 Unidades/ml) y ADNasa I (750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  = 487,5 Unidades/ml) y se congeló/descongeló 4 veces. A continuación los lisados se centrifugaron a 20.000 g durante 15 minutos para la separación de la proteína soluble en el sobrenadante de la proteína insoluble (cuerpos de inclusión) que precipita en el sedimento.

Las muestras procedentes de las fracciones solubles se dispusieron en forma de puntos sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania).

*Incubación con anticuerpos y desarrollo de las transferencias de filtración de colonias y de las transferencias en mancha:* Las transferencias de filtración de colonias y las transferencias en mancha se trataron de manera similar después de la transferencia de la proteína a la nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en BSA al 1% en TBST (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, 0,05% de Tween-20) durante 1 hora o durante toda la noche. A continuación las transferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBST. Las membranas se incubaron durante 1 hora con la Sonda de His INDIA (Pierce) diluida 5.000 en TBST. Después las transferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos en TBST. Las membranas se desarrollaron utilizando una disolución quimioluminiscente SuperSignal WEST DURA (Pierce) y las imágenes se capturaron con una cámara de CCD (Biorad). El nivel de expresión se cuantificó utilizando el paquete informático TotalLab (Pharmacia biotech).

### Resultados

#### *Confirmación de la expresión de proteína soluble mediante transferencia de filtración de colonias*

La expresión de proteína total se confirmó para los 48 constructos diferentes (Figura 4a). Cuando la transferencia de filtración de colonias (Figura 4b) se comparó con la transferencia en mancha de las fracciones de proteína soluble después del análisis de centrifugación (Figura 4c) solamente 4 de los 48 constructos fueron falsos positivos o falsos negativos. A partir del paquete informático TotalLab se obtuvieron los valores de la intensidad integrada de las manchas. Utilizando las intensidades, las manchas se categorizaron en 4 categorías diferentes; nivel No, Bajo, Medio o Alto de expresión de proteína soluble. El 72% se predijo en la categoría correcta. El 20% se predijo en la categoría vecina y solamente el 6% en la más distante (Tabla A).

### Ejemplo 2

#### *Construcción y cribado de colecciones de delección*

Para obtener clones de delección, se empleó un procedimiento que se ha descrito anteriormente en los manuales de Protocolos de Biología molecular estándar tales como Ausubel *et al* (Short Protocols in Molecular Biology, 2ª Ed, 1992, ISBN 0- 471-57735-9). En la presente memoria, se utilizó un kit comercialmente disponible de Promega, Madison, WI, EE.UU. (el sistema Erase-a-base<sup>®</sup>) para llevar a cabo esta etapa de reacción.

Para crear la colección, el vector que contiene el gen objetivo se corta con enzimas de restricción justo en frente del gen. Las enzimas de restricción para esto se eligen de manera que produzcan extremos 5' y 3' adecuados. El extremo 3' está protegido del ataque de la Exonucleasa III mientras que el extremo 5' es susceptible a ella. Se añade Exonucleasa III y se retiran pequeñas alícuotas de la reacción cada ciertos puntos de tiempo. Estas alícuotas contienen constructos de longitud variable que se religan y transforman en *E. coli*.

## ES 2 331 311 T3

Dos proteínas diferentes se han sometido a nuestro método de delección acoplado a la transferencia de filtración de colonias.

5 El RORa era hasta hace poco un receptor nuclear huérfano sin ligando conocido. A finales de 2002 se resolvió la estructura del RORa y se demostró que el ligando era el colesterol (Kallen JA *et. al.*). SOCS-2 está implicada en la retroinhibición de la señalización de citocina y hasta la fecha se han demostrado por lo menos tres mecanismos de modulación diferentes, uno que implica las proteínas de unión esperadas a la caja SOCS a la degradación proteosómica.

10

### *Material y Métodos*

Los clones de ADNc se eligieron de la base de datos Mammalian Gene Collection (Colección de Genes de Mamíferos) y se pidió a RZDP Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung.

15

### *Clonación*

20 Los objetivos se amplificaron utilizando la PCR Touch down con un plásmido que contenía el ADNc como plantilla. Los cebadores de PCR se diseñaron de tal manera que los sitios de restricción adecuados se situaron en frente del marco de lectura abierto. Los productos de la PCR se clonaron en un vector de expresión basado en pET utilizando métodos de restricción/ligadura convencionales.

### *Creación de colecciones de delección*

25 Los vectores basados en pET que contenían la secuencia de codificación para las dos proteínas se linearizaron mediante la digestión con endonucleasa en los dos únicos sitios de restricción introducidos en el cebador de clonación. El RORa se digirió con SphI y HindIII y el SOCS-2 con SphI y XhoI, ambas digestiones se hicieron en tampón 2 NEB 30 y a 37°C durante 3 horas.

35 Los digeridos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron (Kit de Purificación de PCR QIAquick, QIAGEN). El Kit Erase-a-Base de Promega se utilizó según las instrucciones del fabricante con las alteraciones siguientes. Las digestiones con Exonucleasa III se hicieron a 27°C para lograr una velocidad de aproximadamente 70 pb/min. Se retiraron 24 alícuotas de la mezcla de digestión con ExoIII, cada minuto para RORa y para SOCS-2 cada 30 segundos. Las 24 muestras se agruparon en seis y se trataron con nucleasa S1. El ADN se precipitó utilizando etanol y acetato amónico. El ADN precipitado se resuspendió en Tris 10 mM pH 8 y se trató con polimerasa de Klenow para hacer romos los extremos. Los plásmidos se religaron y transformaron en una cepa de clonación, DH5a o Top10 sembradas en placas de LB que contenían los antibióticos apropiados. La colección se recuperó a partir 40 de la cepa de clonación haciendo una preparación del plásmido a partir de las colonias en la placa.

### *Cribado para la expresión de proteína soluble*

45 Las colecciones de delección se transformaron en una cepa de expresión BL21 (DE3) y se sembraron en placas que contenían los antibióticos apropiados. También se añadieron controles positivos, constructos que expresan proteínas solubles, a la placa para facilitar la orientación. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. La criba para proteínas soluble se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1 con las siguientes excepciones. La expresión se indujo durante 6 horas a 25°C en lugar de a 37°C y 4 horas. Se tomaron para posterior análisis 12 clones positivos y 50 12 clones negativos para RORa y 14 clones positivos para SOCS-2.

### *Ensayo de solubilidad, transferencias SDS PAGE y Western*

55 Los clones que se recogieron para posterior análisis se caracterizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Con la excepción de que las células se cultivaron durante 6 horas a 25°C después de la inducción de la expresión.

### *Incubación con anticuerpos y desarrollo de las transferencias de colonias y transferencias Western*

60

Las transferencias de colonias y las transferencias western se desarrollaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

### *Resultados*

65

Se hicieron colecciones que cubrían completamente RORa y SOCS-2 y se cribaron para la expresión de proteína soluble utilizando nuestro método de transferencia de colonias solubles. Todos los clones positivos (solubles) se confirmaron como solubles por los métodos convencionales, por ejemplo centrifugación, electroforesis en gel y trans-

## ES 2 331 311 T3

5 ferencias western (Figuras 9 y 10). Los clones juzgados como negativos en la criba, no dieron ninguna banda en la transferencia Western (Figura 9). Es interesante que cuando se compararon los tamaños con la estructura del dominio PFAM todos los clones solubles se situaron entre las fronteras predichas del dominio. El último constructo soluble en la colección RORa aparece muy cerca del inicio del dominio de unión al colesterol que se ve en la estructura cristalina (Figura 11).

### Ejemplo 3

#### 10 *Construcción y Cribado de una Proteínoteca de Proteínas de Membrana*

15 *Clonación de clones recombinantes de E. coli:* Fragmentos de ADN que codificaban 42 proteínas de membrana diferentes de *E. coli* se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. coli* mediante PCR, utilizando cebadores específicos. Los productos de la PCR se clonaron en vectores Gateway mediante recombinación homóloga. Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* C41. Se cogieron las colonias individuales y se cultivaron durante toda la noche en medio LB (Difco, Detroit, MI, USA) a +37°C mientras se agitaba a 200 rpm. Se prepararon existencias de células añadiendo glicerol a alícuotas del cultivo celular a la concentración final de 25%, y se almacenaron a -80°C.

20 *Cultivo en placas de medio LB:* Células procedentes de las existencias congeladas se resuspendieron en LB, se sembraron sobre placas de medio LB que contenían un antibiótico apropiado, y se cultivaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias se transfirieron a membranas de filtro de tipo y origen diferentes (Millipore, Bedford, MA, USA; o Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA), o de diferente tamaño de poro (0,45 a 3 µm) colocando suavemente la membrana de filtro encima de la placa de LB, poniendo por lo tanto la membrana en contacto con las colonias.

25 A continuación la membrana de filtro se transfirió con el lado de las colonias hacia arriba a una nueva placa de LB que contenía IPTG par la expresión inducida a +37°C durante 3 horas.

#### 30 *Lisis de las colonias y transferencia a la membrana de detección*

35 La lisis bajo condiciones naturales y desnaturalizantes se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1, durante 60-90 minutos. La lisis en presencia de detergentes se llevó a cabo de la misma forma que la lisis natural en el Ejemplo 1, excepto que se añadió Triton X-100 (1%) o dodecilmaltósido (5 mM) al tampón de lisis natural. La detección se hizo utilizando un anticuerpo específico para una etiqueta de His del extremo C.

### *Resultados*

40 Las proteínas de membrana procedentes de las colonias que se lisaron en un tampón de lisis natural con detergente presente fueron claramente visibles en las transferencias, mientras que las proteínas procedentes de colonias lisadas sin detergente presente no fueron visibles (Véase la Figura 12). La adición de detergente solubilizó las proteínas de membrana permitiéndolas pasar la membrana de filtración y ser visibles en la transferencia de colonias.

### Ejemplo 4

#### 50 *Mutagénesis aleatoria de proteínas de membrana acoplada con cribado de la expresión utilizando la transferencia de filtración de colonias*

### *Mutagénesis*

55 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un termociclador Gene-amp PCR system 9700. La mutagénesis se llevó a cabo con un kit de mutagénesis aleatoria Stratagen GeneMorph Random Mutagenesis (Stratagen, La Jolla, USA) según el protocolo del fabricante para una frecuencia de mutación de rango medio (3 - 7 mutaciones/kb). Se utilizó el programa de PCR sugerido en el manual del fabricante con una temperatura de desnaturalización de 94°C y una temperatura de renaturalización de 55°C.

#### 60 *Clonación y creación de colecciones*

65 Los productos de la PCR se clonaron en un plásmido de expresión, se transformaron en células ultracompetentes DH5α y se sembraron en placas de LA con tetraciclina (30 µg/ml). Después del cultivo durante toda la noche, las colonias se reunieron usando 9 ml de LB, y el ADN del plásmido se aisló utilizando un kit miniprep según el protocolo del fabricante. Los plásmidos se transformaron en un sistema de expresión C41 y se sembraron en placas de LA con tetraciclina (30 µg/ml).

## ES 2 331 311 T3

### *Criba de la expresión*

El cribado de la expresión de las colecciones se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 3 con las excepciones siguientes: Se utilizó el detergente n-dodecil- $\beta$ -Maltopiranosido (DDM) en lugar de Triton X-100 y la membrana se sondeó utilizando la sonda India HisProbe-HRP (Pierce) según se ha descrito en el Ejemplo 1.

### *Expresión a pequeña escala y estimación de los niveles de expresión por transferencias en mancha*

Los clones de interés se cultivaron en cultivo líquido como se ha descrito en el Ejemplo 1 y las células se lisaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 con la excepción de que se añadió DDM al tampón de lisis. Las transferencias en mancha se desarrollaron como se ha descrito más arriba.

### *Resultados*

La mutagénesis aleatoria se llevó a cabo sobre proteínas de membrana de *E. coli* con un nivel muy bajo de expresión de la proteína. Las proteinotecas que contenían las proteínas mutadas se cribaron utilizando la transferencia de filtración de colonias (Figura 13). Se identificaron los clones que mostraron un aumento en el nivel de proteínas de membrana capaces de ser solubles. El aumento en el nivel de expresión, comparado con el tipo natural (WT), se confirmó por las transferencias en mancha de la proteína de membrana solubilizada (Figura 14).

### Ejemplo 5

#### *Cribar colecciones de vectores*

Para evaluar la aleatorización de la región entre el codón de inicio y el gen de interés, se puede diseñar una colección de vectores que consiste en un segmento aleatorizado de cinco aminoácidos adyacentes al codón de inicio. Esto crea una gran variación del vector e idealmente la región aleatorizada se puede ajustar individualmente a los diferentes objetivos de proteínas. Los nucleótidos aleatorizados después de ATG en el vector de expresión se pueden añadir directamente al vector o se pueden añadir juntos con el gen de interés mediante clonación de un producto de la PCR generado a partir de cebadores aleatorizados. El principio del diseño del cebador para añadir nucleótidos aleatorizados es ATG NNN NNN NNN NNN NNN. La selección de clones solubles de alta expresión se llevará a cabo como se ha descrito con la técnica de transferencia de filtración de colonias (CoFi-blot).

### Ejemplo 6

#### *Mutagénesis genómica al azar de cepas de expresión*

La mutagénesis genómica se llevó a cabo con 2AP (2-aminopurina) sobre Rosetta 2 (DE3) como se describió en el trabajo de Miller (Miller *et al.* 1992. A short course in bacterial genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring harbour laboratory press, Cold Spring Harbour, New York, 1992). La 2-aminopurina (2AP) se utilizó a una concentración de 700  $\mu\text{g/ml}$  - 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Los cultivos se prepararon subcultivando  $10^4$ , a  $10^5$  en 3 ml de LB con o sin 2AP (sin 2AP para la prueba de viabilidad), ambos cultivos se cultivaron durante 12 a 16 generaciones en LB antes de sembrarlos en placas. La mutagénesis se hizo tanto sobre bacterias vacías como sobre bacterias que contenían vectores de expresión con los genes objetivo. Las frecuencias de mutación se determinaron por el método Rifr (revertientes de la Rifampicina) descrito por Miller (Miller *et al.* 1992 arriba) en el que las frecuencias de mutación deben estar de manera óptima en el intervalo de  $10_{-4}$  -  $10_{-3}$ . Las rifampicinas inhiben la ARN polimerasa y por tanto el crecimiento celular. Las frecuencias de mutación se calcularon como la cantidad de revertientes que crecían en placas que contenían Rif comparada con el número de células viables. Las colecciones de cepas de expresión mutantes se cribaron con la técnica de transferencia de filtración de colonias (CoFi-blot) como se ha descrito más arriba.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de identificar una colonia celular que expresa una variante soluble de una proteína objetivo, método que comprende:
- (a) someter dicha colonia celular a condiciones que son capaces de causar la lisis no desnaturizante de la misma;
  - 10 (b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que permiten pasar solamente proteínas solubles a través del filtro; y
  - (c) detectar la proteína objetivo que ha pasado a través del filtro, en el que el objetivo no se detecta sobre la base de su propia actividad enzimática.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la lisis no desnaturizante se lleva a cabo mediante la congelación descongelación de las colonias.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la lisis no desnaturizante se lleva a cabo utilizando un tampón de lisis no desnaturizante.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína objetivo se fusiona a una etiqueta proteica o polipeptídica.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las proteínas solubles en el filtrado se identifican utilizando anticuerpos y/o etiquetas de fusión.
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en el que la etiqueta de fusión es His.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la etiqueta actúa como el sustrato en un método de detección enzimático para detectar la proteína objetivo en la etapa (c) de la reivindicación 1.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa (c) es un método de detección no enzimático.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho filtro tiene un tamaño de poro entre 0,1 y 1,5  $\mu\text{m}$ .
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichas colonias se levantan de su medio de cultivo sobre el filtro utilizado en la etapa (b).
11. El método de la reivindicación 10, en el que dichas colonias se levantan antes de la lisis de la etapa (a).
- 45 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa de filtración (b) incluye la aplicación de una fuerza al filtro que lleva las colonias.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las proteínas en el filtrado procedente de la etapa de filtración (b) se capturan sobre un soporte sólido antes de la etapa de detección (c).
- 50 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha proteína es una proteína de membrana.
15. El método de identificar una colonia celular que expresa una variante soluble de una proteína de membrana, método que comprende:
- 55 (a) someter una o más colonias de células a condiciones que son capaces de causar la lisis no desnaturizante de las mismas;
- (b) filtrar el lisado de la etapa (a) a través de un filtro que tiene poros que permiten pasar solamente proteínas solubles a través del filtro, generando así un filtrado que contienen las proteínas de membrana solubles.
- 60 16. El método de la reivindicación 15, en el que la lisis se lleva a cabo en presencia de detergentes o sustancias anfífilas.
- 65

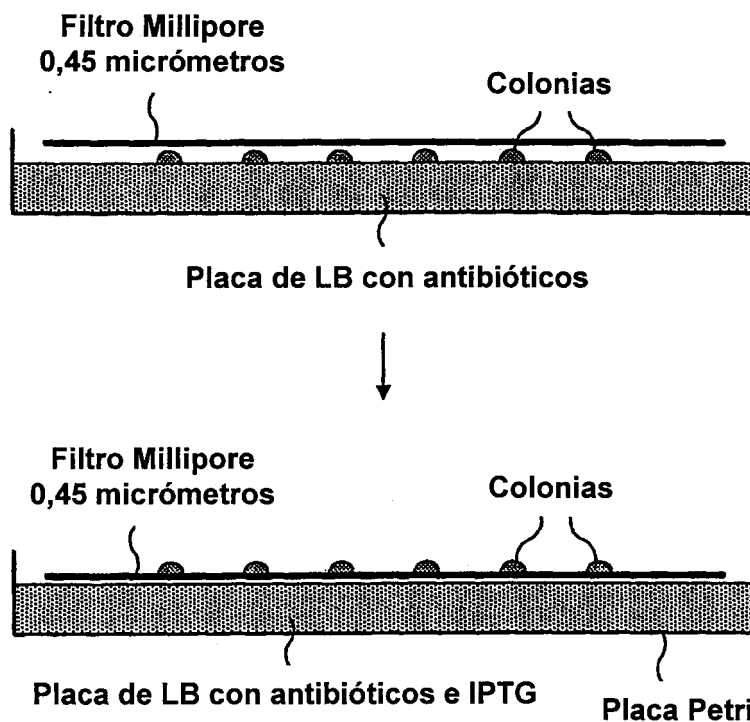


FIG. 1

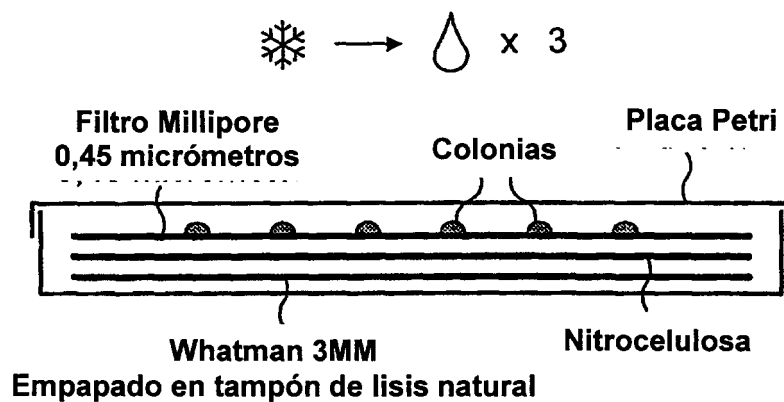


FIG. 2

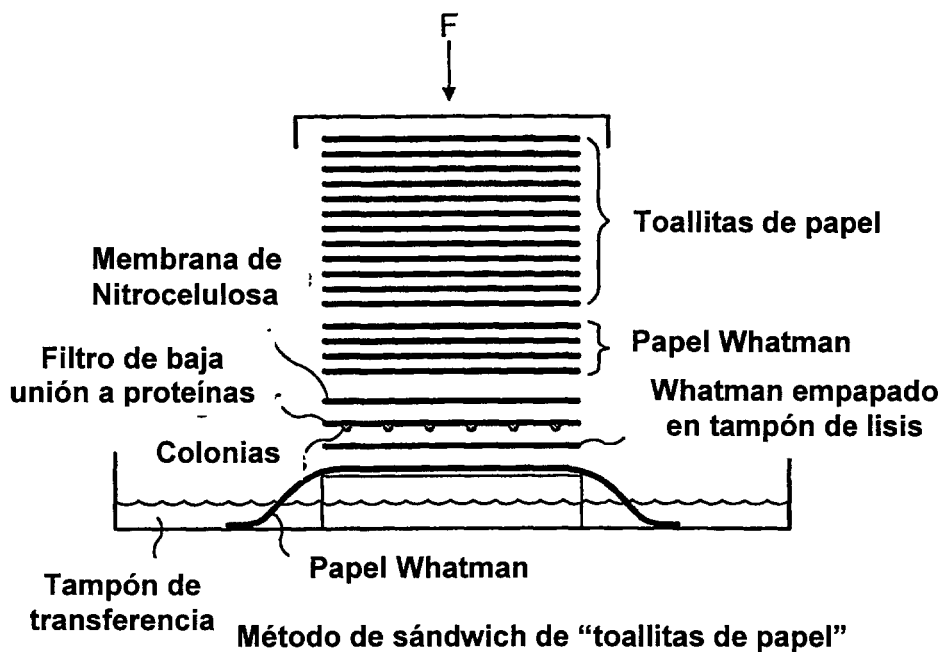


FIG. 3A

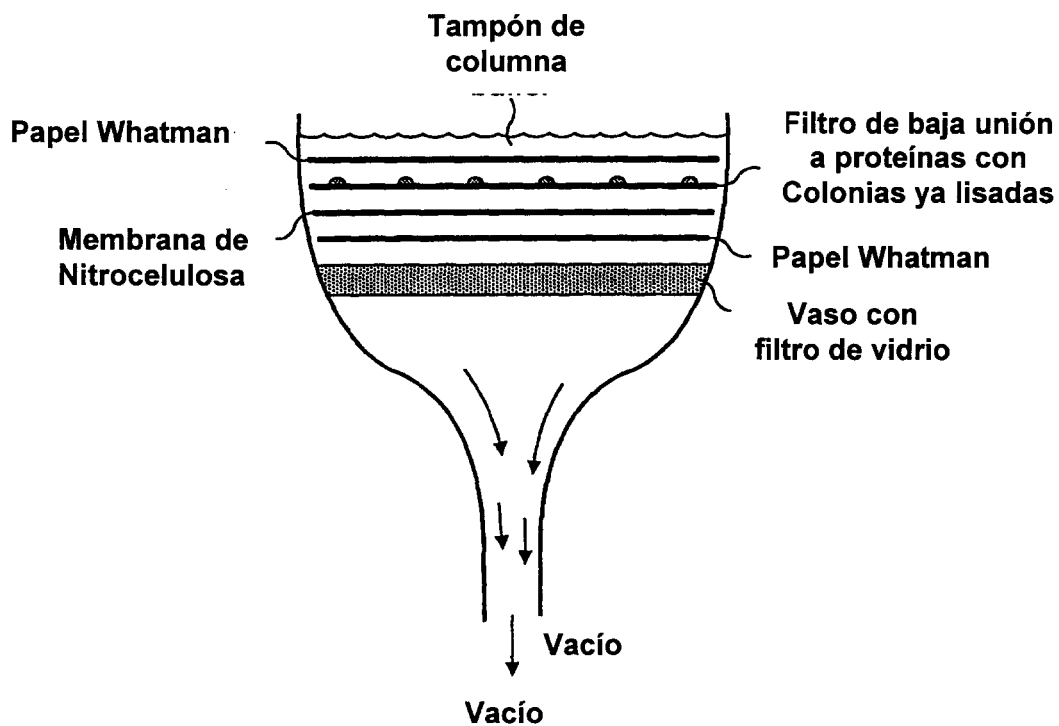


FIG. 3B

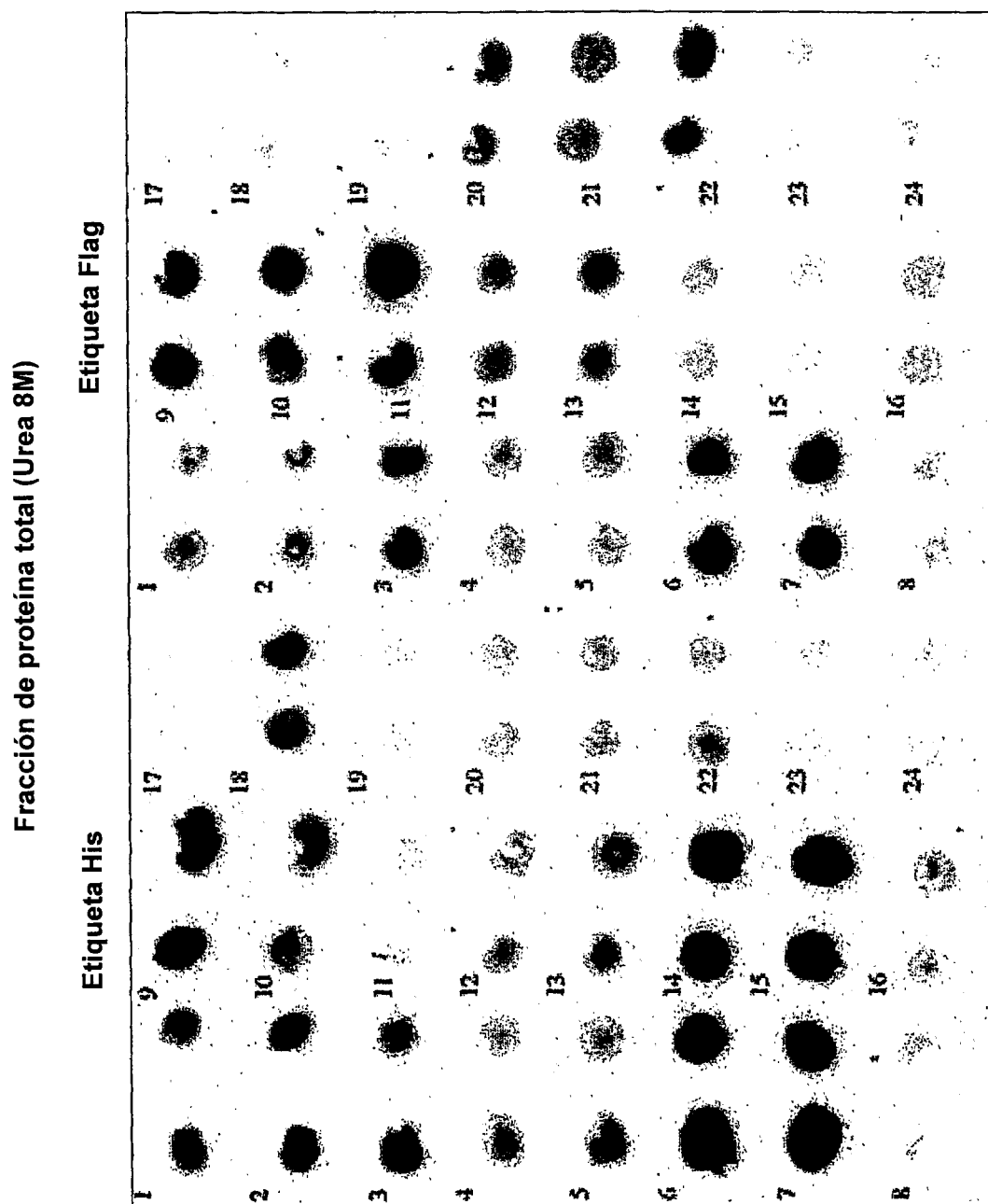


FIG. 4a

Transferencia de filtración de colonias (CoFi-blot)

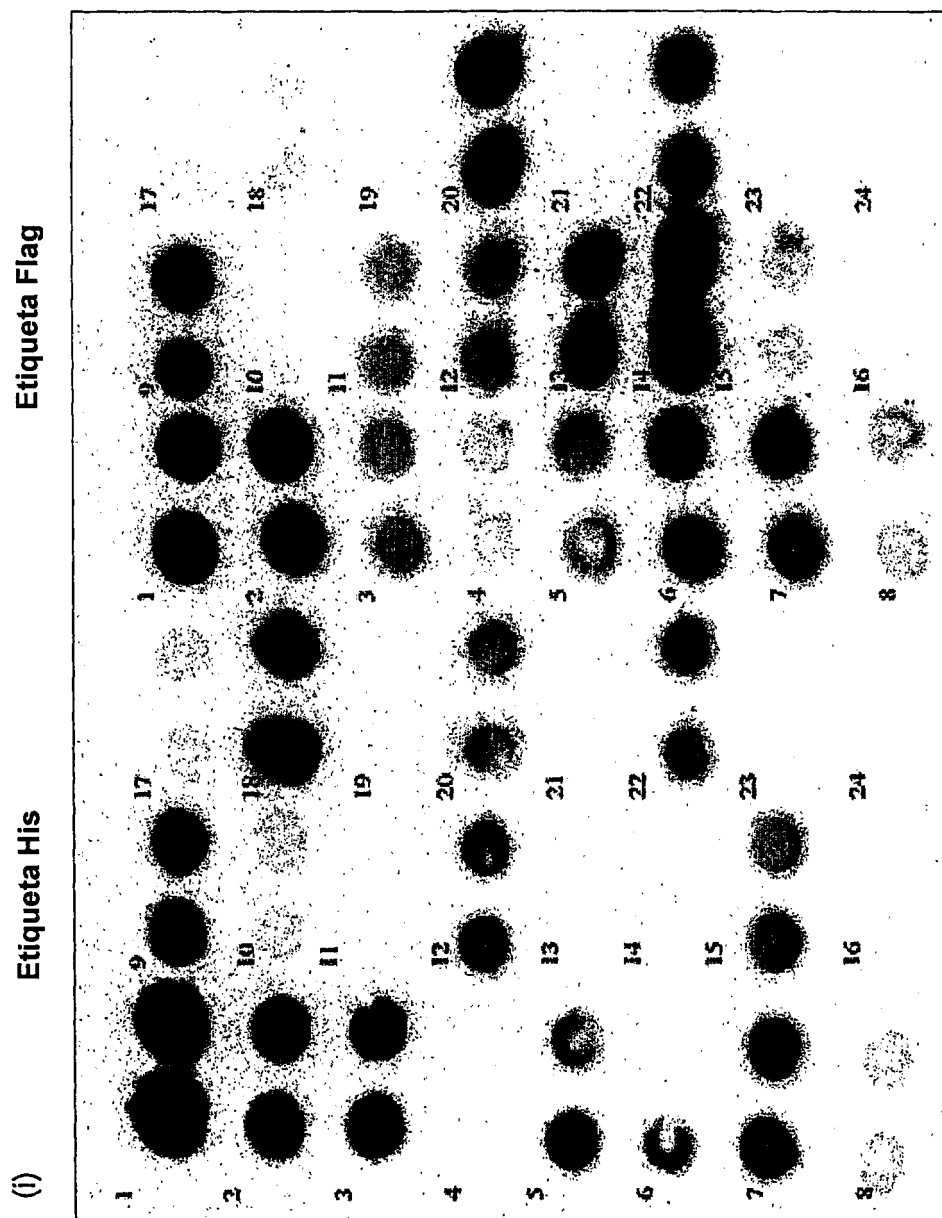
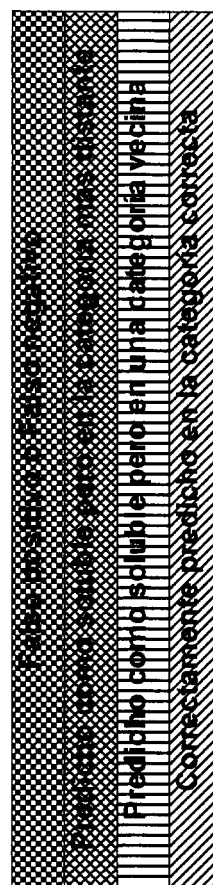


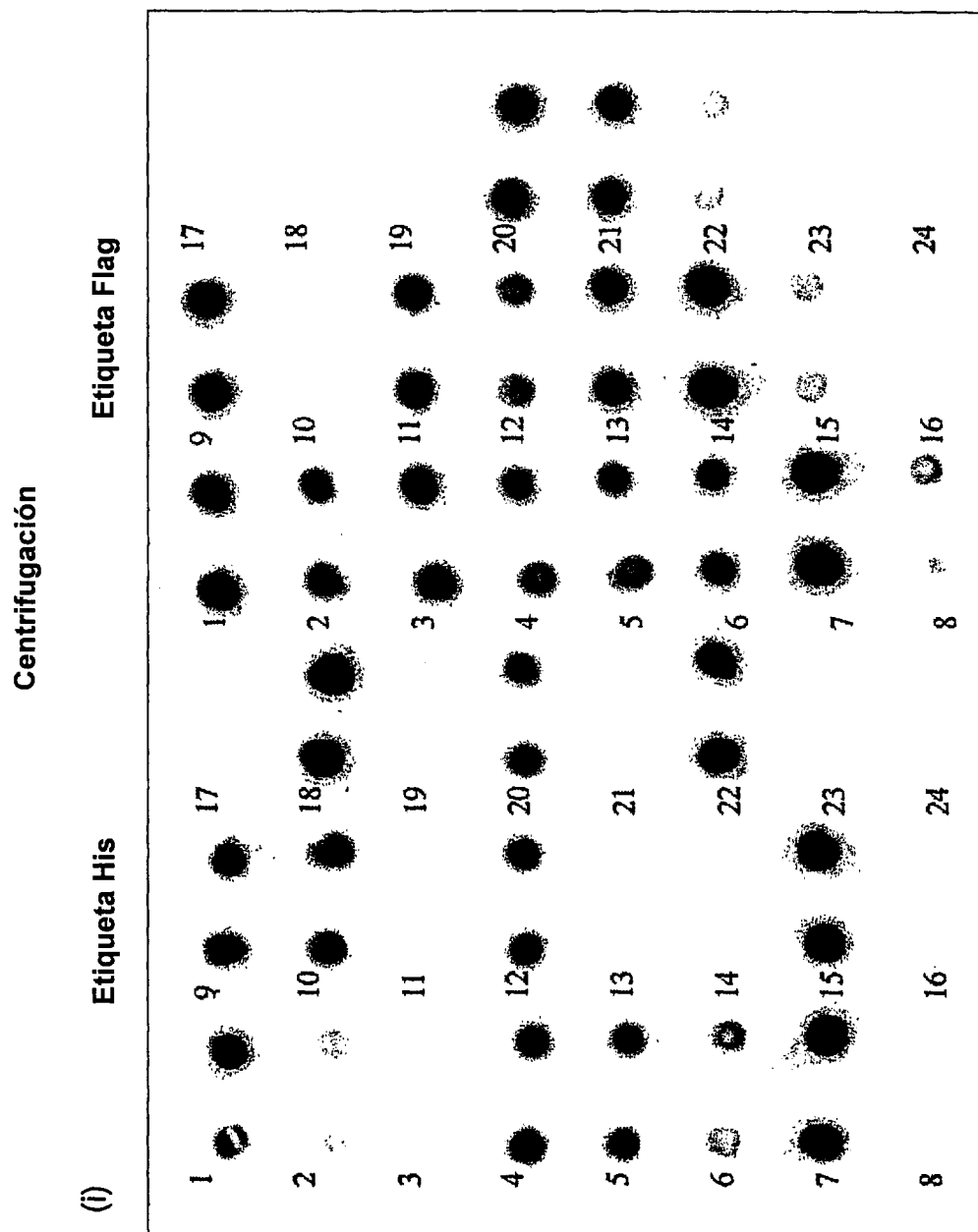
FIG. 4b

(ii)

		CoFi-Blot					
		His			Flag		
A	Alto	Alto	Bajo	Alto	Alto	No	
B	Bajo	Bajo	Alto	Alto	No	No	
C	Alto	No	No	Medio	Medio	No	
D	No	Medio	Medio	Bajo	Medio	Alto	
E	Medio	No	No	Medio	Alto	No	
F	Alto	No	Medio	Alto	Alto	Alto	
G	Bajo	Medio	No	Alto	Bajo	No	
H	Medio	No	No	Bajo	No	No	



**FIG. 4b** CONTINUACIÓN



**FIG. 4C**

(ii)

		Centrifugación							
		His				Flag			
		Alto	Bajo	Alto	No	No	Alto	Alto	No
A		Alto	Bajo	Medio	Alto	No	Alto	Alto	No
B		Bajo	Bajo	Medio	Alto	No	Medio	No	No
C		Bajo	Bajo	No	No	No	Medio	Medio	No
D		Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Bajo	Alto
E		Medio	Medio	No	No	No	Medio	Alto	Alto
F		Bajo	Bajo	No	Alto	Alto	Medio	Alto	Bajo
G		Alto	Alto	Alto	No	No	Alto	Bajo	No
H		No	No	No	No	No	Bajo	No	No

**FIG. 4c** CONTINUACIÓN

48 clones etiquetados con GTS

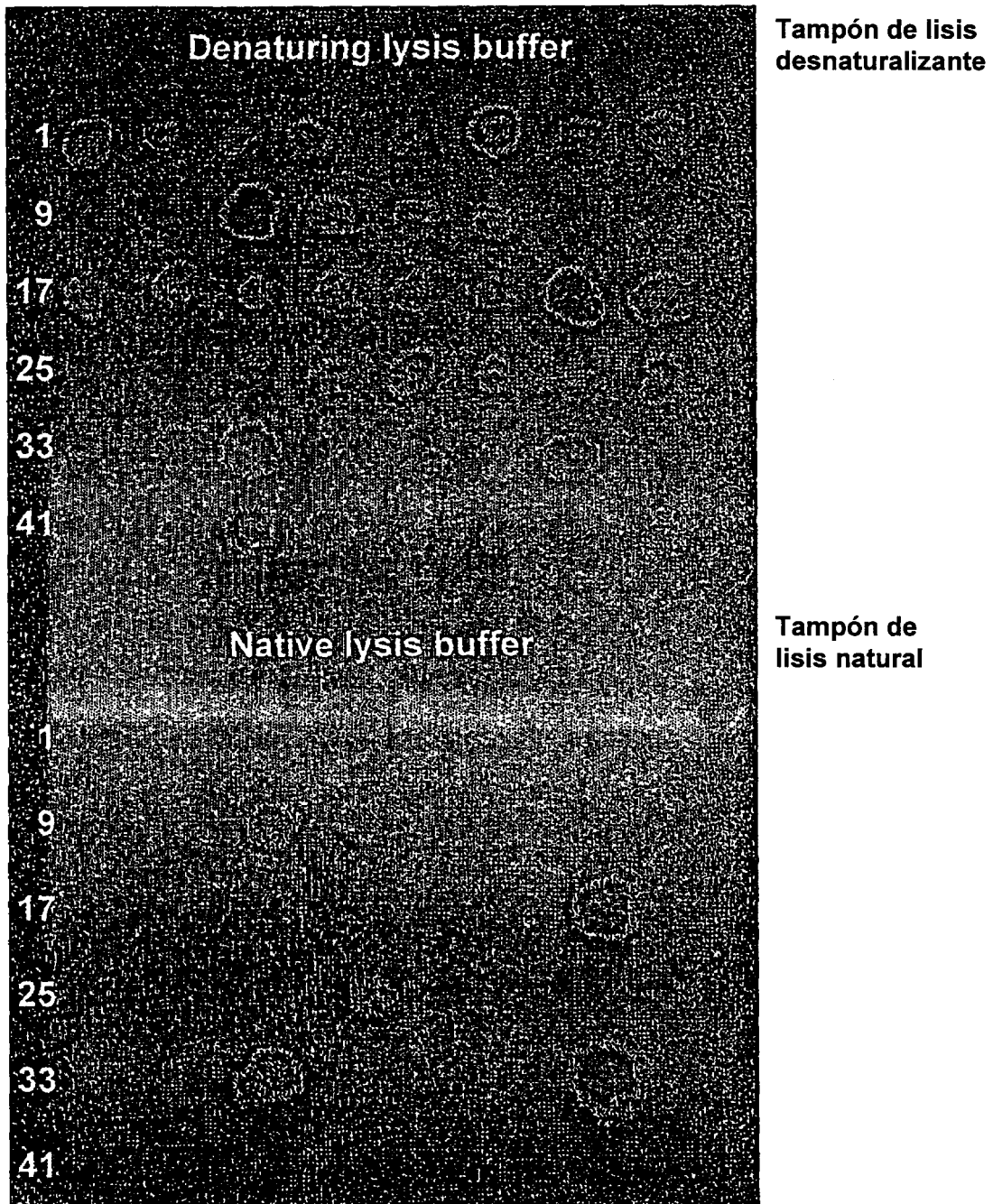


FIG. 5

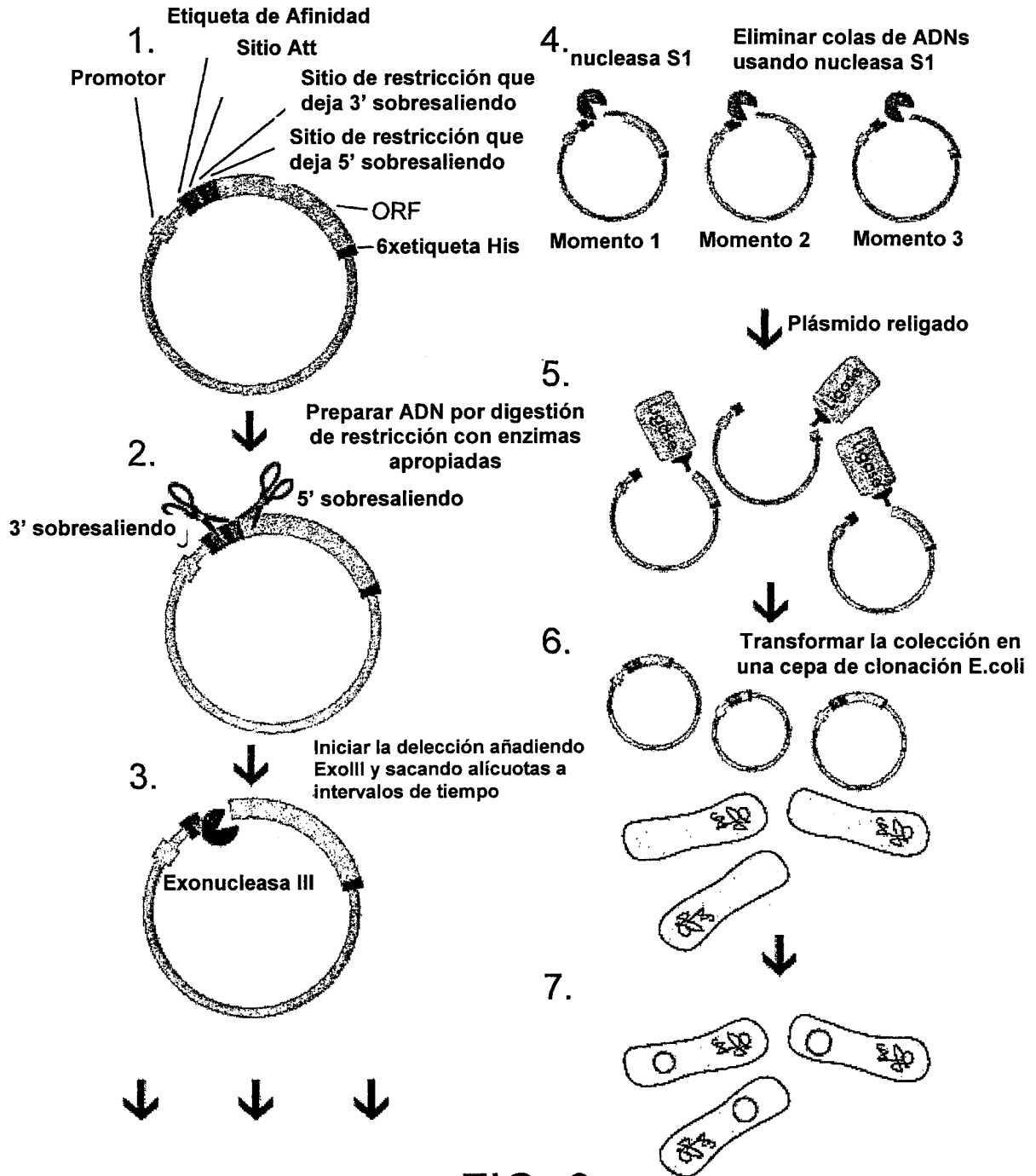
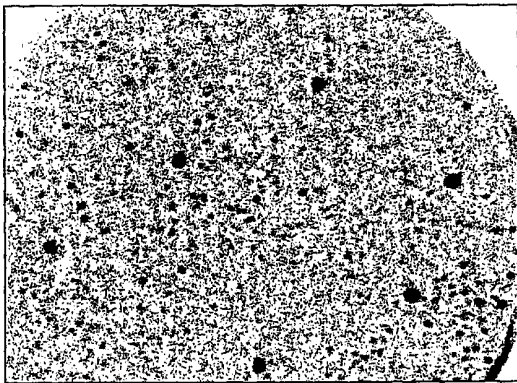
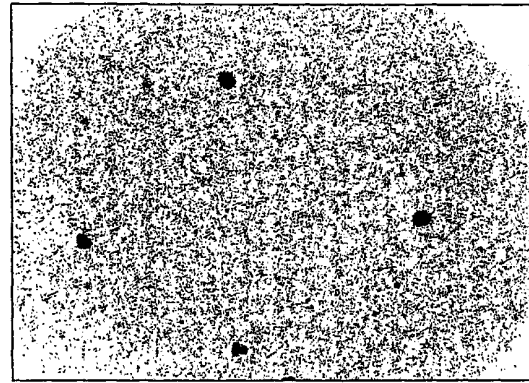


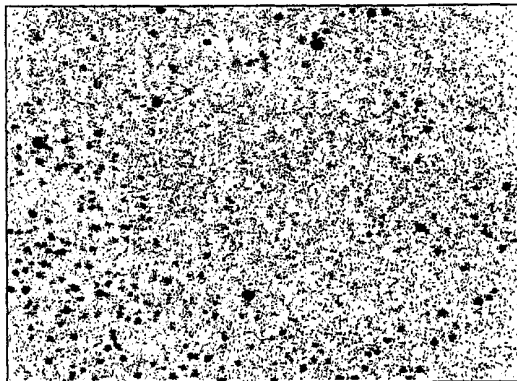
FIG. 6



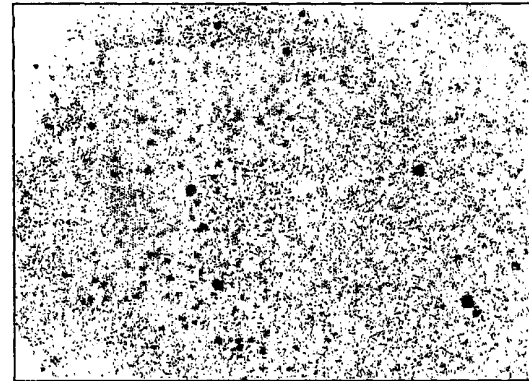
RORA 5-8 minutos  
(~100-190 aa:s)



RORA 20-24 minutos  
(~450-560 aa:s)

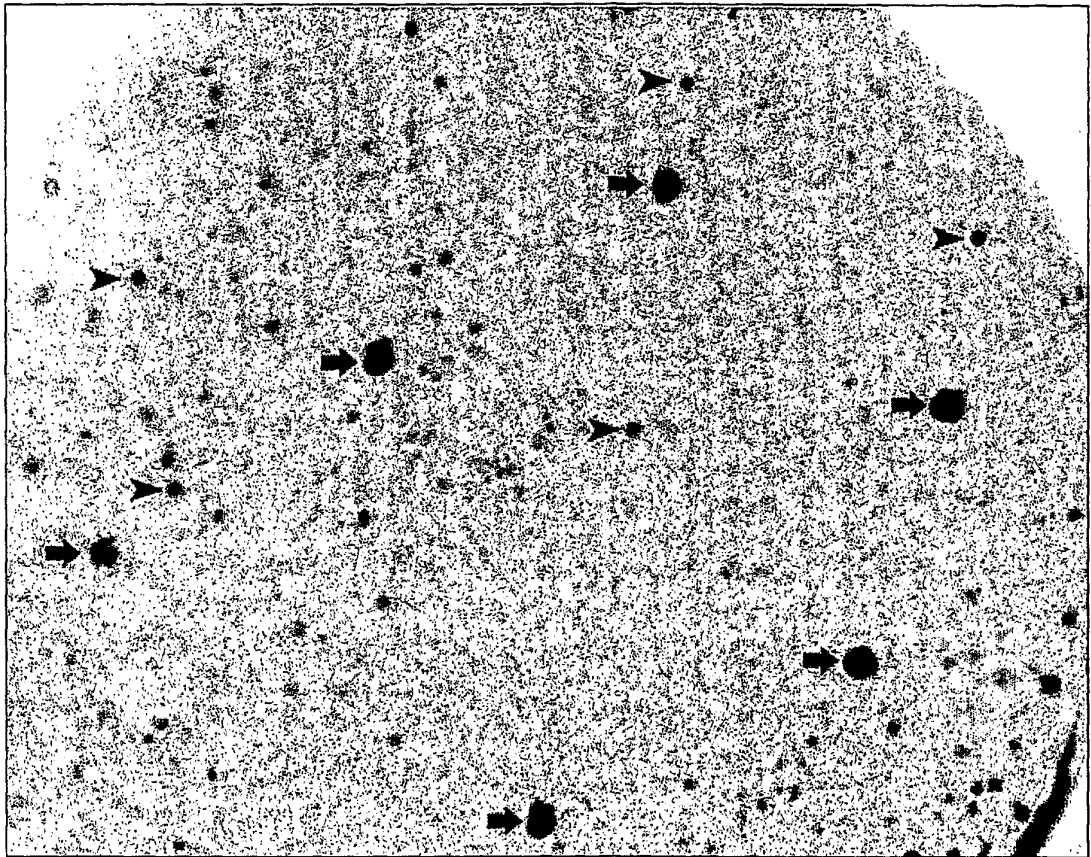


SOCS-2 1-4 minutos  
(~0-90 aa:s)



SOCS-2 9-12 minutos  
(~210-300 aa:s)

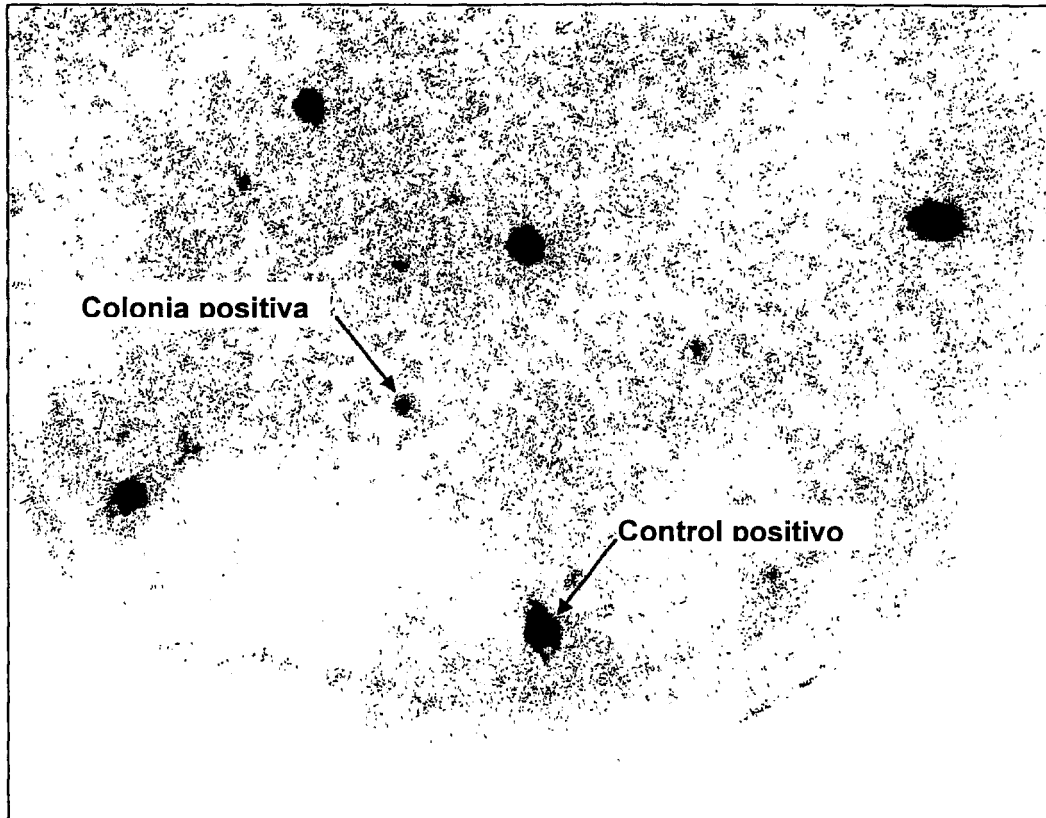
**FIG. 7a**



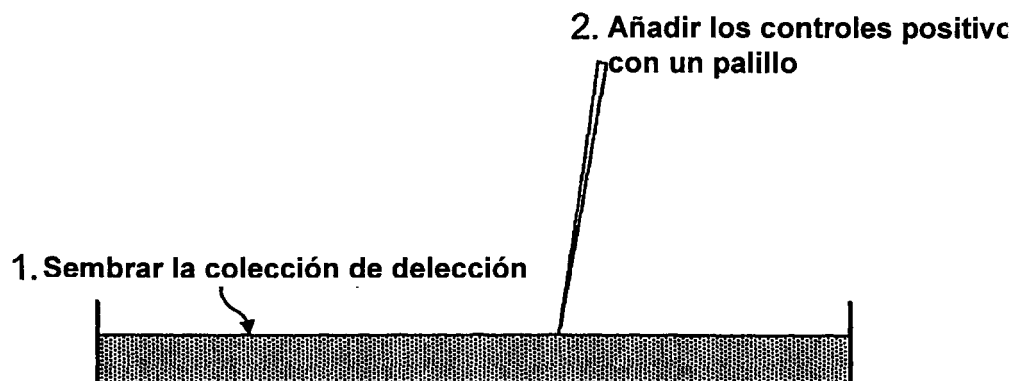
**Cribado de colonias de una colección RORa. Los controles positivos (➡) se añaden a la placa con la colección para facilitar la orientación. ➤ Indica ejemplos de colonias jugadas que producen proteína soluble.**

**FIG. 7b**

**Colonia FiDo con referencia**



5:2500 Colonias



**FIG. 8**

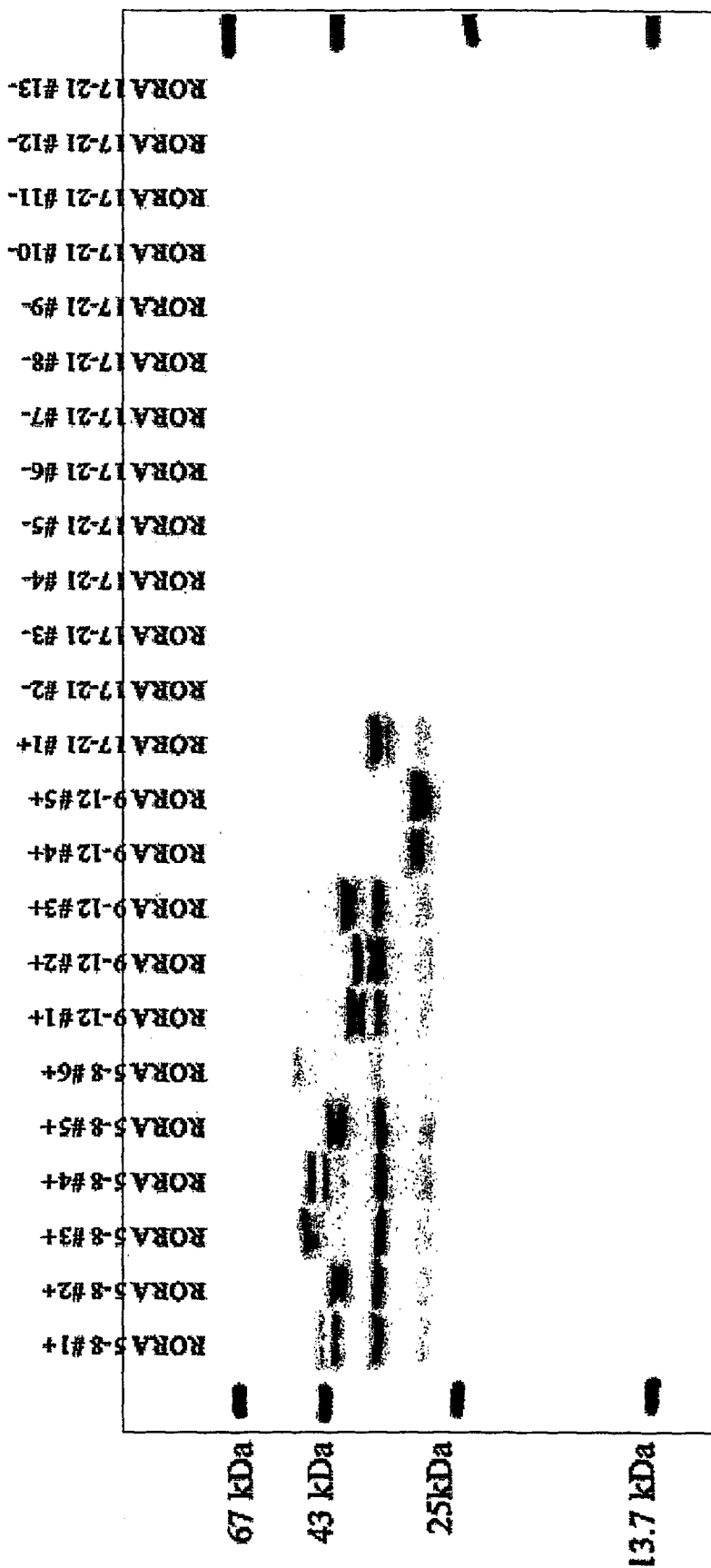


FIG. 9

# SOCS-2

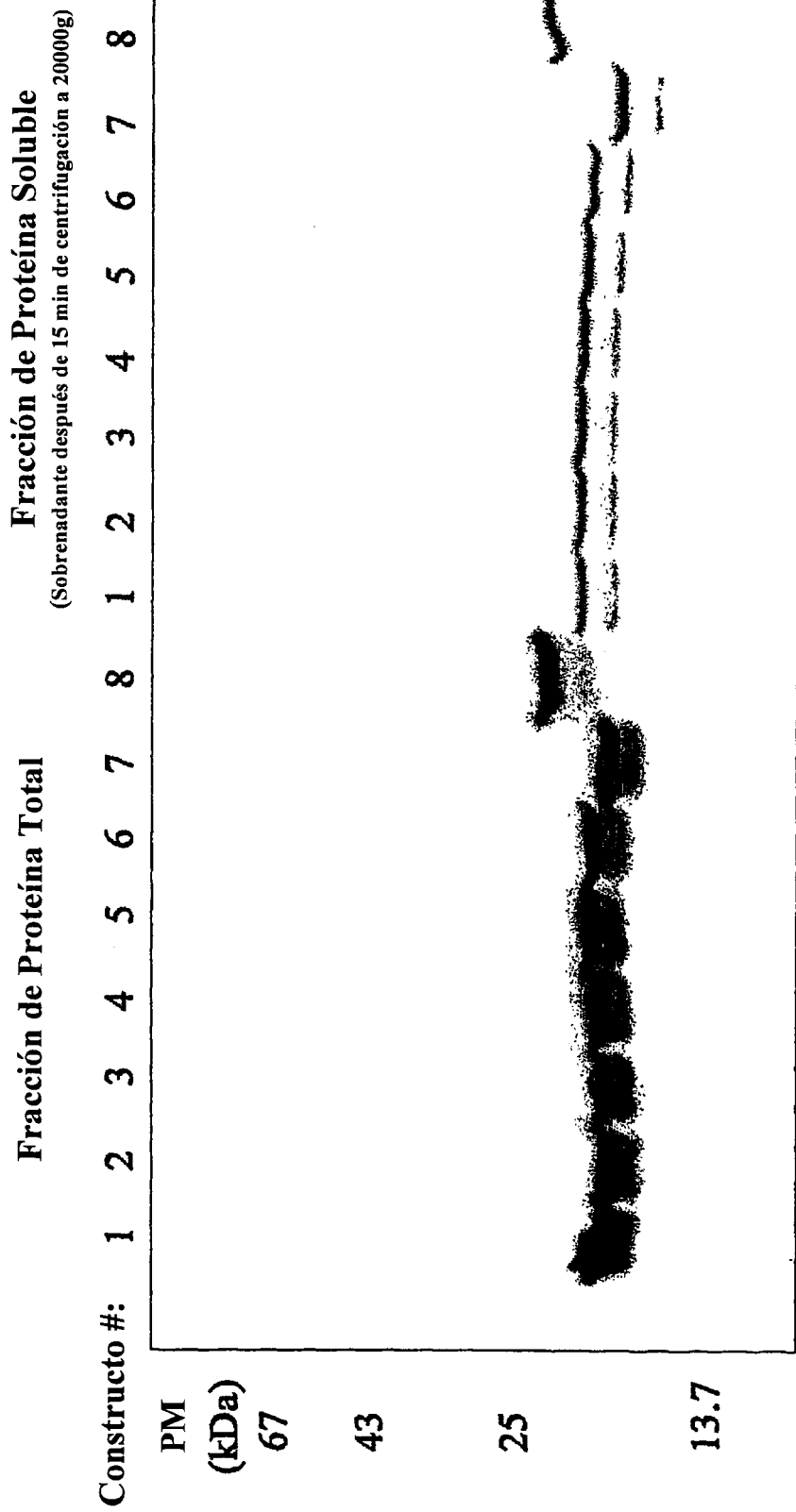


FIG. 10

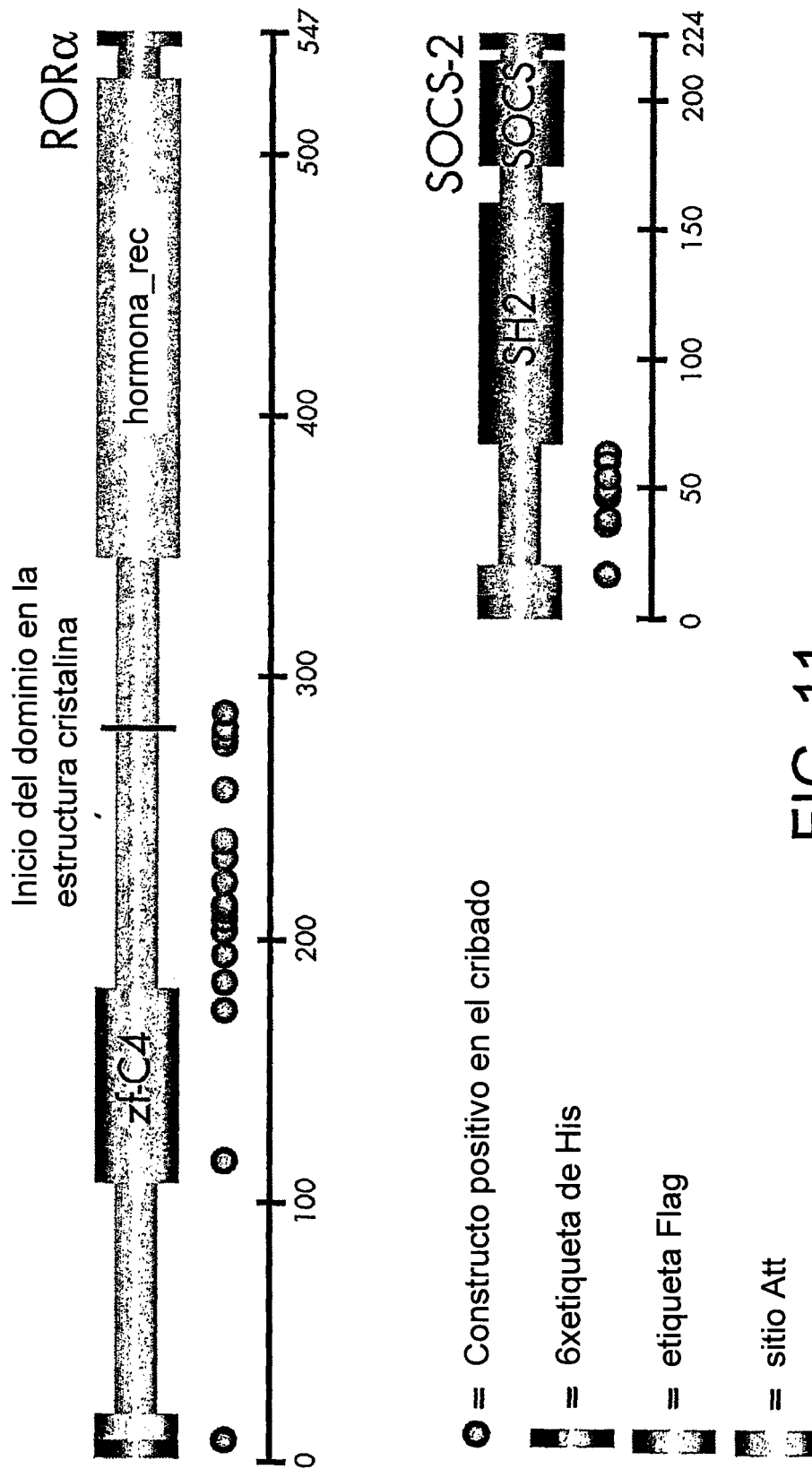


FIG. 11

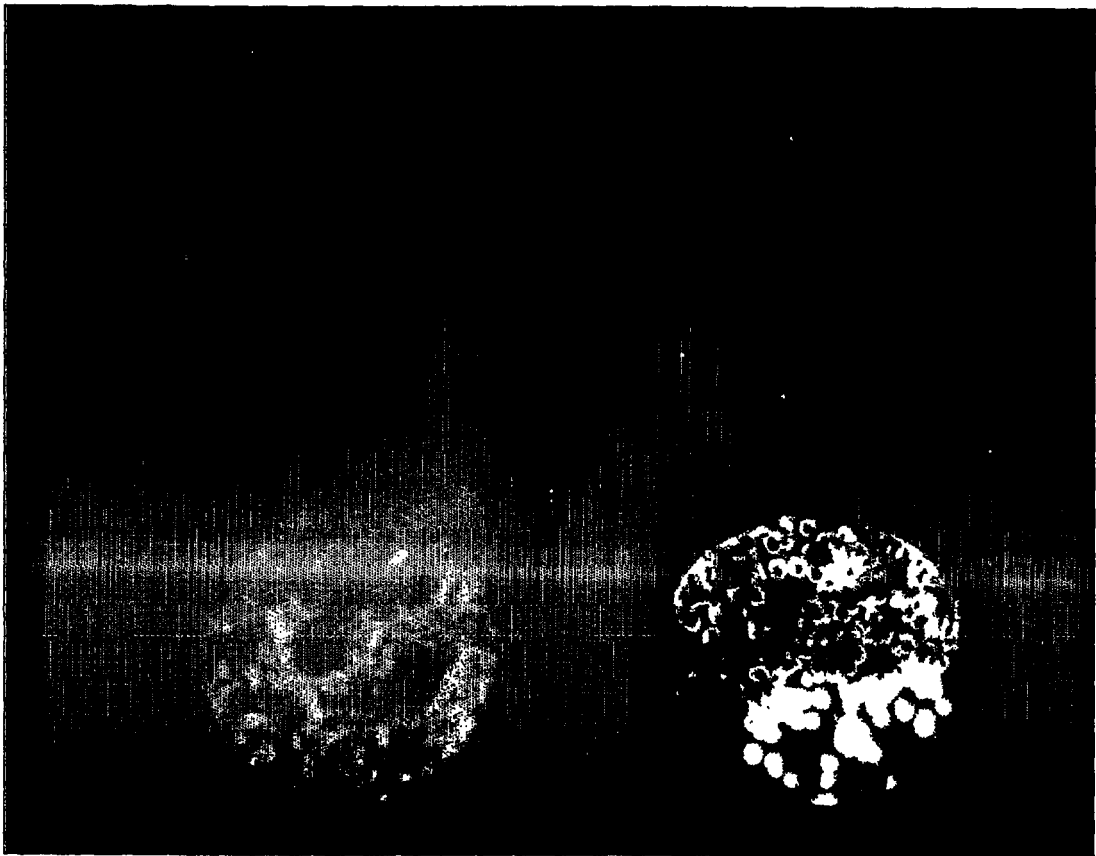


FIG. 12

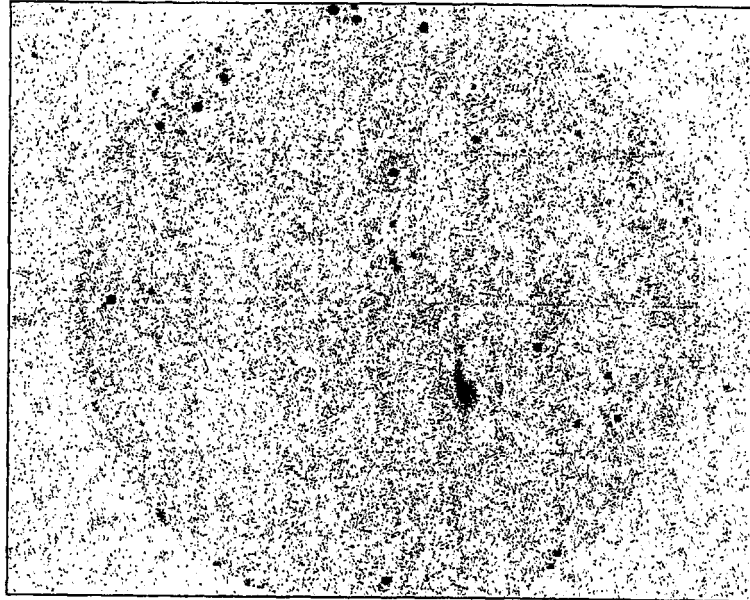


FIG. 13a

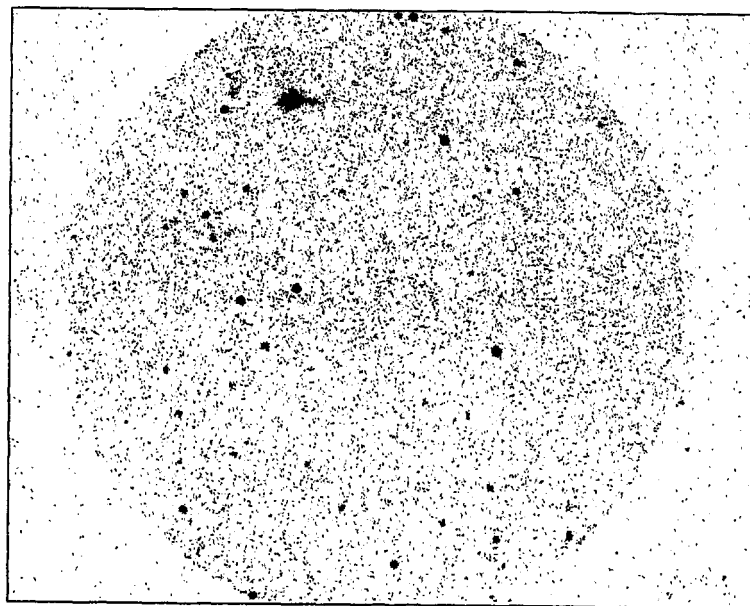


FIG. 13b

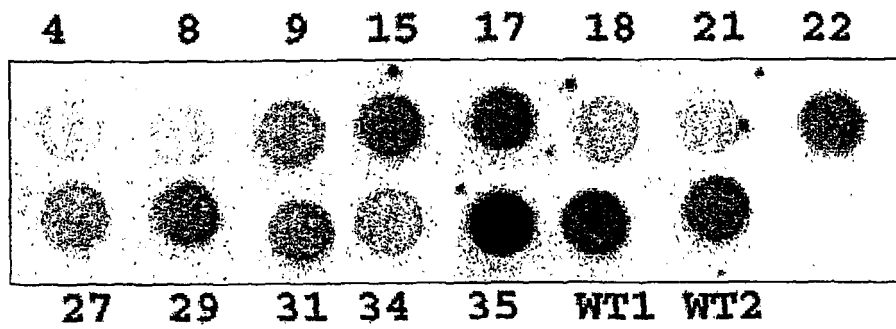


FIG. 14a

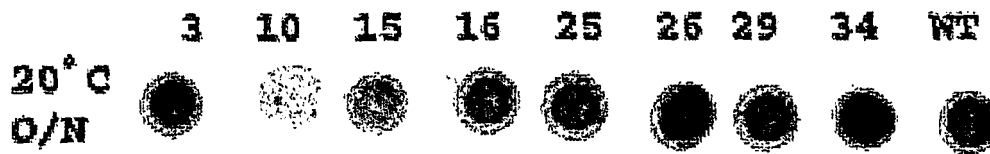


FIG. 14b