



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio de la expresión de proteínas de interés
biotecnológico en el citoplasma y periplasma de
Escherichia coli recombinante: Utilidad de fuentes
de carbono alternas”**

Tesis que presenta

M. B. Emilio Medina Rivero

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2006



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Estudio de la expresión de proteínas de interés biotecnológico en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli* recombinante: Utilidad de fuentes de carbono alternas” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **M. B. Emilio Medina Rivero** y aprobada el **15 de Diciembre de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Codirector de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Codirectora de la tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de biotecnología molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Antonio De León Rodríguez y Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 157496 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 002 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de diciembre del año 2006, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dr. Francisco Villaseñor Ortega	Sinodal externo	ITC

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Emilio Medina Rivero

sobre la Tesis intitulada:

Estudio de la Expresión de Proteínas de Interés Biotecnológico en el Citoplasma y Periplasma de Escherichia coli Recombinante: Utilidad de Fuentes de Carbono Alternas

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

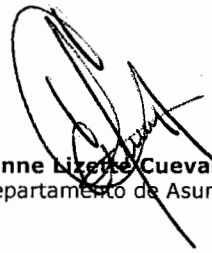
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes diciembre de 2006.


Dr. Marcial Borrillo Marín
Secretario Académico




L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

A

Mi esposa Mildred,

Mi hijo Diego

y

Mi fiel amigo Cuffin

Agradecimientos

A los doctores Antonio De León y Ana Paulina Barba por su asesoría y apoyo para realizar mi trabajo de tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 157496 para realizar mis estudios de doctorado en el IPICYT.

Al CONACYT y FOMIX por el financiamiento otorgado en los proyectos No. J39639-Q y FMSLP-2002-4100.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por haber brindado todos los recursos necesarios para mi formación.

A Jacinto Ramírez y Gabriel Ordóñez por sus comentarios que contribuyeron para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de los laboratorios 2 y 4 por su apoyo incondicional.

A la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y a los doctores Elizabeth Jeffery, Elvira de Mejía, Flavia G. Loarca, Isaac Cann y Keith Kelley por haberme dado la oportunidad de hacer una estancia en la Universidad de Illinois, Urbana-Champaign por medio del programa TIES.

Al Consejo Británico por otorgarme una beca para realizar una estancia en el laboratorio del Dr. Colin Harwood de la Universidad de Newcastle upon Tyne.

A los doctores Alejandro De las Peñas e Irene Castaño por sus comentarios y correcciones del idioma inglés del manuscrito "Secretion of recombinant proteins to the periplasmic space using the Tat pathway in *Escherichia coli*".

A todos los que forman parte del IPICYT, por que participaron directa o indirectamente en la realización de mi proyecto de tesis doctoral.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xii
Anexos	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Vector de expresión	1
1.2. Sistema de expresión	1
1.2.1. Inducción del promotor <i>lac</i> con galactosa	2
1.2.2. Sistema de expresión inducido con NaCl	3
1.3. Vías de secreción en <i>E. coli</i>	3
1.3.1. Vía de transporte Tat	6
1.4. Características de péptidos señal bacterianos	8
1.5. Genes sintéticos	10
1.6. Proteínas modelo	12
1.6.1. Penicilino acilasa	12
1.6.2. Interleucina-2 humana	12
1.6.3. Interferón- γ humano	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo general	14
2.2. Objetivos particulares	14

	Página
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. Estrategia experimental	15
3.2. Mutagénesis sitio dirigida	16
3.3. Construcción de los sistemas de expresión	17
3.3.1. Plásmido pPA102	18
3.3.2. Plásmido pGAL-sphIL2	20
3.3.3. Plásmido pGAL-wphIL2	20
3.3.4. Plásmido pET12a-hIL2	21
3.3.5. Plásmido pEMR-hIL2 e pEMR-hINF γ	22
3.4. Preinóculo	22
3.5. Producción por lote en biorreactor	22
3.6. Producción en biorreactor <i>air lift</i>	24
3.7. Producción en cultivo por lote alimentado	24
3.8. Procesamiento de las muestras de <i>E. coli</i> tomadas durante el cultivo	25
3.9. Fraccionamiento celular	25
3.10. Determinación de biomasa	26
3.11. Determinación de azúcares por DNS	26
3.12. Determinación de azúcares por HPLC	26
3.13. Cuantificación de proteína total	27
3.14. Preparación de geles de acrilamida de gradiente bajo condiciones desnaturalizantes	27
3.15. Western blot	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Producción de proteínas recombinantes utilizando fuentes de carbono alternas	30
4.1.1. Producción de rhIL-2 utilizando la fructosa de jugo de <i>Agave salmiana</i>	30

4.1.2. Producción de penicilino acilasa utilizando la lactosa del suero de leche	34
4.2. Procesamiento de rhIL-2 a partir de <i>E. coli</i> JM101/pGALsphIL-2	42
4.2.1. Producción de rhIL-2 en biorreactor	42
4.3. Producción de hINF- γ e hIL-2 en el periplasma de <i>E. coli</i> BL21-SI	46
5. CONCLUSIONES	62
6. REFERENCIAS	63
ANEXOS	69

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Vías de secreción en bacterias	5
Tabla 2. Energía requerida para transportar proteínas por las vías Sec y Tat	8
Tabla 3. Péptidos señal Tat de <i>E. coli</i>	10
Tabla 4. Uso de codones de Arg, Gly, Ile, Leu y Pro en <i>E. coli</i>	11
Tabla 5. Sistema de reacción para mutagénesis sitio dirigida	16
Tabla 6. Parámetros del ciclo de PCR para el método de mutagénesis	17
Tabla 7. Descripción de los sistemas de expresión	18
Tabla 8. Sistema de reacción Klenow	19
Tabla A1. Medio LB	69
Tabla A2. Medio LBON	69
Tabla A3. Medio (M9)	69
Tabla A4. Medio BSG	70
Tabla A5. Solución I para purificar ADN plasmídico	71
Tabla A6. Solución II para purificar ADN plasmídico	71
Tabla A7. Solución III para purificar ADN plasmídico	71
Tabla A8. TAE 50X	71
Tabla A9. Gel de agarosa 1 %	71
Tabla A10. Amortiguador de choque osmótico	72
Tabla A11. Solución de DNS	72
Tabla A12. Soluciones para cuantificar proteína	72
Tabla A13. Soluciones requeridas	73
Tabla A14. Soluciones para el gel de gradiente	73
Tabla A15. Soluciones para el gel de concentrador	73
Tabla A16. Amortiguador de la muestra 5x	74
Tabla A17. Amortiguador de corrida	74
Tabla A18. Amortiguador de transferencia <i>Towbin</i>	74
Tabla A19. Amortiguador de fosfatos (PBS)	74
Tabla A20. Solución para bloquear	75

	Página
Tabla A21. Amortiguador para la enzima fosfatasa alcalina (AP)	75
Tabla A22. Solución de anticuerpos policlonales primarios	75
Tabla A23. Solución de anticuerpos secundarios	75

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Esquema general del transporte de proteínas al periplasma de <i>E. coli</i> por las vías Sec y Tat	4
Figura 2. Vía de transporte Tat	7
Figura 3. Estructura esquemática de un péptido señal bacteriano	9
Figura 4. Diagrama de la estrategia experimental	15
Figura 5. Construcción del plásmido pPA102	19
Figura 6. Construcción del plásmido pGAL-sphIL2.	20
Figura 7. Construcción del plásmido pGAL-wphIL2	21
Figura 8. Biorreactor Applikon automatizado	23
Figura 9. Sistema para geles de gradiente	28
Figura 10. Producción e identificación de rhIL-2 con jugo de Agave como fuente de carbono	31
Figura 11. Cinéticas de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21-SI/pET12ahIL-2 en biorreactor en cultivo por lote con medio BSG	33
Figura 12. Western blot de rhIL2 producida en <i>E. coli</i> JM101/pGALsphIL-2	42
Figura 13. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> JM101/pGALsphIL-2 en biorreactor con limitación de OD en medio M9	43
Figura 14. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> JM101/pGALsphIL-2 en biorreactor air lift con medio M9	44
Figura. 15. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> JM101/pGALsphIL-2 en cultivo por lote alimentado con medio M9	45
Figura A1. Curva estándar de biomasa	76
Figura A2. Curva estándar de galactosa	77
Figura A3. Curva estándar de glucosa	78
Figura A4. Curva estándar de fructosa	79
Figura A5. Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA)	80

Anexos

	Página
Anexo 1. Medios y soluciones	69
Anexo 2. Curvas estándar	76
Anexo 3. Métodos de rutina	81
Anexo 4. Solicitud de patente No. NL/a/2006/000069	83

Resumen

“Estudio de la expresión de proteínas de interés biotecnológico en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli* recombinante: Utilidad de fuentes de carbono alternas”.

En el presente estudio se utilizó la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* para la expresión de proteínas recombinantes de alto valor agregado en el citoplasma y periplasma, utilizando fuentes de carbono de bajo costo, tal como fructosa de jugo de *Agave* y lactosa de suero de leche. La producción de interleucina-2 humana (rhIL-2) en el citoplasma de *E. coli* BL21-SI fue de 45 mg L⁻¹ a 9 % de oxígeno disuelto (OD) y 10 g L⁻¹ de fructosa de jugo de *Agave*. Para evaluar el efecto que tiene el OD y la concentración de lactosa de suero de leche sobre la producción de penicilino acilasa (PA) en *E. coli* W3110/pPA102, se diseñó un factorial 3². La actividad específica máxima de PA fue de 781 U g⁻¹ cuando se utilizó 5 g L⁻¹ de lactosa de suero de leche y 3 % de OD. Los resultados obtenidos mostraron que el jugo de *Agave* y el suero de leche pueden ser utilizados como fuente de carbono, para la producción de proteínas de interés comercial en procesos biotecnológicos, tal como rhIL-2, INF- γ y PA. Por otra parte, se evaluó el transporte de interferón- γ humano (hINF- γ) e interleucina-2 humana (hIL-2) al periplasma de *E. coli* por la vía de secreción Tat. Para esto, los genes sintéticos de hINF- γ y hIL-2 fueron fusionados al péptido señal de la penicilino acilasa modificado (SP ρ ac), y clonados en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector de expresión pEMR. La expresión se llevó a cabo en *E. coli* BL21-SI y las fracciones del periplasma, soluble e insoluble, se analizaron por Western blot. Se encontró rhINF- γ soluble en el periplasma, mientras que rhIL-2 fue parcialmente procesada en el citoplasma. Con base en los resultados anteriores se concluyó que el plásmido pEMR permite transportar rhINF- γ por la vía de secreción Tat.

PALABRAS CLAVE: jugo de Agave, péptido señal, proteína recombinante, suero de leche.

Abstract

“Study of protein expression in cytoplasm and periplasm of recombinant *Escherichia coli*: Use of *Agave* juice and cheese whey as carbon source”

In this work, we present the use of the Gram negative bacteria *Escherichia coli* for the expression of recombinant proteins of biotechnology interest, using inexpensive carbon sources, such as fructose from *Agave* juice and lactose from cheese whey. The cytoplasmic production of human interleukin-2 (rhIL-2) from *E. coli* BL21-SI was 45 mg L⁻¹ at 9 % dissolved oxygen (DO) and 10 g L⁻¹ of fructose from *Agave* juice. In order to evaluate the effect of DO and lactose (from cheese whey) concentration on penicillin acylase production in *E. coli* W3110/pPA102, a design factorial 3² was used. Maximum specific PA activity was 781 U g⁻¹ at 3 % of DO and 5 g L⁻¹ of lactose from cheese whey. These results showed that *Agave* juice and cheese whey could be used as carbon source for the production of recombinant proteins with biotechnological interest, such as rhIL-2, INF- γ and PA. In addition, the transport of human interferon- γ (hINF- γ) and human interleukin-2 (hIL-2) to periplasm of *E. coli* by Tat pathway was evaluated. The pEMR vector containing the T7 promoter and a modified signal peptide from penicillin amidase (SP pac), was used to express hINF- γ and hIL-2 synthetic genes. *Hind*III and *Bam*HI were used to clone in pEMR. The expression analysis was made in *E. coli* BL21-SI, periplasm, soluble and insoluble fractions, were analyzed by Western blot, we found that rhINF- γ was produced as a soluble form in the periplasm, whereas rhIL-2 was partially processed in the cytoplasm. Based on these results the plasmid pEMR, presents an alternative for easy cloning and S pac fusion in order to target gene products to the periplasm through the Tat pathway.

KEYWORDS: *Agave* juice, cheese whey, signal peptide.

1. ANTECEDENTES

1.1. Vector de expresión

La construcción de un vector de expresión requiere de varios elementos, que deben ser cuidadosamente considerados para obtener altos niveles de síntesis de proteína. La arquitectura de un vector de expresión para *E. coli* debe contener un promotor para iniciar la transcripción, ubicado aproximadamente entre 10 y 100 pb río arriba del sitio de unión al ribosoma. Este promotor debe estar bajo el control de un represor que regule la expresión y este el gen podría estar en el vector de expresión o integrado al cromosoma del hospedero. El terminador de la transcripción se localiza río abajo de la secuencia que codifica para la proteína, que generalmente forma una estructura de tallo-asa para proteger al ARNm de la degradación y prolongar su tiempo de vida media. Entre otros elementos que debe contener el vector de expresión, es al menos un gen que confiera resistencia a algún antibiótico, sitios únicos de restricción para la clonación de genes y finalmente un sitio de origen de replicación (Makrides, 1996).

1.2. Sistema de expresión

La selección del hospedero para la producción de proteínas heterólogas, depende de las modificaciones postraduccionales requeridas para su función. Estos sistemas de expresión pueden ser células u organismos, en donde un gen se clona en el cromosoma o en un vector de expresión. Entre varios sistemas disponibles para la producción de proteínas heterólogas, la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* es uno de los más atractivos, debido a su capacidad de crecer rápidamente en sustratos económicos, su genética bien caracterizada y la disponibilidad de un número cada vez más grande de vectores de expresión y cepas mutantes (Baneyx 1999). A pesar de tener como desventaja la formación de cuerpos de inclusión, sigue siendo uno de los sistemas más utilizados en la

industria farmacéutica para la expresión de biofármacos (citocinas), por que existen métodos eficientes de solubilización con urea, guanidina-HCl y detergentes tales como SDS (Tsumoto *et al.* 2003). El transporte de proteínas al espacio periplasmático de *E. coli* a través de péptidos señal, podría evitar la formación de cuerpos de inclusión de algunas proteínas en el citoplasma; además de tener ventajas como la formación de puentes disulfuro en el ambiente oxidante del periplasma y la facilidad de recuperar y purificar la proteína heteróloga, debido a que en el espacio periplasmático, solo se encuentran el 4 % de las proteínas de la célula (Makrides, 1996).

1.2.1. Inducción del promotor *lac* con galactosa

La lactosa y el Isopropil-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) son las sustancias químicas que inducen de manera eficiente el promotor silvestre del operón *lac* (Donovan *et al.* 1996). Sin embargo, el uso de IPTG como inductor tiene las desventajas de ser costoso, disminuye el crecimiento de *E. coli* y es tóxico para los humanos. La lactosa es por lo general elegida como inductor en cultivos a gran escala, cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono, pero no puede ser usada en cultivos donde la fuente de carbono es glucosa, por que esta inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, dando como resultado una importante disminución en los niveles de AMP cíclico, lo conoce como represión catabólica, en donde los genes (Hannig y Makrides 1996). De León y col. (2003b) demostraron que la galactosa induce el promotor *lac* del plásmido pPA102 para producir penicilino acilasa en *E. coli* recombinante crecida en medio mínimo (M9) con glucosa como fuente de carbono, esto representa un avance significativo para la producción de proteínas heterólogas a gran escala utilizando inductores muy económicos.

1.2.2. Sistema de expresión inducido con NaCl

La sobre-expresión de genes inducidos con sal (NaCl) en *E. coli* se produce debido a que una copia del gen de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 esta integrada en el genoma de *E. coli* BL21-SI bajo el control del promotor *proU*, que se induce por choque osmótico. Por lo tanto cualquier gen que se clone río abajo del promotor del fago T7 y se introduzca en esta cepa, se sobre-expresará al adicionarle sal. La ventaja en este sistema de expresión es que existen una variedad de vectores como es el caso de la serie pET que se han desarrollado para la inducción con sal (Bhandari y Gowrishankar, 1997).

1.3. Vías de secreción en *E. coli*

El transporte de proteínas es esencial para el crecimiento celular. Las vías de transporte en bacterias Gram-negativas podrían resumirse en dos grupos: las vías que transportan polipéptidos de la membrana citoplasmática al periplasma por los translocones SecYEG y TatABC y las vías de secreción al exterior de la célula (Holland 2004, Kostakioti *et al.* 2005). La partícula de reconocimiento de la señal (SRP) o el *trigger factor* (TF), se unen al péptido señal nascente del ribosoma de la vía Sec, para ser transportados al periplasma por el translocón SecYEG. En la mayoría de los casos las preproteínas requieren ser plegadas con ayuda de las chaperonas GroEL-GroES y DnaKJ (Figura 1, ruta a y b). Las proteínas transportadas por la vía Tat se pliegan espontáneamente después de la traducción o algunas requieren unirse a cofactores antes de ser plegadas y transportadas al periplasma como se muestra en la ruta c mostrada en la Figura 1 (Robinson y Bolhuis, 2004). Una vez en el periplasma las proteínas, pueden tomar diferentes caminos: agregarse en cuerpos de inclusión, ser hidrolizadas por las proteasas DegP y Prc, plegarse espontáneamente, formar puentes disulfuro entre cisteínas por la oxidoreductasa DsbA y corregir puentes disulfuro incorrectos al ser isomerizados por DsbC (Figura 1).



Figura 1. Esquema general del transporte de proteínas al periplasma de *E. coli* por las vías Sec y Tat (tomada de Baneux y Mujacic, 2004).

En la Tabla 1 se resumen las características y mecanismos de la secreción de proteínas que requieren cruzar del citoplasma hacia el exterior de *E. coli* conocidos como tipos I, II, III, IV y V (autotransporte), que tienen la función de transportar proteínas del pili y flagelos, adquisición de nutrientes, virulencia y secreción de toxinas (Holland 2004, Kostakioti *et al.* 2005).

Tabla 1. Vías de secreción en bacterias.

Tipo de secreción	Descripción*	Tipo de proteínas transportadas*
I	Transporta proteínas directamente del citoplasma al medio extracelular, que tienen un péptido señal C-terminal que no es liberado y dirige la proteína a un poro central hidrofóbico constituido por 3 polipéptidos que forman un barril β . Ej. <i>E. coli</i> transporta la proteína HlyA por el canal que atraviesa las membranas citoplasmática y exterior formado por HlyB, HlyD y TolC.	Usualmente exoenzimas de alto peso molecular o toxinas.
II	Las proteínas son transportadas al periplasma por las vías Sec o Tat antes de ser transportadas al exterior. Posteriormente son liberadas al medio a través de un canal de transporte formado por la proteína D.	Un amplio rango de enzimas y toxinas.
III	La proteína es secretada en un solo paso sin intermediarios en el periplasma, por un translocon aún no caracterizado.	Factores de virulencia bacterianos a una célula huésped.
IV	Las proteínas son transportadas a través de <i>pili</i> .	Complejos de proteínas y proteínas de unión a ADN de cadena.
V (Autotransporte)	Las proteínas son transportada a través de la vía Sec y posteriormente se insertan en la membrana externa, en donde un dominio de transporte localizado en el C-terminal forma un barril β con un canal central hidrofóbico.	Transporta factores de virulencia con diversos roles de patogenicidad.

*Información tomada de Kostakioti *et al.* 2005.

1.3.1. Vía de transporte Tat

La vía de transporte Tat se encuentra en las membranas del citoplasma de muchas bacterias y archeas y en las membranas de tilacoides de cloroplastos, la característica más notable es su habilidad de transportar proteínas plegadas por la membrana del citoplasma (Sargent *et al.* 2006). La mayoría de los estudios en bacterias de la vía Tat se han hecho en mutantes de *E. coli*. Estos han identificado los componentes que forman el complejo de la vía Tat, codificados por el operón *tatABC* (Bogsch *et al.* 1998; Berthelmann y Brüser, 2004; Gohlke *et al.* 2005; McDevitt *et al.* 2005). Los genes *tatA* y *tatB* codifican a proteínas pequeñas de 9.6 y 18.4 kDa, *tatC* es una proteína de 28.9 kDa. Existe un cuarto gen *tat* en *E. coli* que no forma parte del operón *tatABC*, *tatE* (Figura 2A), que codifica a un parálogo de TatA y se expresa en bajas concentraciones. En cepas mutantes tanto de *tatA* y como de *tatE* el transporte de proteínas se bloquea por la vía Tat, pero la sobreexpresión de *tatE* suprime mutantes Δ *tatA*, esto confirma una función similar (Robinson y Bolhuis, 2004). La razón evolutiva para mantener ambos genes en *E. coli* es incierta, debido a que la proteína TatE se expresa en bajas concentraciones y muchas bacterias Gram-negativas sólo poseen un gen del tipo *tatA*. TatB también es homóloga a TatA (y TatE) sin embargo los fenotipos de Δ *tatA* y Δ *tatB* son diferentes, por lo tanto estas dos proteínas tienen funciones distintas. En el operón *tat* existe el gen *tatD*, este gen codifica para una proteína soluble que tiene actividad de DNasa y su función aún no ha sido descrita (Robinson y Bolhuis, 2004). Estudios del aislamiento de membranas de *E. coli*, revelaron que el complejo TatABC tiene una masa de 600 kDa, en donde TatB y TatC mantienen una relación constante 1:1 con TatA (Palmer *et al.* 2005). El ciclo para el transporte de proteínas al periplasma por la vía Tat inicia cuando el péptido señal específico de esta vía que consiste en un par de argininas juntas se une al complejo TatBC de la membrana citoplasmática a través de TatC. Posteriormente por un gradiente electroquímico transmembranal de protones, el complejo TatA se asocia al módulo TatBC, para formar el complejo TatABC, en donde la proteína es

transportada al periplasma a través de un canal formado en la membrana por múltiples moléculas de TatA, finalmente el complejo TatABC se disocia en TatBC y TatA, tal y como se muestra en la Figura 2B (Palmer *et al.* 2005).

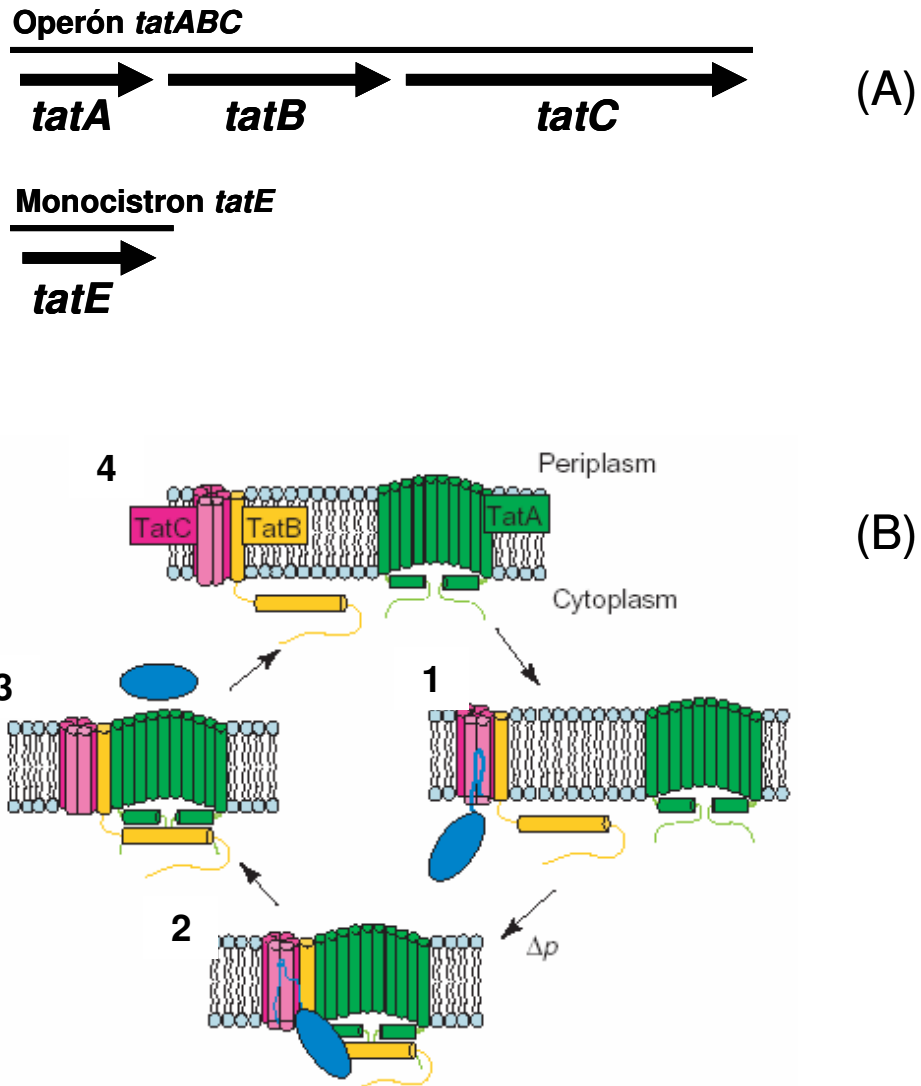


Figura 2. Vía de transporte Tat. (A) Genes de la vía Tat (tomada de Robinson y Bolhuis, 2004). (B) Modelo del ciclo de transporte de la vía Tat (figura tomada de Palmer *et al.* 2005). La proteína con el péptido señal esta ilustrada en color azul.

A diferencia de la vía Sec que utiliza directamente ATP para el transporte de proteínas, la vía Tat requiere de un gradiente electroquímico transmembranal de protones, el ΔG estimado para el transporte por la vía Tat es de 6.9×10^5 kJ/mol de proteína, esto representa entre 2 y 10 veces más energía de la requerida por la vía Sec (Tabla 2). La mayoría de las proteínas transportadas por la vía Tat se unen a cofactores de FeS, Ni-Fe, centros de molibdoterina y grupos hemo (Berks, 1996; Palmer *et al.* 2005, Sturm *et al.* 2006).

Tabla 2. Energía requerida para transportar proteínas por las vías Sec y Tat.

Vía de transporte	Moléculas de ATP /mol de proteína	Referencia
Sec	1,000 – 5,000	Lill <i>et al.</i> 1989 Driessen, 1992
Tat	10,000*	Alder y Theg, 2003

*Es la equivalencia en moléculas de ATP para transportar un mol de proteína por la vía Tat.

1.4. Características de péptidos señal bacterianos

El sistema Sec reconoce péptidos señal que contiene tres regiones características mostradas en la Figura 3: una región polar n-terminal que va de 2 a más de 15 aminoácidos, con una carga neta positiva, una región hidrofóbica h constituida por más de 8 aminoácidos, principalmente aminoácidos hidrofóbicos y alaninas, y carece de aminoácidos polares o cargados, y una región polar c-terminal que usualmente es menos hidrofóbica y contiene sitios de corte que reconocen las péptidasas LepB y LspA (Pugsley 1993).

Las proteínas que son transportadas por la vía Tat tienen los péptidos señal con una estructura tripartita de manera similar a los péptidos señal de la vía Sec. De hecho algunos péptidos señal Tat pueden ser transportados por ambas vías y cortados por las mismas péptidasas, como es el caso de la proteína transportadora de iones YcdO (Sturm *et al.* 2006). La longitud promedio de los péptidos señal de la vía Tat es de 37 aminoácidos es significativamente más largo que un péptido señal clásico de Sec, además la región h de los péptidos señal Tat es menos hidrofóbica que la de los péptidos señal Sec (Bendtsen *et al.* 2005).

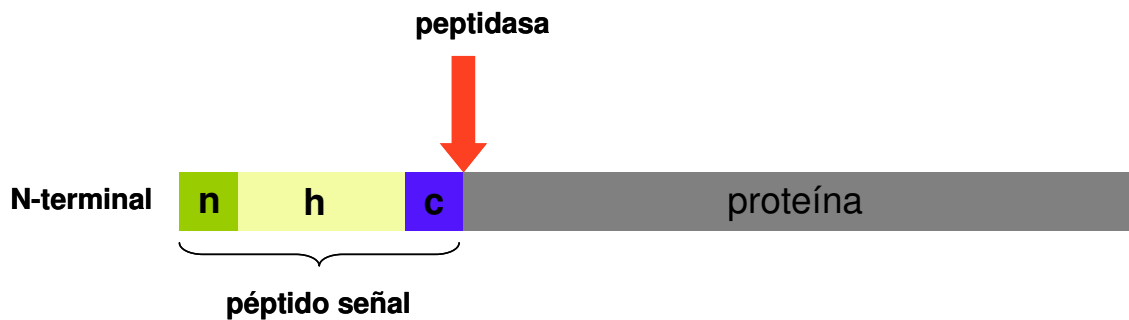


Figura 3. Estructura esquemática de un péptido señal bacteriano. (n) región polar n-terminal, (h) región hidrofóbica y (c) región polar c-terminal.

En contraste con los péptidos señal de la vía Sec, los péptidos señal Tat contienen una secuencia consenso de un par de argininas entre las regiones n y h, en la Tabla 3 se muestran unos ejemplos. Esta secuencia consenso es (S/T)RRxFLK, donde las dos argininas están consecutivas. Sin embargo, existen excepciones como es el caso del péptido señal de la penicilino acilasa en donde el par de argininas está separado por una asparagina. A pesar de este cambio es un péptido señal dependiente de Tat, esto fue demostrado al expresar el gen de la penicilino acilasa con su péptido señal nativo en una cepa de *E. coli* $\Delta tatA \Delta tatE$, en donde no hubo transporte de la penicilino acilasa, pero cuando la penicilino acilasa se fusionó al péptido señal OmpT de la vía Sec, la proteína fue transportada con eficiencia en una cepa de *E. coli* tat^- (Ignatova *et al.* 2002).

Tabla 3. Péptidos señal Tat de *E. coli*.

Péptido señal Tat	Secuencia de aminoácidos	Proteína
TorA	MNNNDLFOASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRATAAQA	TMAO reductasa
NapA	MKLSRRSFMKANAVAAAAAAGLSVPGVARA	Nitrato reductasa
FdoG	MQVSRQFFKICAGGMAGTTAAALGFAPSVALA	Formato deshidrogenasa
PcoA	MLLKTSRRRTFLKGLTSGVAGSLGVWSFNARS	Resistencia a cobre

Información tomada de Robinson y Bolhuis, 2004.

1.5. Genes sintéticos

Escherichia coli y otras especies muestran una marcada preferencia en el uso de codones, lo que se refleja en una expresión elevada o disminuida de los genes heterólogos expresados. Esta preferencia es diferente para *E. coli* que para células de mamífero, por consiguiente, cuando un gen de mamífero se expresa en *E. coli*, debido al uso de codones es posible obtener bajos rendimientos de producción de la proteína recombinante. En la Tabla 4 se muestran los codones poco frecuentes en *E. coli*, que principalmente codifican para los aminoácidos de Arg, Gly, Ile, Leu y Pro, la frecuencia del uso de codones de AGG, AGA, CGG, CGA (Arg); GGA (Gly); AUA (Ile); CUA (Leu) y CCC (Pro) es menor en los 195 genes que se expresan en altos niveles durante la fase exponencial de crecimiento (fracción en clase II), que en la fracción de todos los 4,290 genes que codifican proteínas en *E. coli* (Novy *et al.* 2001). Se han reportado varios ejemplos, donde la sustitución de codones poco frecuentes aumenta los niveles de expresión de proteínas heterólogas, como es el caso de la proteasa del VIH (Rangwala *et al.* 1992) y de la neurofibromina humana (Hale y Thompson, 1998) ambas expresadas en *E. coli*. El análisis de la secuencia del marco de lectura, permite predecir el nivel de expresión de una proteína heteróloga (Rangwala *et al.* 1992). En este sentido, el diseño de genes sintéticos que codifiquen para proteínas de mamífero y utilicen codones frecuentes, es la mejor estrategia para optimizar la expresión en *E. coli* (Zhou *et al.* 2003). También es importante evitar que se

formen estructuras secundarias de ARNm en la secuencia Shine-Dalgarno, para que se acople al ribosoma (ARNr) y dar inicio eficiente al proceso de traducción (Schumann y Ferreira, 2004).

Tabla 4. Uso de codones de Arg, Gly, Ile, Leu y Pro en *E. coli*.

Aminoácido	Codón	Fracción en todos los genes	Fracción en Clase II
Arg	AGG	0.022	0.003
Arg	AGA	0.039	0.006
Arg	CGG	0.098	0.008
Arg	CGA	0.065	0.011
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
Gly	GGG	0.151	0.044
Gly	GGA	0.109	0.020
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
Ile	AUA	0.073	0.006
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
Leu	CUA	0.037	0.008
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
Pro	CCC	0.124	0.016

Los codones poco frecuentes están en negrita. Fracción en clase II: genes que se expresan en la fase exponencial de crecimiento. La tabla fue tomada de (Novy *et al.* 2001).

1.6. Proteínas modelo

Para evaluar la expresión y transporte de proteínas recombinantes al periplasma de *E. coli* en este estudio se utilizaron como proteínas modelo la penicilino acilasa (PA) y las citocinas interleucina-2 humana (hIL-2) y el interferon- γ humano (INF- γ).

1.6.1. Penicilino acilasa

El gen de la enzima penicilino acilasa (PA) se encuentra en bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Duggleby, 1995), se utiliza para la producción de antibióticos semi-sintéticos, después de hidrolizar el enlace amida de la penicilina G y formar el ácido 6-aminopenicilánico, este proceso enzimático cambia la cadena lateral de la penicilina (Youshko *et al.* 2001). La PA pertenece a la familia de las N terminal nucleofílico (Ntn)-hidrolasas, todos los miembros de esta familia comparten una estructura tridimensional y llevan a cabo un autoprocesamiento proteolítico (Sizmann *et al.* 1990), se sintetiza en el citoplasma de *E. coli* como un precursor que contiene un péptido señal N-terminal que transporta la pre-proteína al periplasma. Una vez en el periplasma, se forma una enzima activa mediante un proceso autocatalítico que resulta en un heterodímero formado de dos polipéptidos de 209 y 557 aminoácidos, la subunidad α de 23 kDa y una subunidad β de 62 kDa, respectivamente (Kasche *et al.* 1999).

1.6.2. Interleucina-2 humana

En 1976, Morgan y col. descubrieron una glicoproteína capaz de inducir el crecimiento en cultivo de linfocitos T aislada de médula ósea humana. A esta glicoproteína se le denominó factor de crecimiento de células T o interleucina-2 humana (hIL-2) (Bubeník, 2004). En 1983 Taniguchi y col. clonaron el cADN de

hIL-2 y lo expresaron en células de mono, tres años después clonaron el gen de linfocitos T humanos y lo expresaron en *E. coli* (Rosenberg *et al.* 1986).

La hIL-2, es una citocina que tiene un peso molecular de 15.3 kDa, constituida por 133 aminoácidos. Las células T secretan la proteína madura que se encuentra glicosilada. Esta glicosilación no es necesaria para su actividad biológica y su función se desconoce. La hIL-2 es una citocina que estimula el crecimiento de los linfocitos T activados, aumenta la respuesta inmune mediante la activación de otras células de la fórmula blanca como son los, linfocitos T citotóxicos, linfocitos B y células naturales asesinas, por tal motivo, se administra a pacientes con carcinoma renal metastático, melanoma maligno avanzado, leucemia aguda mieloblástica, trasplante de médula ósea y en el tratamiento de pacientes con SIDA (Malek y Gutgsell, 1993).

1.6.3. Interferón- γ humano

El interferón- γ humano (hINF- γ) es secretado por linfocitos estimulados por mitogénesis. En los humanos, el hINF- γ está constituido por 143 aminoácidos y tiene un peso molecular entre 20-25 kDa dependiendo del grado de glicosilación, sin embargo, esta no es necesaria para su actividad biológica. En 1986 el ADN complementario de hINF- γ se clonó y expresó en *E. coli* por primera vez. En este sistema de expresión, el hINF- γ tiene una metionina en el N-terminal y su peso molecular es de 17 kDa. El hINF- γ está indicado para el tratamiento de cáncer de riñón, cáncer de colon y artritis reumatoide, entre otras (Khalilzadeh *et al.* 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Construir sistemas de expresión para la producción de proteínas de interés biotecnológico en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli* recombinante.

2.2. Objetivos particulares

Determinar la producción y procesamiento en biorreactor de rhIL-2 en *E. coli* utilizando galactosa como fuente carbono.

Determinar la producción de rhIL-2 y PA en *E. coli*, utilizando fructosa de jugo de *Agave* y lactosa de suero de leche como fuentes de carbono.

Evaluar el transporte de hINF- γ e hIL-2 al periplasma de *E. coli* por la vía Tat utilizando el péptido señal modificado de la penicilina acilasa (SP pac).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estrategia experimental

Con la finalidad de obtener un proceso biotecnológico eficiente para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se evaluó el transporte de rhIL-2 e INF- γ al periplasma y la producción de rhIL-2 y PA utilizando jugo de *Agave* y suero de leche como única fuente de carbono. La estrategia utilizada se muestra en la Figura 4.

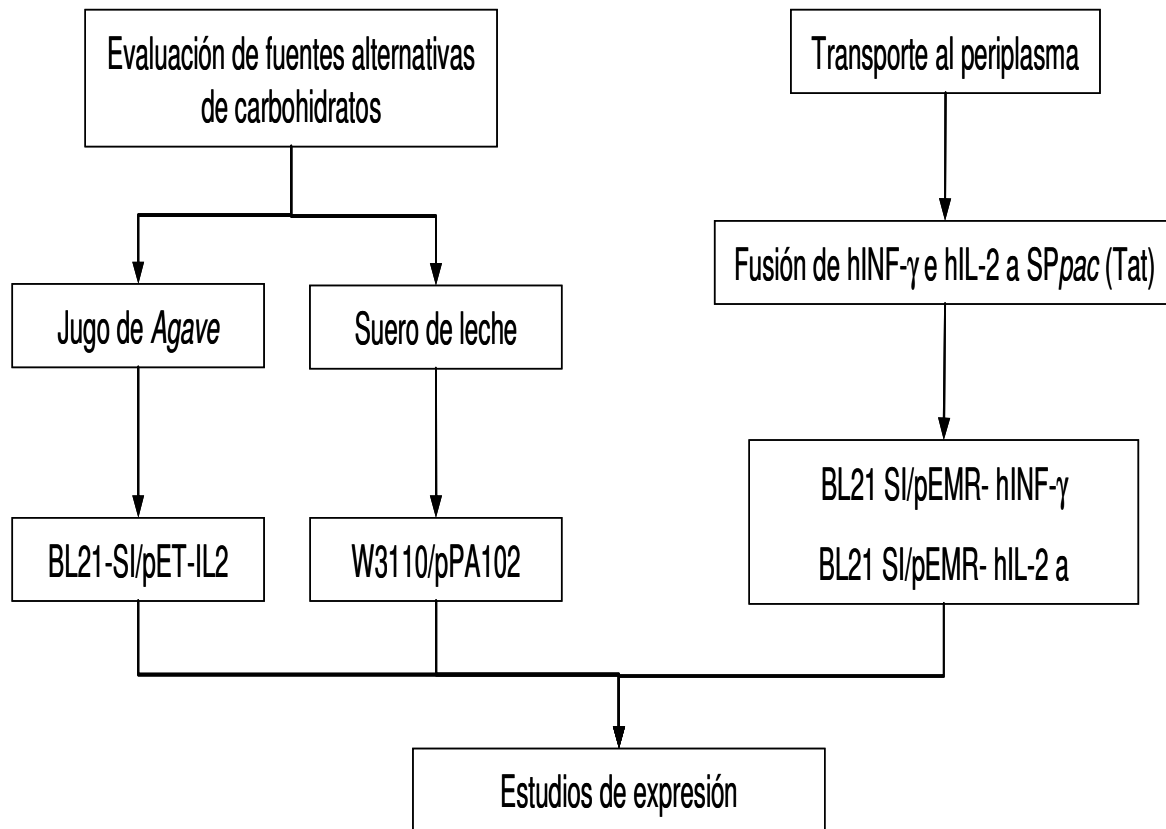


Figura 4. Diagrama de la estrategia experimental.

3.2. Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis sitio dirigida se realizó utilizando el protocolo del kit QuikChange® (Stratagene No. Cat. 200518). El procedimiento se describe a continuación.

Se diseñaron oligonucleótidos complementarios entre 25 y 45 bases, con la mutación deseada, en donde la temperatura de alineamiento (T_m) no debe ser mayor o igual a 78 °C. La mutación debe estar a la mitad de los oligonucleótidos flanqueada por aproximadamente 10 a 15 bases. Los oligonucleótidos deben contener un 40 % mínimo de GC y deben contener una C o G en el extremo 3'. Se preparó el sistema de reacción en un tubo para PCR como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Sistema de reacción para mutagénesis sitio dirigida.

Componentes	Cantidad (μL)
Amortiguador 10x	5
ADN plasmídico molde (5-50 ng)	1
Oligonucleótido 1 (10 pM)	1.25
Oligonucleótido 2 (10 pM)	1.25
dNTPs (0.5 mM)	1
Agua miliQ estéril	40.5
<i>PfuTurbo</i> ADNpol (2.5 U/ μ L)	1
Total	50

El tubo con el sistema de reacción se colocó en el termociclador y se corrió el ciclo de la Tabla 6, posteriormente la reacción se incubó durante 2 minutos en hielo y digirió con *DpnI* que corta exclusivamente ADN metilado, se incubó por 1 h. Se tomaron 5 μ L del sistema de reacción tratado con *DpnI*, para transformar por choque térmico (Anexo 3) células supercompetentes de *E. coli* XLBlue. La

selección se llevo acabo en placas de medio LB con 35 µg/ mL de kanamicina, las mutaciones se confirmaron por patrón de restricción y secuenciación.

Tabla 6. Parámetros del ciclo de PCR para el método de mutagénesis.

Segmento	No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	95	30 s
2	12	95	30 s
		55	1 min
		68	1 min/kb de plásmido

3.3. Construcción de los sistemas de expresión

E. coli DH5α fue utilizada rutinariamente, para seleccionar transformantes con las nuevas construcciones, posteriormente se purificaron los plásmidos por lisis alcalina y se verificaron por análisis de restricción y secuenciación, por último se transformaron por choque térmico la diferentes cepas de *E. coli* para la expresión de los genes de penicilino acilasa (PA), interleucina-2 humana (hIL-2) e interferon-γ humano (INF-γ). Los sistemas de expresión para realizar los experimentos de este estudio se describen en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de los sistemas de expresión.

<i>E. coli</i>	Plásmido	Promotor	Resistencia	Inductor
W3110 F- λ - IN(rrnD-rrnE)1	pPA102	<i>lac</i>	Km ¹	Lactosa Galactosa IPTG
JM101 F- <i>traD36</i>	pPA102	<i>lac</i>	Km	Galactosa
<i>proA+</i> <i>proB+</i> <i>lacIq</i>	pGAL-sphIL2	<i>lac</i>	Km	Galactosa
$\Delta(lacZ)M15$ $\Delta(lac-$ <i>proAB)</i> <i>supE</i> <i>thi-1</i>	pGAL-wphIL2	<i>lac</i>	Km	Galactosa
λ -				
BL21-SI F- <i>ompT</i>	pET-IL2	T7	Amp ²	NaCl
<i>hsdSB(rB-,mB-)</i> <i>gal</i>	pEMR-IL2	T7	Amp	NaCl
<i>dcm</i> <i>endA1</i> <i>lon-</i> <i>proUp::T7</i>	pEMR-INF γ	T7	Amp	NaCl
<i>RNAP::malQ-lacZ</i> (TetS)				

1) Kanamicina, 2) Ampicilina

3.3.1. Plásmido pPA102

El plásmido pPA102 se obtuvo al rellenar los extremos cohesivos del sitio *HindIII* del plásmido pPA101 para generar el sitio *NheI* (Figura 5). Para ello, el plásmido pPA101 se cortó con *HindIII*, esta digestión se corrió en un gel de agarosa al 1 %, la banda de 6.8 kb correspondiente a pPA101 linealizado, se purificó con el kit *QIAquick* (QIAGEN No. Cat. 28704). En un sistema de reacción con ADN polimerasa *Klenow* (Tabla 8) los extremos cohesivos del sitio *HindIII* del plásmido pPA101, se rellenaron con dNTPs, la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se purificó el plásmido utilizando el kit

QIAquick (QIAGEN No. Cat. 28704), y se ligaron los extremos romos, se transformó por choque térmico *E. coli* DH5 α y se seleccionaron las transformantes en cajas de LB-kanamicina. El cambio del plásmido resultante denominado pPA102 se comprobó por análisis de restricción y secuenciación.

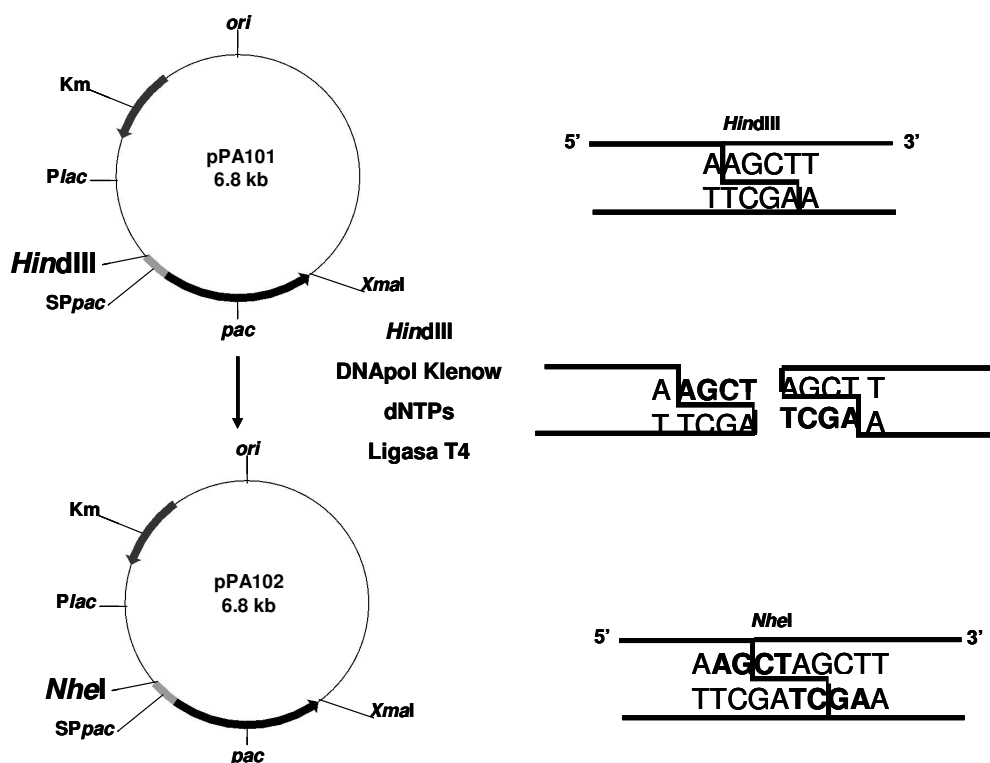


Figura 5. Construcción del plásmido pPA102.

Tabla 8. Sistema de reacción *Klenow*.

Componente	Cantidad (μ L)
Amortiguador 10x (REact 2 Invitrogen)	3
dNTPs 0.5 mM	1
pPA101 digerido con <i>Hind</i> III	10
Agua miliQ estéril	15
ADNpol <i>Klenow</i> (0.5 U/mL)	1
Total	30

3.3.2. Plásmido pGAL-sphIL2

El plásmido pGAL-sphIL2 se construyó al clonar el gen sintético de interleucina-2 humana fusionado el péptido señal de la penicilino acilasa (sphIL2) en los sitios *NheI* y *XmaI* del vector pPA102 (Figura 6). El gen sphIL2 fue optimizado para el uso de codones en *E. coli*, sintetizado por la compañía Entelechon (Rosenburg, Germany) y clonado en pCR4 (Invitrogen).

Las bases G59 y G60 de la secuencia nativa de SP*pac* se cambiaron por CA en la secuencia sintética (señaladas en la secuencia con negritas):

5'ATGAAAAATAGAAATCGTATGATCGTGAAGCTGTGTTACTGCTTCCCTGATGT
ATTATT**CAAGCTT**ACCTGCACTGGCT3', esta modificación generó el sitio *HindIII* y el cambio del codon de Trp por Ser.

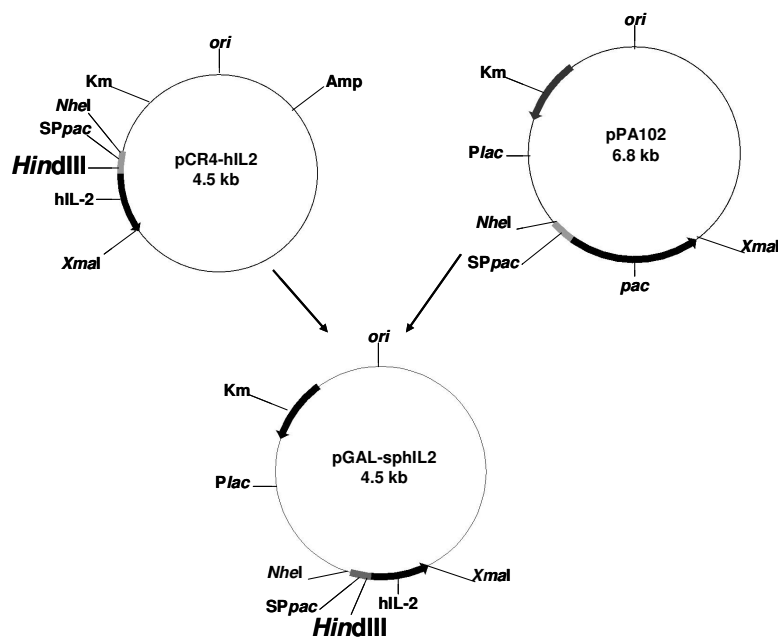


Figura 6. Construcción del plásmido pGAL-sphIL2.

3.3.3. Plásmido pGAL-wphIL2

La modificación del SP*pac* se revirtió por mutagénesis sitio dirigida (ver punto 4.2.2) y se obtuvo la hIL-2 fusionada al SP*pac* nativo, esta construcción se

denominó pGAL-wpHIL2 (Figura 7). Las bases en letras negras de los oligonucleótidos indican las bases que se cambiaron para revertir la mutación y cambiar el codon de Ser por el nativo de Trp. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Sentido: 5' GCTTCCCTGATGTATTATT**GG**AGCTTACCTGCACTGGC 3' y Anti-sentido: 5' GCCAGTGCAGGTAAGCT**CCA**ATAATACATCAGGGAAGC 3'

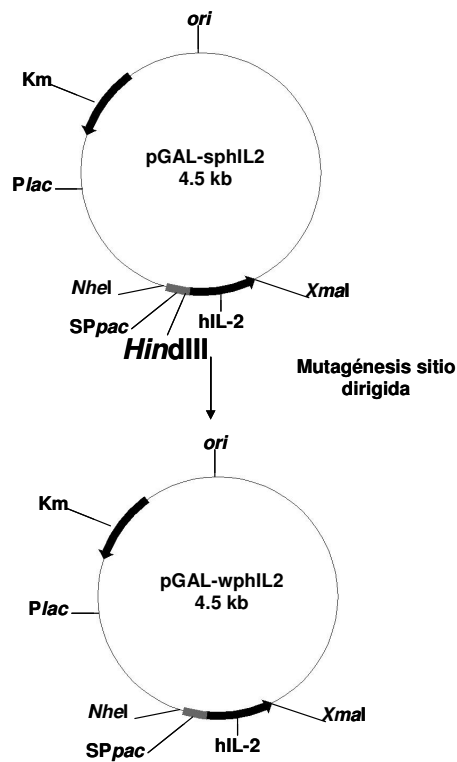


Figura 7. Construcción del plásmido pGAL-wpHIL2.

3.3.4. Plásmido pET12a-hIL2

El plásmido pGAL-sphIL2 se utilizó como molde para amplificar por PCR el gen de hIL2 y eliminar el SPpac con los siguientes oligonucleótidos:

Sentido 5' AAGCTTCCGCTAGCGAGAGGATACATATGGCCCCAACCTCCTCCTCT 3' y anti-sentido 5' CCCGGGGGATCCCTCGAG 3'. Los sitios *NdeI* y *BamHI* fueron utilizados para clonar el gen de hIL-2 en pET12a, esta construcción se denominó pET12a-hIL2.

3.3.5. Plásmido pEMR-hIL2 e pEMR-hINF γ

La construcción del plásmido pEMR y la clonación de los genes sintéticos de hIL-2 e INF- γ se describen en sección 5.3.

3.4. Preinóculo

El pre-inóculo se preparó en matraces de 500 mL con 100 mL de medio BSG o M9 (Anexo 1, Tablas A3 y A4) según el caso, adicionado con el antibiótico correspondiente, e incubado a 37 °C y 200 rpm, durante 14 horas.

3.5. Producción por lote en biorreactor

Los cultivos para la producción de rhIL-2 en biorreactor se llevaron a cabo en una jarra de 1 L conteniendo medio M9 con 5 g/L de galactosa (*E. coli* JM101/pGAL-sphIL2 y JM101/ pGAL-wphIL2) o BSG con 10 g/L de glucosa, o fructosa de jugo de *Agave* (*E. coli* BL21-SI/pET-IL2), adicionado con el antibiótico adecuado (Tabla 6). El medio de cultivo fue inoculado con una concentración celular correspondiente a una densidad óptica (DO_{620nm}) de 0.2.

Se utilizó un biorreactor Applikon automatizado y con control de pH, agitación, nivel de espuma, oxígeno disuelto (OD) y temperatura. El OD se midió con un electrodo polarográfico (Ingold) y se mantuvo a una concentración de 3 %

mediante la mezcla de gases de aire, nitrógeno y oxígeno utilizando rotámetros independientes (Applikon) y un algoritmo de control proporcional integral derivativo (PID). La agitación se mantuvo constante a 250 rpm y la temperatura se controló mediante un recirculador de inmersión (SEV). El pH se midió con un electrodo de pH autoclaveable (Applikon) y se controló a 7.0 ± 0.05 , mediante un controlador PID usando solución de NaOH 2 N, a través de una bomba peristáltica (Cole Palmer). Como antiespumantes se adicionó una solución de silicón (Sigma) al 0.1 %. El sistema completo de fermentación y adquisición de datos se muestra en la Figura 8.

A las muestras tomadas durante el cultivo se les determinó la concentración de biomasa; glucosa, galactosa o fructosa; proteína total y producción de rhIL-2.

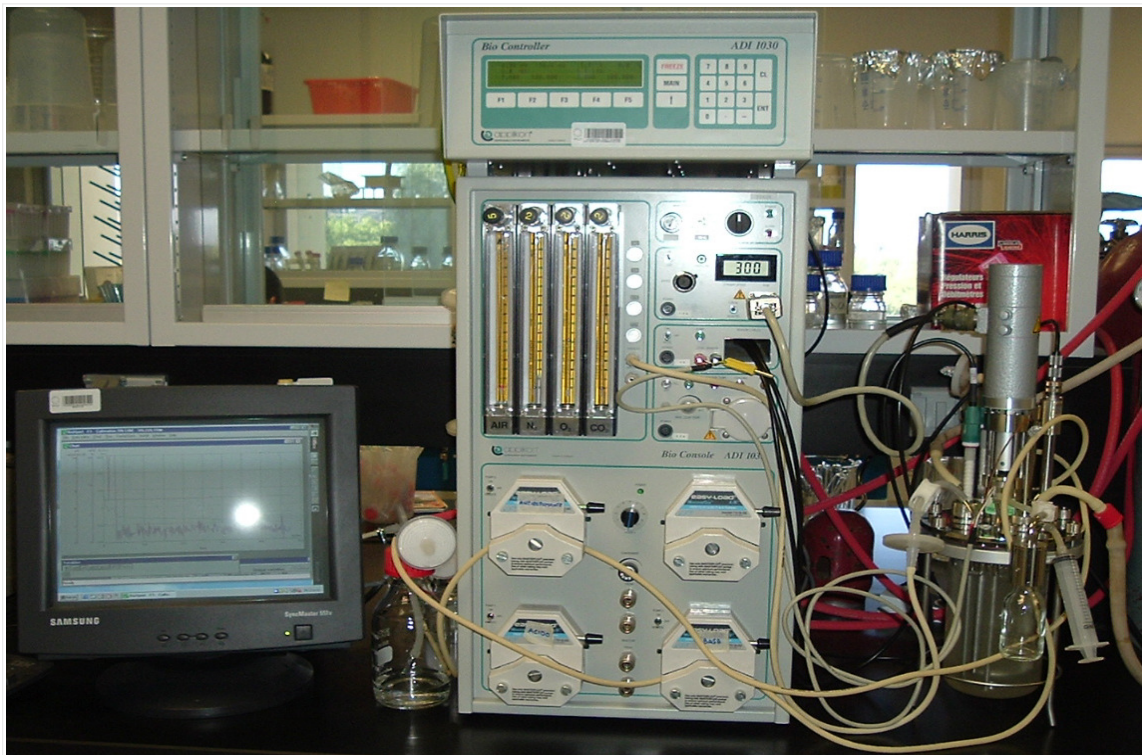


Figura 8. Biorreactor Applikon automatizado.

3.6. Producción en biorreactor *air lift*

El cultivo de *E. coli* JM101/pGAL-sphIL2 para la producción de rhIL-2 se realizó en un biorreactor *air lift* (SEV) de 2 L con un volumen de operación de 1.7 L y utilizando medio M9 con 5 g/L de galactosa como fuente de carbono e inductor, el pH se mantuvo en 7 con 2 N de NaOH con un controlador PID SEV, el OD se monitoreó durante el cultivo y la temperatura se controló a 28 °C mediante un recirculador de inmersión (SEV). El reactor fue inoculado con una concentración celular correspondiente a una densidad óptica (DO_{620nm}) de 0.2.

A las muestras tomadas durante el cultivo se les determinó, la concentración de biomasa, galactosa, proteína total y producción de rhIL-2.

3.7. Producción en cultivo por lote alimentado

El cultivo de lote alimentado se realizó en un biorreactor Applikon, con un volumen inicial de 170 mL de medio M9 con 5 g/L de galactosa como fuente de carbono e inductor, se inoculó con *E. coli* JM101/pGAL-sphIL2 a una concentración celular correspondiente a una densidad óptica (DO_{620nm}) de 0.2. El cultivo se incubó a 28 °C y agitó 250 rpm, el OD y pH se controlaron a 3 % y 7, respectivamente como se describe en el punto 3.5. Después de inocular el reactor, el cultivo se realizó en lote hasta llegar a una fase cuasi-estacionaria, en donde la concentración de biomasa y sustrato se mantienen constantes, posteriormente se alimento con medio M9 a una tasa de dilución de 0.03 h^{-1} , durante 68 h, el volumen final fue de 1 L. El cultivo se detuvo a las 92 h.

A las muestras tomadas durante el cultivo se les determinó, la concentración de biomasa, galactosa, proteína total y concentración de rhIL-2.

3.8. Procesamiento de las muestras de *E. coli* tomadas durante el cultivo

Se tomaron muestras de 1.5 mL a diferentes tiempos del cultivo y se centrifugaron a 16,000 x *g* durante 1 min. Al sobrenadante se le determinó la concentración de fuente de carbono, el pellet se resuspendió en 500 µL de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.8 (PBS), y se le determinó la concentración de proteína total y recombinante, como se describe adelante.

3.9. Fraccionamiento celular

Las proteínas de la fracción del periplasma y la fracción soluble e insoluble del citoplasma fueron obtenidas por el siguiente método: 1.5 mL de células con una DO_{620nm} de ~2 se centrifugaron a 8,000 x *g* durante 2 minutos, el paquete celular obtenido se resuspendió en 200 µL de amortiguador de choque osmótico (Anexo 1, Tabla A10), se incubó durante 5 minutos en hielo, posteriormente se centrifugaron a 8,000 x *g* durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue rápidamente resuspendido en 200 µL de agua miliQ con agitación vigorosa e incubado por 5 minutos más en hielo. La fracción del periplasma se recuperó en el sobrenadante después de centrifugar a 16,000 x *g* durante 2 minutos. Los protoplastos fueron resuspendidos en 200 µL de agua miliQ y sonicados en hielo durante 30 segundos, se centrifugaron a 16,000 x *g* durante 2 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo (fracción soluble del citoplasma) y el paquete celular se lavó 2 veces con agua miliQ y finalmente se resuspendió en 200 µL de agua miliQ (Robbens *et al.* 2006).

3.10. Determinación de biomasa

La concentración celular se determinó como densidad óptica (DO) a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Varian Cary Bio-50 y se convirtió a peso seco mediante una curva estándar de diferentes concentraciones de *E. coli* (Anexo 2, Figura A1).

3.11. Determinación de azúcares por DNS

La concentración de galactosa se cuantificó por el método para azúcares reductores (Miller, 1959). Se tomaron 250 μL de sobrenadante, se les adicionó 750 μL de la solución de ácido dinitrosalicílico (Anexo 1, Tabla A11), se calentó a baño María durante 15 min, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente, se agregaron 4 mL de H_2O destilada, se mezcló y leyó la $\text{DO}_{550\text{nm}}$. En algunos sobrenadantes se realizaron diluciones, para que las concentraciones de galactosa quedaran entre los intervalos de concentración de la curva estándar (Anexo 2, Figura A2).

3.12. Determinación de azúcares por HPLC

Las muestras se filtraron por una membrana de 0.45 μm antes de inyectarse al HPLC Waters. Se utilizaron 20 μL de muestra, que fue separada por una columna Dextropac (Waters), a temperatura controlada de 80 $^{\circ}\text{C}$ y un flujo de 1 mL/min de H_2O (grado milliQ) como fase móvil. La concentración de glucosa y fructosa se determinó con un detector de alta sensibilidad (Eurosep Inst DDL 31), las temperaturas de nebulización y evaporación del detector fueron de 40 y 60 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, la ganancia fue de 600 V. Las áreas correspondientes a los picos de glucosa o fructosa se integraron e interpolaron en las curvas estándar de glucosa y fructosa (Anexo 2, Figuras A3 y A4) por medio del software Millennium.

3.13. Cuantificación de proteína total

La concentración de proteína se determinó por el método espectrofotométrico de Lowry (1951). Se tomaron 200 μ L de células resuspendidas en PBS, se adicionó 1 mL de solución D (Anexo 1, Tabla A12), se agitó y posteriormente se incubó por 10 minutos, se adicionó 100 μ L de reactivo de folín e incubó 30 minutos, finalmente se determinó la DO_{590nm} . Las densidades ópticas se interpolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino (Anexo 2, Figura A5).

3.14. Preparación de geles de acrilamida de gradiente bajo condiciones desnaturalizantes

El uso de un gradiente de acrilamida para geles de electroforesis, tiene dos ventajas sobre los geles lineales. La primera es el incremento en la concentración de acrilamida, lo que permite obtener bandas más definidas. Los geles de gradiente también permiten la separación de proteínas de un amplio rango de peso molecular de 15 a 200 kDa en geles de 5 – 20 % o de 13 a 950 kDa en geles de 3 – 30 % (Bollag y Edelstein, 1991).

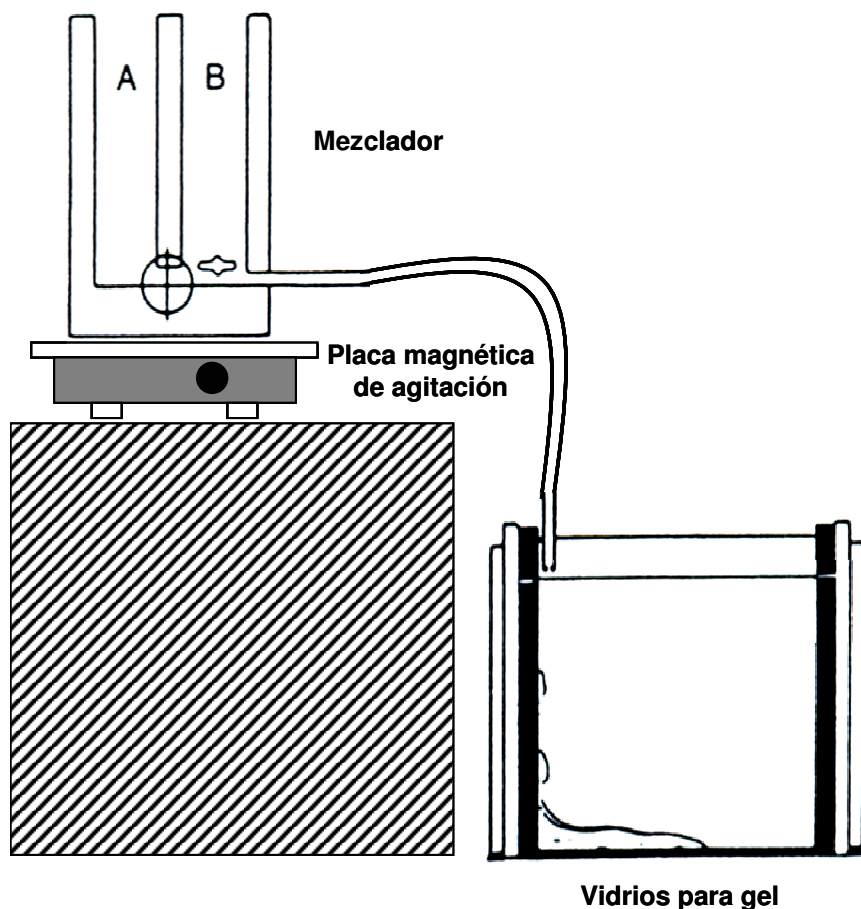


Figura 9. Sistema para geles de gradiente.

En la preparación de geles de gradiente se ensamblan los vidrios para geles de acrilamida e instala el mezclador sobre una placa magnética de agitación de tal forma que la manguera que sale del mezclador, quede entre los dos vidrios, tal como se muestra en la Figura 9, se adicionan las soluciones de 4 y 20 % de acrilamida (Anexo 1, Tabla A14), en los reservorios A y B, respectivamente. Para iniciar el gradiente se coloca un agitador magnético en el reservorio B, se enciende la placa de agitación y abre la válvula del mezclador, se vierte la solución de acrilamida entre los vidrios hasta un 1 cm menos de la parte superior, después de que polimerize el gel de gradiente se adiciona el gel concentrador al 4 % de acrilamida (Anexo 1, Tabla A16) y se coloca el peine. En tubos eppendorf se mezclan 10 μL de muestra y 10 μL de amortiguador de carga (Anexo 1, Tabla A16), se incuban a 96 °C durante 10 minutos y se cargan 10 μL por carril. En el

primer pozo del gel de gradiente se cargaron 3.5 μL de marcador de peso molecular Invitrogen (Cat. 10747-012). Los geles de 0.75 mm de grosor se corrieron a un voltaje constante de 120 volts, en amortiguador Tris-glicina pH 8.3 (Anexo 1, Tabla A17), a temperatura ambiente, durante 3 horas.

3.15. Western blot

Una vez que corrió el gel, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa mediante una cámara de electrotransferencia semi-seca (Bio Rad). Para esto, se colocaron sobre el ánodo en el siguiente orden: un papel filtro extra grueso, la membrana de nitrocelulosa, el gel de acrilamida y un papel filtro, previamente humedecidos con el amortiguador de transferencia *Towbin* (Anexo 1, Tabla A18) finalmente se colocó la placa del cátodo. La transferencia se realizó a 10 V durante 20 minutos.

La membrana se tiño con rojo de Ponceau, para cortar el marcador de peso molecular, se bloqueo durante 1 h con leche descremada svelty al 3 % en PBS (Anexo 1, Tabla A19), se incubó a 4 °C con el anticuerpo primario toda la noche (Anexo 1, Tabla A20), posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario 1 h, finalmente se reveló con 66 μL de NBT y 33 μL de BCIP (Amersham) diluidos en 10 mL de amortiguador AP (Tabla A21). La reacción se detuvo con agua destilada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de proteínas recombinantes utilizando fuentes de carbono alternas

El éxito de la producción de proteínas de interés biotecnológico en *E. coli*, se debe a los bajos costos de producción. La búsqueda de nuevas fuentes de carbono como son la fructosa de jugo de *Agave* utilizada como materia prima para la producción de mezcal en San Luis Potosí o la lactosa de suero de leche que es un sub-producto de la industria quesera, representan una alternativa en el desarrollo de nuevos medio de cultivo económicos para la producción de proteínas recombinantes de alto valor agregado. Por esta razón se evaluó la producción de rhIL-2 y penicilino acilasa, utilizando como fuente de carbono jugo de *Agave* y suero de leche, respectivamente.

4.1.1. Producción de rhIL-2 utilizando la fructosa de jugo de *Agave salmiana*

En el estado de San Luis Potosí las condiciones climatológicas favorecen el crecimiento del *Agave salmiana* o maguey. Esta planta es uno de los recursos naturales de importancia económica, que se destina para la producción de mezcal. Para ello la inulina que se encuentra en el centro de la planta se hidroliza en hornos rústicos durante 32 horas, para obtener el jugo de *Agave* con aproximadamente 85 % de fructosa, 14 % de glucosa y 1 % de sacarosa, el cual es sometido a procesos de fermentación con microorganismos nativos. Por su alto contenido de azúcares, se consideró al jugo de *Agave* como una fuente de carbono idónea para procesos de producción de proteínas de uso industrial o terapéutico por medio de microorganismos modificados genéticamente. Por esta razón, se estableció la producción en biorreactor de rhIL-2 en el citoplasma de *E. coli* BL21-SI/pET12a-hIL2, utilizando 10 g/L de fructosa de jugo de *Agave* en medio BSG, esta producción se comparó con procesos de posinducción basados

en glucosa. El jugo de *Agave* no inhibió el crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pET12a-hIL2 a pesar que, durante el procedimiento de cocción de la planta a altas temperaturas para hidrolizar la inulina se forma el compuesto indeseable 5-(hidroximetil)-2-furfural por la deshidratación de hexosas, que inhibe hasta en un 50 % el crecimiento de *E. coli* (Zaldivar *et al.* 1999). La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.29 h^{-1} , mientras que con glucosa fue de 0.17 h^{-1} . En el gel de acrilamida se muestra un incremento en la banda de 15.3 kDa correspondiente al peso molecular de rhIL-2 durante el cultivo en biorreactor (Figura 10A), esta banda fue confirmada por Western blot (Figura 10B).

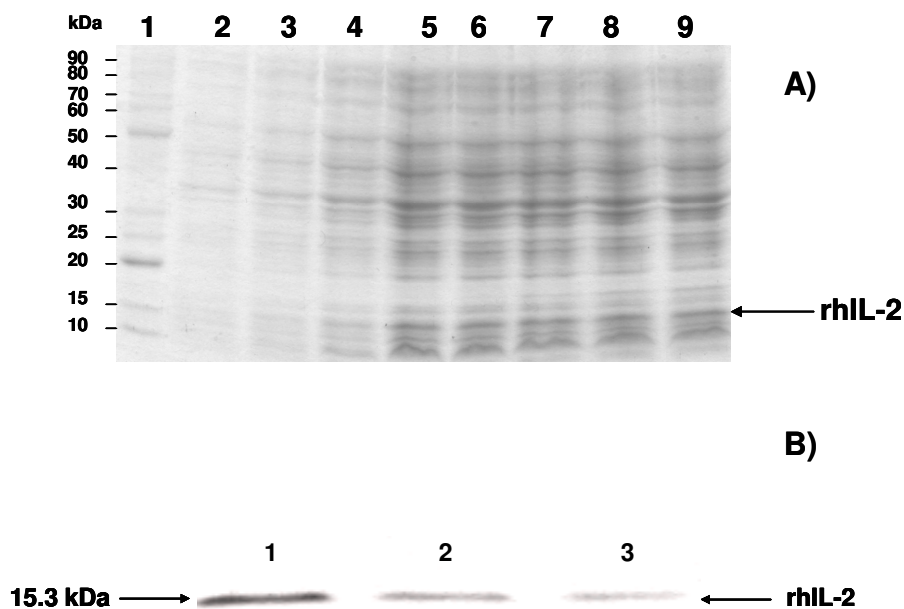


Figura 10. Producción de rhIL-2 en *E. coli* con jugo de *Agave* como fuente de carbono. A) Gel de acrilamida de gradiente (5-20 %), teñido con azul de Coomassie R-250. Carril 1, marcador de peso molecular (Invitrogen cat.10747-012). Los carriles del 2 al 9 muestran la producción de rhIL-2 a diferentes tiempos del cultivo durante 16.5 h después de inducir, un cultivo de 10 g L^{-1} de fructosa de jugo de *Agave* a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y 9 % de oxígeno disuelto. B) Western blot de rhIL-2. Carril 1 y 2 rhIL-2 a 11.5 y 13.5 h después de inducir; carril 3, 50 ng de estándar de rhIL-2.

Las cinéticas de los cultivos de *E. coli* BL21-SI/pET12a-hIL2 presentaron un crecimiento y consumo de sustrato típico, en donde después de agotarse el sustrato el crecimiento se detuvo (Figuras 11A y 11B). Cuando se utilizó fructosa de jugo de agave como fuente de carbono las concentraciones de proteína total y rhIL-2 fueron 1.65 mg mL^{-1} y 46.33 mg L^{-1} , respectivamente (Figuras 11A y 11C), aproximadamente el doble que cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, en donde se obtuvo 0.75 mg L^{-1} y 25.80 mg L^{-1} , respectivamente (Figuras 12A y 12C), esta diferencia de concentración de rhIL-2 podría deberse a que en medios de cultivo con fructosa la producción de ácido acético disminuye, efecto que favorece la producción de proteínas recombinantes (Aristidou *et al.* 1999). Los resultados anteriores mostraron, que el uso de fuentes de carbono de bajo costo, como el jugo de *Agave*, pueden ser una alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico, tal como la rhIL-2.

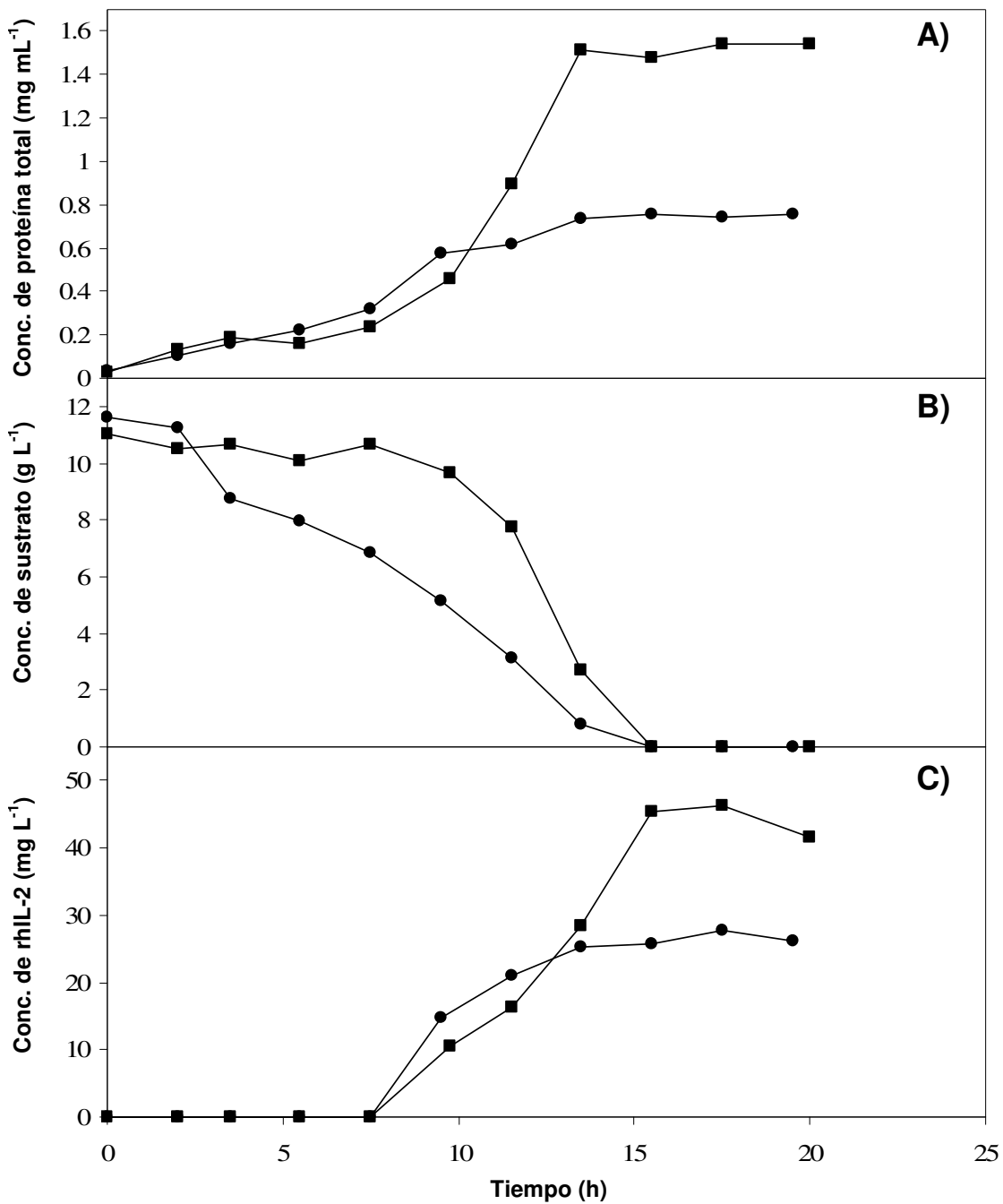


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pET12ahIL-2 en biorreactor en cultivo por lote con medio BSG. Los cultivos fueron inducidos con 0.3 M de NaCl a una DO_{620} de 0.6. A) proteína total, B) consumo de azúcar y C) producción de rhIL-2. Símbolos: ■) jugo de *Agave*, ●) glucosa.

4.1.2. Producción de penicilino acilasa utilizando la lactosa del suero de leche

El suero de leche es un subproducto de la industria quesera, representa entre el 85-90 % del volumen total de leche procesada, una pequeña proporción se utiliza para alimentar ganado y en la industria de alimentos, lo demás es descargado al medio ambiente y considerado un contaminante. Por su alto contenido en lactosa puede ser utilizado como una fuente de carbono alterna para la producción de proteínas recombinantes de alto valor agregado en *E. coli*, como es el caso de la enzima penicilino acilasa (PA), que hidroliza la penicilina G y derivados fenil-acéticos, esta enzima es utilizada en la industria farmacéutica para la producción de antibióticos semi-sintéticos. En este trabajo se evaluó el efecto que tiene el oxígeno disuelto (OD) y la concentración de lactosa de suero de leche como fuente de carbono e inductor sobre la producción de PA en *E. coli* W3110/pPA102. Se encontró que las mejores condiciones de operación fueron 5 g L⁻¹ de lactosa de suero de leche y 3 % de OD, la actividad específica máxima de PA fue de 781 U g⁻¹. Estos resultados demuestran que el suero de leche puede ser utilizado eficientemente en la producción de proteínas recombinantes, y así disminuir los contaminantes en el medio ambiente.

Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer

Antonio De León-Rodríguez^{a,*}, Dulce Rivera-Pastrana^a, Emilio Medina-Rivero^a,
José Luis Flores-Flores^b, Alejandro Estrada-Baltazar^c, Leandro G. Ordóñez-Acevedo^a,
Ana P. Barba de la Rosa^a

^a *División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78231 San Luis Potosí, S.L.P., Mexico*

^b *División de Ingeniería Ambiental y Recursos Naturales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78231, San Luis Potosí, S.L.P., México*

^c *Departamento de Ingeniería Química, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y García Cubas s/n, Celaya, Gto. 38010, Mexico*

Received 14 February 2006; received in revised form 27 September 2006; accepted 29 September 2006

Abstract

Cheese whey (CW) is the major subproduct from cheese manufacturing and it is considered as a waste pollutant since its high content of lactose. In this work a fermentation process for the production of penicillin acylase (PA) by a recombinant *Escherichia coli* and using CW as unique carbon source and inducer was developed. A design factorial 3^2 was used to evaluate the influence of independent variables (dissolved oxygen and CW concentration) on the ability of *E. coli* W3110/pPA102 to produce PA. Maximum specific PA activity of 781 U g^{-1} was attained at 5 g L^{-1} of CW and 3% dissolved oxygen. The results showed that CW can be used successfully as unique carbon source and inducer for the production of recombinant proteins using constructions driven by the *lac* promoter and this way reducing the discharges of that pollutant to the environment. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Batch processing; Growth kinetics; Lactose; Recombinant DNA; Protein

1. Introduction

Cheese whey (CW) is the major subproduct obtained from the manufacture of cheese, representing a 85–90% of the total volume of milk processed. Only a minor proportion of this subproduct is re-used for food ingredients and animal feed, the rest is discharged to the environment and it is considered a strong pollutant due to the high amount of compounds, such as lactose, lactoalbumin, lactic acid and minerals. Since its high content of lactose, CW is a potential raw material for fermentative processes. Several proposals for the production of organic solvents (Ennis and Maddox, 1987; Porro et al., 1992; Varela et al., 1992; Huang and Yang, 1998; Lee et al., 2000; Altaras et al., 2001; Qureshi and Maddox, 2003), organic acids (El-Samragy et al., 1996), biopolymers such as xanthan gum (Konicek and Konickova-Radochova, 1994),

polyhydroxybutyrate (Ahn et al., 2000) and proteins (Kumar et al., 1992; Maullu et al., 1999; Rubio-Teixeira et al., 2001; Liu et al., 2004) have been described as alternative to re-use CW. The microorganisms used in these reports were yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, and bacteria such as *Clostridium* and *Lactococcus* (Huang and Yang, 1998; Qureshi and Maddox, 2003; Liu et al., 2004). Despite of the advantages of *Escherichia coli* as expression system (Neubauer and Hofmann, 1994; Gombert and Kilikian, 1998), few reports of the use of recombinant *E. coli* for the production of proteins using CW as unique carbon source and inducer have been described. Viitanen et al. (2003) used CW as inducer and glycerol as carbon source in fed-batch cultures for the production of muraminidase by a recombinant *E. coli*. They concluded that the yield of the recombinant product was comparable to fermentations induced by isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

The penicillin acylase (PA; E.C. 3.5.1.11) hydrolyzes penicillin G and other phenyl-acetic derivatives and it is currently used for the production of semi-synthetic antibiotics

* Corresponding author. Tel.: +52 444 8342000; fax: +52 444 8342010.
E-mail address: aleonr@ipicyt.edu.mx (A. De León-Rodríguez).

4.2. Procesamiento de rhIL-2 a partir de *E. coli* JM101/pGALsphIL-2

El gen de hIL-2 fue fusionado al péptido señal de la penicilino acilasa (SP_{pac}) para evaluar el transporte de rhIL-2 en el periplasma de *E. coli* JM101 por la vía Tat y la producción en biorreactor. Para realizar estos estudios de transporte se seleccionó una clona sobre-productora de rhIL-2. La concentración de rhIL-2 se estimó por densitometría en un Western blot. De 5 clonas se seleccionó la clona 2. La Figura 12 muestra el Western blot de la preproteína y rhIL-2 madura. Se puede observar que la mayor cantidad de la proteína recombinante se encuentra en el carril 2 como pre-proteína que corresponde a la clona 2. Con esta clona se realizaron cultivos para evaluar el procesamiento de rhIL-2 en biorreactor en lote con limitación de oxígeno disuelto (OD), *air lift* y lote alimentado.

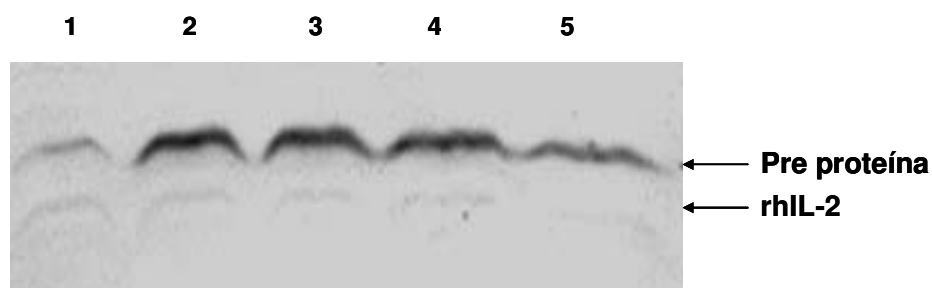


Figura 12. Western blot de rhIL-2 producida en *E. coli* JM101/pGALsphIL-2. Los carriles 1 al 5 corresponden a 5 clonas diferentes.

4.2.1. Producción de rhIL-2 en biorreactor

Con la finalidad de incrementar el procesamiento de la preproteína y el transporte de rhIL-2 al periplasma de *E. coli*, se realizaron cultivos en biorreactor agitado con limitación de OD (3 % de OD), basados en estudios previos, en donde demostraron que a bajos niveles de OD, incrementa la producción y procesamiento de la penicilino acilasa en *E. coli* JM101 en medio M9 (De León *et*

al. 2003a). El crecimiento y consumo de sustrato de *E. coli* JM101/pGALsphIL-2 fueron típicos de *E. coli*, la concentración máxima de biomasa fue de 1.58 g L^{-1} (Figura 13A), la rhIL-2 solamente se encontró como pre-proteína y la producción esta asociada al crecimiento (Figura 13A). La producción máxima de la preproteína y proteína total fueron de 2 mg L^{-1} y 0.74 , respectivamente, a las 20 h de cultivo se observó que la preproteína se degrada en un 20 % (Figuras 13A y 13B).

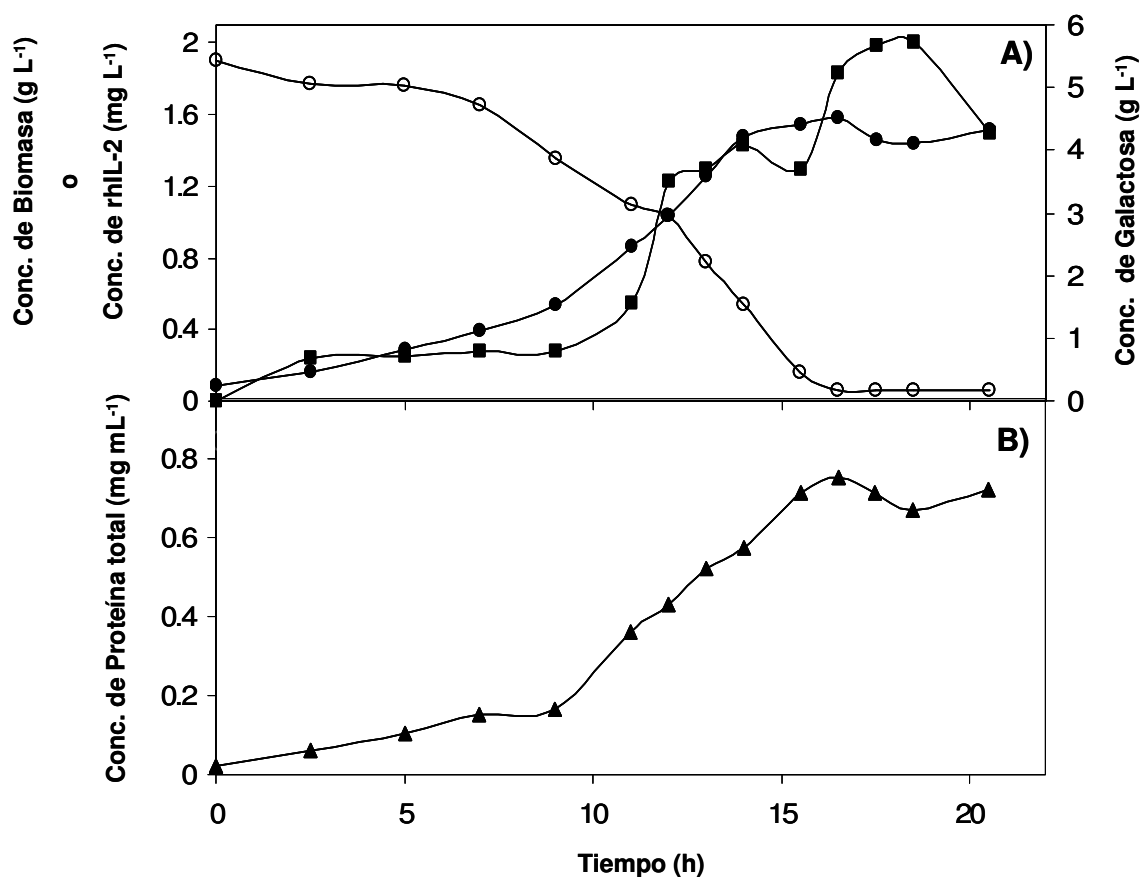


Figura 13. Cinética de crecimiento de *E. coli* JM101/pGALsphIL-2 en biorreactor con limitación de OD en medio M9. Biomasa (●), rhIL-2 (■), galactosa (○) y proteína total (▲).

En el caso del biorreactor tipo *air lift*, el resultado con respecto al procesamiento de rhIL-2 fue el mismo que en caso anterior, la producción máxima de pre-proteína fue de 1.15 mg L^{-1} (Figura 14A), 49.25 % menos que con limitación de OD, la

preproteína se degradó en un 48 % después de 27 h de cultivo (Figura 14A). La concentración de biomasa y proteína total después de haberse agotado la galactosa fueron de 1.78 g L⁻¹ y 0.83 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 14A y 14B).

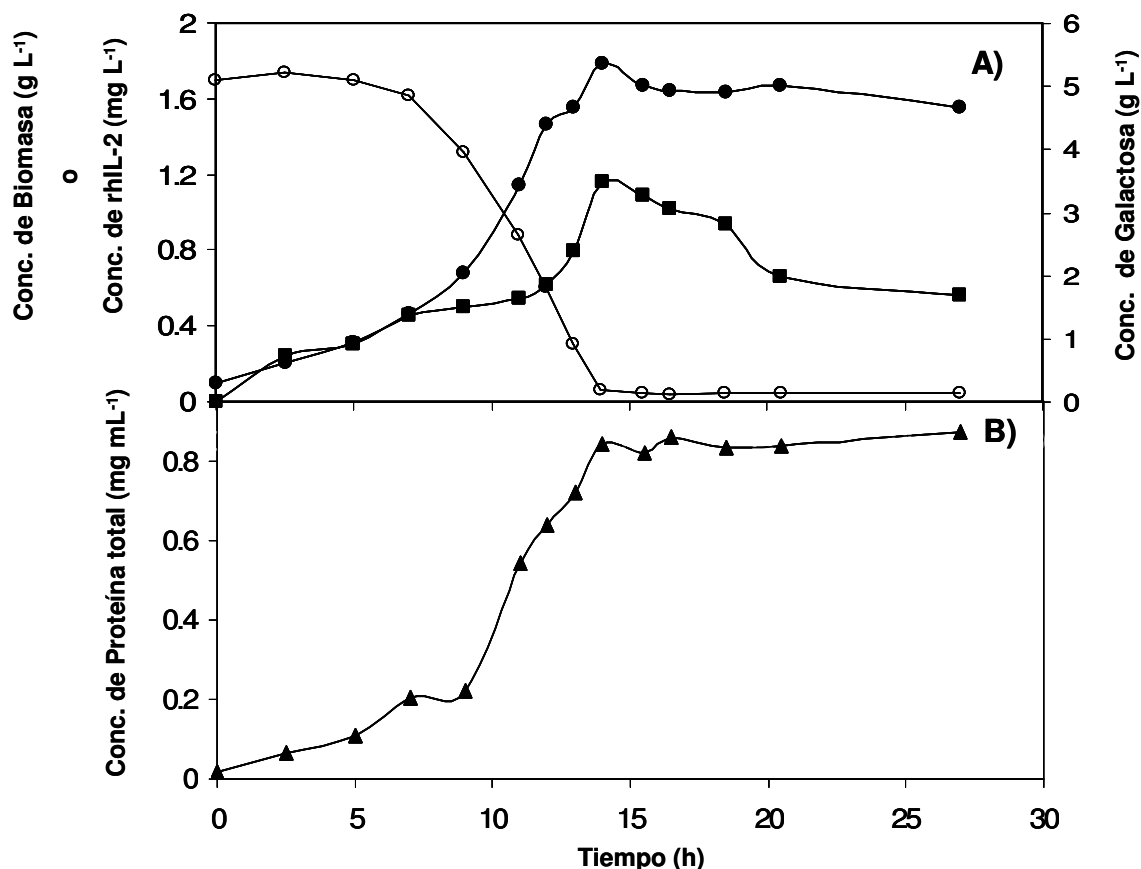


Figura 14. Cinética de crecimiento de *E. coli* JM101/pGALsphIL-2 en biorreactor *air lift* con medio M9. Biomasa (●), rhlL-2 (■), galactosa (○) y proteína total (▲).

La producción máxima de preproteína en lote alimentado fue de 1.66 mg L⁻¹ (Figura 15A) después de 20 h del inicio de la fase cuasi-estacionaria, a pesar de que en estudios previos en biorreactor de lote alimentado han demostrado un incremento en la producción de proteínas recombinantes y el procesamiento de proteínas que requieren ser secretadas al espacio periplasmático de *E. coli* (Sanden *et al.* 2003, Ramírez *et al.* 1994), en el caso de rhlL-2, solo se encontró

como preproteína y no se obtuvo un incremento importante de rhIL-2 con respecto a los cultivos en lote. El cultivo se mantuvo en un estado cuasi-estacionario durante 70 h, en donde la concentración de biomasa y galactosa fueron constantes (Figura 15A), durante este período el biorreactor fue alimentado con medio M9 y galactosa a una dilución de 0.03 h^{-1} . La producción máxima de biomasa y proteína total fueron de 1.67 g L^{-1} y 0.6 mg mL^{-1} , respectivamente (Figuras 15A y 15B).

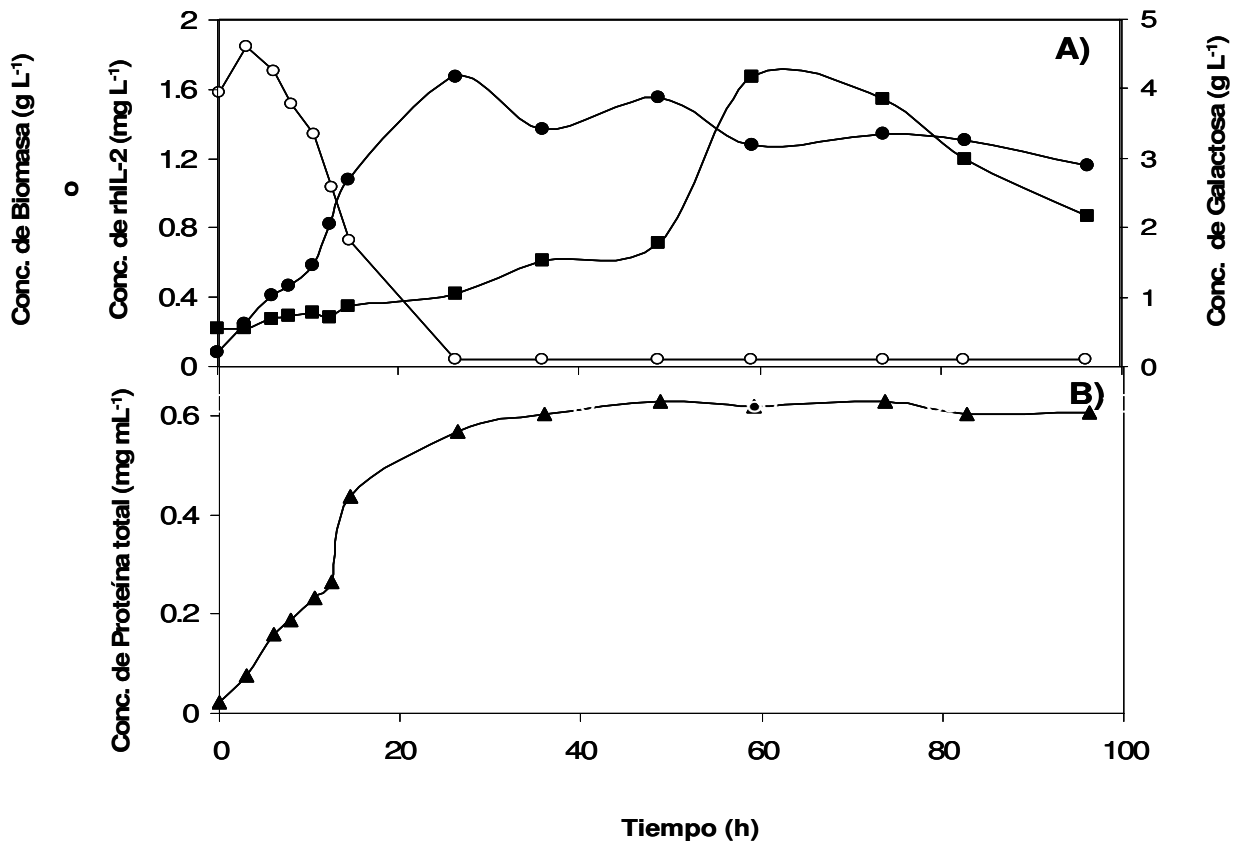


Figura 15. Cinética de crecimiento de *E. coli* JM101/pGALsphIL-2 en cultivo por lote alimentado con medio M9. Biomasa (●), rhIL-2 (■), galactosa (○) y proteína total (▲).

En los estudios de diferentes condiciones de cultivo en biorreactor con JM101/pGALsphIL2, no se encontró rhIL-2 procesada, esto podría deberse a que la proteína madura se encuentra en bajas concentraciones tal como se muestra en la Figura 12 o bien la proteína es degradada rápidamente. Con base en estos

resultados se decidió evaluar el transporte de rhIL-2 en el sistema de expresión *E. coli* BL21-SI, en donde la producción de rhIL-2 fue 25 veces mayor, los resultados se presentan en la siguiente sección.

4.3. Producción de hINF- γ e hIL-2 en el periplasma de *E. coli* BL21-SI

La secreción de proteínas recombinantes en el periplasma de *E. coli*, tiene ventajas con respecto a la expresión en el citoplasma, tales como: el péptido señal se corta lo que permite obtener un N-terminal correcto, se forman puentes disulfuro por las oxidoreductasas del periplasma, disminuye la degradación proteolítica y facilita la recuperación de la proteína para su purificación. El transporte de proteínas por la vía Tat tiene ventajas con respecto a la vía Sec, debido a que puede transportar proteínas complejas que contengan FeS, Ni-Fe, centros de molibdoterina y grupos hemo. Otras ventajas son que en condiciones aerobias pocas proteínas usan esta vía y la vía Tat no es esencial, por lo que el complejo Tat puede ser modificado para la secreción de proteínas específicas. Por tal motivo en este trabajo se diseñó el vector de expresión pEMR, que contiene el SP $_{pac}$ y el promotor T7, se utilizaron como proteínas modelo rhIL-2 y rhINF- γ para evaluar el transporte. Se encontró que el rhINF- γ fue soluble en el periplasma, mientras que rhIL-2 fue parcialmente procesada en el citoplasma. Estos resultados sugieren que el transporte de proteínas recombinantes depende de las características nativas de la proteína.

Secretion of recombinant proteins to the periplasmic space using the Tat pathway in *Escherichia coli*

E. Medina-Rivero, V.E. Balderas-Hernández, L.G. Ordoñez-Acevedo, L.M.T. Paz-Maldonado, A.P. Barba-De la Rosa and A. De León-Rodríguez*.

Division of Molecular Biology, Institute for Scientific and Technological Research of San Luis Potosi, Camino a la Presa San Jose 2055 Lomas 4^a. Sección C.P. 78216, San Luis Potosi, S.L.P., Mexico.

*Corresponding author

Fax: +52-444-8342010

e-mail: aleonr@ipicyt.edu.mx

Submitted to: Biotechnology Letters

Keywords Periplasm, pEMR, Signal peptide, Therapeutic protein, Tat pathway

Abstract

Secretion of recombinant human interferon- γ (rhINF- γ) and human interleukin-2 (rhIL-2) to the periplasmic space by the Tat pathway in *Escherichia coli* BL21-SI is described. Secretion was obtained using the expression/translocation pEMR vector that contains the modified penicillin acylase signal peptide driven by T7 promoter. We found that rhINF- γ was produced as a soluble form in the periplasm, whereas rhIL-2 was partially processed in the cytoplasm.

Introduction

Escherichia coli is the most common host used in recombinant DNA technology for over-expression of proteins that do not require glycosylation. *E. coli*, has a periplasmic space where recombinant proteins can be secreted and purified. Production of secreted recombinant proteins has advantages over cytoplasm production such as, the signal peptide is removed leaving the correct N-terminal, disulfide bonds are formed, degradation is reduced due to fewer proteases, and recombinant proteins can be released by osmotic shock, facilitating the purification process (Makrides 1996). The Sec system is the main route to transport unfolded periplasmic and outer membrane proteins. Signal sequences such as OmpT, OmpA, PhoA and MalE have been fused used to transport the recombinant proteins to the periplasmic space (Ignatova *et al.* 2003; Hytonen *et al.* 2004; Xu *et al.* 2002; Pratap and Dikshit 1998). The Twin arginine translocation (Tat) system was identified as a transport mechanism for a specific group of periplasmic proteins (Palmer *et al.* 2005). The Tat system is a complex composed of TatABCE proteins, with a relative mass of 600 kDa. Proteins secreted by Tat pathway require a signal peptide with the consensus sequence S/TRRXFLK (Palmer *et al.* 2005). The TorA is the most studied Tat signal peptide (Thomas *et al.* 2001). There are some exceptions of Tat-canonical signal peptides, for example *E. coli* penicillin acylase signal peptide (SP_{pac}) has a small and unusual Tat signal peptide with an asparagine separating the twin arginine motif (Ignatova *et al.* 2002) and *Salmonella enterica* tetrathionate reductase (TtrB) contains only a single arginine residue (Hinsley *et al.* 2001). Previous work showed that the SP_{pac} drives translocation of pre-penicillin acylase specifically by the Tat pathway and it is not substrate for Sec machinery (Ignatova *et al.* 2002).

The Tat machinery presents advantages over the Sec pathway. First, the Tat pathway can transport complex proteins containing FeS, Ni-Fe, molybdopterin center (Berks 1996; Palmer *et al.* 2005), heme group (Sturm *et al.* 2006) and multidisulfide bonds (Kim *et al.* 2005). Second, under aerobic conditions, few

proteins use the Tat pathway, making this system readily available (Robinson and Bolhuis 2004). Proteomic analysis and bioinformatics indicate that only 5-8% of secreted proteins are transported by the Tat pathway (Berks 1996). Third, unlike the Sec route, the Tat pathway is not essential, thus the Tat complex can be modified for secretion of specific proteins (Bogsch *et al.* 1998).

In this work, we described the design of an expression system driven by T7 promoter and a SP*pac* for the secretion of recombinant proteins to the periplasmic space using the Tat pathway in *E. coli*. The system was tested for the transport of human interferon- γ (rhINF- γ) and human interleukin-2 (rhIL-2) in *Escherichia coli* BL21-SI.

Materials and Methods

Construction of pEMR

An expression/transport vector was constructed using a pBR322 origin, the *bla* gene and the modified SP*pac* under control of T7 promoter (Fig. 1). To facilitate the cloning of the target genes, we introduced restriction sites in the wild-type SP*pac*. The changes were: 1) the insertion of CAT at position 1 generated a *Nde*I site (CATATG) right in front of the start codon (ATG). 2) The change of G for A at position 60 generated a *Hind*III cloning site (AAGCTT) and changed the amino acid sequence from tryptophan for a serine. It has been reported that this mutation improves the transport of penicillin acylase (Monroy-Lagos *et al.* 2006). 3) The changes of A for G at position 72 and G for A at position 75, both generated a *Nhe*I site (GCTAGC), but did not change the amino acid sequence. The mutations were carried out using the Quick-change site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla CA) and were confirmed by sequencing. The modifications in SP*pac* let the

cloning of genes encoding proteins with biotechnological interest. The resultant plasmid was identified as pEMR (Mexican patent pending No. NL/a/2006/000069).

Bacterial strains and plasmids

E. coli DH5 α was used for routinely plasmid screening and was grown at 37 °C in Luria-Bertani medium (LB). The pCR4-516 and pCR4-556 vectors containing the synthetic hINF- γ and hIL-2 genes, respectively, were purchased from Entelechon GmbH (Regensburg, Germany). The *Hind*III and *Bam*HI sites were added to hINF- γ synthetic gene by PCR using pCR4-516 as template and the primers sense 5'-aagcttacctgcactgcctcaggaccacatagtgaaa-3' and anti-sense 5'-ggatccttactgacttgc-3'. The *Hind*III-hINF- γ -*Bam*HI amplified fragment was cloned in the pEMR vector to construct pEMR-hINF γ , then *E. coli* BL21-SI (GIBCO, Darmstadt, Germany) was transformed by heat-shock method with the pEMR-hINF γ plasmid and transformant clones were selected on LBON medium (Luria-Bertani salt free) with 100 μ g ml⁻¹ ampicillin. For the construction of pEMR-hIL2, the same protocol described above was used, but using the pCR4-556 as template and the primers sense 5'-aagcttacctgcactggctgccccaacctcctcc-3' and anti-sense 5'-ggatccattaagtaaggtgga-3' for the PCR.

Media and culture conditions

E. coli BL21-SI/pEMR-hINF γ and *E. coli* BL21-SI/pEMR-hIL2 were grown in minimum medium containing per liter: 5.0 g glucose, 3.5 g (NH₄)₂HPO₄, 3.5 g KH₂PO₄, 1.0 g MgSO₄, 40 μ g thiamine, 100 mg ampicillin and 3 ml of trace elements solution (containing per liter: 27 g FeCl₃, 2 g ZnCl₂, 2 g CoCl₂·6H₂O, 2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 1 g CaCl₂·2H₂O, 1 g CuCl₂·2H₂O, 0.5 g H₃BO₃ and 100 ml HCl). The pH was adjusted to 7.4 with NaOH prior to sterilization (15 min at 121 °C). Batch cultures were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml of minimum medium inoculated at a cell density of 0.2 at 620 nm and incubated at 37 °C and 250 rpm. The cultures were induced with 0.3N NaCl when they reached a cell density of 0.6. For all experiments, pre-inocula in minimum medium plus 5 g l⁻¹

of yeast extract (Difco Labs. Frankling Lakes, NJ) were grown overnight at 37°C and 250 rpm.

Cell fractionation

Periplasmic, soluble and membrane fractions were obtained as described previously (Robbens et al. 2006). Then protein were separated in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed by western blot as described below.

Analytical methods

Biomass concentration was determined from optical density measurements at 620 nm in a Varian Cary Bio-50 spectrophotometer and converted to dry cell weight (DCW) using a standard curve. The concentration of glucose was measured with a high sensitivity evaporative light scattering detector (Eurosep Inst. DDL 31) after separation by HPLC with a Shodex SP0810 column (Waters) maintained at 80 °C and using 1 ml min⁻¹ of H₂O (MilliQ grade) as the mobile phase. Total protein concentration was quantified Lowry method at 590 nm using a UV-visible spectrophotometer Varian (Model Cary Bio 50). The protein was separated by SDS-PAGE with Tris-glycine buffer in 5-20% linear polyacrylamide gradient gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane for Western blot analysis in a semi dry Trans-blot (Bio-Rad). The nitrocellulose membranes were blocked with 3 % (w/v) Svelty milk (Nestle) for 1 h. For rhINF- γ or rhIL-2 detection, respective rabbit polyclonal antibodies (Peprotech) were used at 0.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Goat anti-rabbit immunoglobulin conjugated with alkaline phophatase (Bio-Rad) diluted to 1:3000 was used as secondary antibody. The blot was developed with *p*-nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, sodium salt (NBT/BCIP, Amersham Biosciences). Densitometry of nitrocellulose membranes was carried out using a photo-documenter Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) and using the Quantity OneTM v 4.5 software (Bio-Rad). Recombinant hINF- γ and hIL-2 (Preprotech) were used as standards. The concentration of soluble rhIL-2 and rhINF- γ were quantified by ELISA (R&D).

Results and Discussion

Expression of rhINF- γ and rhIL-2

Typical batch cultures of *E. coli* BL21-SI/pEMR-hINF γ and *E. coli* BL21-SI/pEMR-hIL2 are shown in the Fig. 2 and 3 respectively. In both cases, glucose was consumed and cell growth ceased upon glucose depletion. The growth rate was 0.22 and 0.25 h⁻¹ for cultures producing rhINF- γ and rhIL-2, respectively. The maximum amount of rhINF- γ was 41.6 mg l⁻¹ after 5.5 h of induction (Fig. 2B). The highest cell density attained and total protein concentration were 1.46 g_{DCW} l⁻¹ and 0.45 mg ml⁻¹, respectively at 18.5 h (Fig. 2B and 2C). The analysis by Western blot showed that pre-rhINF- γ was efficiently cleaved, and all recombinant protein was found as mature protein with a molecular weight of 17 kDa (Fig. 4A). Whereas, only 15 % of pre-rhIL-2 was processed and Western blot showed both the pre-protein and mature rhIL-2 with molecular weight 17.5 and 15.5 kDa, respectively (Fig. 4B). These results shown, that the aminoacid sequence of the protein is important for obtaining efficient processing. For the culture with *E. coli* BL21-SI/pEMR-hIL2, the maximum cell density and total protein concentration were 1.22 g_{DCW} l⁻¹ and 0.40 mg ml⁻¹, respectively (Fig. 3A and 3C). In this case, both pre-rhIL-2 and mature rhIL-2 were observed during all time of culture, with maximum concentration of 197.5 and 84.9 mg l⁻¹, respectively (Fig. 3B).

Cell fractionation analysis

The rhINF- γ was found in the periplasm, soluble and insoluble fractions at 5.34, 2.86 and 91.80 %, respectively (Fig. 5A). Despite only a fraction of the rhINF- γ was exported, the soluble rhINF- γ recovering can be carried out by simple cell-permeation protocols (Robbens *et al.* 2006). This result demonstrated that modified SP ρ ac led the secretion of rhINF- γ by Tat pathway. Kim *et al.*, (2005) reported the TorA signal peptide is capable of transporting complex eukaryotic proteins such as the human tissue plasminogen activator to the bacterial periplasm by the Tat pathway. For the case of hIL-2, the mature recombinant protein was detected in

both, the soluble and insoluble fractions (9.82 and 7.28 %, respectively) and as pre-protein in the soluble and insoluble fractions (3.58 and 79.32 %, respectively) (Fig. 5B). However, we did not find rhIL-2 in the periplasmic space. van Kimmenade et al. (1989) reported that rhIL-2 fused to OmpA signal peptide could not be transported by the Sec pathway. These results suggest that efficient transport of recombinant proteins is determined by the native protein characteristics as well.

Acknowledgments

This work was funded by a CONACyT Grant J39639-Q and a FOMIX grant FMSLP-2002-4100. E. Medina-Rivero was supported by a CONACyT fellowship No. 157496. We thank Dr. Roderick Mackie (University of Illinois) for English corrections and Dr. A. De Las Peñas and Dr. I. Castaño (IPICyT) for critical reading of the manuscript.

Referentes

- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**: 393-404.
- Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C and Palmer T (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**: 18003-18006.
- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T and Berks BC (2001) A naturally occurring bacterial tat signal peptide lacking one of the “invariant” arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.* **497**: 45-49.
- Hytonen VP, Laitinen OH, Airene TT, Kidron H, Meltola NJ, Porkka EJ, Horha J, Paldanius T, Maatta JA, Nordlund HR, Johnson MS, Salminen TA,

- Airenne KJ, Yla-Herttuala S and Kulomaa MS (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **384**: 385-390.
- Ignatova Z, Hörnle C, Nurk A and Kasche V (2002) Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: 146-149.
- Ignatova Z, Mahsunah A, Georgieva M and Kasche V (2003) Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1237-1245.
- Kim JY, Fogarty EA, Lu FJ, Zhu H, Wheelock GD, Henderson LA and DeLisa MP (2005) Twin-arginine translocation of active human tissue plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8451-8459.
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.
- Monroy-Lagos O, Soberon X, Gaytan P and Osuna J (2006) Improvement of an unusual twin-arginine transporter leader peptide by a codon-based randomization approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3797-3801.
- Palmer T, Sargent F and Berks BC (2005) Export of complex cofactors-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* **13**: 175-180.
- Pratap J and Dikshit KL (1998) Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 326-333.
- Robbens J, De Coen W, Fiers W and Remaut E (2006) Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in *Escherichia coli* through a single aminoacid change at the cleavage site. *Process Biochem.* **41**: 1343-1346.

- Robinson C and Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 135-147.
- Sturm A, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lilie H and Brüser T (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of tat-dependently translocated hemoproteins. *J. Biol. Chem.* **281**: 13972-139978.
- Thomas JD, Daniel RA, Errington J and Robinson C (2001) Export of active green fluorescent protein to periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **39**: 47-52.
- van Kimmenade A, Dang W and Kastelein RA (1989) Secretion of murine and human interleukin-2 by *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **11**: 11-24.
- Xu R, Du P, Fan JJ, Zhang Q, Li TP and Gan RB (2002) High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **24**: 453-459.

Figure legends

Figure 1. Expression vector pEMR. Abbreviation, Amp: ampicillin resistance gene (β -lactamase), *ori*: ColE1 origin of replication, SP*pac*: modified signal peptide from penicillin acylase, T7: T7 promoter.

Figure 2. Growth Kinetics of *E. coli* BL21 SI/pEMR-hINF- γ in 500 ml flask containing 100 ml of minimal medium. (●) Biomass concentration, (○) Glucose concentration, (□) rhINF- γ concentration, (▲) Total protein concentration.

Figure 3. Growth Kinetics of *E. coli* BL21 SI/pEMR-hIL-2 in 500 ml flask containing 100 ml of minimal medium. (●) Biomass concentration, (○) Glucose concentration, (■) pre- rhIL-2 concentration, (□) rhIL-2 concentration, (▲) Total protein concentration.

Figure 4. Western blot analysis for the rhINF- γ and rhIL-2 obtained in *E. coli* BL21-SI cultures. Total cells lysate of BL21-SI/pEMR-hINF γ (A) and BL21-SI/pEMR-hIL2 (B). Lanes 1-5 are samples at different time points of the culture during 22.5 h after induction. Lane 6 is 50 ng of recombinant hINF- γ (A) and hIL-2 (B) used as standard.

Figure 5. Cell fractionation analysis of rhINF- γ (A) and rhIL-2 (B). The plots show the fraction of recombinant rhINF- γ (A) and rhIL-2 (B) in periplasm (P), soluble (S) and insoluble (I) cell fractions, these fractions were determinate by densitometry of Western blot. The black and gray bars correspond to mature and pre-protein, respectively.

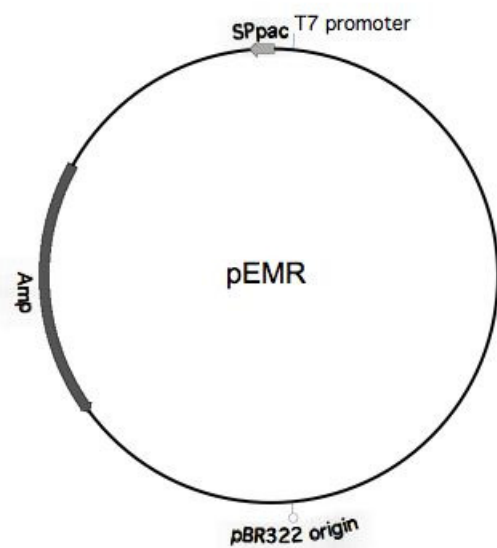
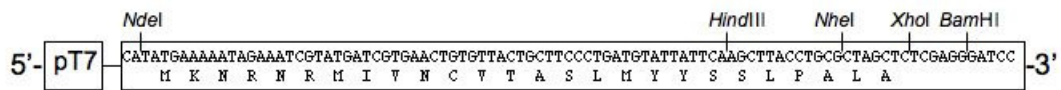


Figure 1.

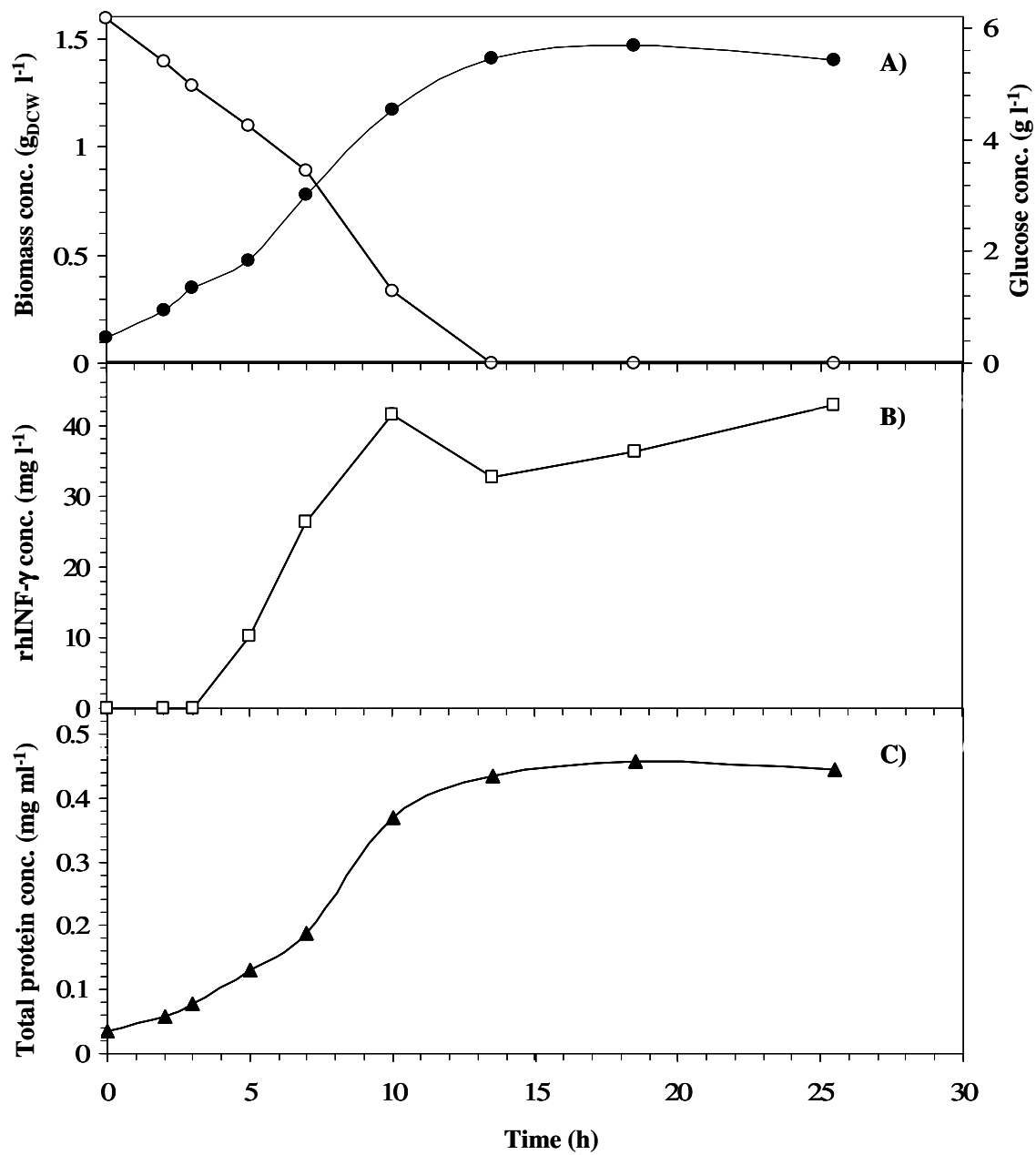


Figure 2.

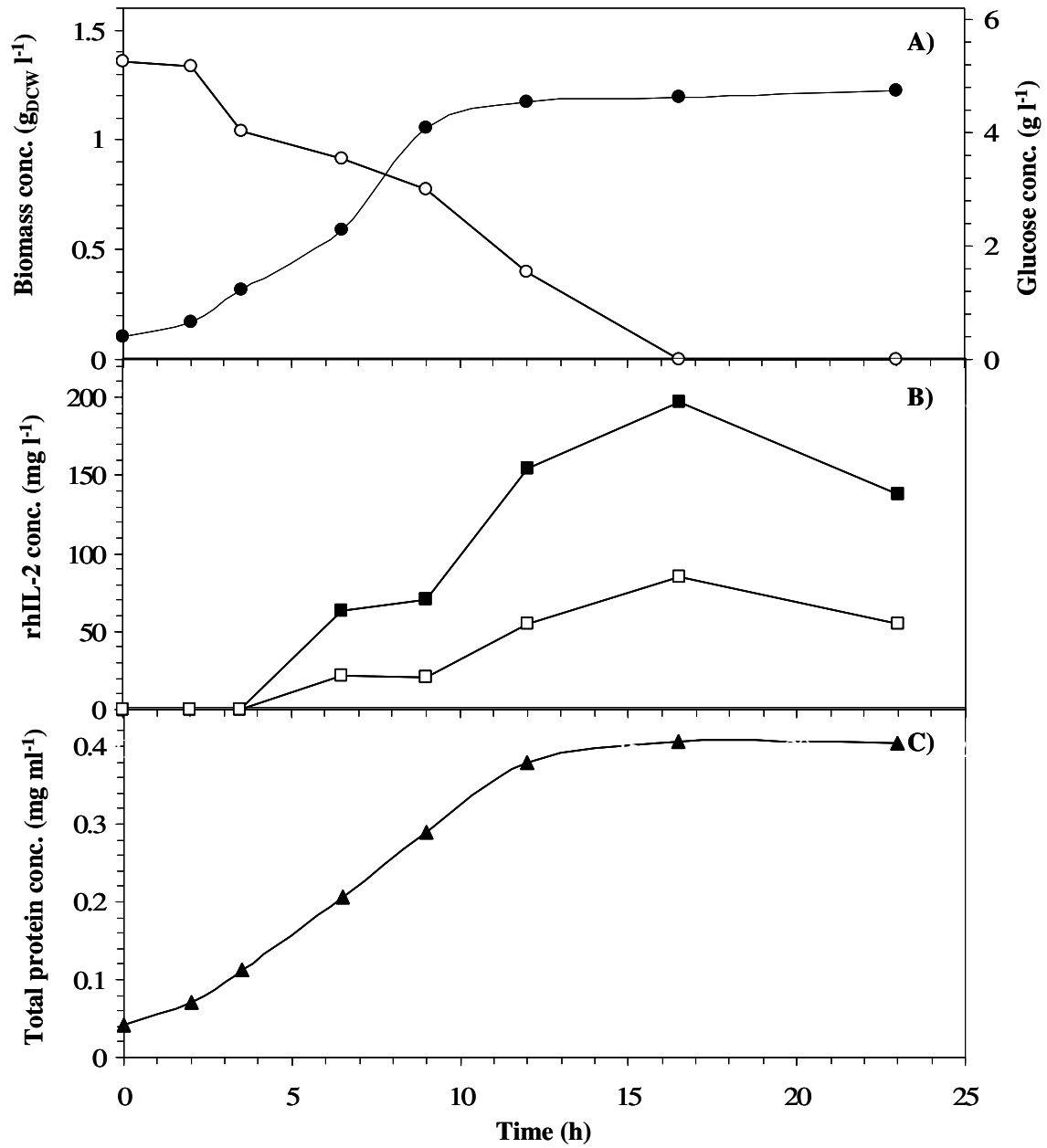


Figure 3.

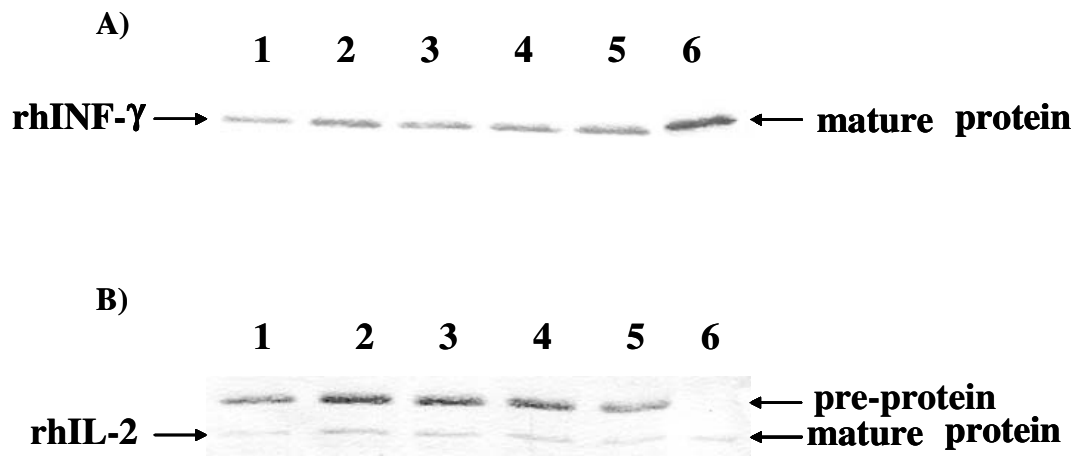


Figure 4.

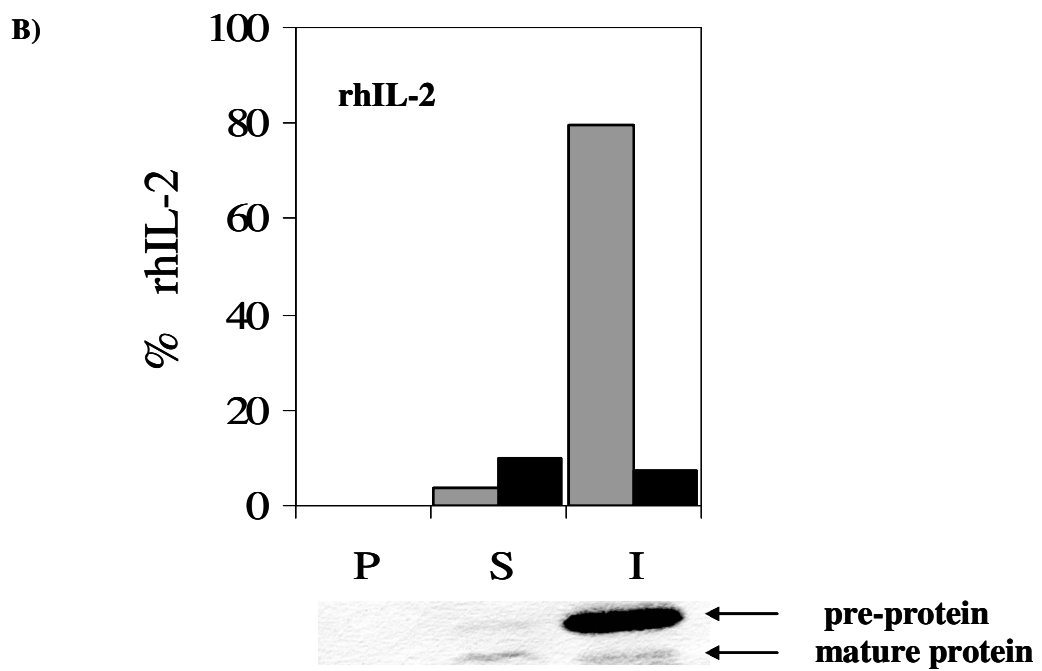
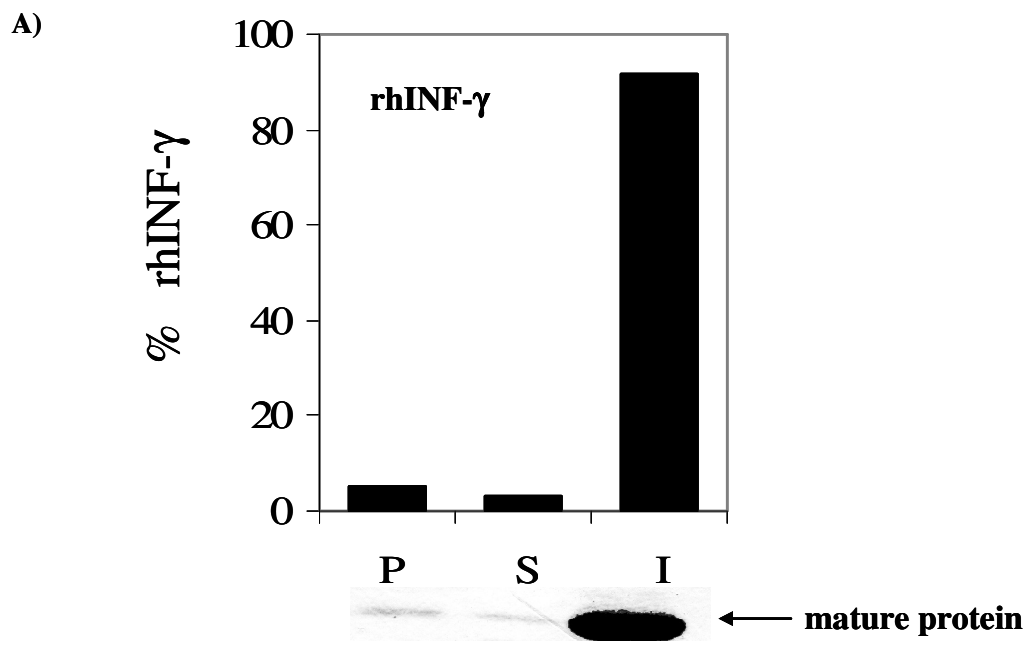


Figure 5.

5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo mostraron, que el uso de fuentes de carbono de bajo costo, como el jugo de *Agave* y el suero de leche son una alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico, como rhIL-2 y PA, debido a que los niveles de producción de biomasa y proteína recombinante son equivalentes a los obtenidos con glucosa. Por otro lado el sistema de expresión de *E. coli* BL21-SI/pEMR (solicitud de patente No. NL/a/2006/000069) que utiliza la vía de secreción Tat para el transporte de proteínas al periplasma se presenta como una alternativa útil a los sistemas de expresión comerciales que solamente contienen péptidos señal para el transporte de proteínas por la vía Sec. Los estudios del transporte de rhIL-2 y INF- γ por la vía Tat, en donde se encontró que el rhINF- γ fue soluble en el periplasma, mientras que rhIL-2 fue parcialmente procesada en el citoplasma, sugieren que el transporte de proteínas recombinantes depende de las características nativas de la proteína.

6. REFERENCIAS

- Alder NN and Theg SM (2003) Energetics of protein transport across biological membranes: A study of the thylakoide Δ pH-dependent/cpTat pathway. *Cell*. **112**: 231-242.
- Aristidou AA, San KY and Bennett GN (1999) Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnol. Prog.* **15**: 140-145.
- Bhandari P and Gowrishankar J (1997) An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J. Bacteriol.* **179**: 4403-4406.
- Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 411-421.
- Baneyx F and Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1399-1408.
- Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T and Brunak S (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* **6**: 167.
- Berks BC (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* **22**: 393-404.
- Berthelmann F and Brüser T (2004) Localization of the Tat translocon components in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **569**: 82-88.
- Bogsch EG, Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Robinson C and Palmer T (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**: 18003-18006.
- Bollag DM and Edelstein S J (1991) Proteins methods. WILEY-LISS, NY.
- Bubeník J (2004) Interleukin-2 therapy of cancer. *Folia Biol. (Praha)*. **50**: 120-130.
- De León A, Hernández V, Galindo E and Ramírez OT (2003a) Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **33**: 689–697.

- De León A; Breceda GB; Barba de la Rosa AP; Jiménez-Bremont JF and López-Revilla R (2003b) Galactose induces the expression of penicillin acylase under control of the *lac* promoter in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1397–1402.
- De León-Rodríguez A, Rivera-Pastrana D, Medina-Rivero E, Flores JL, Estrada-Baltazar A, Ordóñez-Acevedo LG and Barba de la Rosa AP (2006) Production of penicillin acylase by a recombinant *Escherichia coli* using cheese whey as substrate and inducer. *Biomol. Eng.* **23**: 299-305.
- Donovan RS; Robinson CW and Glick BR (1996) Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 145–154.
- Driessen AJM (1992) Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J.* **11**: 847-853.
- Duggleby HW, Tolley SP, Hill CP, Dodson G and Moody PC (1995) Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center. *Nature.* **373**: 264-268.
- Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR and Berks BC (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *PNAS.* **102**: 10482-10486.
- Hale RH and Thompson G (1998) Codon optimization of the gene encoding a domain from human type 1 neurofibromin protein results in a threefold improvement in expression level in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **12**: 185-188.
- Hannig G and Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **16**: 54–60.
- Hinsley AP, Stanley NR, Palmer T and Berks BC (2001) A naturally occurring bacterial tat signal peptide lacking one of the “invariant” arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.* **497**: 45-49.
- Holland IB (2004) Translocation of bacterial proteins – an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 5-16.

- Hytonen VP, Laitinen OH, Airene TT, Kidron H, Meltola NJ, Porkka EJ, Horha J, Paldanius T, Maatta JA, Nordlund HR, Johnson MS, Salminen TA, Airene KJ, Yla-Herttuala S and Kulomaa MS (2004) Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **384**: 385-390.
- Ignatova Z, Hörnle C, Nurk A and Kasche V (2002) Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: 146-149.
- Ignatova Z, Mahsunah A, Georgieva M and Kasche V (2003) Improvement of posttranslational bottlenecks in the production of penicillin amidase in recombinant *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1237-1245.
- Kasche V, Lummer K, Nurk A, Piotraschke E, Ricks A, Stoeva S and Voelter W (1999) Intramolecular proteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1433**: 76-86.
- Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Maghsoudi N, Mohammadian-Mosaabadi J, Mohammadi MR, Bahrami A, Maleksabet N, Nassiri-Khalilli MA, Ebrahimi M and Naderimanesh H (2004) Process development for production of recombinant human interferon- γ expressed in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 63-69.
- Kim JY, Fogarty EA, Lu FJ, Zhu H, Wheelock GD, Henderson LA and DeLisa MP (2005) Twin-arginine translocation of active human tissue plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8451-8459.
- Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG and Stathopoulos C (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* **187**: 4306-4314.
- Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver D and Wickner W (1989). SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **8**: 961-966.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL and Randall UL (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.
- Malek TR and Gutsell NS (1993) IL-2 and Its Receptor: Structure, Function, and Regulation of Expression (Cap. 1). In: Therapeutic Applications of Interleukin-2 (edited by Michael B. Atkins and James W. Mier). 3-25. Dekker.
- McDevitt CA, Hicks MG, Palmer T and Berks BC (2005) Characterisation of Tat protein transport complexes carrying inactivating mutations. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **329**: 693-698.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Morgan DA, Ruscetti FW and Gallo R (1976) Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* **193**: 1007-1008.
- Novy R, Drott D, Yaeger K and Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations.* **12**: 1-3.
- Palmer T, Sargent F and Berks BC (2005) Export of complex cofactors-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* **13**: 175-180.
- Pratap J and Dikshit KL (1998) Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 326-333.
- Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108.
- Ramírez OT, Zamora R, Quintero R and López-Munguía A (1994) Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enz. Microbiol Technol.* **16**: 895-903.
- Rangawala SH, Finn RF, Smith CE, Berberich SA, Salsgiver WJ, Stallings WC, Glover GI and Olins PO (1992) High level production of active HIV protease in *Escherichia coli*. *Gene.* **122**: 263-269.

- Robbens J, De Coen W, Fiers W and Remaut E (2006) Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in *Escherichia coli* through a single aminoacid change at the cleavage site. *Process Biochem.* **41**: 1343-1346.
- Robinson C and Bolhuis A (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 135-147.
- Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M, Doyle M, Kawasaki E, Kothe K and Mark DF (1984) Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science.* **223**: 1412-1415.
- Sanden AM, Prytz I, Tubulekas I, Forberg C, Le H, Hektor A, Neubauer P, Pragai Z, Harwood C, Ward A, Picon A, De Mattos JT, Postma P, Farewell A, Nystrom T, Reeh S, Pedersen S and Larsson G. Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 158-166.
- Sargent F, Berks BC and Palmer T (2006) Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 198-207.
- Schumann W and Ferreira LCS (2004) Production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Genet. Mol. Biol.* **27**: 442-453.
- Sizmann D, Keilman C and Böck (1990) Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **192**: 143-151.
- Sturm A, Schierhorn A, Lindenstrauss U, Lilie H and Brüser T (2006) YcdB from *Escherichia coli* reveals a novel class of tat-dependently translocated hemoproteins. *J. Biol. Chem.* **281**: 13972-139978.
- Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature.* **302**: 305-310.
- Tsumoto K; Ejima D; Kumagai I and Arakawa T (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **28**: 1-8.

- Xu R, Du P, Fan JJ, Zhang Q, Li TP and Gan RB (2002) High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **24**: 453-459.
- Youshko MI, Van Langen LM, Vroom E, Van Rantwijk F, Sheldon RA and Svedas VK (2001) Highly efficient synthesis of ampicillin in an aqueous solution precipitate system: repetitive addition of substrates in a semicontinuous process. *Biotechnol. Bioeng.* **73**: 426-430.
- Zaldivar J, Martinez A and Ingram LO (1999) Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **65**: 24-33.
- Zhou Z; Schnake P; Xiao L and Lal AA (2003) Enhanced expression of a recombinant malaria candidate vaccine in *Escherichia coli* by codon optimization. *Protein Expr. Purif.* **34**: 87-94.

Anexo 1

Medios y soluciones

Tabla A1. Medio LB.

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para LB sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

Tabla A2. Medio LBON.

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para LBON sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

Tabla A3. Medio (M9)

Reactivos	Cantidad
Galactosa	5 g
NaCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
CaCl ₂	0.01g
KH ₂ PO ₄	3 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Tiamina (40 µg/L)	40 µL
Kanamicina (35 mg/mL)	1 mL

Se disuelven la galactosa y el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada correspondiente al 10 % del volumen total, las sales excepto el CaCl_2 en el 90 % del volumen total, se esterilizan a 121°C durante 15 minutos. La solución de 10 g L^{-1} CaCl_2 (1000x) se esteriliza aparte también por calor. Por filtración se esterilizan las soluciones de 35 mg mL^{-1} de Kanamicina y $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiamina. Después de enfriarse se mezclan la fuente de carbono y las sales, se adiciona a 1 L de medio: 1 mL de CaCl_2 , 1 mL de kanamicina y $40 \mu\text{L}$ de tiamina. Para preparar el preinoculo, se le adiciona 5 g L^{-1} de extracto de levadura, que se esteriliza con la galactosa y el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Tabla A4. Medio BSG.

Reactivos	Cantidad
Glucosa	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	3.5 g
KH_2PO_4	3.5 g
Tiamina ($40 \mu\text{g/L}$)	$40 \mu\text{L}$
Ampicilina (100 mg/mL)	1 mL
Elementos Traza	3 mL

Se disuelven la glucosa y el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada correspondiente al 10 % del volumen total, las sales en el 90 % del volumen total, se esterilizan a 121°C durante 15 minutos. Por filtración se esterilizan las soluciones de 100 mg mL^{-1} de ampicilina y $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiamina. Después de enfriarse se mezclan la fuente de carbono y las sales, se adiciona a 1 L de medio: 1 mL de ampicilina, $40 \mu\text{L}$ de tiamina y 3 mL de elementos traça (conteniendo por litro: 27 g FeCl_3 , 2 g ZnCl_2 , 2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g H_3BO_3 and 100 mL HCl). Para preparar el preinoculo, se le adiciona 5 g L^{-1} de extracto de levadura, que se esteriliza con la glucosa y el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Tabla A5. Solución I para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	10 mM

Tabla A6. Solución II para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
SDS	1 %
NaOH	0.2 M

Tabla A7. Solución III para purificar ADN plasmídico.

Reactivos	Cantidad
Acetato de Sodio	3 M

Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial

Electroforesis en gel de agarosa

Tabla A8. TAE 50X.

Reactivos	Cantidad
Tris (base)	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5 mM, pH 8)	100 mL

Aforar a 1 L con agua miliQ.

Tabla A9. Gel de agarosa 1 %.

Reactivos	Cantidad
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL
Bromuro de etidio (10 mg mL ⁻¹)	0.5 µg mL ⁻¹

Calentar la solución en horno de microondas a máxima potencia durante 2 minutos.

Fraccionamiento celular

Tabla A10. Amortiguador de choque osmótico.

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl pH 7.4	100 mM
Sacarosa	20 %
EDTA	10 mM

Cuantificación de azúcares reductores por DNS

Tabla A11. Solución de DNS.

Reactivos	Cantidad
NaOH	1 g
Tartrato de sodio y potasio	20 g
Metabisulfito de sodio	0.05 g
Fenol	0.2 g
ácido 3,5-dinitrosalicílico	1 g

Se disuelven en 60 mL de agua destilada NaOH, tartrato de sodio y potasio, metabisulfito de sodio y fenol, posteriormente se agrega 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y se afora a 100 mL.

Cuantificación de proteína total por el método de Lowry

Tabla A12. Soluciones para cuantificar proteína.

Solución	Reactivos
A	0.25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua destilada.
B	0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua destilada.
C	10 g de Na_2CO_3 en 500 mL de NaOH 0.1 N.
D	1 mL de solución A, 1 mL de solución B y 98 mL de la solución C.
Folín	1:2 en agua destilada (prepararse antes de utilizar).

Geles de acrilamida de gradiente.

Tabla A13. Soluciones requeridas.

Solución
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v)
Persulfato de amonio al 10% (APS)
Glicerol al 50%(v/v)
Azul de bromofenol al 1% (p/v)

Filtrar la solución de azul de bromofenol, para remover agregados del colorante.

Tabla A14. Soluciones para el gel de gradiente.

Soluciones	Gel al 4 %	Gel al 20 %
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	365 µL	1815 µL
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	690 µL	690 µL
SDS al 10 %	27.5 µL	27.50 µL
H ₂ O _m	1650 µL	205 µL
TEMED	1.83 µL	0.91 µL
APS al 10 %	9.16 µL	9.16 µL

Tabla A15. Soluciones para el gel de concentrador.

Soluciones	Gel al 4 %
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	365 µL
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	690 µL
SDS al 10 %	27.5 µL
H ₂ O _m	1650 µL
TEMED	1.83 µL
APS al 10 %	9.16 µL

NOTA: Adicionar el TEMED y el APS antes de usar.

Tabla A16. Amortiguador de la muestra 5x.

Soluciones	Cantidad
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.6 mL
Glicerol al 50%	5 mL
SDS al 10 %	2 mL
2-β-mercaptoetanol	0.5 mL
Azul de bromofenol al 1%	1 mL

Adicionar 0.9 mL de agua destilada.

Tabla A17. Amortiguador de corrida.

Reactivos	Cantidad
Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Disolver en 1 L de agua destilada, el pH aproximado es de 8.3.

Western Blot

Tabla A18. Amortiguador de transferencia *Towbin*.

Reactivos	Cantidad
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM

Disolver en solución de metanol al 20 %.

Tabla A19. Amortiguador de fosfatos (PBS).

Reactivos	Cantidad
NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	7.2 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.8 mM

Disolver en agua miliQ, ajustar el pH a 7.5

Tabla A20. Solución para bloquear.

Reactivos	Cantidad
Leche descremada svelty®	3 g

Disolver en 100 mL de PBS

Tabla A21. Amortiguador para la enzima fosfatasa alcalina (AP).

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH 9.5)	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50 mM

Tabla A22. Solución de anticuerpos policlonales primarios.

Anticuerpo	Concentración
Anti rhINF- γ	0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Anti rhIL-2	0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Diluir en PBS con 1 % de BSA.

Tabla A23. Solución de anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Dilución
Anti conejo conjugado con AP	1:3000

Diluir en PBS con 1 % de BSA.

Anexo 2

Curvas estándar

Curva estándar de biomasa

Un cultivo de *E. coli* JM101 se creció durante toda la noche, se tomaron diferentes alícuotas del cultivo y se ajustaron con agua destilada a una DO_{620} de 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 y 0.8, los diferentes volúmenes de cultivo se filtraron a través de membranas de $0.22 \mu\text{m}$ (Tabla A24). La biomasa cosechada en las membranas se seco durante toda la noche en una estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se determino la cantidad de biomasa por diferencia de peso entre la membrana y la membrana con la biomasa.

Tabla A24. Datos experimentales de la curva estándar de biomasa.

Absorbancia (620 nm)	Cultivo (mL)	Agua (mL)	Volumen (mL)	Biomasa (g)	Biomasa (g/L)
0.2	16.57	183.43	200	0.0204	0.102
0.4	16.57	83.43	100	0.0202	0.202
0.5	20.72	79.28	100	0.0259	0.259
0.6	24.86	75.14	100	0.0274	0.274
0.8	16.57	33.43	50	0.0209	0.418

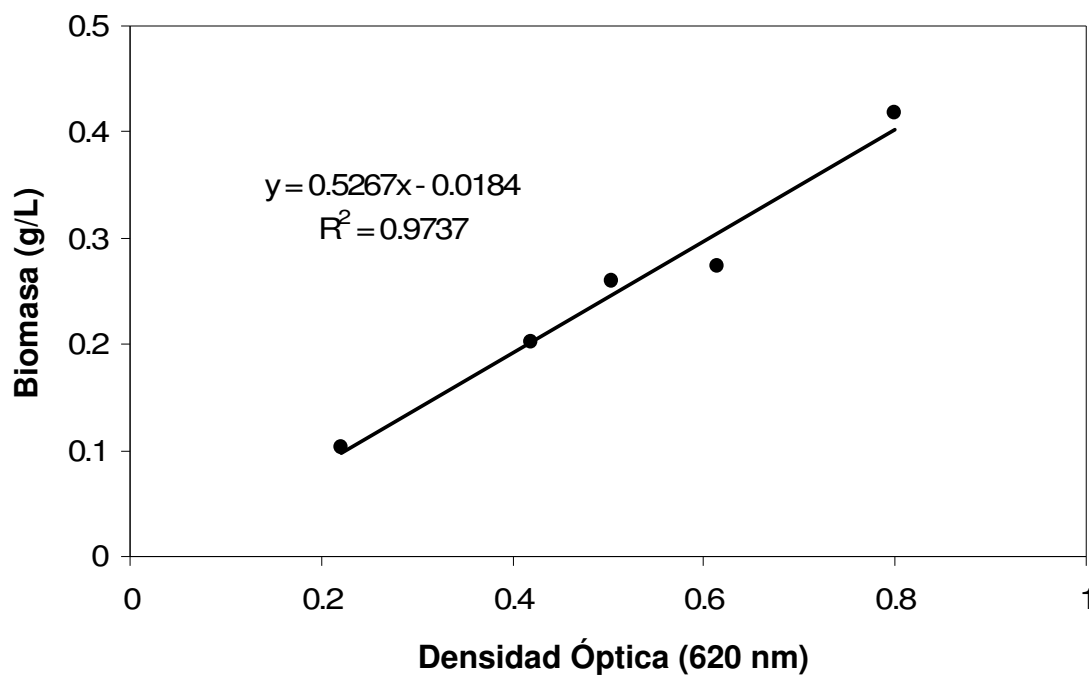


Figura A1. Curva estándar de biomasa.

Curva estándar de galactosa

La galactosa se cuantificó por el método de azúcares reductores, la curva estándar se construyó cuantificando entre 0 y 1 g/L de galactosa (Tabla A25).

Tabla A25. Datos experimentales de la curva estándar de galactosa.

Galactosa (g/L)	Agua (μL)	μL de Sol. Patrón (1g/L)	DNS (mL)	H2O dest. (mL)	Promedio (DO ₅₅₀)
0	250	0	0.75	4	Blanco
0.1	225	25	0.75	4	0.0196
0.4	150	100	0.75	4	0.2476
0.6	100	150	0.75	4	0.3967
0.8	50	200	0.75	4	0.5282
1	0	250	0.75	4	0.6847

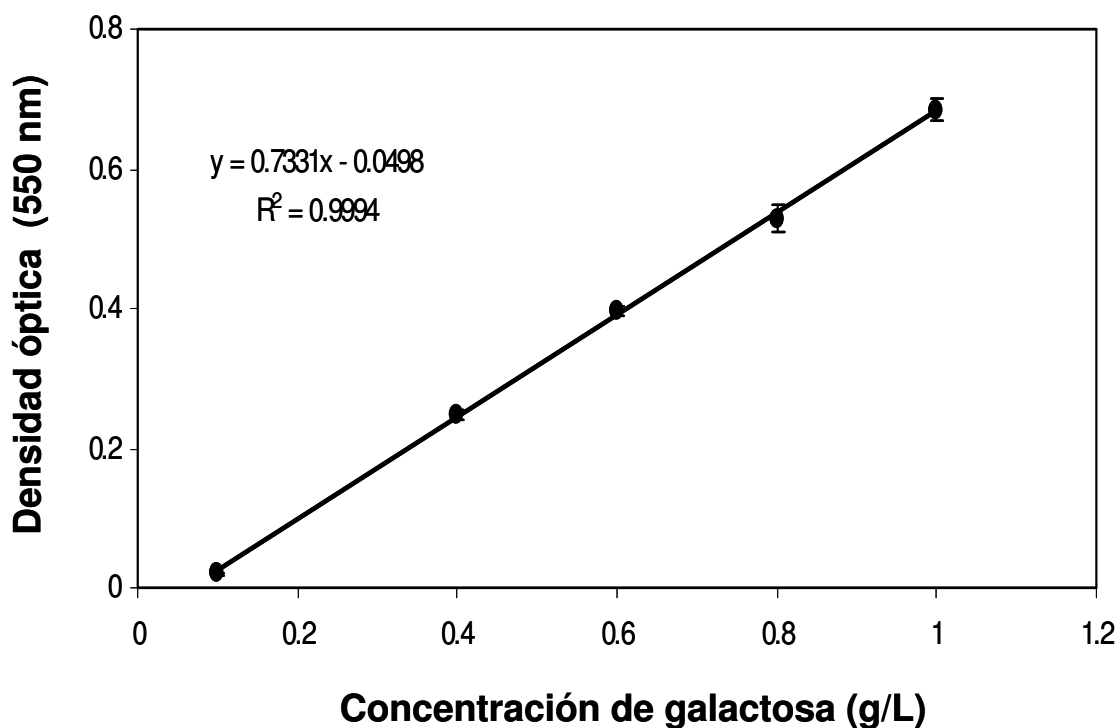


Figura A2. Curva estándar de galactosa.

Curva estándar de glucosa y fructosa

La glucosa y fructosa se cuantificó por HPLC. Las curvas estándar de azúcares se construyeron calculando las áreas de los picos correspondientes a las diferentes concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 g/L de glucosa y fructosa.

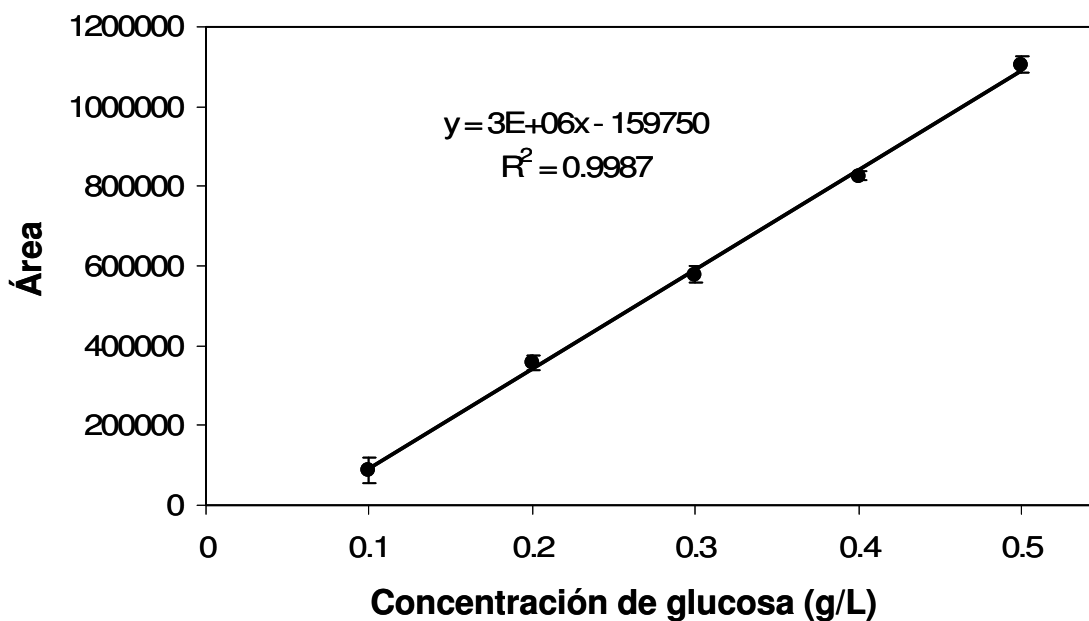


Figura A3. Curva estándar de glucosa.

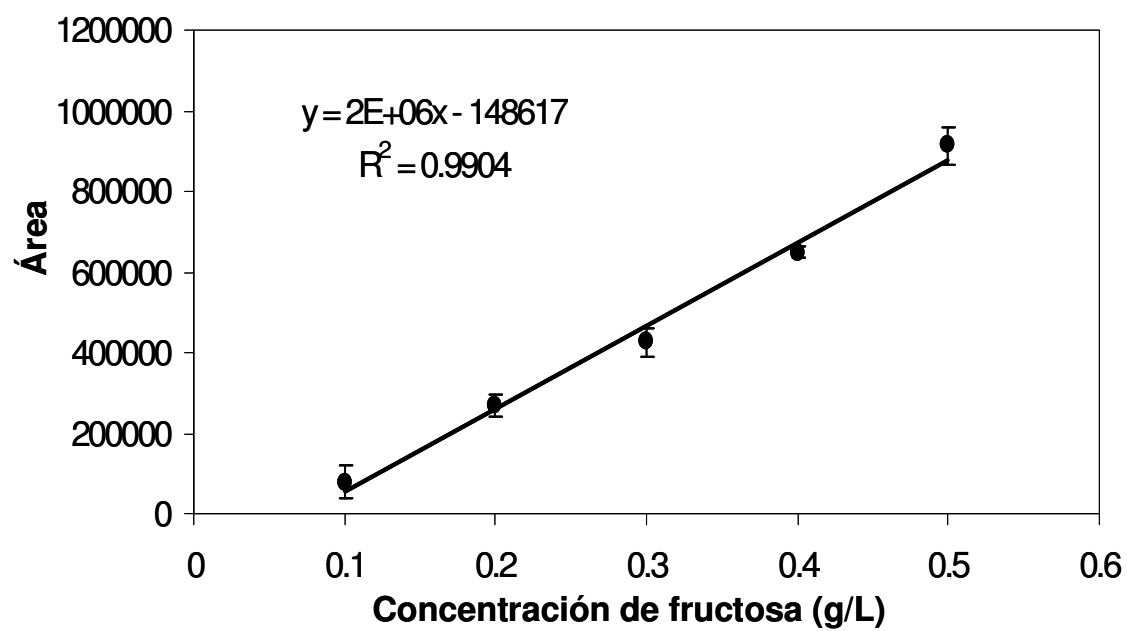


Figura A4. Curva estándar de fructosa.

Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA)

Se tomaron diferentes volúmenes de una solución estándar de 1.4 mg de BSA/mL, y fueron ajustados a 1 mL con agua destilada, a estas diluciones se les determinó la cantidad de proteína total por el método de Lowry. Se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina con los datos mostrados en la Tabla A26.

Tabla A26. Datos experimentales de la curva estándar de BSA.

BSA (mg/mL)	μL de sol. Patrón (1.4 mg/mL)	Agua (μL)	React. E (mL)	Folín (μL)	Promedio DO ₅₉₀
0	0	1000	5	0.5	Blanco
0.035	25	975	5	0.5	0.1212
0.105	75	925	5	0.5	0.2319
0.14	100	900	5	0.5	0.3172
0.21	150	850	5	0.5	0.4401
0.28	200	800	5	0.5	0.5544

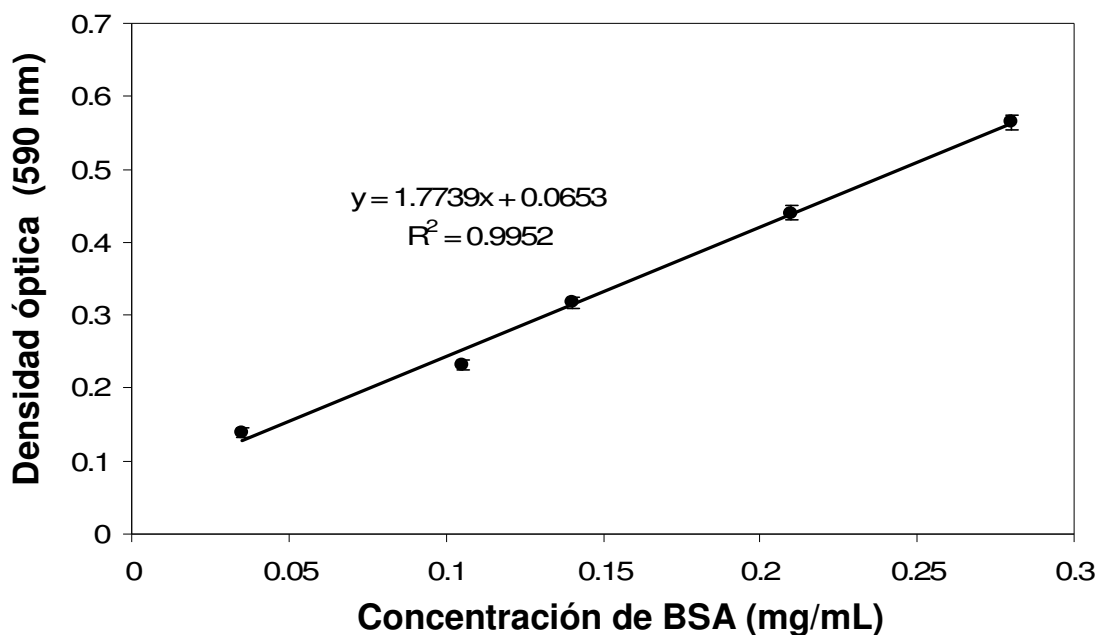


Figura A5. Curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

Anexo 3

Métodos de rutina

Preparación de células competentes de *E. coli* con cloruro de calcio

Se prepara un preinoculo de *E. coli* en 5 mL de medio LB, el cual se crece durante la noche, con 250 μ L del preinoculo se inoculan 25 mL de medio LB, e incuban a 37 °C y 250 rpm hasta que las células crezcan a una concentración celular que de una densidad óptica de 0.6 a 620 nm. Alícuotas de 1 mL del cultivo se colocan en tubos eppendorf fríos y se centrifugan a 16,000 x *g* durante 35 s, se descarta el sobrenadante y las pastillas celulares se resuspenden en una solución fría de CaCl₂ 0.1 M en glicerol al 15 %, se centrifugan a 16,000 x *g* durante 25 s y se descartan los sobrenadantes, finalmente se agregan 33 μ L de la solución fría de CaCl₂ 0.1 M en glicerol al 15 % y se almacenan a -70 °C entre 3 y 4 meses.

Transformación de *E. coli* por choque térmico

Un tubo con 33 μ L de células calcio-competentes de *E. coli* se transforman con 1 μ L de plásmido o 10 μ L de producto de ligación, se incuban en hielo durante 30 minutos, posteriormente se incuba el tubo a 42 °C por 2 minutos y regresa al hielo por un minuto más, se adicionan 250 μ L de medio LB sin antibiótico e incuba a 37 °C y 150 rpm durante 45 minutos, finalmente se inoculan placas de LB con el antibiótico de resistencia del plásmido, se incuba a 37 °C durante toda la noche.

Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina

Un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado se inocula con una colonia de *E. coli* recombinante e incuba a 37 °C

durante toda la noche, posteriormente las células se cosechan centrifugando 1.5 mL del cultivo a 16,000 x *g* durante 1 minuto, el pellet se resuspende en 100 µL de solución I, a la suspensión se le adicionan 200 µL de solución II y 150 µL de solución III, se centrifuga a 16,000 x *g* durante 10 minutos. El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio y se le agregan 350 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:25:1), se coloca en hielo durante 20 minutos, posteriormente se centrifuga a 16,000 x *g* durante 10 minutos y recolecta la fracción acuosa en un tubo nuevo, se precipita el ADN plasmídico con etanol al 70 % frío y se lava 3 veces con la misma solución, finalmente se seca la pastilla a 50 °C durante 10 minutos y resuspende en 30 µL de agua.

Anexo 4

Solicitud de patente No. NL/a/2006/000069

“SISTEMA PARA EXPRESAR Y TRANSPORTAR PROTEÍNAS RECOMBINANTES AL PERIPLASMA DE *Escherichia coli* POR LA VÍA DE SECRECIÓN Tat”

Resumen

La presente invención describe un vector de expresión que contiene un péptido señal que utiliza la vía de secreción Tat como alternativa al sistema Sec de secreción para el transporte de citocinas y otras proteínas de interés biotecnológico al periplasma de *Escherichia coli*. La parte novedosa de esta invención consiste en utilizar el péptido señal de la penicilino acilasa (SP_{pac}) mutado y fusionado al gen sintético de interferón- γ humano (hINF- γ) para el transporte de la proteína al periplasma de *Escherichia coli* por la vía Tat. El SP_{pac} mutado contiene el sitio *NdeI* en el extremo 5', contenido en el vector de expresión pEMR, y en el extremo 3' el codon de triptófano se cambia por el codon de serina y con ello se genera el sitio de restricción *HindIII*. Se modifican los codones de leucina y alanina para generar el sitio *NheI*. Con ello se generan dos sitios de restricción para la clonación y fusión en fase de genes de proteínas homólogas ó heterólogas. Actualmente, no hay vectores comerciales disponibles para la expresión y transporte de proteínas mediante péptidos señal de la vía de transporte Tat.