

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
MOLECULAR**

**EXPRESIÓN DE INTERFERÓN GAMMA HUMANO Y LA
PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EN *E. COLI* USANDO
EL SISTEMA DE AUTOTRANSPORTE SHDA**

Tesis que presenta

Karla Ivon Solís Andrade

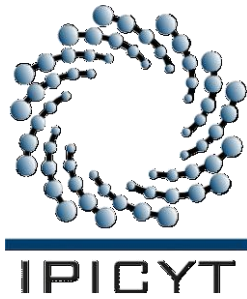
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, SLP., Junio de 2012.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karla Ivon Solís Andrade** y aprobada el **21 de 06 de 2012** 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
(Director de la tesis)

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

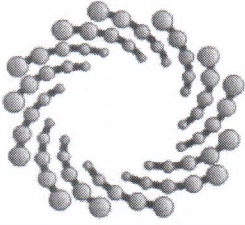
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



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 dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez. Mediante el apoyo económico del proyecto CONACyT-Ciencias Básicas 82010

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 233521 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 102 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Secretario	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karla Ivon Solís Andrade

sobre la Tesis intitulada:

Expresión de interferón gama humano y GFP en Escherichia coli usando el sistema de autotransporte ShdA

que se desarrolló bajo la dirección de


Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2012.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A todas las personas que han contribuido a que esta fracción de mi vida sea una pequeña obra maestra.

En especial a mi hermana Elena, la mujer admirable quien ha sido mi cómplice y me ha dado su apoyo a lo largo de la vida.

A mis hermanas Lucerito y Chayo, quienes comparten conmigo sus ánimos, apoyo y cariño.

A mis padres y abuelos, quienes me han dado su confianza, ánimos y ayuda para emprender este proyecto.

A la IBT. Lety Hdz y la Dra. Janneth Peralta, de quienes he aprendido mucho y a pesar de la distancia me han dado su apoyo, amistad y tiempo.

A Noemi C., Karina R., Lupita S., Joshua E., Marizel A., Lilia M., Mariel D., Gil M, a los chicos del café filoso, Guadalupe G. Benita O., Francisco L y Hugo C. a el equipo Edith U., Mayte, Jessica M. Esperanza, quienes han contribuido a que esta aventura sea divertida.

Agradecimientos

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

Al Dr. Antonio De León por permitirme trabajar en su equipo de trabajo.

A L. Gabriel por su asesoría, ayuda técnica y ánimos en la realización de este proyecto.

A la Dra. Lina Riego y a la Dra. Araceli Patrón por su asesoría y ayuda técnica en la captura de imágenes de fluorescencia.

A Dra. Martha Leticia Santos y Dr. Francisco Jiménez Bremont por sus comentarios, evaluación y revisión de este documento.

A los compañeros del laboratorio 4, por el ambiente cordial y agradable durante mi estancia.

Al IPICyT por la oportunidad de desarrollo de posgrado en Biología Molecular.

Al LAMBAMA por el acceso a sus equipos.

A CONACyT por la beca otorgada con número de registro 250278.

Contenido

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Materiales y Métodos	4
Resultados y Discusión	10
Conclusiones	28
Anexos	30
Referencias	35

Lista de tablas

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

Tabla 1. Velocidades de crecimiento de cultivos de <i>E.coli</i> BL21SI y BL21(DE3) transformados con pShdA-GFP y pShdA-hIFN γ a 37°C	11
--	----

Lista de figuras

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

Figura 1. Mecanismo de secreción de proteínas autotransportadores	2
Figura 2. Estructura de las proteínas de fusión LTB-Pasajero-ShdA	5
Figura 3. El crecimiento del cultivo BL21SI/pShdA-GFP muestra cinética de tres fases.	13
Figura 4. Algunas células y residuos celulares de transformantes con la fusión LTB-GFP-ShdA emiten fluorescencia en <i>E. coli</i> .	15
Figura 5. La expresión de la fusión LTB-hIFN γ -ShdA se incrementa al inducir el cultivo a 28°C en <i>E. coli</i> BL21(DE3)-pLysS	18
Figura 6. La fusión LTB-GFP-ShdA y una versión truncada de 35kDa se expresan en <i>E. coli</i> BL21SI/ShdA	24
Figura 7. La proteína de fusión LTB-hIFN γ -ShdA y otras de menor tamaño como la de 41 kDa se expresan en <i>E. coli</i> cepa BL21(DE3) pLysS/pShdA-hIFN γ	25
Figura 8. La proteína de fusión LTB-hIFN γ -ShdA se localiza en fracción citoplásmica en la fracción de material insoluble <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS/pShdA-hIFN γ .	27

Lista de anexos

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

Tabla 1. Plásmidos usados en este estudio	25
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos usados en experimentos de PCR	26
Tabla 3. Cepas y medios de cultivo	27
Tabla 4. Análisis de uso de codones raros y baja frecuencia	28

Expresión de Interferón gamma humano y Proteína Verde Fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA

PALABRAS CLAVE. Proteínas recombinantes, Vía tipo V, secreción de proteínas

La exportación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, ya sea ancladas o liberadas fuera de la membrana externa es de gran utilidad en muchas aplicaciones biotecnológicas. En bacterias Gram–negativas se conocen siete vías de secreción de proteínas y una adicional auxiliada por chaperonas, de ellas la vía V llamada de los ‘Autotransportadores’ es la más simple. Los autotransportadores de *Salmollela sp*, MisL y ShdA, comparten con AIDA-I, de *E. coli*, alrededor de un 30% de identidad. El autotransportador AIDA-I ha demostrado ser una herramienta útil para el transporte de proteínas. En el presente trabajo se estudió la expresión de dos proteínas de fusión, LTB-hIFN γ -ShdA, LTB-GFP-ShdA para evaluar si el autotransportador ShdA permite la translocación de la proteína verde fluorescente (GFP) y el interferón gamma humano (hIFN γ) fuera de la membrana de *E. coli*. Las secuencias se subclonaron en pET-12. Las cepas BL21SI, BL21(DE3)-pLysS y BL21(DE3)-pRARE se transformaron y se encontró que las proteínas de fusión, LTB-GFP-ShdA y LTB-hIFN γ -ShdA, son tóxicas para el metabolismo de las cepas usadas en este trabajo. El cambio de temperatura, medio de cultivo y coexpresión de las cepas con pRARE no aumentó significativamente la expresión de las fusiones. Finalmente la proteína LTB-hIFN γ -ShdA no se detectó fuera de la membrana externa de *E. coli*. Esto sugiere que la proteína se encuentra anclada en la membrana interna y en cuerpos de inclusión citoplásmicos

Expression of Human Interferon-gamma and Green Fluorescent Protein in *E. coli* using the ShdA autotransporter system

Keywords: Pathway V, secretory system

Recombinant protein display at cellular surface in *Escherichia coli* is useful for many biotechnical applications. In Gram-negative bacteria seven secretion systems are recognized along with an additional the chaperone usher. The system V termed 'Autotransporters' is the simplest mechanism. The *Salmonella's* autotransporters, MisL and ShdA share 30% identity with AIDA-I. AIDA-I is an *E. coli's* autotransporter and it has been demonstrated to be an useful tool for protein display.

The aim of this study was to evaluate whether the ShdA system is suitable to translocate, the human interferon gamma (hIFN- γ) and the green fluorescent protein (GFP), toward out membrane in *E. coli*. We focused on the expression of two fusion proteins: LTB-hIFN γ -ShdA and LTB-GFP-ShdA. The DNA sequences of those fusions were subcloned into the pET-12 vector expression system. BL21SI, BL21(DE3)-pLysS and BL21(DE3)-pRARE were used as host strains. The findings showed that LTB-GFP-ShdA and LTB-hIFN γ -ShdA were toxic to the strains tested. Changes in temperature, medium and co-expressing pRARE in host strains did not significantly improve the quantity and quality of protein expression. Finally LTB-hIFN γ ShdA was not detected toward the outer membrane in *E. coli* this suggests that the protein is could be anchored to the inner membrane and in cytoplasmic inclusion bodies.

INTRODUCCIÓN

La exportación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, ya sea ancladas o liberadas fuera de la membrana externa permite grandes ventajas para muchas aplicaciones biotecnológicas. En bacterias Gram negativas se conocen siete vías de secreción de proteínas (numeradas I-VI y la vía auxiliada por chaperonas) que facilitan la secreción de proteínas a través de la membrana interna, periplasma y membrana externa. Generalmente estas vías usan maquinarias especializadas que se extienden a largo de las membranas celulares y difieren en complejidad (Leyton et al. 2011).

La vía V o de los 'Autotransportadores' es aparentemente el sistema más simple de translocación (Jose and Meyer 2007). Las proteínas que integran esta vía se sintetizan como secuencias multidominio (secuencia señal, dominio pasajero y dominio de autotransporte). Una vez que la secuencia es traducida, el péptido señal es reconocido por el translocón de la vía Sec (una vía general de secreción que permite el paso de la secuencia multidominio por la membrana interna). La eliminación del péptido señal permite la difusión y transporte del polipéptido a través del espacio periplasmático. Finalmente la parte C-terminal del precursor se pliega en la membrana externa y forma un barril beta, que permite la exportación del dominio pasajero hacia la superficie celular. El pasajero puede ser liberado o permanecer como desplegado unido a la célula bacteriana (Fig. 1) (Jose and Meyer 2007)

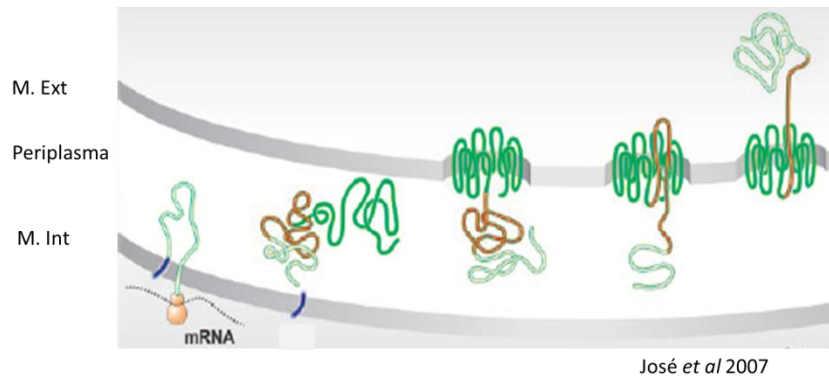


Figura 1. Mecanismo de secreción de proteínas autotransportadores

Dentro de los autotransportadores más estudiados están aquellos que provienen de *Neisseria gonorrhoeae* (proteasa IgA1) y de *E. coli* (AIDA-I). Los autotransportadores en *Salmonella typhimurium* MisL y ShdA comparten con AIDA-I alrededor de un 30% de identidad.

Los autotransportadores pueden tener diferentes aplicaciones como en el diseño de biocatalizadores, *i.e.* el autotransportador AIDA-I demostró ser funcional para la translocación fuera de la membrana externa de *E. coli* de la enzima organofosforohidrolasa, la cual se fusionó de manera heteróloga en el sitio pasajero (Li et al. 2008). En un reporte previo (Marin et al. 2010) demostraron que el sistema ShdA tiene una unidad funcional de translocación de péptidos (HE and Jun) y pequeños dominios globulares (Ig-VHH). Una aplicación prometedora es la expresión extracelular de proteínas recombinantes de uso terapéutico como el Interferón gamma humano recombinante (hIFN γ).

El hIFN γ es una linfocina, la cual tiene actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomodulatorias, además esta involucrado en la maduración, diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas (Khalilzadeh et al. 2004)

El objetivo de este estudio fue evaluar si el autotransportador ShdA permite la translocación de la proteína verde fluorescente (GFP) y del interferón gamma humano (hIFN- γ) fuera de la membrana de *Escherichia coli*. Nos enfocamos en la expresión de dos proteínas de fusión, LTB-hIFN γ -ShdA y LTB-GFP-ShdA. Las secuencias se subclonaron en el vector de expresión pET-12 que cuenta con el promotor T7. Se probaron diferentes estrategias para aumentar la expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de plásmidos pShdA, pShdA-GFP y pShdA-hIFN γ

Los plásmidos y oligonucleótidos usados en este estudio se enlistan en la sección anexos, tablas 1 y 2.

El pET-12a (Novagen) se modificó eliminando dos fragmentos mediante cortes en los sitios, *PvuII-BglII* y *EcoRI-NheI*, y se le designó pET12a-mod.

En el vector de expresión pET12a-mod, entre los sitios *NdeI-BamHI*, se clonó la secuencia del péptido señal-autotransportador 'LTB-ShdA', obtenida del plásmido pASM y se nombró pShdA. A la construcción anterior en el sitio de restricción *NheI* se clonó de forma individual los genes amplificados *gfp* y *hifn γ* . A los plásmidos obtenidos se les denominó pShdA-GFP y pShdA-hIFN γ (Fig. 2). Las construcciones obtenidas se comprobaron por restricción y secuenciación.

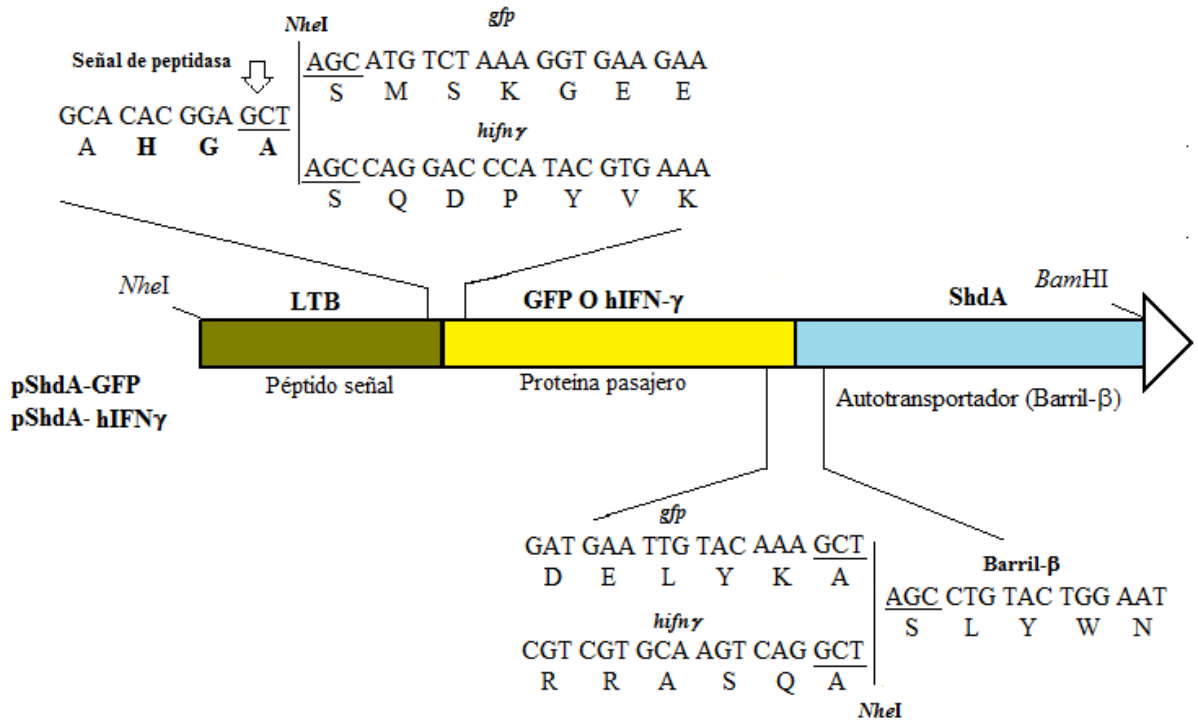


Figura 2. Estructura de las proteínas de fusión LTB-Pasajero-ShdA. Los sitios de las fusiones se muestran como secuencia de nucleótidos y aminoácidos. Los aminoácidos que actúan como señal de reconocimiento de peptidasa en vía Sec se muestran en negritas. El sitio de restricción *NheI* donde se fusionaron los genes que codifican para las proteínas pasajeras (GFP o hIFN γ) se muestran como secuencia subrayada. Para el transporte de las proteínas pasajeras se utilizó la porción Barril- β del autotransportador ShdA.

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* DH5 α y TOP-10F' se usaron para la clonación y escrutinio de plásmidos. Estas cepas se mantuvieron en agar LB- ampicilina (100 μ g/mL) y se crecieron las células en medio líquido agar LB -ampicilina (100 μ g/mL).

Las cepas de *E. coli* BL21SI, BL21SI-pRARE, BL21(DE3)pLys y BL21(DE3)-pRARE se transformaron con los vectores pShdA, pShdA-GFP y pShdA-hIFN γ para la expresión de las proteínas de fusión.

Las cepas se crecieron en cajas con agar (LB o LBON)-antibiótico y por asada de una colonia aislada las células se crecieron en medio líquido con antibiótico hasta alcanzar la densidad celular de inducción. En la inducción se probó adicionar el inductor en fase exponencial y fase estacionaria. Para la fase exponencial las bacterias se crecieron hasta alcanzar 0.5 DO_{600nm} y en fase estacionaria las células se crecieron hasta 3 DO_{600nm}. Durante la inducción se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y para todos los experimentos se usó un inóculo propagado toda la noche a 250 rpm a 37°C. Los medios de cultivo, concentración final de antibiótico y concentración final de inductor usados en las diferentes pruebas se enlistan en la sección anexos en la tabla 3. Todos los cultivos se realizaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio.

Las cepas BL21SI/pET12a-hIFN γ y DH5 α /pUC 19 se usaron para producir las proteínas controles, hIFN γ y GFP, respectivamente.

Fraccionamiento subcelular

Proteínas periplásmicas (P), fracción citoplasmática soluble (Cit) y Material Insoluble (MI) (membrana interna, membrana externa y cuerpos de inclusión), se obtuvieron con el siguiente procedimiento.

Células BL21(DE3)pLysS/pShdA-hIFN γ se cultivaron hasta alcanzar 3 DO_{600nm} y se indujeron con IPTG 0.5 mM. Muestras de 6.0 mL se centrifugaron a 6,500 rpm por 10 min y la pastilla celular se resuspendió en 800 μ L de solución hipertónica (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, sacarosa 20% (p/v) y EDTA 10 mM) seguido de incubación en hielo por 5 min. La muestra se centrifugó a 11,000 rpm por 8 min a 4°C y la pastilla celular se resuspendió rápidamente por pipeteo en 800 μ L de solución hipotónica (Fluoruro-fenil-metil-sulfónico 1mM en agua desionizada fría) con incubación por 5 min en hielo. La muestra se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a 4°C y en el sobrenadante se recuperó la fracción periplásmica. El *pellet* celular se resuspendió en 500 μ L de agua estéril desionizada y se sonó en hielo (10 sec por 6 ciclos, amplitud 25%), la muestra se centrifugó a 11,000 rpm 4°C por 10 min, se colectó sobrenadante y se etiquetó como fracción citoplásmica. Finalmente se lavó y se resuspendió la pastilla en 200 μ L de agua y se etiquetó como fracción material insoluble. El análisis de proteínas se realizó por electroforesis desnaturante al 12% de acuerdo al método de (Laemmli 1970).

Microscopía de Inmunofluorescencia y fluorescencia

Células de *E. coli* BL21(DE3)pLys/pShdA-hIFN γ se crecieron en medio líquido LB con ampicilina (100 μ g/mL) hasta alcanzar la densidad celular de 3 DO_{600nm} y se indujeron con IPTG 0.5 mM. La pastilla celular de 600 μ L de muestra se colectó por centrifugación a 11,000 rpm por 10 min, se lavó tres veces con PBS 1X buffer (pH 7.4) y se fijó la muestra con formaldehído libre de metanol al 2% por 10 min. Se lavaron las células con PBS 1X, se bloquearon con PBS 1X, BSA 2% y se incubaron a 4°C por 3 h. Las células se centrifugaron y se resuspendieron con el anticuerpo primario policlonal (PBS 1X, BSA 2% y IgG anti-human IFN γ de conejo diluido 1:1000 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) y se incubó a 4 °C por toda la noche. Las células se lavaron tres veces con PBS e incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo etiquetado con rodamina (Santa Cruz–Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluido 1:100 a temperatura ambiente por 2 h. Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia Axio Imager M2 (Zeiss) con el objetivo 100X y la cámara AxioCam MRm, equipado con filtros de excitación de 530-585 nm y emisión de 615-660 nm para Rodamina.

Para observar la fluorescencia de la GFP, las muestras de cultivo inducido BL21SI/pShdA-GFP se examinaron en el mismo microscopio a un tiempo de exposición de 4.8 s con filtros de excitación de 450-495 nm y emisión de 525-550 nm para fluorescencia de GFP.

Electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante y análisis de Western Blot

La concentración de proteína total fue analizada por el método de (Lowry et al. 1951) usando albumina sérica bovina (Research Organics) como estándar. Las proteínas se separaron por geles electroforesis desnaturalizante al 12% de acuerdo al método de (Laemmli 1970) y se visualizaron con solución de Commassie coloidal en células totales.

Para análisis de Western blot, las proteínas de los geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) usando el sistema de transferencia semiseco (Transblot-Bio Rad). Como anticuerpo primario se usó el anticuerpo policlonal de conejo Anti h-IFN γ (Peprotech, Rocky Hill, NJ) dilución 1:5000, o bien el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-GFP N-Terminal (Sigma) dilución 1:1500 como anticuerpo secundario, el anticuerpo de cabra Anti- IgG-fosfatasa alcalina de conejo o de ratón según sea el caso con dilución 1:3000 para ambos casos. Las membranas se revelaron con p-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP, Amersham)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de las proteínas de fusión LTB-GFP-ShdA y LTB-hIFN γ -ShdA, en cepas BL21SI y BL21DE3 pLysS

Se ha reportado que en los cultivos donde se producen proteínas recombinantes tóxicas tales como; óxido nítrico sintetasa (Roman et al. 1995), DNA helicasa II (George et al. 1994), β -galactosidasa (Dong et al. 1995) proteína transportadora de oxoglutarato-malato OGCP (Miroux and Walker 1996), eventualmente disminuyen las velocidades de crecimiento y las células bacterianas pueden dejar de dividirse desde el momento de la inducción (Dong et al. 1995); sin embargo, en algunos otros casos hay poco efecto sobre las células en que se encuentran creciendo en fase exponencial no obstante matan a las células al llegar a la fase estacionaria (Studier 1990).

Los cultivos de clonas transformantes de *E. coli* BL21SI y BL21DE3-pLysS se crecieron e indujeron en la fase exponencial (0.5 OD_{600nm}) para seleccionar la cepa con mejor expresión de la proteína de fusión. En general se encontró que en los cultivos de las cuatro cepas transformantes, las velocidades específicas de crecimiento disminuyeron después de añadir el inductor (Tabla 4). A pesar de esto la fase estacionaria fue alcanzada en los cultivos para la fusión LTB-GFP-ShdA con 3 de OD_{600nm} y para LTB-hIFN γ -ShdA con 2.4 de OD_{600nm}. En esta última las células dejaron de dividirse y se observó lisis celular.

Tabla 1. Velocidades de crecimiento de cultivos de *E. coli* BL21SI y BL21(DE3) transformados con pShdA-GFP y pShdA-hIFN γ a 37°C

Velocidad específica de crecimiento	Proteína de fusión			
	LTB-GPF-ShdA		LTB-hIFN γ -ShdA	
	BL21SI/pShdA-GFP	BL21DE3 pLysS/pShdA-GFP	BL21SI/pShdA-hIFN γ	BL21DE3 pLysS/pShdA-hIFN γ
$\mu_{\text{rec}}(\text{h}^{-1})$	1.15 \pm 0.06	1.05 \pm 0.08	0.71 \pm 0.01	0.66 \pm 0.01
$\mu_{\text{ind}}(\text{h}^{-1})$	0.20 \pm 0.06	0.16 \pm 0.00	0.42 \pm 0.00	ND Lisis celular

Los datos se presentan como promedio \pm DS con n=3
ND. No determinado.

En los cultivos de la cepa BL21SI/pShdA-GFP se observó una cinética de crecimiento de tres fases. fase pre-inducción, el cultivo creció por 2 h antes de la adición de inductor (Fase 1, Fig. 3), fase de post-inducción, la densidad celular del cultivo se mantuvo estable por 4 h (Fase 2, Fig. 3) y finalmente se registró una fase de propagación donde la densidad celular se incrementó por 4 h hasta llegar a fase estacionaria (Fase 3, Fig. 3). Este comportamiento lo han reportado (Miroux and Walker 1996, Studier 1990) donde concluyeron que esta asociado a inestabilidad del plásmido y la prolongación a tres fases se debe a la proliferación de células que pierden la capacidad de expresar el gen de interés, el punto donde se inactiva o destruye el antibiótico en el medio dichas células inician su propagación en el cultivo. Por otro lado el alargamiento de la fase adaptación post-inducción, depende del grado de toxicidad asociada al plásmido que lleva al gen de interés.

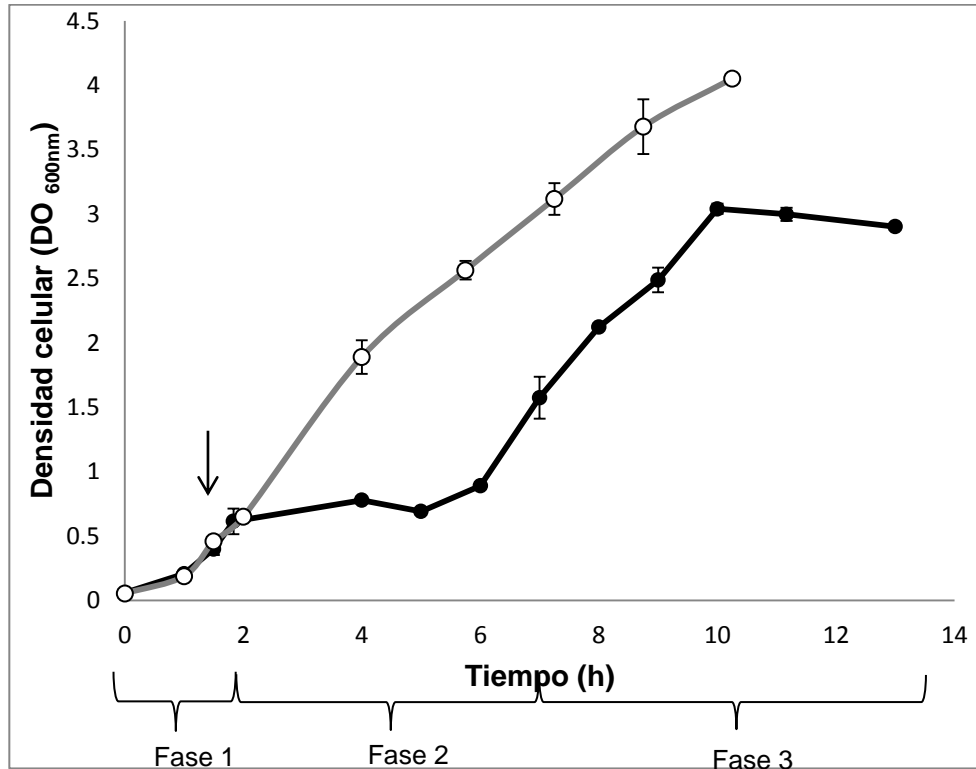


Figura 3. El crecimiento del cultivo BL21SI/pShdA-GFP muestra cinética de tres fases. Cepas control BL21SI/pShdA[○], cepa BL21SI/pShdA-GFP[●], con la flecha se indica en punto de inducción. Una colonia fresca de la cepa BL21SI/pShdA-GFP se inóculo en matraces con 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina a 37°C y se indujo a 0.5 de DO_{600nm}. Tres fases de crecimiento se han marcado: Fase1, Pre-inducción; Fase 2, Adaptación post-inducción; Fase 3, Propagación del cultivo.

Los pesos moleculares de las proteínas de fusión, LTB-GFP-ShdA y LTB-hIFN γ -ShdA son de 70 kDa y 58 kDa respectivamente, determinados en base a su secuencia de residuos de aminoácidos. En los análisis de proteínas en los geles de poliacrilamida mostraron que en transformantes con pShdA-hIFN γ se produjo una proteína de aproximadamente 58 kDa, mientras que en transformantes con pShdA-GFP no se observó la proteína de aproximadamente 70 kDa (Datos no mostrados).

Se ha reportado que algunas proteínas como la óxido nítrico sintetasa (Roman et al. 1995), la proteína transportadora de fosfato bovina (Miroux and Walker 1996) y las proteínas alergénicas de cacahuete (Kleber-Janke and Becker 2000), al sobreexpresarlas en plásmidos basado en el promotor T7 en cepas BL21, la expresión fue baja o indetectable.

La microscopía de fluorescencia mostró que algunas células y residuos celulares, tanto de BL21SI como BL21DE3-pLysS transformadas con pShdA-GFP, después de 1 h de inducción emiten fluorescencia a un nivel más alto que la muestra control, cuando se les incidía luz azul a 400nm (Fig. 4). Lo que indica que GFP citoplásmica de la fusión LTB-GFP-ShdA, se plegó correctamente en algunas células.

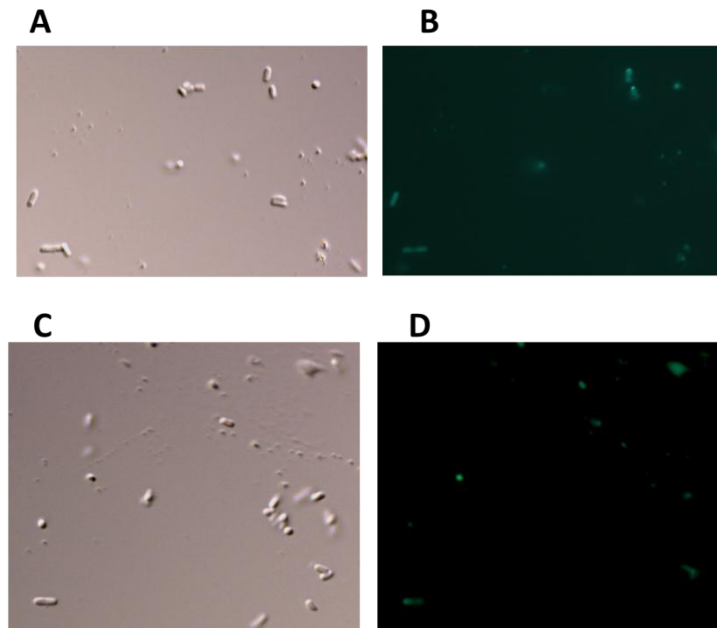


Figura 4. Algunas células y residuos celulares de transformantes con la fusión LTB-GFP-ShdA emiten fluorescencia en *E. coli* A y C) Imagen contraste de fases campo claro, muestra la morfología celular. B y C) Imagen campo oscuro, emisión de fluorescencia de células transformadas con pShdA-GFP, B) Cepa de *E. coli* BL21SI/pShdA-GFP D) Cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS/pShdA-GFP

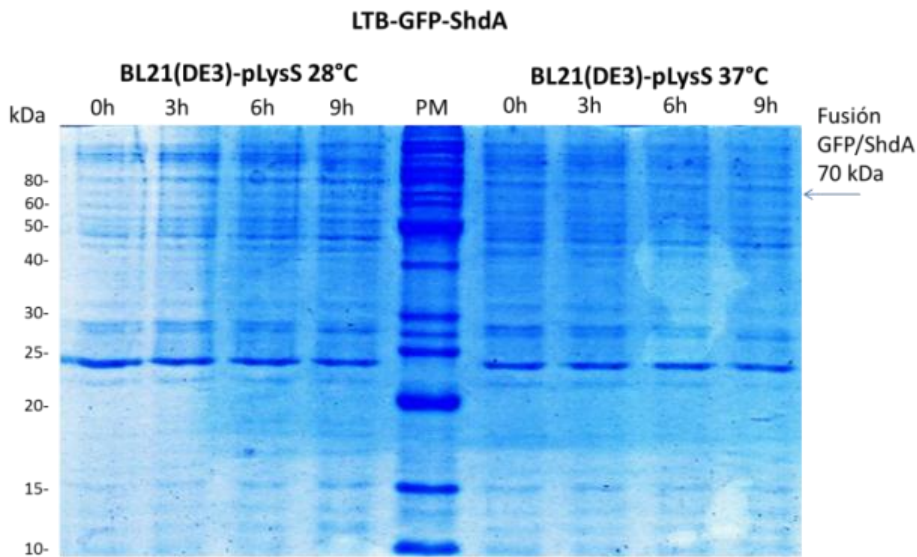
En resumen en las cepas transformantes con pShdA-GFP, las disminuciones en las velocidades específicas de crecimiento después de la inducción con IPTG o con NaCl, la cinética de crecimiento de tres fases y la expresión indetectable de la proteína de 70 kDa, sugieren que la proteína de fusión LTB-GFP-ShdA es tóxica para las células hospederas. De forma similar para las cepas transformantes con pShdA-IFN γ ; las disminuciones en las velocidades específicas de crecimiento después de inducción con IPTG o con NaCl, la muerte celular una vez alcanzada la fase estacionaria, sugieren que la proteína de fusión LTB-IFN γ -ShdA también es tóxica para las células de *E. coli*, cepas BL21SI y BL21(DE3)-pLysS.

Modificación de medio de cultivo y de la temperatura

Las condiciones de cultivo tales como el uso de medio mínimo y de temperatura baja de incubación causan una disminución de procesos de replicación, transcripción, traducción y modificaciones post-traduccionales (Jana 2005). Además con la disminución de la temperatura de cultivo se elimina parcialmente las proteasas inducidas por choque térmico que se inducen bajo las condiciones de sobreexpresión y se incrementa un número importante de chaperonas (Sorensen and Mortensen 2005). (Balderas Hernandez et al. 2008) publicaron que el uso de medio mínimo y temperaturas de 20°C mejora la producción de hIFN- γ soluble.

Se crecieron cultivos de *E. coli* BL21SI y BL21DE3-pLysS, e indujeron en fase exponencial ($OD_{600nm}=0.5$) usando por un lado medio mínimo (BSG) y 28°C de inducción (Fig. 5). Al variar las condiciones de medio y temperatura en los cultivos se observaron que no hubo cambios en la expresión de la fusión LTB-GFP-ShdA (Fig. 5A), mientras que en la fusión LTB-hIFN γ -ShdA si se observó un ligero incremento al variar temperatura (Fig. 5B).

A)



B)

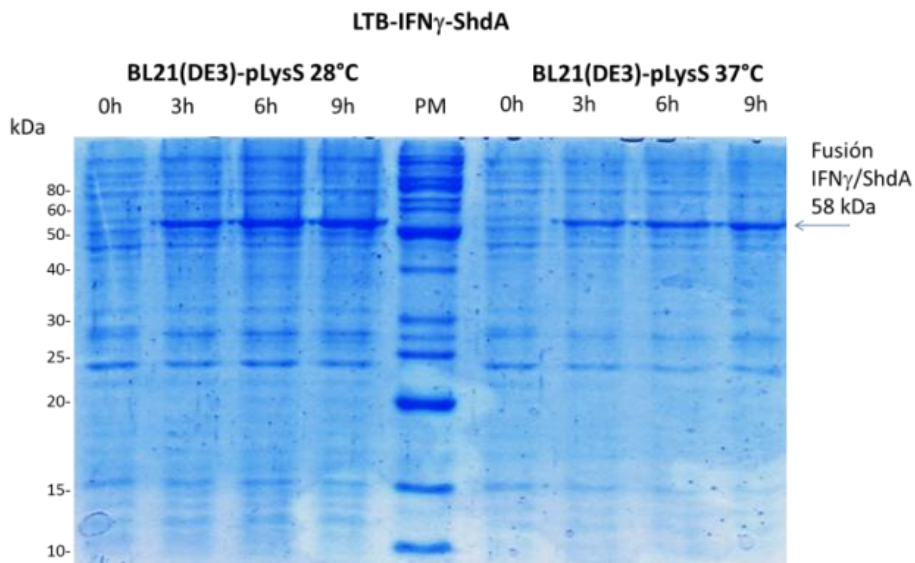


Figura 5. La expresión de la fusión LTB-hIFN γ -ShdA se incrementa al inducir el cultivo a 28°C en *E. coli* BL21(DE3)-pLysS. (A) LTB-GFP-ShdA Carriles 1-4) Cinética de inducción a 28°C, Carril 5) Marcador de PM (invitrogen); Carriles 6-9) Cinética de inducción a 37°C (B) LTB-hIFN γ -ShdA Carriles 1-4) Cinética de inducción a 28°C, Carril 5) Marcador de PM (invitrogen); Carriles 6-9) Cinética de inducción a 37°C

Análisis de uso de codones raros y de baja frecuencia.

Comúnmente genes codificados por codones abundantes da como resultado genes sobreexpresados en grandes cantidades mientras que genes codificados por codones raros da como resultado niveles bajos de expresión (Kane 1995). La expresión de genes con codones raros puede conducir anomalías traduccionales, como resultado del requerimiento de la incorporación de aminoácidos acoplado a un tRNA de baja frecuencia (Angov 2011). La tendencia a alteraciones es altamente prevalente cuando los transcritos contienen codones raros en conjuntos, en forma de dobletes, tripletes o en grandes cantidades. Dentro de las alteraciones que pueden tener en los transcritos incluyen, mala traducción, sustitución de aminoácidos, eventos de cambio de marco de lectura o terminación prematura de la traducción. Dentro de los codones problemáticos o raros, son los productos codificados por los tRNAs *argU* (AGA y AGG), *argX* (CGG), *argW* (CGA y CGG), *ileX* (AUA), *glyT* (GGA), *leuW* (CUA), *proL* (CCC) y *lys* (AAG) (Sørensen and Mortensen 2005). El plásmido pRARE contiene los genes que codifican para *argU*, *ileX*, *glyT*, *proL* y *leuW* (Novy 2001, Sørensen and Mortensen 2005)

Se realizó un análisis de secuencia de los genes, *LTB-GFP-ShdA* y *LTB-hIFN γ -ShdA*, considerando como codones raros a los más problemáticos o con una frecuencia menor a 5 de cada 1000 codones (Kane 1995) y los de baja frecuencia aquellos con frecuencia menores a 10 codones de cada 1000. En la fusión *LTB-GFP-ShdA* se encontró tiene 23 codones raros y 34 de baja frecuencia, mientras *LTB-hIFN γ -ShdA* tiene 10 codones raros y 33 de baja frecuencia (Anexos, Tabla 4).

Para incrementar el número de copias de especies limitantes de tRNAs se cotransformó las cepas, BL21(DE3) y BL21SI, con pRARE. De esta forma para la fusión LTB-GFP-ShdA, se incrementan los tRNAs para seis codones AGA, dos CCC y dos CUA, y en LTB-hIFN γ -ShdA dos GGA y dos CUA. Se encontró que la expresión de proteínas, para LTB-GFP-ShdA no se observó sobreexpresión y para la LTB-hIFN γ -ShdA el nivel de expresión fue comparable con la cepa control sin cotransformación (datos no mostrados).

Los resultados indican que los 10 codones de la fusión LTB-GFP-ShdA y los 4 codones de la fusión LTB-IFN γ -ShdA suplementados por la coexpresión de pRARE no incrementan la expresión de la proteína en los cultivos y sugieren que otros factores pueden estar afectando la cantidad y calidad de la expresión proteica; dentro de los cuales se pueden incluirse, los codones raros no suplementados, la cantidad, posición de codones de baja frecuencia, degradación por proteasas citoplásmicas e inclusive el uso de plásmidos con alto número de copias.

Expresión de las fusiones LTB-GFP-ShdA y LTB-hIFN γ -ShdA en fase estacionaria.

Se crecieron e indujeron cultivos en medio líquido de las cepas de *E. coli*; BL21SI; BL21(DE3)-pLysS; BL21SI-pRARE y BL21(DE3)-pRARE en fase estacionaria (OD_{600nm} = 3) para seleccionar la cepa transformante con mejor expresión de la proteína de fusión.

Los cultivos transformados con pShdA-hIFN γ mostraron que en todas las cepas, BL21SI, BL21(DE3)-pLys y BL21(DE3)-pRARE, después de la adición de inductor la población bacteriana disminuyó. Sin embargo, en la cepa BL21(DE3)-pLysS el efecto fue menor por lo que se decidió usar esta cepa en experimentos posteriores.

En muestras de los cultivos transformados con pShdA-GFP mostraron que en las cepas, BL21SI-pRARE; BL21(DE3)-pLysS y BL21(DE3)-pRARE, la señal de las proteínas detectadas fue muy débil o no detectada (Fig. 6C-E). Interesantemente, se encontró que en la cepa BL21SI/pShdA, la proteína de fusión LTB-GFP-ShdA, se sobreexpresó (Fig 6 A y B). Sin embargo, este no fue un evento reproducible, por lo que no se realizó la prueba de fraccionamiento celular.

En estudios con la proteína de membrana mitocondrial OGCP (proteína transportadora de oxoglutarato-malato) en la cepa BL21(DE3) encontraron que al agregar IPTG las células silvestres se mueren; sin embargo, hay algunas que mutantes que sobreviven. Los autores sugirieron que pequeñas cantidades de las proteínas inducidas provoca una respuesta de mutagénesis SOS en la célula y se generan mutantes. Las cepas (C41(DE3)y C43(DE3)) mostraron mejor expresión de la proteína tóxica que la cepa BL21(DE3) (Miroux and Walker 1996).

Al comparar lo reportado por Miroux y Walker (1996), se puede sugerir que los cultivos donde se sobreexpresó la fusión LTB-GFP-ShdA se seleccionaron células sobreexpresantes. Cabe mencionar que la cepa BL21SI-pShdA-GFP muestra expresión basal de la proteína (Fig. 6B) y probablemente las proteínas basales provocaron una respuesta de mutagénesis SOS. Aunado a esto, el proceso de cultivo involucra una serie de pases de resembrado; de cultivo conservado en glicerol a medio semisólido; de medio semisólido al inóculo y finalmente del inóculo al cultivo en medio líquido, donde pudo llevarse la selección de células sobreexpresantes.

Otro resultado interesante encontrado en la cepa BL21SI/pShdA-GFP, fue que al detectar LTB-GFP-ShdA por Western Blot se observaron dos proteínas: la proteína de fusión completa de 70 kDa y una versión truncada de 35 kDa (Fig. 6B) y para las cepas transformadas con pShdA-hIFN γ para LTB-hIFN γ -ShdA se encontró que se induce la proteína de fusión de 58kDa, y varias proteínas de menor tamaño como la de 41kDa (Fig. 7 A y B).

(Schweder et al. 2002) reportaron que en sistemas de expresión basados en el promotor T7, se puede obtener una gran cantidad de productos que sufren problemas de traducción como traducción abortada, agregación y productos degradados. Además se ha visto que las cepas BL21SI y BL21(DE3) aunque son mutantes con ausencia de dos de las proteasas principales involucradas en la degradación de proteínas recombinantes, Lon y Omp T, tienen otras proteínas

como ClpAP y ClpYQ que las pueden suplir su función y hay degradación de proteasas es estas cepas (Rozkov and Enfors 2004). Por lo que podemos sugerir que las proteínas de menor tamaño al peso molecular esperado en ambas fusiones son producto de degradación proteolítica y/o problemas de traducción debido al sistema de expresión basado en el promotor T7 usado.

Por último cabe mencionar que diversos autores (Dong et al. 1995, Kurland and Dong 1996, Miroux and Walker 1996) han mostrado evidencias que soportan la hipótesis que el componente principal de la toxicidad de la sobreexpresión esta ligado a la transcripción del gen de interés. Sugieren que la probable toxicidad se alcanza por desacoplamiento de los procesos de transcripción y traducción.

La RNA polimerasa del fago T7 transcribe DNA a una velocidad de 230 nucleótidos por s y la RNA polimerasa de *E. coli* 50 nucleótidos por s, por esto hay un desacoplamiento de la transcripción sobre la traducción, permitiendo una acumulación de RNAm desnudo y por un mecanismo no conocido, la falta de acoplamiento de RNAm con proteínas ribosomales lleva a la degradación de RNAr recién sintetizado y el subsiguiente efecto letal en las células y bajos niveles de expresión de genes recombinantes.

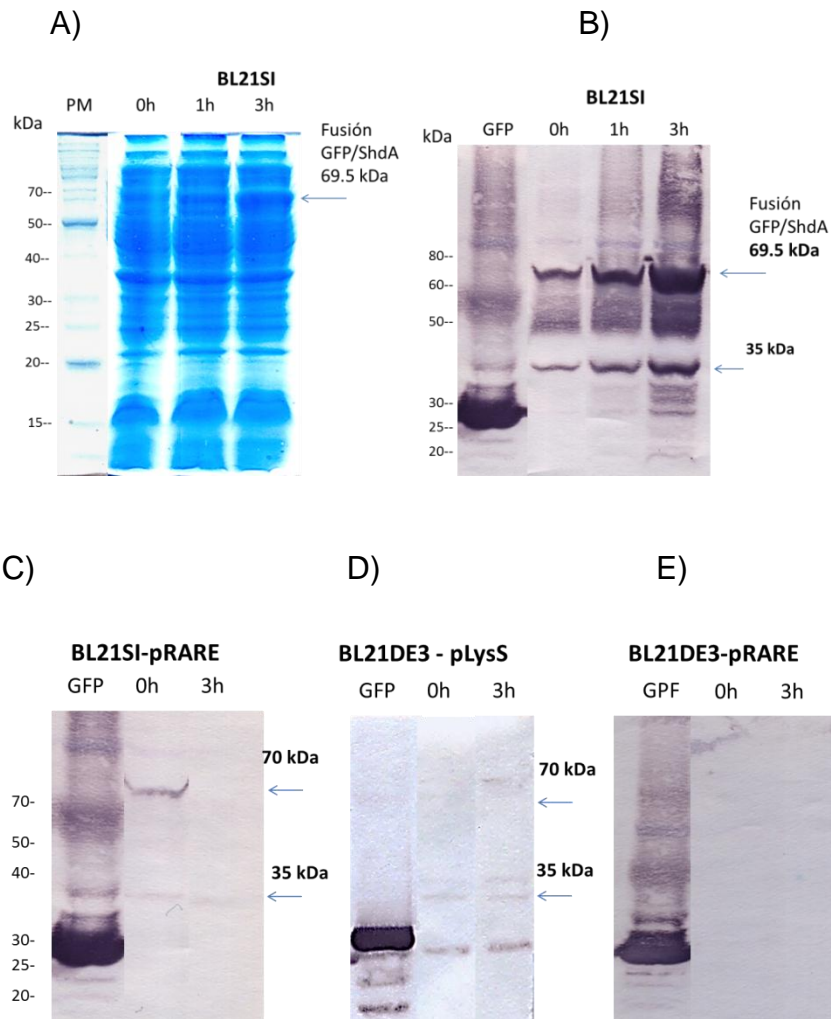


Figura 6. La fusión LTB-GFP-ShdA y una versión truncada de 35kDa se expresan en *E. coli* BL21SI/ShdA (A) SDS-PAGE Carril 1) Marcador de PM (invitrogen); Carriles 2-4) Cinética de inducción (B) Western Blot Carril 1) Control, GFP (27kDa), Carriles 2-4) Cinética de inducción (C) Western Blot BL21SI/pRARE Carril 1) Control, GFP (27kDa), Carriles 2-3) Cinética de inducción (D) Western Blot BL21(DE3)/pLysS Carril 1) Control, GFP (27kDa), Carril 2-3) Cinética de inducción (E) Western Blot BL21(DE3)/pRARE Carril 1) Control, GFP (27kDa), Carriles 2-3) Cinética de inducción

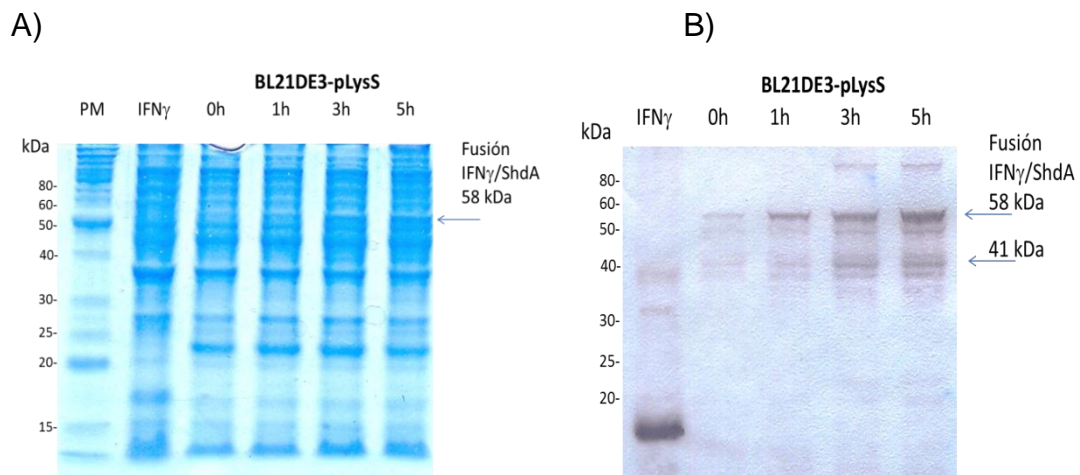


Figura 7. La proteína de fusión LTB-hIFN γ -ShdA y otras de menor tamaño como la de 41 kDa se expresan en *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pShdA-hIFN γ (A) SDS-PAGE Carril 1) Marcador de PM (invitrogen); Carril 2) Control, hIFN γ (17kDa) Carriles 3-6) Cinética de inducción (B) Western Blot Carril 1) Control, hIFN γ (17kDa), Carriles 2-5) Cinética de inducción

Fraccionamiento celular

Las células del cultivo BL21(DE3) pLysS /pShdA-hIFN γ se fraccionaron, en las porciones periplásmica, citoplásmica y material insoluble. La porción de material insoluble es membrana interna, membrana externa y cuerpos de inclusión (citoplásmicos y periplásmicos). Por Western blot se encontró que en la fracción citoplásmica y en el material insoluble se detectaron las proteínas 70 kDa y otras de menor tamaño mientras que en fracción periplásmica no se detectaron proteínas que dieran señal positiva al anticuerpo anti-hIFN γ (Fig. 8). En la prueba de microscopía de inmunofluorescencia no se detectó emisión de fluorescencia con rodamina en la membrana externa.

(Wilkinson and Harrison 1991) propusieron un modelo para el cálculo teórico de los porcentajes de solubilidad de proteínas recombinantes expresadas en el citoplasma de *E. coli*. Esta correlación usa la composición de residuos de aminoácidos de la proteína y predice solubilidad empleando los parámetros: carga promedio, fracción de residuos que forman estructuras flexibles, fracción de prolina, fracción de cisteína, hidrofiliidad y número total de residuos. Se analizó la secuencia de LTB-hIFN γ -ShdA y se encontró que tiene un 57.3 % de probabilidad de ser insoluble cuando se sobreexpresa en *E. coli*.

Con base en los resultados anteriores posiblemente la proteína de fusión citoplásmica se queda anclada en la membrana interna al pasar por el translocón de la vía Sec y en cuerpos de inclusión citoplásmicos dada la alta probabilidad de insolubilidad.

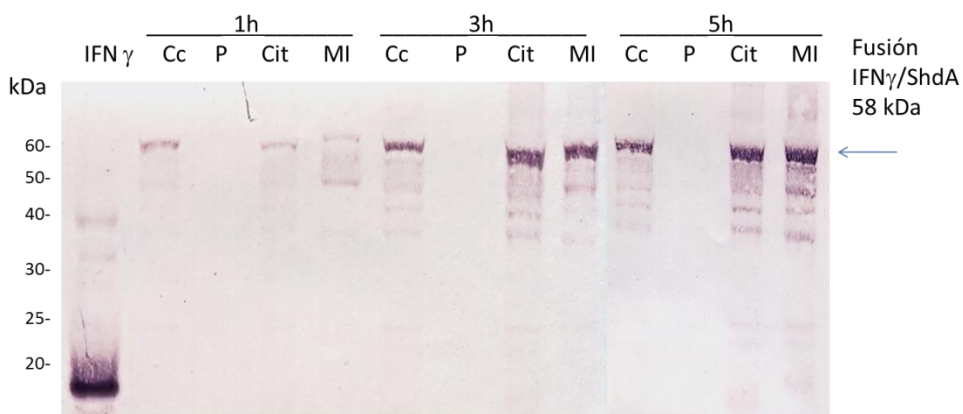


Figura. 8 La proteína de fusión LTB-hIFN γ -ShdA se localiza en fracción citoplásmica en la fracción de material insoluble *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pShdA-hIFN γ . Carril 1) Cultivo control hIFN γ (17 kDa), Carriles 2-13) Fraccionamiento celular, Cc (Célula completa), P (Fracción periplásmica), Cit (Fracción citoplásmica), MI (Material Insoluble).

CONCLUSIONES

Tanto la proteína de fusión LTB-GFP-ShdA como LTB-hIFN γ -ShdA son tóxicas para las cepas BL21SI y BL21(DE3)-pLysS.

La temperatura incrementa la expresión de LTB-hIFN γ -ShdA mientras que en LTB-GFP-ShdA no se favorece la sobreexpresión de proteínas en las cepas BL21SI y BL21(DE3)-pLysS.

Tanto el uso de medio mínimo como la complementación de pRARE que significa el incremento de tRNAs, 10 codones (6 AGA, 2 CCC y 2 CUA) para LTB-GFP-ShdA y 4 codones (2 GGA y 2 CUA) para LTB-IFN γ -ShdA, no aumentan la expresión de las proteínas de fusión en las cepas BL21SI y BL21(DE3).

Las cepas BL21SI, BL21(DE3)-pLysS y BL21(DE3)-pRARE transformadas con pShdA-IFN γ al inducir los cultivos en fase estacionaria muestran lisis celular después de la adición de inductor. Sin embargo, en BL21(DE3)-pLysS, el proceso de lisis es más lento.

Al inducir los cultivos en fase estacionaria, la proteína LTB-GFP-ShdA se sobreexpresó en la cepa BL21SI/pShdA; sin embargo, fue un evento no reproducible, mientras que en las cepas BL21(DE3)-pLysS, BL21SI-pRAREy BL21(DE3)-pRARE la proteína no se sobreexpresó.

Finalmente la proteína LTB-hIFN γ -ShdA al parecer no alcanza a desplegarse fuera de la membrana externa de *E. coli*, probablemente se encuentra anclada en la membrana interna y en cuerpos de inclusión citoplásmicos.

ANEXOS

Tabla 1. Plásmidos usados en este estudio

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pET-12 ^a	4674 pb, promotor T7, Amp ^r	Novagen
pET-12amod	2743 pb, promotor T7, Amp ^r	Este trabajo
pCR4-TOPO	3956pb, Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen
pASM	3810 pb, promotor nir, Amp ^r Codifica péptido señal (LTB) y el β -barril de ShdA	Este trabajo
pUC19	Ampr. Codifica para GFP	
pCR4-SPI γ	Amp ^r , Kan. Codifica para hIFN γ ^r	Tesis de doctorado Victor Emmanuel Balderas Hernández.
pShdA	3921 pb, promotor T7, Amp ^r Codifica péptido señal (LTB) y el β -barril de ShdA	Este trabajo
pShdA-GFP	4644 pb, promotor T7, Amp ^r Codifica péptido señal (LTB), GFP y el β -barril de ShdA	Este trabajo
pShdA-hIFN γ	4644 pb, promotor T7, Amp ^r Codifica péptido señal (LTB), hIFN γ y el β -barril de ShdA	Este trabajo
pLysSRARE	7393pb, Cam ^r , codifica para tRNA raros en <i>E. coli</i> , AGG, AGA, AUA, GGA, CUA y CCC	Novagen

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos usados en experimentos de PCR

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Gen a amplificar	Sitio de restricción
CORRFGFP- <i>NheI</i>	gctagcATGTCTAAAGGTGAA GAATTATTC	<i>gfp</i>	<i>NheI</i>
RGFP- <i>NheI</i>	gctagcTTTGTACAATTCATCC ATACC	<i>gfp</i>	<i>NheI</i>
FIFNG- <i>NheI</i>	gctagcCAGGACCCATACGTG AAAGAG	<i>hifn-γ</i>	<i>NheI</i>
RIFNG- <i>NheI</i>	gctagcCAGGGAACGTTTACG TTTACCAGTTTTAGCTGCTG GTGACAGTTCTGCCATCACT	<i>hifn-γ</i>	<i>NheI</i>

En letras minúsculas se muestra el sitio de restricción *NheI*

Tabla 3. Cepas y medios de cultivo

Cepa	Experimento	Medio semisólido de mantenimiento	Medio líquido Inóculo/cultivo	Concentración final de Antibiótico	Concentración final de Inductor
DH5- α	Inducción de GFP control	LB	LB/LB	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	IPTG [0.5mM]
BL21SI	-Inducción en fase exponencial -Inducción en fase estacionaria	LBON	LBON/LBON	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	NaCl [0.3M]
BL21SI	-Crecimiento en medio mínimo	LBON	BSG+Extracto de Levadura (Inóculo) BSG (Cultivo)	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	NaCl [0.3M]
BL21(DE3)-pLysS	-Inducción en fase exponencial -Inducción en fase estacionaria	LB	LB/LB	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	IPTG [0.5mM]
BL21(DE3)-pLysS	-Crecimiento en medio mínimo	LB	BSG + Extracto de Levadura (Inóculo) BSG (Cultivo)	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	IPTG [0.5mM]
BL21SI-pRARE	-Coexpresión de pRARE	LBON	LBON	Ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] Cloranfenicol 25 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	IPTG [0.5mM]

BL21(DE3)- pRARE		LB	LB	Ampicilina [100 µg/mL] Cloranfenicol 25 [µg/mL]	IPTG [0.5mM]
---------------------	--	----	----	--	--------------

LB, Medio Luria Bertani (Bactotripton 10g/L, Bacto extracto de levadura 5g/L, Cloruro de sodio 10g/L)

LBON, (Bactotripton 10g/L, Bacto extracto de levadura 5g/L)

BSG, (Glucosa 5.0 g/L, (NH₄)₂ HPO₄ 3.5g/L, KH₂PO₄ 3.5 g/L, MgSO₄ 7 H₂O 1.0g/L, Tiamina 0.1%, Elementos traza 3.0 mL/L)

Elementos traza: FeCl₃ 27.0 g/L, ZnCl₃ 2.0 g/L, CoCl₂ 6H₂O 2.0 g/L, NaMoO₄ 2H₂O 2.0g/L, CaCl₂ 2H₂O 1.0g/L, CuCl₂ 2H₂O 1.0 g/L, H₃BO₃ 0.5 g/L y HCl al 10%v/v

Tabla 4. Análisis de uso de codones raros y baja frecuencia

Codón/Aminoácido	Frecuencia por 1000 codones (Kane,1995)	LTB-GFP-ShdA	LTB- hIFN γ -ShdA
	Codones Raros		
*AGA (Arg)	2.1	6	-
CGA (Arg)	3.1	1	1
*CUA (Leu)	3.2	2	2
CGG (Arg)	4.6	1	1
UGU (Cys)	4.7	3	1
**AAG (Lys)	ND	8	3
*GGA (Gly)	7.0	2	2
		23	10
Codón/Ami noácido	Codones de Baja Frecuencia		
ACA (Thr)	6.5	1	2
CCU (Pro)	6.6	2	2
UCA (Ser)	6.8	4	7
AGU (Ser)	7.2	5	6
UCG (Ser)	8.0	4	4
CCA (Pro)	8.2	10	3
UCC (Ser)	9.4	5	6
GGG (Gly)	9.7	1	1
CUC (Leu)	9.9	2	2
		34	33

*Codones complementados con plásmido pRARE

**Codón clasificado como codón raro por (Yarian et al. 2000).

ND: No determinado

REFERENCIAS

- Angov E. 2011. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnology Journal* 6: 650-659.
- Balderas Hernandez VE, Paz Maldonado LM, Medina Rivero E, Barba de la Rosa AP, Jimenez-Bremont JF, Ordonez Acevedo LG, De Leon Rodriguez A. 2008. Periplasmic expression and recovery of human interferon gamma in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 59: 169-174.
- Dong H, Nilsson L, Kurland CG. 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* 177: 1497-1504.
- George JW, Brosh RM, Jr., Matson SW. 1994. A dominant negative allele of the *Escherichia coli* *uvrD* gene encoding DNA helicase II. A biochemical and genetic characterization. *J Mol Biol* 235: 424-435.
- Jose J, Meyer TF. 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 600-619.
- Kane JF. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 6: 494-500.
- Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Maghsoudi N, Mohammadian-Mosaabadi J, Mohammadi MR, Bahrami A, Maleksabet N, Nassiri-Khalilli MA, Ebrahimi M, Naderimanesh H. 2004. Process development for production of recombinant human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31: 63-69.
- Kleber-Janke T, Becker W-M. 2000. Use of Modified BL21(DE3) *Escherichia coli* Cells for High-Level Expression of Recombinant Peanut Allergens Affected by Poor Codon Usage. *Protein Expr Purif* 19: 419-424.
- Kurland CG, Dong H. 1996. Bacterial growth inhibition by overproduction of protein. *Mol Microbiol* 21: 1-4.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leyton DL, Sevastyanovich YR, Browning DF, Rossiter AE, Wells TJ, Fitzpatrick RE, Overduin M, Cunningham AF, Henderson IR. 2011. Size and conformation limits to secretion of disulfide-bonded loops in autotransporter proteins. *J Biol Chem* 286: 42283-42291.

- Li C, Zhu Y, Benz I, Schmidt MA, Chen W, Mulchandani A, Qiao C. 2008. Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter pathway. *Biotechnol Bioeng* 99: 485-490.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Marin E, Bodelon G, Fernandez LA. 2010. Comparative Analysis of the Biochemical and Functional Properties of C-Terminal Domains of Autotransporters. *Journal of Bacteriology* 192: 5588-5602.
- Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260: 289-298.
- Novy R. 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Newsletter of Novagen* 12: 1-3.
- Roman LJ, Sheta EA, Martasek P, Gross SS, Liu Q, Masters BS. 1995. High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8428-8432.
- Rozkov A, Enfors SO. 2004. Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89: 163-195.
- Schweder HLB, Jørgensen T. 2002. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 330-337.
- Sørensen HP, Mortensen KK. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 4: 1.
- Sørensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128.
- Studier W. 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Methods in Enzymology* 185: 60-89.
- Wilkinson DL, Harrison RG. 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9: 443-448.
- Yarian C, Marszalek M, Sochacka E, Malkiewicz A, Guenther R, Miskiewicz A, Agris PF. 2000. Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA^{Lys}UUU species. *Biochemistry* 39: 13390-13395.