



03088  
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Ingeniería de la proteína OmpC de *Escherichia coli*  
para propiciar la bioadsorción de iones metálicos**

T E S I S

que para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

presenta el Maestro en Química (Orgánica)

NORBERTO CRUZ GARCÍA

Cuernavaca, Morelos

2001

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Contenido

### I Resumen

### II Introducción y antecedentes

### III Objetivo

### IV Materiales y métodos

### V Resultados:

Artículo publicado en la revista **Biotechnology Letters** 22, 623-629, (2000).

Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption. N. Cruz, S. LeBorgne, G. Hernández, G. Gosset, F. Valle y F. Bolívar

#### Consideraciones relevantes sobre los resultados de la publicación:

- 1) El diseño y la ingeniería de epítopes ricos en residuos de histidina expresados en OmpC
- 2) La expresión de genes híbridos que codifican para proteínas recombinantes OmpC con epítopes de histidina
- 3) La demostración de la presencia y de la exposición de los epítopes de histidina en la superficie de células de *Escherichia coli*
- 4) La adsorción de iones metálicos en solución en la superficie de células que portan las proteínas recombinantes con epítopes de histidina.

### VI Conclusiones y perspectivas

### VII Bibliografía

### VIII Agradecimientos

### IX Artículo publicado:

Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption. N. Cruz, S. LeBorgne, G. Hernández, G. Gosset, F. Valle y F. Bolívar  
**Biotechnology Letters** 22, 623-629, (2000).

## I Resumen

La contaminación del medio ambiente es un problema creciente que afecta prácticamente a todos los ecosistemas del planeta, generando situaciones graves de salud y de destrucción de la biodiversidad. Las técnicas de la biotecnología moderna son una de las mejores opciones para contender con muchos de estos problemas a través del uso de sistemas biológicos optimizados.

Entre los problemas importantes de contaminación se encuentra la producida por la presencia de ciertos iones metálicos en cuerpos de agua y suelos. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue el diseño de células bacterianas de *Escherichia coli* con capacidades mejoradas para la adsorción de iones metálicos. Para lograr lo anterior, se seleccionó a la proteína OmpC de la bacteria *E. coli*, que se encuentra presente en más de  $10^5$  copias por célula en la superficie bacteriana, como proteína acarreadora y presentadora de epítopes de residuos de histidina, los cuales incrementan la capacidad de adsorción de ciertos iones metálicos por la biomasa bacteriana.

En este sentido, demostramos que la incorporación de estos epítopes en proteínas recombinantes OmpC, incrementaron la capacidad de la célula bacteriana para adsorber ciertos iones metálicos en solución, tales como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  de manera dependiente al número de residuos de histidina presentes en el epítope. Para el caso del ion  $\text{Cr}^{+3}$ , no hubo una adsorción positiva y pensamos que lo anterior se debe a que los residuos de histidina no complejan con este ión. Además, se obtuvo el resultado de que al aumentar el número de residuos de este aminoácido en la superficie de la bacteria, disminuyó aún más la adsorción basal de este ión en la membrana celular.

## II Introducción y antecedentes

La contaminación de los diferentes ecosistemas de nuestro planeta, representa una de las problemáticas más complejas a las que se enfrenta la sociedad actualmente a nivel mundial, y a la que indudablemente se enfrentarán las siguientes generaciones. Los procesos de producción de energéticos, alimentos, medicamentos y otros satisfactores sociales, generan en su mayoría contaminantes, muchos de ellos recalcitrantes, que se incorporan a los cuerpos de agua, al suelo y el aire y permanecen allí generando problemas muy serios de destrucción de la biodiversidad y de salud humana y animal.

La biotecnología moderna, entendida como una actividad multidisciplinaria, sustentada por el conocimiento y metodología de varias disciplinas tradicionales, entre ellas la genética y la bioingeniería, es una de las mejores opciones que tenemos como sociedad mundial y mexicana, para contender con muchas de las demandas de alimentos, medicamentos y otros satisfactores de la sociedad (Bolívar *et al* 2001). En particular a nivel del problema de la contaminación de los cuerpos de agua, del suelo y del aire, existen una serie de acciones que habría que desarrollar, apoyadas en la biotecnología moderna, para contender con este problema de la contaminación.

En el caso del aire habría, por ejemplo que desarrollar la ingeniería idónea para construir sistemas adecuados a las necesidades de tratamiento; desarrollar inóculos microbianos avanzados y adaptados para aplicaciones específicas no convencionales y avanzar en la implementación de biosensores para la medición *in situ* de la actividad de microorganismos en biopelículas.

En el caso del agua, habría por ejemplo, que profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales para optimizar su diseño y operación; desarrollar biosensores optimizados para mejorar el control de procesos biotecnológicos, avanzar en el seguimiento de la calidad de agua en drenajes y cuerpos de agua y desarrollar procesos especializados, con base en microorganismos modificados genéticamente, para el tratamiento en las fuentes, de contaminantes xenobióticos problemáticos, antes de mezclarlos con otras corrientes, así como desarrollar métodos modernos para detectar microorganismos patógenos en aguas tratadas.

Finalmente, en el caso de los esfuerzos de recuperación y remediación de suelos contaminados, entre algunas de las acciones que se han recomendado, estarían el diagnóstico

y seguimiento del tratamiento de suelos contaminados; selección y estandarización de métodos analíticos para el monitoreo de suelos contaminados; identificación y modificación de las especies participantes en los consorcios responsables de la bioremediación de suelos; el desarrollo de procesos de modificación biocatalítica (oxidativa principalmente), para modificar/degradar contaminantes, en particular compuestos aromáticos y azufrados, mutagénicos, derivados del petróleo (combustibles) y de pesticidas; el análisis de compuestos recalcitrantes en suelos contaminados con hidrocarburos y en suelos agrícolas contaminados con pesticidas; generar estudios toxicológicos de sustancias contaminantes y subproductos de degradación y desarrollar procesos biológicos para eliminar iones metálicos pesados (Noyola *et al* 2001).

Las técnicas modernas de la ingeniería genética permiten el diseño, la construcción y optimización de organismos biológicos mejorados. La producción de insulina humana en *Escherichia coli*, en 1979, fue el primer ejemplo del uso de esta metodología para producir un organismo transgénico de interés comercial (Goeddel *et al* 1979), y dio lugar a la formación de Genentech, Inc., la primera compañía de ingeniería genética y biotecnología moderna orientada a la producción de moléculas humanas de uso clínico por esta tecnología (Watson *et al* 1992). A más de veinte años de ese experimento exitoso, hemos atestiguado el uso de esta tecnología en el desarrollo de otros organismos modificados genéticamente para diferentes propósitos. Si bien, el impacto de la ingeniería genética y la nueva biotecnología ha sido primariamente en el sector de la salud con mucho éxito, la segunda ola de impacto se está dando en la actualidad en el sector agrícola, con el desarrollo de nuevos cultivares modificados genéticamente, para adquirir nuevas propiedades, como resistencia a insectos, herbicidas, sales, etc. (Herrera *et al* 2001).

Son aún pocos los ejemplos del impacto de la biotecnología moderna en el área de la industria química y en la de la contaminación ambiental, pero es indudable que, debido a la presión social para desarrollar esquemas sustentables de producción, que sean respetuosos con el medio ambiente y la biodiversidad, serán cada día más comunes los ejemplos de desarrollo de tecnologías biológicas limpias para la producción en la industria química y además, habría también un mayor número de procesos encaminados a contender con los problemas de contaminación en el medio ambiente (López-Munguía *et al* 2001, Noyola *et al* 2001).

El papel de los iones metálicos para la vida y el medio ambiente es fundamental. Actúan como cofactores en reacciones enzimáticas, formando parte del sitio activo de

enzimas, estabilizando su estructura terciaria o catalizando la regulación y expresión de genes. También se ha encontrado que un desbalance en la concentración de ciertos iones, entre ellos el  $\text{Fe}^{+2}$ , puede provocar enfermedades como las de Wilson y Menkes. (Peter y Cox 1994). Sin embargo, insistiendo sobre lo comentado en relación a la contaminación ambiental, los iones metálicos se han acumulado en el medio ambiente, contribuyendo a la contaminación de la biósfera (Nriagu y Pacyna 1989) y en los últimos años se han incrementado los efectos tóxicos por metales que contaminan el agua, lo que ha dado lugar a una mayor preocupación de la sociedad por este aspecto, generándose leyes que procuran disminuir la concentración de estos iones con posible efectos tóxicos para la salud (Noyola *et al* 2001). De hecho, la Organización Mundial de la Salud, en un reporte en este sentido, señala que los iones metálicos de mayor preocupación en este aspecto son el aluminio, cromo, manganeso, fierro, cobalto, níquel, cobre, zinc, mercurio y plomo (OMS, 1984), los cuales se producen en un gran número de procesos industriales. Por mencionar un ejemplo, se conoce que las tenerías arrojan a los afluentes descargas residuales que van de 0.3-1.1 g/L de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , además de incrementar también las concentraciones de níquel, magnesio y calcio. (Silvestre *et al* 1994, Thomas *et al* 1995). Por las razones anteriores, resulta claramente importante desarrollar procesos de remediación, adecuados y competitivos técnica y económicamente, que permiten remover los iones metálicos y en particular  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ .

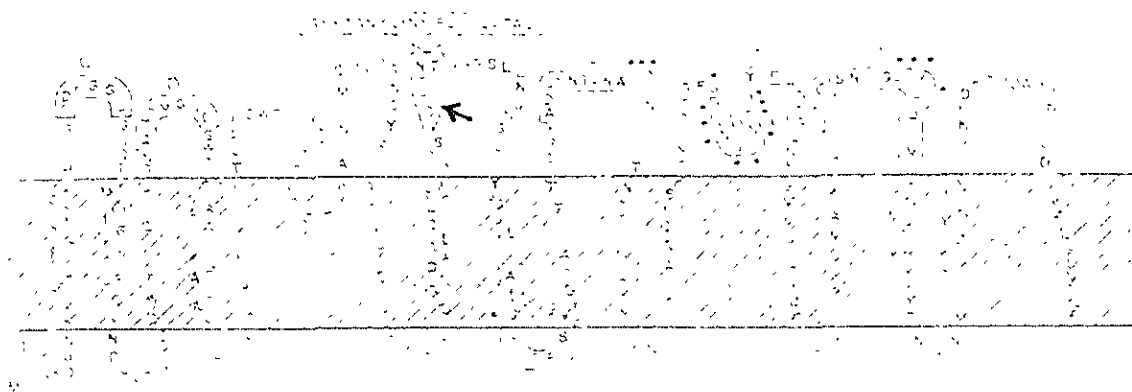
Para contender con este problema de la contaminación por iones metálicos, se han desarrollado diferentes tipos de tecnología (biológica, química y fisicoquímica). Estos métodos en lo general, explotan las diferentes propiedades fisicoquímicas con el propósito de adsorber, concentrar y precipitar iones metálicos tóxicos y en algunos casos transformarlos en compuestos no tóxicos. En este contexto, uno de los enfoques más promisorios ha sido el uso de tecnología que permite la bioadsorción de metales pesados por diferentes tipos de biomasa (Fourest y Roux 1992, Beate y Gunhild 1994, Nourbakhsh *et al* 1995, Stoll y Duncan 1996, Cuero 1996, Kratochvil y Volesky 1998), aunque este tipo de procesos es generalmente inespecífico (Kim *et al* 1996).

Para mejorar este tipo de procesos de bioadsorción se han desarrollado diferentes enfoques orientados a la modificación de la pared celular de los microorganismos utilizados en los procesos, incluyendo la sobreexpresión de proteínas, como las metalotioninas, en la superficie de microorganismos (Pazirandeh *et al* 1995). La expresión de péptidos y proteínas en la superficie de las bacterias Gram-negativas, tiene una amplia gama de aplicaciones en diferentes sectores, como por ejemplo la producción de vacunas vivas (Puente *et al* 1995), el

-uso de la pared celular para la presentación de librerías de péptidos y la preparación de biocatalizadores microbianos (Georgiou *et al* 1993).

En particular, en *E. coli*, se han descrito diferentes enfoques orientados a la presentación de péptidos y proteínas en la superficie de este organismo. Estos incluyen la inserción de secuencias “blanco” específicas en regiones expuestas en la superficie de proteínas que forman parte de la membrana externa y también en proteínas que forman parte de la superficie externa de la célula, tales como el flagelo o lipoproteínas (Hofnung 1991, Little *et al* 1993). Una proteína frecuentemente utilizada para la presentación de péptidos y proteínas pequeñas, ha sido LamB, la cual es una proteína muy abundante ( $10^4$  copias), en la superficie de *E. coli* (Charbit *et al* 1988). Otra proteína de superficie que se encuentra presente también en un número de copias alto es la proteína de membrana externa OmpC (outer membrane protein). Monómeros de esta proteína se organizan como un agregado de tres unidades (trímero) en la membrana externa de la bacteria para dar lugar a la formación de un poro, que está involucrado en la difusión pasiva de moléculas pequeñas de tipo hidrofóbico (Mizuno *et al* 1983, Nikaido 1996). Finalmente, se ha demostrado que OmpC es una proteína estructuralmente importante para estabilizar la membrana externa (Nogami y Mizushima 1983). El gene *ompC* de *E. coli* ha sido clonado y caracterizado; tiene una región estructural con 1,101 pares de bases y se ha demostrado que la expresión de este gene está bajo control de la osmolaridad del medio de cultivo (Mizuno *et al* a, b 1983, Puente *et al* 1991). La proteína OmpC, que tiene un peso molecular de 37,083 kDa, se sintetiza en medios de alta molaridad, como el medio completo de Luria (LB) o en medios mínimos a los que se incrementa la osmolaridad adicionando cloruro de sodio o sacarosa, (Puente *et al* 1991, Nikaido 1996). El alto número de copias de OmpC ( $2 \times 10^5$  moléculas por célula), la convierten en excelente candidato para la expresión de péptidos específicos en la superficie de *Escherichia coli*, además de que en *Salmonella typhi*, OmpC ya se ha utilizado para la presentación de un epítipo específico de rotavirus en la superficie bacteriana, ver figura 1, (Puente *et al* 1995).





**Figura 1.** Representación esquemática de la proteína OmpC de *Salmonella typhi* con en base en el estudio comparativo de Jeanteur *et al* 1995. Las regiones encerradas corresponden a las regiones variables de las secuencias de aminoácidos de OmpC entre *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Las letras en negritas representan residuos de aminoácidos que varían entre las dos bacterias y los puntos representan residuos presentes en *S. typhi* y ausentes en *E. coli*. La flecha señala el sitio de inserción empleado para la exposición de las secuencias de histidinas.

En nuestro laboratorio, hemos estado interesados en el desarrollo de técnicas y herramientas de ingeniería genética (Bolívar *et al* 1977, LeBorgne *et al* 1998, 2001, Palmeros *et al* 2000), que permiten aislar, sintetizar y manipular genes nativos y material genético específico, para utilizarlo con fines particulares. Así, hemos sintetizado, por ejemplo, genes que permiten la producción de las cadenas A y B de insulina (Cruz *et al* 1990, 1992), y de la proinsulina humana en *E. coli* (Olmos *et al* 1994). Asimismo, hemos aislado genes, como el de la penicilino acilasa, que es una enzima involucrada en la producción de penicilinas semisintéticas (Valle *et al* 1991, Merino *et al* 1992), con el propósito de desarrollar procesos de sobreproducción de esta enzima. Finalmente, nuestro grupo también ha desarrollado esfuerzos en el área de la ingeniería de vías metabólicas en *E. coli*, con el propósito de modificar los flujos de carbono en este organismo, para desarrollar cepas optimizadas en la producción de metabolitos aromáticos (Flores *et al* 1996, Gosset *et al* 1997, Flores *et al* 2001).

### III Objetivo

Este proyecto se enmarca en el contexto del uso de la biotecnología moderna para contender con problemas relevantes, particularmente en el área de la contaminación ambiental, mediante el uso y manipulación de la información genética en *E. coli*. El proyecto tuvo como objetivo el desarrollo de cepas de *E. coli* modificadas genéticamente, con el fin de que tuvieran una capacidad incrementada para adsorber iones metálicos tales como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Cr}^{+3}$  que contaminan aguas y suelos. Específicamente, se decidió utilizar la proteína OmpC de *E. coli* por el alto número de copias presentes en la membrana bacteriana, como sistema para presentar epítopes ricos en residuos de histidina los cuales son capaces de formar enlaces de coordinación con iones metálicos y por ello tienen la capacidad de unir iones metálicos en la superficie de la bacteria.

#### IV Materiales y métodos

- 1) Cepa bacteriana y plásmidos utilizados y construidos durante este trabajo; condiciones de crecimiento

La cepa de *Escherichia coli* y los plásmidos utilizados y construidos durante el trabajo se describen en la tabla I. La cepa JM101 de *E. coli* fue utilizada como receptora de los diferentes plásmidos construidos en el presente trabajo (Rodríguez *et al* 1976). El plásmido pBR322 (Bolívar *et al* 1977) fue utilizado por Mizuno *et al* (1983), para insertar el gene *ompC* en el sitio *HindIII* de este vector, construyéndose así el plásmido pMY111.

Las células de la bacteria JM101 con y sin plásmidos, fueron crecidas en medio Luria (10 g/lit de triptona, 5 g/lit de extracto de levadura, y 5 g/lit de NaCl, Miller 1972), suplementado con 50 mg/ml de carbenicilina como antibiótico para seleccionar. Al medio sólido se le agrega agar al 1.5%.

**Tabla I.** Cepa bacteriana y plásmidos utilizados y construidos

Cepa de <i>E. coli</i>	Genotipo y fenotipo relevante	Referencia
JM101	SupE44, <i>thi</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M13	Rodríguez <i>et al</i> 1976
Plásmidos	Características relevantes	
pMY111	Ap <sup>r</sup> derivado de plásmido pBR322. Contiene la inserción del gene <i>ompC</i> , como un fragmento de <i>HindIII</i> .	Mizuno <i>et al</i> 1983
pMY112	Derivado de pMY111. Contiene un oligonucleótido que codifica para 13 residuos de aminoácidos, insertados en el sitio <i>SpeI</i> del gene <i>ompC</i> .	este trabajo
pMY113	Derivado de pMY112. Contiene dos copias del cassette donde cada uno codifica para 13 residuos de aminoácidos insertados en fase en <i>ompC</i> .	este trabajo

## 2) Técnicas de DNA recombinante

### Reactivos

Todas las enzimas de restricción, la DNA ligasa de T4, la DNA kinasa de T4, la fosfatasa alcalina de intestino de becerro, así como la secuenciadora (versión 2) y el kit de secuenciación, fueron adquiridos de New England Biolabs, USA, y se utilizaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

### Transformación de DNA

En los experimentos de clonación, el DNA de los plásmidos se introdujo en la bacteria *E. coli* a través del método standard de transformación química que utiliza  $\text{CaCl}_2$  (Sambrook *et al* 1989).

### Purificación de DNA

Para extraer DNA de las clonas con plásmidos recombinantes, se utilizó el método de lisis alcalina para extraer y purificar el DNA episomal (Rodríguez y Tait 1983). Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA se extrajeron de geles preparativos de agarosa utilizando un kit de extracción (QIAGEN-Minisolation kit) fabricado por Qiagen, Inc., Ca, USA.

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa (1%) o de poliacrilamida (7.5%), según el tamaño, bajo condiciones descritas previamente (Sambrook *et al* 1983).

## 3) Selección del sitio de inserción de las secuencias heterólogas en OmpC

Trabajo publicado previamente demostró que una región de la proteína OmpC de *Escherichia coli*, cerca de la mitad de la cadena polipeptídica entre los residuos 154 y 175, se encuentra expuesta en la superficie celular y actúa como el sitio de unión de un bacteriófago (Mizuno *et al*<sub>ab</sub> 1983, Morona *et al* 1985, Puente *et al* 1995). Estudios más recientes, basados en alineamiento de secuencias y en predicción de la estructura secundaria de varias porinas de diferentes bacterias Gram-negativas,

también señalaban que esta región correspondía a una estructura tipo asa altamente hidrofílica, expuesta en la superficie celular de esta proteína OmpC (Jeanteur *et al* 1995).

Adicionalmente, una comparación de secuencias de residuo de aminoácidos con la proteína OmpF, que es altamente homóloga a OmpC, y cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por técnicas de cristalografía-difracción de rayos X, claramente confirmaron que esta asa está orientada hacia el exterior de la célula y que no está involucrada en la formación del trímero ni del poro (Cowan *et al* 1992). Además, esta región había sido ya utilizada por Puente y colaboradores (1995) para la inserción de un epítipo de rotavirus en la proteína OmpC de *Salmonella typhi*. Por estas razones, se decidió utilizar esta región particular de OmpC para presentar epítopos ricos en histidina en la superficie de *E. coli*. Finalmente, se decidió utilizar el sitio único de reconocimiento de la endonucleasa *SpeI* que está presente en esta región, para insertar los epítopos que contienen residuos de histidina, que se describen a continuación.

#### 4) Construcción de plásmidos con epítopos de histidina en el gene *ompC*

Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios OMHis<sub>61</sub> 5'-CTAGTGATCCATCCGGACATCACCATCATCACCATTCTGGTG-3' y OMHis<sub>62</sub> 5'-CTAGCACCAGAATGGTGATGATGGTGATGTCCGGATGGATCA-3', que codifican para la siguiente secuencia de aminoácidos: SDPSGHHHHHHS. Estos dos oligos se hibridaron a 25°C, a través de bajar lentamente la temperatura de una solución inicialmente a 95°C y el DNA de doble hélice resultante fue fosforilado, utilizando la enzima DNA kinasa proveniente de T4. Los fragmentos fosforilados fueron clonados en el sitio único para la endonucleasa *SpeI*, presente en el gene OmpC insertado en el plásmido pMY111, previa digestión de éste con la misma endonucleasa. Para ello, DNA de este plásmido fue digerido con la *SpeI* y tratado después con fosfatasa alcalina. La mezcla del DNA del plásmido pMY111 linearizado y del oligo sintético fue ligado con la enzima ligasa de T4 y el DNA resultante fue utilizado para transformar la bacteria JM101, conforme a las condiciones descritas previamente.

El diseño de los fragmentos de DNA sintético permitió la regeneración de un sitio único de *SpeI*, en el extremo 5' del fragmento insertado, pero solamente cuando la

inserción de este DNA ocurre en la orientación adecuada. Asimismo, la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima *BspEI*, en el DNA sintético, permitió la identificación rápida de plásmidos recombinantes con insertos.

De acuerdo con la estrategia anterior se generó el plásmido pMY112 que lleva un inserto del oligonucleótido sintético, en la orientación correcta. Utilizando la misma estrategia, a partir de pMY112, se generó el plásmido pMY113, insertando un segundo fragmento del oligonucleótido en el sitio de *SpeI* (ver tabla I y figura 2).

5) Purificación de proteínas de membrana externa y análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Las proteínas que forman parte de la membrana externa de las células bacterianas fueron preparadas y solubilizadas utilizando Tritón X-100, a partir de cultivos de 16 hrs., tal y como ha sido descrito por Puente y colaboradores (1995). Las proteínas así purificadas fueron analizadas utilizando electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida 12% con 0.1% SDS. Las proteínas se visualizan al teñir el gel con azul de Coomassie (Laemmli 1970).

6) Epifluorescencia de células bacterianas inmobilizadas en resina de agarosa NTA-Ni<sup>+2</sup>.

Las células obtenidas a partir de cultivos en medio completo de Luria, fueron colectadas por centrifugación y lavadas dos veces con una solución de NaCl 150 mM. Los paquetes celulares fueron resuspendidos con la misma solución de NaCl 150 mM y se ajustó al valor de 4 la densidad óptica medida a 600 nm.

Cincuenta microlitros de la suspensión bacteriana resultante fueron mezclados con 25 µl de una suspensión de resina de Ni<sup>+2</sup>-NTA-agarosa (Qiagen, Ca., USA), previamente lavadas con NaCl 150 mM. La suspensión resultante se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a baja velocidad y las resinas fueron lavadas (3X) con NaCl 150 mM y resuspendidas en 500 µl de una solución de NaCl 150 mM que además contenía 1 µg de yoduro de propidio, para teñir las células. Las muestras así tratadas fueron examinadas usando un microscopio de epifluorescencia acoplado a una cabeza para escanear a través de un laser confocal (BioRad Laboratories, Ca., USA).

7) Bioadsorción de iones metálicos durante el crecimiento celular

Las células fueron crecidas en medio Luria completo, en presencia de una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de los diferentes iones metálicos. Las cuatro sales metálicas utilizadas en este estudio fueron:  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{NiCl}_2$ . El crecimiento celular fue monitoreado turbidimétricamente a 580 nm. Las células fueron colectadas por centrifugación y el paquete celular fue lavado tres veces con una solución de  $\text{NaCl}$  150 mM y secado posteriormente.

Los paquetes celulares resultantes fueron incubados a 50°C durante toda la noche en ácido nítrico 70% (22.2 M), para disolver la biomasa. El contenido metálico de las muestras fue determinado por espectroscopía de absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer, modelo 3100 de la Facultad de Química de la UNAM.

## V Resultados:

Artículo publicado en la revista *Biotechnology Letters* 22, 623-629, (2000).

Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption. N. Cruz, S. LeBorgne, G. Hernández, G. Gosset, F. Valle y F. Bolívar

### Consideraciones relevantes sobre los resultados de la publicación:

#### 1) El diseño y la ingeniería de epítopes ricos en residuos de histidina para ser expresados en OmpC

El plásmido pMY111 fue utilizado como fuente de DNA para obtener el gene *ompC* (Mizuno et al. 1983). Es importante insistir en que existe un sitio único de reconocimiento para la endonucleasa *SpeI* presente en la porción de DNA que codifica para la región seleccionada para presentar péptidos heterólogos. Como epítoto reportero, se utilizaron péptidos que contienen secuencias ricas en histidinas (secuencia: SDPSGHHHHHSG, ver materiales y métodos) ya que la afinidad de los residuos de histidina por iones metálicos ha sido reportada previamente (Siegel, H., et.al. 1982) y dicha propiedad también ha sido explotada para la adsorción de  $Cd^{+2}$  a través de la expresión de epítopes con residuos de histidina expresados en la proteína de superficie LamB (Sousa et al 1996). Un fragmento de DNA sintético que codifica para este epítoto fue insertado en el sitio único para la endonucleasa *SpeI* presente en el gene *ompC* en el plásmido pMY111, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. El plásmido resultante que codifica para la proteína híbrida OmpC-(His)<sub>6</sub> fue llamado pMYII2. La misma estrategia fue utilizada para construir el plásmido pMY113, a partir de pMY112, el cual codifica para una proteína híbrida que contiene OmpC(His)<sub>12</sub>, dos secuencias repetidas de (His)<sub>6</sub>. El análisis con las enzimas de restricción *PstI* y *SpeI* confirmaron la orientación de los insertos. La figura 2 muestra las secuencias de las regiones de residuos de histidinas que son presentadas como epítopes, en estas proteínas recombinantes.

#### 2) La expresión de genes híbridos que codifican para proteínas recombinantes OmpC con epítopes de histidina

Los fragmentos de DNA sintético que codifican para los epítopes ricos en histidina fueron diseñados de tal manera que se conservara el frente de lectura correcto



después de la inserción del material sintético en el sitio único de reconocimiento de la endonucleasa *SpeI* presente en *ompC*. Así, la traducción de los genes híbridos *ompC* de los plásmidos pMY112 y pMY113 debería resultar en la síntesis de proteínas híbridas OmpC con los insertos de los epítopes de histidina. Para confirmar esta suposición, cultivos de la cepa JM101 fueron transformados con los plásmidos pMY111, pMY112 y pMY113, y como control se utilizaron células JM101 no transformadas. Las diferentes células fueron crecidas en medio rico Luria y los cultivos resultantes fueron utilizados para aislar las proteínas de la membrana externa. Como ya se ha mencionado, *ompC* es expresado en medios de alta osmolaridad bajo el control de su promotor natural (Puente et al 1991). Las proteínas de membrana externa purificadas fueron analizadas por electroforesis en condiciones desnaturizantes. En el artículo publicado, la figura 2 carril 1, muestra el patrón de proteína observado para la cepa JM101, en donde se observan claramente dos bandas correspondientes a las proteínas OmpC y OmpF. Los carriles 2, 3 y 4 muestran, por su parte, los patrones de proteína para las cepas que contienen los plásmidos pMY111, pMY112 y pMY113, respectivamente. Como puede observarse, y conforme a lo esperado, los pesos moleculares aparentes de OmpC-(His)<sub>6</sub> y OmpC(His)<sub>12</sub> fueron ligeramente mayores que los de la proteína OmpC de la cepa silvestre (fig. 2 carriles 1 y 2). Estos datos son consistentes con la presencia de epítopes en las proteínas híbridas. Los perfiles obtenidos en los carriles 3 y 4 muestran también que no hay contaminación de las proteínas OmpC u OmpF naturales, reflejándose con ello la inhibición de la incorporación de proteínas de membrana externa endógena, cuando el gene *ompC* es sobrepresado en un plásmido multicopia (Click et.al 1988). Adicionalmente, no hubo una diferencia importante en la intensidad de las bandas correspondientes a OmpC-(His)<sub>6</sub> comparada con OmpC presente en la cepa control. Sin embargo, la intensidad de las bandas fue ligeramente menor para OmpC-(His)<sub>12</sub>, aunque es importante puntualizar que aún así la concentración de OmpC-(His)<sub>12</sub> es ligeramente mayor a la que presenta la proteína OmpC en la cepa JM101. Por lo tanto, el nivel de expresión de los genes que codifican para las proteínas híbridas parecen ser similares a los de la cepa control OmpC en la cepa JM101, cuando estos genes híbridos están presentes en plásmidos multicopia. Finalmente, las tres diferentes cepas que portan estos tres plásmidos presentaron perfiles similares de crecimiento cuando fueron cultivadas en medio Luria, sugiriendo que su capacidad de crecimiento en este medio de alta osmolaridad, no fue afectado por la presencia de los epítopes (Figura 3).

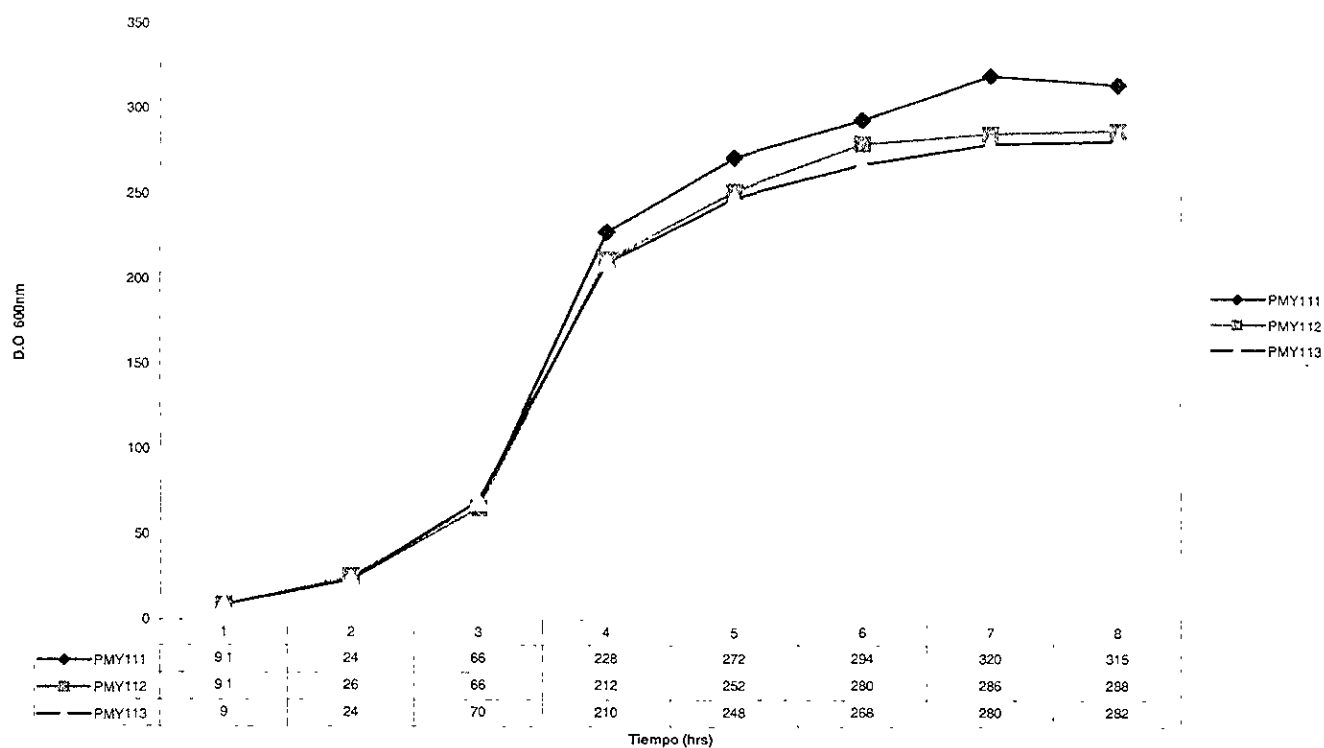


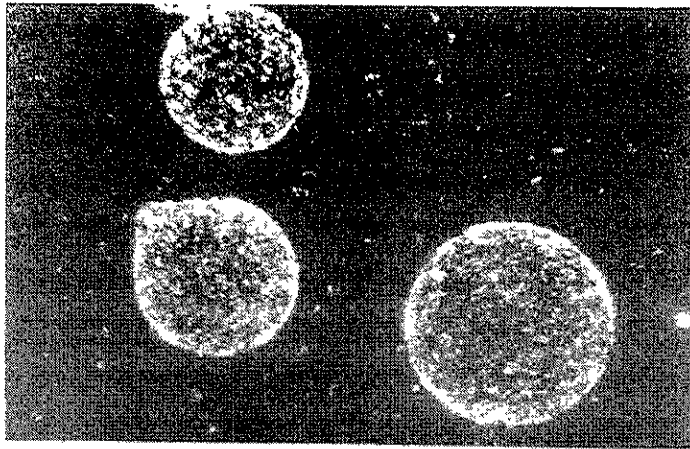
Figura 3. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas que portan los plásmidos pMY111, pMY112 y pMY113. Las cepas fueron crecidas en medio Luria con carbenicilina y la D.O. fue medida a 600 nm

### 3) **Demostración de la presencia y de la exposición de los epítopes presentados en la superficie de la bacteria**

Una vez demostrada la producción de proteínas híbridas OmpC, el esfuerzo se enfocó en determinar si realmente los epítopes ricos en histidina se encontraban localizados en la superficie de las células de *E. coli*. Debido a que estos epítopes son sitios potenciales de enlace con iones metálicos, por su alto contenido de histidinas, se determinó la capacidad de las diferentes cepas bacterianas llevando estas secuencias, para enlazarse con iones  $\text{Ni}^{+2}$  inmovilizados. Para probar esta capacidad de unión, se incubaron células completas expresando los genes híbridos y el gene *ompC* de la cepa silvestre, en presencia de la resina de agarosa NTA- $\text{Ni}^{2+}$ . Después de la remoción del material no enlazado, las resinas fueron examinadas mediante microscopía epifluorescente, tal y como puede verse en la figura 4 (y en la figura 3 del artículo). La resina de agarosa incubada con células de *E. coli* que produce la proteína híbrida OmpC-(His)<sub>12</sub>, fue visible por microscopía de transmisión (Fig.4A) y también fluoresció (Fig 4B). En contraste, las partículas de resina incubadas ya sea con células que producen la proteína híbrida OmpC (His)<sub>6</sub>, o las células silvestres que sintetizan la proteína OmpC silvestre o resina sin células, no producen ninguna señal de fluorescencia (Fig. 4C), indicando que estas células no tienen la capacidad para enlazarse con el soporte o que fueron enlazadas muy débilmente, de tal manera que fueron eluidas por los lavados con la solución de cloruro de sodio. Por lo tanto, sólo las células que llevan la proteína híbrida OmpC-(His)<sub>12</sub> fueron capaces de permanecer adsorbidas sobre las partículas de resina a través del níquel inmovilizado. Estos resultados sugieren que los residuos de OmpC(His)<sub>12</sub> fueron accesibles en la superficie y fueron capaces de interactuar, con alta afinidad, con los iones de níquel inmovilizado.

A

B



C



**Figura 4.** Micrografía de la misma muestra de un cultivo de células de *E.coli* JM101 (pMY113) unidas a esferas de resina Ni-NTA agarosa. A) Contraste de fase; B) Fluorescencia; C) Control de resinas sin células. La magnificación es 40X y la barra equivale a 50  $\mu$ m.

4) **La adsorción de iones metálicos en solución, en la superficie de células modificadas que llevan epítopes con afinidad por iones metálicos**

Las células que producen las proteínas híbridas OmpC-(His)<sub>6</sub> ó Omp C (His)<sub>12</sub>, así como células de la cepa JM101 que produce la proteína OmpC silvestre, fueron cultivadas en presencia de diferentes iones metálicos. Las células fueron colectadas a partir de cultivos en la fase estacionaria tardía, debido a que ésta es una condición donde se alcanza el máximo número de moléculas de OmpC localizadas en la membrana (Puente *et al* 1991). Finalmente, las células fueron extensivamente lavadas con NaCl 150mM para remover cualquier ión metálico no enlazado. La cantidad de metal adsorbido a estas células, después de lavadas, fue determinado y los resultados se presentan en la tabla II (tabla I del artículo). Las células de *E. coli* que llevan tanto las proteínas híbridas OmpC-(His)<sub>6</sub> como la OmpC (His)<sub>12</sub>, retienen cantidades significativamente mayores, de diferentes iones metálicos, que la cepa control, excepto para el caso de Cr<sup>3+</sup> (tabla II).

**Tabla II.** Bioadsorción de iones metálicos durante el crecimiento de cepas que llevan los plásmidos pMY111, pMY112 y pMY113<sup>a</sup>

Cepas con plásmido	Ión metálico adsorbido ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco)			
	Zn <sup>+2</sup>	Fe <sup>+2</sup>	Ni <sup>+2</sup>	Cr <sup>+3</sup>
JM101 (pMY111)	3.8 (2.02) <sup>+</sup>	5.7 (0.36) <sup>+</sup>	1.7 (0.62) <sup>+</sup>	3.3 (0.81) <sup>+</sup>
JM101 (pMY112)	11.3 (1.42) <sup>+</sup>	16.5 (0.60) <sup>+</sup>	4.2 (0.36) <sup>+</sup>	1.5 (0.56) <sup>+</sup>
JM101 (pMY113)	13.8 (1.21) <sup>+</sup>	35.5 (4.10) <sup>+</sup>	9.9 (0.98) <sup>+</sup>	1.1 (0.30) <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Las células fueron crecidas en medio Luria suplementado con 100  $\mu\text{M}$  de CrCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> ó NiCl<sub>2</sub>. Los cultivos fueron colectados al alcanzar la fase estacionaria, lavados tres veces con una solución de NaCl 150  $\mu\text{M}$  y secados. Las pastas celulares fueron incubadas durante 12 hrs., en ácido nítrico 70% (22.2 M), a 50°C. Los contenidos de metal de las muestras fueron determinadas por espectroscopía de absorción atómica.

<sup>+</sup> Valores de desviación estándar de tres observaciones por duplicado, por muestra.

El hecho de que la cepa control también enlaza iones metálicos no es sorprendente debido a que *E. coli*, así como otras especies bacterianas, poseen una superficie aniónica a la cual se pueden adsorber cationes metálicos (Hoyle y Beveridge 1983). El hecho que las cepas expresen uno o dos epítopes ricos en histidina y retengan más iones metálicos, indican que el incremento en la capacidad de estas cepas, para enlazar iones metálicos, es debido a la presencia de estos residuos de histidina. Ello también indica que el incremento en el número de residuos de histidinas expuestos incrementó la capacidad de las células para adsorber cierto tipo de iones metálicos. Es importante puntualizar que bajo las condiciones experimentales aquí reportadas, contrario a los resultados con  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Ni^{2+}$ , la adición de residuos de histidina a OmpC disminuye la capacidad de enlace del ión  $Cr^{3+}$  por OmpC (His) en *E. coli*.

## VI Conclusiones y perspectivas

La información aquí presentada, claramente demuestra que la proteína de membrana externa OmpC de *E. coli* puede ser usada como una proteína acarreadora para un sistema de despliegue a nivel de la superficie de la célula bacteriana. En este estudio, se diseñó, construyó y expresó un péptido para enlazar cierto tipo de iones metálicos, usado como epítipo reportero, en una región expuesta de la porina OmpC. Estos residuos de aminoácidos en las proteínas híbridas OmpC contienen uno o dos fragmentos de seis residuos consecutivos de histidina separados por ocho aminoácidos para coordinar eficientemente iones metálicos de transición (Hochuli et al 1988).

Se demostró que la biogénesis general y la función biológica de OmpC no fue afectada, al menos en las condiciones experimentales aquí reportadas. Los experimentos de adsorción de iones metálicos libres mostraron que las células que expresan las proteínas híbridas de OmpC, conteniendo uno o dos epítopos de enlace de iones metálicos en su superficie, tienen una mayor capacidad de adsorción para ciertos iones metálicos que las células que expresan la proteína OmpC silvestre. Estos resultados indican claramente que los epítopos quedaron localizados sobre la superficie externa de *E. coli* y fueron accesibles para la coordinación de iones metálicos presentes en el medio de cultivo. Sin embargo, diferencias significantivas fueron observadas en la capacidad de unión a metales de células conteniendo 6 ó 12 residuos de histidina expuestos sobre OmpC. Para  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Ni^{2+}$ , el epítipo con 12 residuos de histidina presenta mayor capacidad de adsorción de iones metálicos.

Por otro lado, bajo las condiciones experimentales aquí reportadas, no se detectó un incremento en la unión del ión  $Cr^{3+}$  por cualquiera de los dos epítopos estudiados. Adicionalmente, se encontró que cuando el número de residuos de histidina se incrementa sobre la superficie de OmpC, la capacidad de unión para el ión cromo disminuye. Pensamos que esto puede ser explicado por las propiedades químicas de este ión, el cual está clasificado como un catión duro ya que tiene carga positiva alta, un tamaño pequeño y carece de electrones de valencia exitados no compartidos. Por estas razones, también presenta una cinética lenta de intercambio de ligandos, además de que sus ligandos principales son compuestos con electrones donados por oxígeno, lo cual no es el caso con los residuos de histidina en las proteínas (Glusker 1991). Para explicar las diferencias de comportamiento de unión del ión  $Cr^{3+}$  a los epítopos de histidina con relación a los otros iones probados, cabe mencionar también que la retención de metales no puede ser atribuida únicamente al número de residuos de histidina, sino que, más bien es un efecto combinado de contribuciones de

muchos otros residuos de aminoácidos, tales como los residuos aromáticos triptofano, tirosina y fenilalanina.

Experimentos con níquel inmovilizado mostraron que sólo las células de las cepas de *E. coli* que expresan OmpC-(His)<sub>12</sub> permanecen enlazadas a las partículas de agarosa-Ni, ya que las células de las cepas que expresan OmpC-(His)<sub>6</sub> fueron removidas durante los lavados. Estos resultados muestran que la presencia de más residuos de histidina en el epítipo de unión a iones metálicos incrementa la unión de células de *E. coli* al ión níquel inmovilizado. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales estudiadas, puede concluirse que las cepas que expresan OmpC-(His)<sub>12</sub> poseen una alta capacidad de adsorción para Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Ni<sup>2+</sup>, debido probablemente a que este epítipo (His)<sub>12</sub>, se encuentra mayormente expuesto en la superficie bacteriana.

Un hecho interesante del sistema de despliegue en la superficie presentado aquí, es que la producción de la proteína OmpC y las proteínas OmpC-híbridas fueron osmóticamente inducidas. Por lo tanto, la expresión del gene *ompC* puede fácilmente ser inducida por exposición de las células a alta osmolaridad, característica encontrada en la mayoría de los medios complejos. Este esquema de inducción evita el uso de compuestos químicos tóxicos y costosos, tales como el IPTG, para incrementar la expresión genética. Este hecho puede ser ventajoso, en el caso de aplicaciones de este tipo de sistemas derivados de OmpC a gran escala, en problemas particulares de la bioremediación de iones metálicos presentes en fuentes acuosas y en suelos contaminados.

Un aspecto importante a resaltar es que, el objetivo de este trabajo fue el de construir cepas de la bacteria *E. coli*, las cuales tuvieron incrementada su capacidad para adsorber ciertos iones metálicos. Sin embargo, hay todavía mucho que avanzar para realmente desarrollar una tecnología competitiva para la biorremediación de iones metálicos usando estas cepas y biomasa derivada de ella. Uno de los aspectos fundamentales a evaluar para avanzar en el proceso de optimización, sería el determinar si la capacidad de adsorción de ciertos iones metálicos por estas células, (en particular, Fe<sup>+3</sup>, Ni<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup>), está ya saturada y simultáneamente a esta pregunta estaría la de qué pasaría si se incrementara aún más el número de residuos de histidina expuestos, entre otros. Por otro lado, sería también muy importante realizar una evaluación fina de cómo compara la capacidad de adsorción de estas células, con las reportadas por otros bioadsorbentes.



En este sentido una primera comparación a nivel general, ya que el tipo de bioadsorbentes reportados es muy variado y en muchos casos se reportan ya optimizadas las condiciones para la adsorción, señala qué sistemas ya desarrollados y optimizados utilizando diferentes tipos de biomasa (no células en cultivo), tienen capacidades de adsorción de  $\text{Ni}^{+2}$ , en niveles que van desde los similares a los obtenidos para nuestras células en cultivo (Beate y Gunhild 1994), hasta niveles que presentan capacidades entre 10 y 20 veces superiores (Cabral 1992, Fourest y Roux 1992, Holan y Volesky 1994, Veglió *et al* 1996) y lo mismo en el caso para la adsorción de  $\text{Zn}^{+2}$  (Beate y Gunhild 1994).

Por otro lado, si bien las células desarrolladas son capaces de adsorber más  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , no es el caso del ión  $\text{Cr}^{+3}$ . Ya se ha comentado la razón por la cual pensamos que ocurre esta diferencia, pero esto no resuelve el problema de contar con sistemas optimizados para la bioadsorción eficiente de  $\text{Cr}^{+3}$  como los reportados en la literatura (Nourbakhsh *et al* 1995). Pensamos que para lograr desarrollar un bioadsorbente eficiente para el ión  $\text{Cr}^{+3}$  será necesaria una estrategia que permita adsorber mejor, a través de una coordinación electrónica adecuada, al ión  $\text{Cr}^{+3}$  en la superficie celular. Para ello, habría que diseñar un sistema, que no puede estar sustentado en el uso de residuos de histidina, ya que estos no coordinan el ión cromo (Glisker 1991), y por lo tanto habría que exponer residuos del tipo de aspártico y glutámico principalmente, que posiblemente pudieran incrementar la adsorción de ión Cromo por la biomasa.

Las técnicas de la biotecnología moderna, entre las que destacan, la construcción de organismos diseñados genéticamente para llevar a cabo funciones específicas, permitirán el desarrollo de procesos más adecuados, sofisticados y más compatibles con el propósito de recuperar los ecosistemas contaminados y con un desarrollo sustentable y respetuoso de la biodiversidad y el medio ambiente. Está claro que el impacto de la biotecnología moderna se ha dado de manera más importante en el sector salud, pero también es indudable que conforme haya más conciencia social habrá más presión para desarrollar tecnología limpia con impacto en otros sectores, como el agrícola y el del medio ambiente.

En particular, en lo que respecta al control de la contaminación del medio ambiente, tal y como lo han señalado Bolívar y colaboradores en el documento: Biotecnología Moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI (2001), son muchas las áreas y las oportunidades en las que se pueden visualizar aportaciones importantes de la biotecnología moderna para resolver problemas relevantes. En este sentido, la contaminación por compuestos de origen químico, varios de ellos del tipo recalcitrante, no biodegradables, es uno de los grandes

problemas que hay que resolver. Asimismo, la contaminación de lechos acuíferos y suelos, por metales, representa también un problema importante. Para resolverlo, entre los esfuerzos importantes, será necesario caracterizar y también desarrollar organismos y consorcios de organismos mejorados genéticamente, con el propósito de degradar específicamente los contaminantes industriales, y para remover o transformar iones metálicos en compuestos no tóxicos, o al menos con menor toxicidad. En este propósito será importante hacer coincidir capacidades técnicas novedosas como, la ingeniería y la evolución dirigida de proteínas y la ingeniería de las vías metabólicas de los organismos, para realmente desarrollar organismos y consorcios con capacidades optimizadas en estos propósitos de la degradación de compuestos recalcitrantes tóxicos y recuperación de iones metálicos. Asimismo, en este contexto debe también tomarse en cuenta que la biodiversidad mexicana es fuente extraordinaria para el aislamiento de nuevos genes para optimizar estos procesos.

## VII Bibliografía

- Beate M., y S. Gunhild (1994) Biosortition of metal by a waste biomass. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **58**: 57-63.
- Bolívar F., R.L. Rodríguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa y S. Falkow (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose system. *Gene* **2**: 95-113.
- Bolívar F. *et al* (2001) Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI. Retos y oportunidades. CONACyT, México, D.F.
- Cabral J.P.S. (1992) Selective binding of metal ion to *Pseudomonas syringae* cells. *Microbios* **71**: 47-53.
- Charbit A., A. Molla, W. Saurin y M. Hofnung (1988) Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 181-189.
- Click E.M., G.A. Mac Donald y C.A. Schnaitman (1988) Translational control of exported proteins that result from OmpC porin overexpression. *J. Bacteriol.* **170**: 2005-2011.
- Cowan S.W., T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R.A. Pauptit, J.N. Jansonius y J.P. Rosenbusch (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**: 727-733.
- Cruz N., S. Antonio, R. de Anda, G. Gosset y F. Bolívar (1990) Preparative purification of recombinant insulin B chain, via HPLC. *J. Liq. Chromat.* **13**: (8) 1517-1528.
- Cruz N., M. López, G. Estrada, X. Alvarado, R. de Anda, P. Balbás, G. Gosset y F. Bolívar (1992) Preparative isolation of recombinant human insulin-A chain by ion exchange chromatography. *J. Liq. Chromat.* **15**(13): 2311-2324.
- Cuero R.G. (1996) Enhanced heavy metal immobilization by a bacterial-chitosan complex in soil. *Biotechnol. Lett.* **18**: 511-514.
- Flores N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolívar y F. Valle (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* **14**(5): 620-623.
- Flores S., G. Gosset, N. Flores, A.A. de Graaf y F. Bolívar (2001) Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy. *Metabol. Eng.* (en prensa).
- Fourest E., y J.C. Roux (1992) Heavy metal biosortition by fungal mycelial by-products: mechanism and influence of pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 399-403.
- Georgiou G., H.L. Poetschke, C. Stathopoulo y J.A. Francisco (1993) Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**: 6-10.

- Glusker, J.P. (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv. Prot. Chem.* **42**: 1-76.
- Goeddel, D., D. Kleid, F. Bolívar, H. Heyneker, D. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura y A. Riggs (1979) Expression of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **76**: 106-110.
- Herrera, E.L., A. Larqué, y J.A. Serratos (2001) La biotecnología en el sector agrícola (capítulo VI), pp. 146-167; en: *Biotecnología Moderna para el Desarrollo de México en el Siglo XXI; retos y oportunidades.* (Bolívar *et al*), CONACyT/Redacta, México, D.F.
- Hochuli W. Bannwarth, H. Doebeli, R. Gentz y D. Stueber (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technol.* **6**: 1321-1325.
- Hofnung M. (1991) Expression of foreign polypeptides at the *Escherichia coli* cell surface. *Meth. Cell Biol.* **34**: 77-105.
- Holan Z.R, y B. Volesky (1994) Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 1001-1009.
- Hoyle B. y T.J. Beveridge (1983) Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 749-752.
- Jeanteur D., J.H. Lakey y F. Pattus (1995) The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol. Microbiol.* **5**: 2153-2164.
- Kim S.Y., J.H. Kim, C.J. Kim y D.K. Oh (1996) Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1161-1164.
- Kratochvil D. y B. Volesky (1998) Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotechnol.* **16**: 291-300.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-687.
- Le Borgne S., B. Palmeros, F. Valle, F. Bolívar y G. Gosset (1998) pBRINT-Ts: a plasmid family with a temperature-sensitive replicon, designed for chromosomal integration into the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *Gene*, **223**: 213-219.
- Le Borgne S., B. Palmeros, F. Bolívar y G. Gosset (2001) Improvement of the pBRINT-Ts plasmid family to obtain marker-free chromosomal insertion of cloned DNA in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, **30**: 252-256.
- Little M., P. Fuchs, F. Breitling y S. Dübel (1993) Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology?. *Trends Biotechnol.* **11**: 3-5.

- Organización Mundial de la Salud (1984) Guidelines for drinking water quality. Vol. 1, Ginebra, Suiza.
- Palmeros B., J. Wild, W. Szybalski, S. Le Borgne, G. Hernández-Chávez, G. Gosset, F. Valle y F. Bolívar (2000) A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene* **247**: 255-264.
- Pazirandeh M., L.A. Chrisey, J.M. Mauro, J.R. Campbell y B.P. Gaber (1995) Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect of heavy-metal uptake. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 1112-1117.
- Peter C. Bull y Diane W. Cox (1994) Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* **10**(7): 342-345.
- Puente J.L., D. Juárez, M. Bobadilla, C.F. Arias y E. Calva (1995) The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* **156**: 1-9.
- Puente, J.L., A. Verdugo-Rodríguez y E. Calva (1991) Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity. *Mol. Microbiol.* **5**: 1205-1210.
- Rodríguez R.L., F. Bolívar, H.M. Goodman, H.W. Boyer y M. Betlach pp. 471-477 (1976) In: *Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression*. Fox and Rutter (eds.), Acad. Press, Inc., NY, USA.
- Rodríguez, R.L. y R. Tait (1983) *Recombinant DNA techniques: An introduction*. Addison-Wesley Pub. Comp. Mass., USA.
- Saarihahti H.T., E. Tapio-Palva, J. Holmgren y J. Sánchez (1989) Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and outer membrane protein OmpC. *Infect. Immun.* **57**: 3663-3665.
- Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSH, NY, CSHL Press.
- Shuttleworth K.L. y R.F. Unz (1983) Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thiothrix* strain A1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1274-1282.
- Siegel, H. y Martin, R.B. (1982) *Chem. Rev.* **82**: 385-426.
- Silvestre, F., Rocrelle, C., Rigal, L., y Gaset, A. (1994) Optimum Condition for the Reactivity of Chromium (III) Salts on Collagen in the Solvent Tanning Process. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **60**: 1-6.
- Sousa C., A. Cebolla y V. de Lorenzo (1996) Enhanced metal adsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nature Biotechnol.* **14**: 1017-1020.
- Stoll A. y J.R. Duncan (1996) Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* **18**: 1209-1212.

- Thomas, F. O Dwyer y Benjamín K. Hodnett (1995) Recovery of Chromium from Tannery Effluents using a Redox-Adsorption Approach. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **62**: 30-37
- Valle F., P. Balbás, E. Merino y F. Bolívar (1991) The role of penicillin amidases in nature and in industry. *TIBS* **16**: 36-40.
- Veglió, F., F. Beolchini, y A. Gasbarro (1996) Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 99-105.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, y M. Zoller (1992) Recombinant DNA, Capítulo 23, pp. 453-455; Scientific American Books, N.Y. EUA.
- Wilhelmi B.S. y J.R. Duncan (1995) Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1007-1012.
- Yanisch-Perron C., J. Vieira y J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

## VIII Agradecimientos

Quiero agradecer el apoyo de los miembros de mi Comité Tutorial Dres. Xavier Soberón, Fernando Valle, Bernardo Campillo y Francisco Bolívar, por su apoyo y recomendaciones en la elaboración de mi trabajo doctoral. Asimismo, quiero agradecer a los coautores del artículo publicado, en particular a los Doctores, Silvie LeBorgne y Guillermo Gosset, sus aportaciones y apoyo, no sólo en este trabajo en particular, sino a lo largo de todo mi trabajo como estudiante en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología.

Asimismo, quiero también agradecer a los Dres. José Luis Puente y Edmundo Calva por proveer el plásmido pMY111 y por toda la información y comentarios sobre OmpC y a los técnicos académicos Georgina Hernández y Xóchitl Alvarado por su ayuda técnica.

Este proyecto fue desarrollado con un apoyo económico del CONACyT (400344-5-0257PN).

**IX Artículo publicado:**

Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption. N. Cruz, S. LeBorgne, G. Hernández, G. Gosset, F. Valle y F. Bolívar  
Biotechnology Letters 22, 623-629, (2000).





## Engineering the *Escherichia coli* outer membrane protein OmpC for metal bioadsorption

Norberto Cruz, Sylvie Le Boigne, Georgina Hernández-Chávez, Guillermo Gosset, Fernando Valle & Francisco Bolívar\*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, Mexico

\*Author for correspondence (Fax: 52-73-172388, E-mail: bolivar@ibt.unam.mx)

Received 16 December 1999, Revisions requested 17 January 2000, Revisions received 21 February 2000, Accepted 22 February 2000

**Key words:** *Escherichia coli*, genetic engineering, metal-binding, OmpC, protein engineering

### Abstract

The outer membrane protein, OmpC, from *Escherichia coli* was used to display metal-binding poly-histidine peptides on the surface of this bacterium. SDS-PAGE analysis of outer membrane protein preparations confirmed the expression of the metal-binding epitopes inserted in position 162 of the mature OmpC protein. Display of these epitopes was confirmed by epifluorescence microscopy of cells bound to Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose beads and metal adsorption experiments. The cells harboring one or two copies of the metal binding epitope were able to adsorb 3 to 6 times more Zn<sup>2+</sup> (13.8  $\mu\text{mol g}^{-1}$  cell), Fe<sup>3+</sup> (35.3  $\mu\text{mol g}^{-1}$  cell), and Ni<sup>2+</sup> (9.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  cell) metallic ions than control cells expressing the wild-type OmpC.

### Introduction

The role that metal ions play on life and environment is fundamental. However, as a result of industrial activities, metal ions have accumulated in the environment, contributing to the pollution of the biosphere (Nriagu & Pacyna 1989). In order to solve this problem, different technologies have been developed. Currently, biological, chemical and physical methods are available for removing heavy metals. These methods exploit different physico-chemical properties with the goal of adsorbing, concentrating, precipitating toxic metal ions or transforming them into non-toxic compounds. Biosorption of heavy metals by different types of microbial biomass, is one of the most promising technologies (Stoll & Duncan 1996, Cuero 1996, Kratochvil & Volesky 1998), however, this process is generally not specific (Wilhelmi & Duncan 1995, Kim *et al.* 1996). Several approaches to improve the biosorption capacity of different microorganisms using cell wall modifications have been developed. Also, genetic engineering techniques have been used to overexpress proteins with high affinity for metals

(metallothioneins) on the surface of microorganisms (Pazirandeh *et al.* 1995).

The expression of peptides and proteins on the surface of Gram negative bacteria has potential applications in several areas including the production of live bacterial vaccines, whole cell adsorbents for the display of peptide libraries and the preparation of microbial biocatalysts (Georgiou *et al.* 1993). Different approaches involving the use of surface-exposed carrier proteins to display peptides and proteins on the surface of *Escherichia coli*, have been described. They include the insertion of the target sequences in surface exposed loops of outer membrane proteins or into a protein forming part of a cell surface structure such as a flagellum or the fusion to the N-terminus of lipoproteins (Hofnung 1991, Little *et al.* 1993).

The most frequently used outer membrane protein for peptide and small protein display is LamB, one of the most flexible and abundant surface proteins with approximately  $1 \times 10^4$  copies per cell (Charbit *et al.* 1988). In this system, the *lamB* gene is under transcriptional control of a *lac* promoter deriva-

tive, so *lamB* expression is induced by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)

Another surface protein that could be used for peptide display is OmpC. This porin is a trimeric protein integrated in the outer membrane of *E. coli*, that forms relatively non-specific pores which allows the passive diffusion of small hydrophilic molecules (Nikaido 1996). It has also been shown that OmpC is structurally important for stabilizing the outer membrane (Nogam & Mizushima 1983). The *ompC* gene from *E. coli* has been cloned, the sequence of the 1,101 base pair coding-region has been determined and it has been demonstrated that its expression is controlled by the osmolarity of the culture medium (Puente *et al.* 1991). This protein, with a molecular weight of 37,083 Da, is synthesized in a high osmolarity medium such as LB or after salt addition (at least 0.15 M) to a low osmolarity medium (Puente *et al.* 1991, Nikaido 1996). The high copy level of OmpC ( $2 \times 10^5$  molecules per cell) suggests that this outer membrane protein could be an excellent candidate for peptide surface expression. In *Salmonella typhi*, it has been reported that the OmpC porin could be used to successfully display a rotavirus epitope (Puente *et al.* 1991). We have decided to use the OmpC porin from *E. coli* as an alternative system to display heterologous peptides. Therefore, we introduced into OmpC a metal-binding epitope and studied its metal-binding capacity on the surface of *E. coli*.

## Materials and methods

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

*Escherichia coli* strain JM101 (*supE*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *pro1B*, *lacZ*  $\Delta$ M15]) was used for all experiments (Yanish-Perron *et al.* 1985). Plasmid pMY111 (Mizuno *et al.* 1983) has been described previously, it carries the complete *ompC* gene under the control of its own promoter, inserted in the *HindIII* site of plasmid pBR322 (Bolívar *et al.* 1977). Cells were grown at 37 °C in LB medium (Miller 1972) supplemented with 50  $\mu$ g carbencillin per ml. Solid media contained 15 g agar per l.

### Recombinant DNA techniques

Restriction endonucleases, calf intestinal phosphatase (CIP), T4 polynucleotide kinase (T4 PNK), T4 DNA ligase, Sequenase version 2 sequencing kit and appropriate buffers were purchased from New England Bio-

labs (MA, USA) or USB (OH, USA) and were used according to the manufacturer's recommended instructions. Plasmid preparation and gel electrophoresis were performed as already described (Sambrook *et al.* 1989).

### Plasmid construction

Two complementary oligonucleotides OMHis<sub>61</sub> 5'-CTAGT GATCCATCCGGACATCACCATCATCACCATTCTGGTG-3' and OMHis<sub>62</sub> 5'-CTAGCACCAG AATGGTGATGATGGTGATGTCGGATGGATCA-3', encoding the following amino acid sequence, SDPSGHHHHHHSG, were chemically synthesized. OMHis<sub>61</sub> and OMHis<sub>62</sub> were annealed by slowly cooling to room temperature from 95 °C. The resulting double-stranded DNA sequence was phosphorylated using T4 polynucleotide kinase. An internal *BspEI* site was included in this synthetic sequence in order to simplify identification of the recombinant plasmids containing an insert. Moreover, this sequence contained a *SpeI* site only at the 5' end, resulting in the regeneration of a single *SpeI* site only at the 5' end of the insert upon ligation in the correct orientation. This strategy allowed a simple restriction analysis screening procedure to detect for plasmids with the correct insert orientation. The annealed DNA fragments were ligated to plasmid pMY111, previously digested to completion with *SpeI* and desphosphorylated using calf intestinal alkaline phosphatase, in order to generate plasmid pMY112. Using the same strategy, a second insert was introduced in the restored *SpeI* site of pMY112 to produce plasmid pMY113.

### Preparation of outer membrane proteins and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis

Outer membrane proteins were prepared and solubilized with Triton X-100 from 5-ml of overnight cultures as described previously (Puente *et al.* 1995). Proteins were analyzed by 0.1% SDS-12% PAGE and the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (Laemmli 1970).

### Epifluorescence of bacterial cells immobilized on Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose beads

Cells from overnight cultures were harvested by centrifugation and washed twice with 150 mM NaCl. Pellets were resuspended in one volume of 150 mM

NaCl and the turbidity at 600 nm of the resulting suspension was adjusted to 4. Fifty  $\mu$ l of the resulting bacterial preparations were added to 25  $\mu$ l of Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose beads (Qiagen, CA, USA) previously washed with 150 mM NaCl. The resulting suspensions were incubated for 24 h at room temperature. After low speed centrifugation, the beads were washed three times with 500  $\mu$ l of 150 mM NaCl and resuspended in 500  $\mu$ l of 150 mM NaCl containing 2  $\mu$ g propidium iodide (20% w/v, in water) per ml in order to stain the cells. Samples were then examined using an epifluorescence microscope coupled to a confocal laser-scanning head (Bio-rad).

#### *Metal bioadsorption during cell growth*

Cells were grown in LB medium supplemented with 100  $\mu$ M of different metal ions. The four metal salts used in this study were CrCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, and NiCl<sub>2</sub>; cell growth was monitored turbidimetrically. Cells were collected by centrifugation, washed three times with 150 mM NaCl and dried. The resulting pellets were then incubated overnight in 70% nitric acid (22.22 M) at 50°C in order to dissolve the biomass. The metal content of these samples was determined by atomic absorption spectroscopy.

#### *Choice of a site for the insertion of heterologous sequences in OmpC*

Previous work has shown that a region of the *E. coli* OmpC protein, near the middle of the polypeptide chain, is cell-surface exposed and acts as a phage receptor binding-site (Morona *et al.* 1985). A more recent study based on sequence alignments and secondary structure predictions of several porins from various gram-negative bacteria, also indicated that this region corresponds to a highly hydrophilic surface-exposed loop of OmpC (Jeanteur *et al.* 1995). In addition, a sequence comparison with the OmpF protein, which is highly homologous to OmpC and whose spatial structure has already been resolved by crystallography (Cowan *et al.* 1992), confirmed that this loop is effectively oriented toward the exterior of the cell and that it is not involved in trimer or pore formation. We chose this particular region of OmpC to display a histidine-rich epitope on the surface of *E. coli*, considering also the high degree of similarity between the *E. coli* and *S. typhi* OmpC proteins (Puente *et al.* 1995). For insertion of the epitope-coding DNA sequences, into OmpC, we decided to use the restriction site *SpeI* that is present on the *ompC*

region that corresponds to residues 151 to 175 of the mature polypeptide.

## Results

### *Engineering histidine-rich epitopes into OmpC*

Plasmid pMY111 was used as a source for the wild-type OmpC coding sequence (Mizuno *et al.* 1983). It is important to notice that a unique *SpeI* site is naturally present in the DNA portion encoding the region selected to display the heterologous peptides. As a reporter epitope, we used a peptide containing a histidine rich motif (sequence: SDPSGHHHHHHHSG) which has already been shown to have a high affinity toward metallic ions (Sousa *et al.* 1996). A synthetic DNA fragment encoding this epitope was inserted into the *SpeI* site of the *ompC* gene in plasmid pMY111. The resulting plasmid encoding the OmpC-(His)<sub>6</sub> hybrid protein was called pMY112. The same strategy was used to construct plasmid pMY113 encoding the OmpC-(His)<sub>12</sub> hybrid protein which contained two tandemly repeated epitopes. Restriction analysis with *PstI* and *SpeI* confirmed the orientation of the inserts. Figure 1 shows the DNA sequences of these regions to be displayed.

### *Expression of the hybrid OmpC proteins*

The synthetic DNA fragment encoding the histidine-rich epitope was designed in order that the correct reading frame was conserved upon insertion in the *SpeI* site of *ompC*. Thus, translation of the *ompC* hybrid genes from plasmids pMY112 and pMY113 should result in the synthesis of larger OmpC hybrid proteins. To confirm this assumption, JM101 cells harboring plasmids pMY111, pMY112 and pMY113 as well as non transformed JM101 cells as a control, were grown in LB-rich medium and the resulting cultures were used to isolate outer membrane proteins. As already described, *ompC* is highly expressed in this high osmolarity medium when placed under the control of its natural promoter (Puente *et al.* 1991). Isolated outer membrane proteins were subjected to SDS-PAGE analysis (Figure 2). Lane 1 shows the protein pattern observed in JM101. Two bands, corresponding to porins OmpC and OmpF can be seen. Lanes 2, 3 and 4 show the protein patterns for strains containing plasmids pMY111, pMY112 and pMY113. As can be observed, the apparent molecular weights of OmpC-(His)<sub>6</sub> and OmpC-(His)<sub>12</sub> were slightly higher

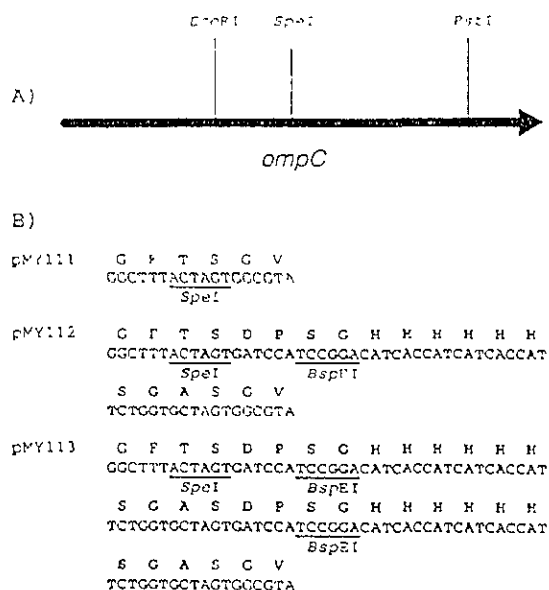


Fig. 1 (A) Relative position of the *SpeI* restriction site in the *E. coli ompC* gene (B) Nucleotide and amino acid sequences of the region surrounding the unique *SpeI* site in the *E. coli ompC* gene and of the metal-binding epitopes inserted into *ompC*. Plasmid pMY111 carries the entire wild-type *E. coli ompC* gene. Plasmids pMY112 and pMY113 encode for the OmpC-(His)<sub>6</sub> and OmpC-(His)<sub>12</sub> hybrid proteins, respectively. *SpeI* and *BspEI* restriction sites are underlined. The heterologous sequences to be displayed are highlighted in bold.

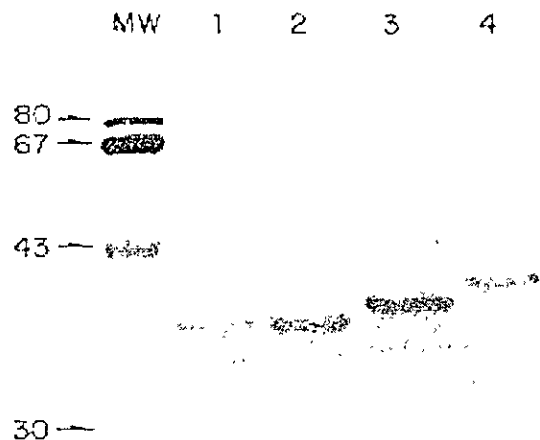


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of outer membrane protein preparations from *E. coli* JM101 (1) and JM101 transformed with pMY111 (2), pMY112 (3) or pMY113 (4). The gel was stained with 0.1% Coomassie Blue. Lane MW contains molecular weight markers, in thousand Da.

A

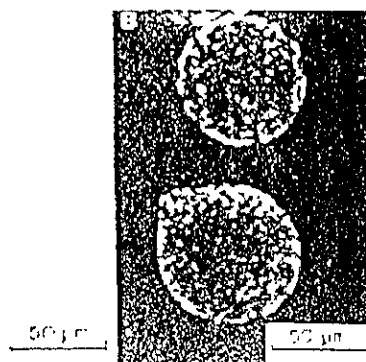


Fig. 3 Phase contrast (A) and fluorescence (B) micrographs of the same two samples of *E. coli* JM101 [pMY113] bound to Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose beads. Magnification 400 $\times$ . Bar is equal to 50  $\mu$ m.

than that of the wild-type OmpC (Figure 2, lanes 1 and 2). These data are consistent with the presence of the epitopes in the hybrid proteins. The obtained profiles in lanes 3 and 4 show that there is no major contamination of wild-type OmpC or Omp1, reflecting the inhibition of the synthesis of other endogenous outer membrane proteins, when *ompC* is overexpressed from a multicopy plasmid (Clack *et al.* 1988). Additionally, there was no major difference in the intensity of the bands corresponding to the OmpC-(His)<sub>6</sub> and the wild-type OmpC, however, band intensity was lower for OmpC-(His)<sub>12</sub>. It is important to point out, though, that the OmpC-(His)<sub>12</sub> level is slightly higher than that of the OmpC porin in strain JM101. Therefore, the level of expression of the genes coding for hybrid proteins appears to be approximately the same as that of the wild-type OmpC, when these genes are present in multicopy plasmids. Moreover, strains carrying either of these three plasmids presented similar growth profiles when cultured in LB medium (data not shown), suggesting that their growth capacity in this high osmolarity medium, was not affected by the presence of these epitopes.

#### Exposure of the inserted epitopes at the bacterial surface

We further investigated whether the histidine-rich epitopes were exposed on the surface of the *E. coli* cells. As these epitopes are potential metal-binding sites due to their high histidine-content, we first examined the ability of bacterial cells carrying these motifs to bind to immobilized nickel ions. To prove their metal-binding capacity, whole cells expressing

the hybrid and wild-type *ompC* genes were incubated in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-agarose beads. After removal of unbound material, the beads were examined by epifluorescence microscopy (Figure 3). The agarose beads incubated with *E. coli* hosts producing  $\text{OmpC}-(\text{His})_{12}$ , visible by transmission microscopy (Figure 3A), became fluorescently labeled (Figure 3B). By contrast, the beads incubated either with cells producing  $\text{OmpC}-(\text{His})_6$  or control cells harboring the wild-type  $\text{OmpC}$  did not produce any fluorescence signal (data not shown), indicating that they did not bind to the support or were bound so weakly that they were removed by the NaCl washing treatment. Therefore, only the  $\text{OmpC}-(\text{His})_{12}$  carrying cells were able to remain adsorbed to the immobilized nickel. These results suggest that the histidine residues of  $\text{OmpC}-(\text{His})_{12}$  were accessible to the outer surface and were able to interact with high affinity with the immobilized nickel ions.

*Adsorption of free metal ions in solution by genetically engineered cells carrying metal-binding epitopes*

*E. coli* cells producing either the chimeric  $\text{OmpC}-(\text{His})_6$  or  $\text{OmpC}-(\text{His})_{12}$  proteins and the wild-type  $\text{OmpC}$  protein as a control, were cultured in the presence of different metallic ions. Cells were collected in the late stationary phase since this is a condition where the maximum number of  $\text{OmpC}$  molecules are present on the membrane. Cells were extensively washed with NaCl 150 mM to remove any unbound metals. The amount of metals adsorbed to these cells after washing was determined and the results are given in Table 1. *E. coli* cells producing the hybrid proteins  $\text{OmpC}-(\text{His})_6$  and  $\text{OmpC}-(\text{His})_{12}$  retained significantly larger amounts of different metals ions than did the control strain, except for the case of  $\text{Cr}^{3+}$  (Table 1). The fact that the control strain also bound metals is not surprising since *E. coli* as other bacterial species possesses an anionic surface to which cationic metallic ions can be adsorbed (Hoyle & Beveridge 1983). The fact that the strain expressing one or two histidine rich epitopes retained more ion metal, indicates that the enhanced metal binding capacity of these strains is due to the presence of these extra histidine residues. They also indicate that increasing the number of histidine residues exposed, increased the overall capacity of the cells to adsorb metallic ions. It is interesting to point out that under our experimental conditions, contrary to the results obtained with  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , the

Table 1. Metallic ion bioadsorption during growth of *E. coli* JM101 cells carrying plasmid pMY111, pMY112 or pMY113<sup>a</sup>

Strains	Metal ion adsorbed ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ dry cells)			
	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Cr}^{3+}$
JM101[pMY111]	3.8	5.7	1.7	3.3
JM101[pMY112]	11.3	16.5	4.2	1.5
JM101[pMY113]	13.8	35.3	9.9	1.1

<sup>a</sup> Cells were grown in LB medium supplemented with 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ , or  $\text{NiCl}_2$ . Cells were collected by centrifugation at late stationary growth phase, washed three times with 150 mM NaCl and dried. The resulting pellets were incubated overnight in 70% nitric acid (22.22 M) at 50°C. Metal content of these samples was determined by atomic absorption spectroscopy.

addition of histidine residues to  $\text{OmpC}$  decreased the binding of  $\text{Cr}^{3+}$  by *E. coli*.

## Discussion

The results presented here demonstrate that the  $\text{OmpC}$  outer membrane protein from *E. coli* can be used as a vector protein for a bacterial surface display system. In this study, we have expressed a metal binding peptide, used as a reporter epitope, in a putatively exposed loop of  $\text{OmpC}$ . This 14 amino acid residue peptide contained six or twelve consecutive histidine residues to efficiently coordinate transition metallic ions (Hochuli *et al.* 1988). Production and correct localization of hybrid  $\text{OmpC}$  proteins containing one or two copies of the epitope could be demonstrated by SDS-PAGE analysis of outer membrane protein preparations. We also demonstrated that the general biogenesis and biological function of  $\text{OmpC}$  was not affected, at least in our experimental conditions. Free metallic ion adsorption experiments showed that cells expressing the  $\text{OmpC}$  hybrid proteins containing one or two metal binding epitopes at their surface had a greater metal adsorption capacity than cells expressing the wild-type  $\text{OmpC}$ . These results demonstrate that the epitopes were localized on the outer surface of *E. coli* and accessible for coordination of metallic ions present in the culture medium. However, significant differences were observed in the metal-binding capacity of cells containing 6 or 12 histidine residues exposed on  $\text{OmpC}$ . For  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , the epitope containing 12 histidine residues provided higher metal adsorption capacity.

Under our experimental conditions, we did not detect an increase in binding of  $\text{Cr}^{3+}$  to any of the two epitopes studied. Furthermore, we found that when the number of histidine residues was increased on the surface of OmpC, the capacity to bind the chromium ion was decreased. This effect could probably be explained by the chemical properties of the  $\text{Cr}^{3+}$  ion, however, we do not know the correct explanation. Predicting and understanding metal ion uptake by growing cultures of bacteria is difficult because complex media contains many components, which can influence metal adsorption (Shuttleworth & Unz 1993). In particular, in this study the medium used contained yeast extract and peptone, both of which are known to complex metallic ions due the presence of various amino acids and peptides.

Experiments with immobilized nickel showed that only the *E. coli* strain expressing OmpC-(His)<sub>12</sub> remained bound to the agarose beads. The strain expressing OmpC-(His)<sub>6</sub> was removed during the washing step. These results show that the presence of more His residues on the metal-binding epitope increases the binding of *E. coli* cells to the immobilized nickel. Therefore, under the experimental conditions studied, it can be concluded that the strain expressing OmpC-(His)<sub>12</sub> possesses the highest metal adsorption capacity for  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ .

An interesting feature of the surface display system presented here is that production of the OmpC protein was osmotically induced. Therefore, expression of the *ompC* gene can easily be induced by exposing the cells to high osmolarity, such as that encountered in most complex growth media. This induction scheme avoids the use of toxic and costly chemical inductors such as IPTG. This feature can be advantageous in the case of large-scale applications, such as pollution bioremediation.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr J.L. Puente and Dr E. Calva for providing plasmid pMY111 and information about OmpC. We thank Q.F.B. Ciro Marquez for his help with the atomic absorption equipment from the Facultad de Química UNAM. We thank Xochitl Alvarado for her skillful assistance in taking microscopy photographs and Mercedes Enzaldo for her technical assistance. This work was supported by grant 400344-5-0257PN from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

#### References

- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach M, Heyneker HL, Boyer HW, Cross JL, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- Click EM, Mac Donald GA, Schnaitman CA (1988) Translational control of exported proteins that result from *OmpC* porin overexpression. *J. Bacteriol.* 170: 2005-2011.
- Cowan SW, Schmitt T, Rummel G, Sterett M, Ghosh R, Pauprit RA, Jansson JN, Rosenbusch JP (1992) Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* 358: 727-733.
- Charbit A, Molla A, Saurin W, Hofnung M (1988) Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 181-189.
- Cuero RG (1996) Enhanced heavy metal immobilization by a bacterial-chitosan complex in soil. *Biotechnol Lett* 18: 511-514.
- Georgiou G, Poetschke HL, Stathopoulos C, Francisco JA (1993) Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol* 11: 6-10.
- Hochuli B, Bannwarth W, Doebeli H, Gentsch R, Staeheli D (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio Technology* 6: 1321-1325.
- Hofnung M (1991) Expression of foreign polypeptides at the *Escherichia coli* cell surface. *Meth Cell Biol* 34: 77-105.
- Hoyle B, Beveridge TJ (1983) Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 46: 749-752.
- Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F (1995) The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol* 5: 2153-2164.
- Kim SY, Kim JH, Kim CJ, Oh DK (1996) Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol Lett* 18: 1161-1164.
- Kratochvil D, Volkov B (1998) Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends-Biotechnol* 16: 291-300.
- Lacmish UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. *Nature* 227: 680-687.
- Lutke M, Fuchs P, Breiting F, Dubel S (1993) Bacterial surface presentation of proteins and peptides: an alternative to phage technology? *Trends Biotechnol* 11: 3-5.
- Miller JH (1972) A short course in bacterial genetics. *A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1983) DNA sequence of the promoter region of the *ompC* gene and the amino acid sequence of the signal peptide of pro-OmpC protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 151: 159-164.
- Morona R, Tommassen J, Henning U (1985) Demonstration of a bacteriophage receptor site on the *Escherichia coli* K12 outer-membrane protein OmpC by the use of a protease. *Eur J Biochem* 150: 161-169.
- Nakajima A, Sakaguchi T (1986) Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 24: 59-64.
- Nikaido H (1996) Outer membrane. In: Neidhardt FC, ed. *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 29-47.

- Nogami I, Mizushima S (1983) Outer membrane porins are important in maintenance of the surface structure of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **156**: 402-408.
- Nriagu JO, Pacyna JM (1989) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**: 134-139.
- Pazirandeh M, Chrisey LA, Mauro JM, Campbell JR, Gaber BP (1995) Expression of the *Neurospora crassa* metallothionein gene in *Escherichia coli* and its effect on heavy-metal uptake. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 1112-1117.
- Puente JI, Juarez D, Bobadilla M, Arias CF, Calva E (1995) The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene* **156**: 1-9.
- Puente JI, Verdugo-Rodríguez A, Calva E (1991) Expression of *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* OmpC is influenced differently by medium osmolarity. *Mol Microbiol* **5**: 1205-1210.
- Saarihtii HT, Tapio Palva E, Holmgren J, Sanchez J (1989) Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and outer membrane protein OmpC. *Infect Immun* **57**: 3663-3665.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Shuttleworth KL, Unz RF (1983) Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thiothrix* strain A1. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1274-1282.
- Sousa C, Cebolla A, de Lorenzo V (1996) Enhanced metalload-sorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nature Biotechnol* **14**: 1017-1020.
- Stoll A, Duncan JR (1996) Enhanced heavy metal removal from waste water by viable, glucose pretreated *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol Lett* **18**: 1209-1212.
- Wilhelmi BS, Duncan JR (1995) Metal recovery from *Saccharomyces cerevisiae* biosorption columns. *Biotechnol Lett* **17**: 1007-1012.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.