

Efecto de lisina y ácido glutámico en la purificación de la proteína GPN2 humana expresada en *E. coli*

Juárez Lucero Jorge Jaime*, Guevara Villa María del Rayo Graciela, Ortiz Gutiérrez Felipe, Alatraste Trejo Kiichi, Bartolo Zarate Alfonso, Serna Villalobos Lisbeth Joselyn

Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla, Departamento de Sistemas Computacionales y Departamento de Biotecnología. Calle Popocatepetl s/n colonia 3 cerritos, Heroica Puebla de Zaragoza. C.P.72480. Puebla, México.

*Autor para correspondencia: jjlucero@gmail.com

Recibido:

01/julio/2017

Aceptado:

05/agosto/2017

Palabras clave

Purificación, proteínas, aminoácidos.

Keywords

Purification, proteins, amino acids.

RESUMEN

La proteína humana GPN2 participa en la biogénesis de la RNA polimerasa II, se expresó como proteína recombinante en *E. coli* y se purificó por cromatografía por afinidad por metales inmovilizados en níquel (IMAC, por sus siglas en inglés *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). El uso de IMAC en proteínas extraídas por *E. coli* genera muchos contaminantes y requiere de un proceso laborioso de purificación pasando por diferentes procesos cromatográficos. Los aminoácidos ácido glutámico y arginina incrementan la solubilidad de proteínas lo que sugiere que su uso combinado facilite el proceso de purificación. Se usaron dichos aminoácidos durante la purificación de la GPN2 obteniendo la muestra completamente pura pero con un bajo rendimiento de la proteína recombinante. Para ello, se sustituyó arginina por lisina consiguiendo mejorar la cantidad de proteína expresada y purificada. Finalmente, se analizó empleando electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y azul de Coomassie y se midió la cantidad de proteína obtenida por el método de Bradford alcanzando una concentración de 2mg/ml.

ABSTRACT

The human protein GPN2 collaborate in the biogenesis of RNA polymerase II, was expressed like recombinant protein in *E. coli* and was purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography with nickel (IMAC). The use of IMAC in proteins expressed in *E. coli* recuperate many impurities and is necessary other chromatographic steps. The amino acids glutamic acid and arginine increase the solubility of proteins, this suggest that the combined use of them make easy the purification process. We use both amino acids in the purification of the GPN2 protein obtaining the sample completely pure but with low performance. For that we interchange arginine for lysine and we get a better performance of the quantity of GPN2 in pure form. Finally, was revealed by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with Coomassie blue. The Bradford method quantifies a concentration of 2mg/ml.

Introducción

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados con Ni^{2+} (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*, IMAC) es el método cromatográfico más utilizado para purificar proteínas solubles enriquecidas en histidinas o para purificar proteínas recombinantes unidas a moléculas con afinidad a un metal quelante enlazado covalentemente a una matriz en una columna. (Gutiérrez, 2007). Varios autores han reportado que algunas proteínas de *E. coli* (que llamamos contaminantes o impurezas) se enlazan fuertemente al níquel cargado o a la matriz de afinidad con Ni-NTA (Níquel - ácido nitriloacético) y su elución se realiza junto con la proteína recombinante, la mayor cantidad de proteína expresada estará contenida dentro de cuerpos de inclusión y sólo una pequeña cantidad de proteínas pueden purificarse en un paso por el método IMAC sin haber realizado previas modificaciones sobre ellas. (Gelūnaite, 2000;)

Para poder recuperar o extraer las proteínas dentro de los cuerpos de inclusión se han desarrollado diferentes técnicas con una pureza relativamente elevada (Rosano, 2014). Por lo tanto, si queremos aislar la proteína recombinante que se mantiene soluble en la bacteria con un grado elevado de pureza es necesario realizar, junto con el sistema IMAC, otros procedimientos cromatográficos que pueden incluir de afinidad, de intercambio iónico, de ligando de colorante, de hidroxapatita, de interacción hidrofóbica, de tamaño de exclusión, de fraccionamiento con sulfato de amonio/glicol de polietileno o polietilenglicol (PEG) y análisis de la homogeneidad del producto (Messerschmidt, 2007) seguido de una búsqueda rápida de diferentes soluciones amortiguadoras, lo que requiere mucho gasto de material de laboratorio y elegir entre diferentes combinaciones posibles que al final no garantizan la obtención de la proteína pura (Gomori, 1955).

Para mejorar la solubilidad de proteínas, disminuir su producción dentro de cuerpos de inclusión y obtener un mejor rendimiento en la purificación se han empleado aminoácidos como la arginina (R) y el ácido glutámico (E) (Shiraki, 2002). Golovanov y colaboradores demostraron que la solubilidad de las proteínas puede incrementarse si se agrega a la solución amortiguadora que las contiene una concentración equimolar de arginina y ácido glutámico, explicando que su uso debe evitarse al momento de realizar la cromatografía y emplearse hasta el final de la purificación (Golovanov, 2004;). Mediante una simulación computacional Shukla y Trout demuestran que este efecto sinérgico entre los aminoácidos para solubilizar la proteína surge solamente si la concentración de ambos aminoácidos es la misma (Shukla y Trout, 2011)

Sin embargo, en 2009, Abe y colaboradores analizaron cuantitativamente la afinidad entre la arginina y el níquel en el sistema IMAC encontrando que la interacción entre las hexa-histidinas de la proteína recombinante y el níquel en la columna se reduce si se incrementa la concentración de arginina. También se demuestra que es posible utilizarla durante la purificación pero a concentraciones menores de 120 mM del aminoácido (Abe y et al., 2009).

Dentro de las proteínas humanas que no se han purificado en forma recombinante se encuentra la GPN-loop GTPasa2 (hGpn2), la cual pertenece a la familia de las hGPN-loop GTPasas (Alonso, 2013). Las GTPasas Gpn incluyen a tres proteínas parálogas, Gpn1, Gpn2 y Gpn3. Estudios filogenéticos han mostrado que estas proteínas evolucionaron a partir de un ancestro común en arquea y que ahora se encuentran universalmente conservadas en todas las células eucariotas (Alonso, 2013). Los tres miembros de esta familia son proteínas esenciales y la inhibición de su función resulta letal para la célula. La familia incluye a Gpn1 /XAB1/MBDin/QQT2/YJR072C / Npa3, Gpn2/QQT1/YOR262W y Gpn3/Parcs/ YLR243W (Lahmy, 2007). Las proteínas hGpn tienen los cinco motivos (G1, G2, G3, G4 y G5) característicos de todas las GTPasas que incluyen secuencias conocidas que permiten su función enzimática (Gras, 2008), además de un motivo de tres aminoácidos glicina, prolina y asparagina, llamado GPN, que le confiere el nombre a esta familia. Varios autores demostraron que la hGpn3 y la hGpn2 pertenecen a la red de interacciones de la proteína hGpn1, que la hGpn2 es requerida para la cohesión entre cromátidas hermanas, interactúa con algunas subunidades de la RNA polimerasa II y su función es importante para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Minaker, 2013).

En este estudio se realizó un método simple de purificación para la hGpn2. Para lograr este objetivo se emplearon los aminoácidos lisina (K) y glutamato de sodio (GluNa) como aditivos a la solución amortiguadora durante el proceso de purificación por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados con Ni^{2+} .

Metodología

Generación de la construcción molecular para expresar hGpn2 en *E. coli*

Se generó una construcción molecular para expresar hGpn2 con seis histidinas en el extremo amino terminal. Para ello se ligó la región codificante de hGpn2 en los sitios NdeI y SalI del vector de expresión bacteriana pET28a. Este vector contiene la información codificante

para seis histidinas y la secuencia de reconocimiento para la enzima trombina (LVPRGS), las cuales se expresaron en el extremo amino de hGpn2 y permitirán primero la purificación por cromatografía de afinidad a níquel y posteriormente eliminar dicha cola de histidinas de hGpn2 con la enzima trombina una vez que haya cumplido su propósito durante el proceso de purificación. El vector se introdujo en *E. coli* BL-21 (DE3) siguiendo la metodología de Armengaud, (2004).

Preparación de la columna His-Bind

Se incubaron 100 µl de resina del kit His-Bind de Novagen con 25 µl de sulfato de níquel en un tubo Eppendorf con 175 µl de una solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM y KCl 100 mM, pH de 8.2). Después de rotar el tubo por 15 minutos, la resina se lavó con 10 ml de la misma solución amortiguadora.

Expresión y purificación de la hGpn2 de la fracción soluble

La cepa bacteriana *E. coli* BL-21/DE3 transformada con la construcción molecular para expresar hGpn2 se creció a 37 °C en 600 ml de medio de cultivo LB (Luria Bertani) dentro de un matraz de 2 litros suplementado con kanamicina 100 µM hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 0.8 a 600 nm para garantizar que las bacterias se encontraran en la fase logarítmica de crecimiento. Para inducir la expresión de la proteína se agregó isopropil β-D-1-tiogalacto-piranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 200 µM y se dejó crecer por 24 horas a 10 °C. Para evaluar la expresión se tomaron alícuotas de 1 ml antes y después de la inducción. Al final del período de inducción las células fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y resuspendidas en una solución amortiguadora constituida por Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, lisina y glutamato de sodio de acuerdo a la concentración deseada a pH 8.2. Finalmente, las células se rompieron por sonicación (Branson sonifier) con tres pulsos de 30 segundos manteniendo la muestra en hielo separados por un intervalo de 30 segundos de reposo. El lisado bacteriano se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se introdujo en la columna con resina previamente cargada con níquel, se mezcló y rotó durante 20 minutos para permitir la unión de la proteína recombinante hGpn2 al níquel. Posteriormente, la columna se lavó con 10 ml de la misma solución amortiguadora conteniendo aminoácidos o imidazol 80 mM, la proteína fue liberada de la resina con la misma solución amortiguadora conteniendo imidazol 300 mM (pH 8.2). Las muestras finales fueron separadas

mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) al 10% y las proteínas presentes se visualizaron por el método de tinción con azul de Coomassie.

Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados empleando diferentes concentraciones de aminoácidos

Se estudió el efecto de arginina a 50 mM y se analizaron diferentes concentraciones de lisina y de glutamato de sodio (ver tabla 1). La purificación fue con la solución amortiguadora control Tris-HCl 100 mM y KCl 100 mM (pH 8.2).

Tabla 1. Soluciones amortiguadoras preparadas para realizar la purificación en un paso de la proteína humana Gpn2 recombinante por el método IMAC.

Solución Tampón	Tris-HCl (mM)	KCl (mM)	Lisina (mM)	Glutamato de Sodio (mM)
Control			0	0
1			0	25
2			0	50
3			0	100
4			0	200
5		100	0	300
6			50	0
7			100	0
8			200	0
9			100	100

Cuantificación de proteína

Se cuantificó la concentración de proteína hGpn2 obtenida al final del protocolo de purificación empleando el método de Bradford (Bio-Rad), midiendo la absorbancia a 595 nm.

Resultados y discusión

Purificación de la proteína Gpn2 humana expresada en *E. coli* BL-21 (DE3)

La adición del agente inductor IPTG a la cepa de *E. coli* BL-21/DE3 transformada con el vector de expresión de hGpn2 resultó en la producción de una proteína del peso molecular predicho para hGpn2. Una vez comprobada la eficacia del vector de expresión para dirigir la producción de hGpn2 como proteína recombinante se procedió a realizar la purificación de esta proteína por afinidad a níquel unido a la resina. Para esto, 1 ml del sobrenadante obtenido en el proceso de purificación descrito anteriormente, fue colocado en contacto con la resina con el níquel unido y rotado durante 40 minutos. La resina se lavó con la misma solución amortiguadora agregando una concentración de 80 mM de imidazol, posteriormente el material que permaneció unido se eluyó de la resina con imidazol a 300 mM. Las muestras se colocaron en una solución de carga con SDS y se calentó a 95°C durante 5 min. Las proteínas se separaron en un gel desnaturante de poliacrilamida y se visualizaron con la técnica de azul de Coomassie (figura 1A). Aunque la señal de mayor intensidad en estos geles corresponde a una proteína con un peso molecular cercano al esperado para hGpn2 también se puede observar la presencia de numerosas proteínas contaminantes.

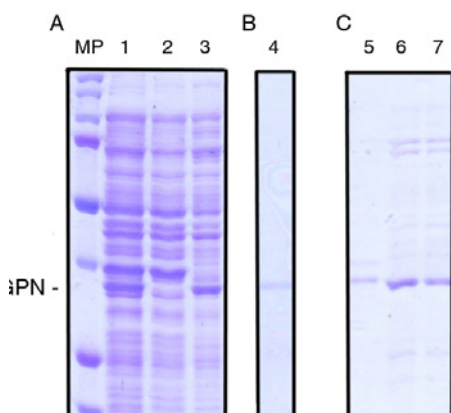


Figura 1. Expresión y purificación de la proteína Gpn2 humana. SDS-PAGE con detección de las proteínas con azul de Coomassie. (A) En solución tampón control (Tris-HCl 100 mM y KCl 100 mM a pH 8,2) eluída con imidazol a 300 mM. (B) La solución control con arginina (C). Misma solución amortiguadora agregando diferentes concentraciones de lisina. Marcadores de peso molecular de proteínas (MP); controles de expresión positivo y negativo de la proteína hGpn2 respectivamente (líneas 1-2); purificación de un paso IMAC de la hGpn2 (línea 3); purificación con arginina a 50 mM (línea 4); purificación con lisina a 200 mM (línea 5), a 100 mM (línea 6) y 50 mM (línea 7).

Purificación de la proteína Gpn2 humana con arginina

Se realizó la purificación de la proteína humana Gpn2 en presencia de arginina a una concentración menor (50 mM) de la máxima permitida reportada por Abe y colaboradores (2009) de 120 mM y se determinó su efecto en la pureza de la proteína obtenida. En la figura 1B se observa una remoción total de los contaminantes pero también una baja retención de la Gpn2 humana.

Purificación de la proteína Gpn2 humana a diferentes concentraciones de lisina

A continuación, se examinó si la presencia del aminoácido lisina durante el protocolo de purificación resultaba en una disminución en el número de proteínas contaminantes. Con este fin se determinó el efecto de la presencia de lisina a las concentraciones de 50, 100 y 200 mM en la pureza de hGpn2. En la figura 1C se observa que el número de proteínas contaminantes al final del proceso de purificación de hGpn2 disminuyó notablemente en presencia de lisina 50 y 100 mM. Sin embargo, la presencia de lisina a una concentración de 200 mM disminuyó también la cantidad de hGpn2 unida a la resina de afinidad.

Purificación de la proteína Gpn2 humana a diferentes concentraciones de ácido glutámico

El proceso de purificación se realizó con la solución amortiguadora control y glutamato de sodio a concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 mM. Los lavados se realizaron con un volumen de 1 ml repitiendo este proceso 10 veces con la misma solución (figura 2A). El análisis de hGpn2 purificada en presencia de ácido glutámico a las concentraciones de 25, 50 ó 100 mM eliminó efectivamente las proteínas contaminantes sin disminuir el rendimiento de hGpn2. Sin embargo, el ácido glutámico a una concentración de 200 ó 300 mM disminuyó significativamente la cantidad de hGpn2 unida a la resina de níquel al final del proceso de purificación.

Purificación de la proteína Gpn2 humana en una solución equimolar de glutamato de sodio y lisina

El proceso de purificación fue realizado con la solución amortiguadora constituida de Tris-HCl, KCl, lisina y glutamato de sodio a 100 mM y pH de 8.2. Se realizaron lavados como se mencionó anteriormente con un volumen de 10 ml de la misma solución amortiguadora equimolar y se verificó su concentración (figura 2B).

Se buscó un sistema económico que no involucrara diferentes tipos de cromatografía ni el uso de diferentes solventes para producir hGpn2 recombinante de alta pureza. Se realizó la purificación en un paso y se utilizó solamente la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC).

De un estudio de diferentes soluciones con distintos aditivos para mantener las proteínas de la familia hGpn solubles y que pudiera facilitar su purificación, se eligió la solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM (pH 8.2) y KCl 100 mM (Lindwall, 2000), que permitió la expresión de las proteínas recombinantes pero no se consiguió obtenerlas de forma pura (figura 1A).

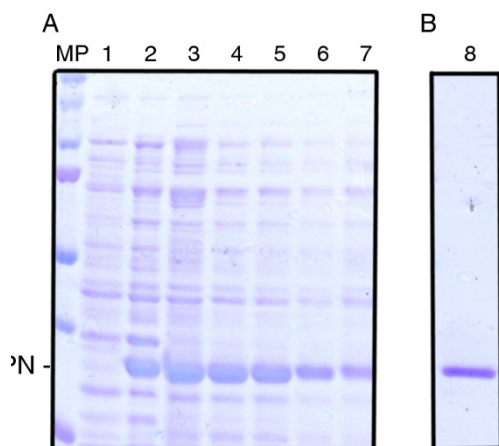


Figura 2. Purificación de la proteína hGpn2 expresada en bacterias *E coli* BL-21/DE3. Las proteínas fueron separadas por medio de geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) y detectadas con azul de Coomassie. (A) En solución tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8.2) y KCl 100 mM a diferentes concentraciones de glutamato de sodio. (B) Purificación final de la hGpn2 a una concentración de 2 mg/ml. Marcadores de peso molecular de proteínas (MP); controles de expresión negativo y positivo de la proteína hGpn2 respectivamente (líneas 1-2); purificación de un paso IMAC de la hGpn2 con glutamato de sodio a 25 mM (línea 3), 50 mM (línea 4), 100 mM (línea 5), 200 mM (línea 6) y 300 mM (línea 7). Purificación con lisina 100 mM y Glutamato de sodio 100 mM (línea 8).

Los resultados muestran que las construcciones moleculares fueron efectivas para dirigir la síntesis de la proteína Gpn2 humana. Después de realizar la purificación como se describió previamente, se hicieron lavados con la misma solución amortiguadora agregando una concentración de 80 mM de imidazol a pH 8.2 (figura 1A). Sin embargo, no fue suficiente para poder eliminar

todos los contaminantes presentes al momento de realizar la purificación en un paso empleando el método IMAC, esto es lo esperado cuando el sistema utilizado para expresar la proteína recombinante es *E. coli*. (Patwardhan, 1997).

Para liberar la proteína recombinante Gpn de la columna se agregó una concentración de 300 mM de imidazol a la solución amortiguadora.

Golovanov y cols. en 2004 incrementaron la solubilidad de proteínas agregando una solución equimolar constituida de arginina (R) y ácido glutámico (E) a la solución amortiguadora, explicando que el uso de aminoácidos se recomienda después de haber realizado la purificación y previo al proceso de concentración de la proteína. Estudios de Shukla y Trout realizando una simulación computacional de la solución amortiguadora demostraron que las proteínas incrementaron su solubilidad cuando se agregó arginina y ácido glutámico debido a que los aminoácidos se usaron como puente entre la superficie de la proteína y la solución amortiguadora (Shukla y Trout, 2011). Por otro lado, Abe y su grupo en el 2009 realizaron experimentos empleando arginina como aditivo en la solución amortiguadora y lo utilizaron para realizar la purificación de proteínas demostrando que puede usarse solamente a bajas concentraciones que no superen los 120 mM del aminoácido (Abe, 2009). Si se incrementa la concentración de arginina entonces se debilita el enlace entre la proteína recombinante y el níquel presente en la columna.

Concentraciones mayores a 200 mM rompe el enlace covalente existente entre el níquel y la resina de la columna cromatográfica impidiendo la purificación de proteínas.

Se realizó la purificación de la proteína recombinante agregando a la solución tampón una concentración de 50 mM de arginina (mucho menor de la tolerancia permitida por la columna antes de que el aminoácido desprendiera el níquel de la misma) y se logró una elución total de los contaminantes. Sin embargo, la proteína Gpn2 humana fue eliminada de la columna en su mayoría al realizar los lavados con la misma solución (figura 1B).

Para incrementar la solubilidad de nuestra proteína blanco (hGpn2) y mejorar su purificación se cambió la arginina por otro aminoácido que tuviera un efecto similar. La mejor elección fue el aminoácido lisina (K) porque al igual que la arginina es un aminoácido polar con carga positiva, es más hidrofóbico y tiene menos fuerza iónica que la arginina (Betts, 2003). Cuando comparamos la arginina con la lisina encontramos que el primer

aminoácido tiene efectos diferentes (Sundlass, 2011). Se utilizaron tres soluciones amortiguadoras con Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM y variamos la concentración de lisina a 50, 100 y 200 mM a pH 8,2 y realizamos la purificación de la proteína recombinante Gpn2 humana.

La figura 1C muestra los experimentos realizados para la purificación de la hGpn2 empleando lisina como aditivo a la solución amortiguadora. Se inició con una concentración de 50 mM y se verificó su efecto sobre la eliminación de impurezas. La adición de este aminoácido a la solución amortiguadora eliminó casi todas las impurezas dejando solo trazas de algunas proteínas no deseadas. Sin embargo, dos proteínas de aproximadamente 75 KDa no pudieron eliminarse. Se incrementó la concentración de la lisina a 100 mM para optimizar la purificación y se mejoró el rendimiento de la proteína hGpn2 purificada pero sin tener progreso en la eliminación de contaminantes que continuaron apareciendo con la misma intensidad que cuando se utilizó lisina a menor concentración. Posteriormente se subió la concentración de lisina a 200 mM logrando la eliminación de todos los contaminantes pero disminuyendo el rendimiento de la proteína Gpn2 humana purificada. Por otro lado, se realizó diferentes purificaciones empleando glutamato de sodio como aditivo a la solución amortiguadora control. Cada una de las purificaciones se realizó a las concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 300 mM del aminoácido. Cuando se incrementó la concentración hasta 100 mM se observó la misma intensidad de la banda de la proteína hGpn2 purificada, pero al incrementar la concentración de glutamato de sodio se observó una disminución del rendimiento de la proteína junto con la disminución de la intensidad de los contaminantes pero sin eliminarlos completamente. La disminución de los contaminantes no fue tan efectiva con el empleo del glutamato de sodio como cuando se utilizó el aminoácido cargado positivamente. Sin embargo, las dos bandas que no pudo eliminar la lisina ya no se observaron con el glutamato de sodio. Analizados los resultados obtenidos con el empleo de aminoácidos como agregados a la solución amortiguadora control se decidió mezclar ambos a la misma concentración final de 100 mM porque fue la concentración de lisina efectiva para despegar los contaminantes de hGpn2 (figura 1C) y el glutamato de sodio removió las dos bandas que no pudieron ser eliminadas por el otro aminoácido (figura 2A) además, esta concentración mantuvo el mismo rendimiento de la hGpn2.

La purificación final se realizó con una solución amortiguadora de Tris-HCl, KCl, lisina y glutamato de sodio equimolar a 100 mM y pH 8.2.

Conclusiones

El efecto de los aminoácidos combinados al momento de realizar la purificación fue notable.

Se logró la completa eliminación de las impurezas y la proteína Gpn2 humana se consiguió en forma pura.

La lisina eliminó la mayoría de los contaminantes y la hGpn2 se retuvo eficientemente en la columna.

El glutamato de sodio por su parte logró limpiar del sistema IMAC las dos bandas que la lisina no consiguió eliminar y el efecto combinado de ambos permitió conseguir la proteína recombinante de forma pura. Para cuantificar la cantidad de la proteína expresada se realizó el análisis de Bradford obteniendo una concentración de 2 mg/ml de proteína hGpn2 pura. Estos resultados permitirán el estudio de la GTPasa hGpn2 a un nivel molecular en estudios bioquímicos y biofísicos in vitro.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración recibida de las siguientes instituciones: A los Laboratorios de Biología Celular y Biología Molecular del Instituto de Física, a la Facultad de Medicina y en especial al Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

Referencias

- Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T, Tsumoto K. (2009). Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:306-10.
- Alonso B. (2013). Eukaryotic hGPN-loop GTPases paralogs use a dimeric assembly reminiscent of archaeal hGPN. *Cell cycle.* 463-472.
- Armengaud J. (2004). N2-Methylation of guanosine at position 10 in tRNA is catalyzed by a THUMP domain-containing, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, conserved in Archaea and Eukaryota. *J. Biol. Chem.* 37142-152.
- Betts MJ. (2003). Chapter 14. Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for geneticist.* Michael R. Barnes and Ian C. Gray. John Wiley & sons, USA, 297-305.

Gomori G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology*. 1:138-146.

Gelūnaite L. (2000). Chelated mercury as a ligand in immobilized metal ion affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A*. 904:131-143.

Golovanov AP. (2004). A simple method for improving protein solubility and Long-Term Stability. *J. Am. Chem. Soc.* 126:8933-39.

Gras S. (2007). Structural insights into a new homodimeric self-activated GTPase family. *EMBO reports*. 569-575.

Gutiérrez R. (2007). Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. *Separation and Purification Reviews*. 36:71-111.

Lahmy S. (2007). QQT proteins colocalize with microtubules and are essential for early embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 50:615-26.

Lindwall G. (2000). A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins. *Protein Eng.* 67-71.

Messerschmidt A. (2007). X-ray crystallography of biomolecules. Wiley-vch verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 203-220.

Minaker SW. (2013). Biogenesis of RNA Polymerases II and III Requires the Conserved GPN Small GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 853-864.

Patwardhan AV. (1997). Site accessibility and the pH dependence of the saturation capacity of a highly cross-linked matrix. Immobilized metal affinity chromatography of bovine serum albumin on chelating Superose. *J. Chromatogr. A*. 11-23.

Rosano GL. (2014). Recombinant protein expression in *E. coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5:1-17.

Shiraki K. (2002). M. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation. *J. Biochem.* 132:591-95.

Shukla D, Trout B. (2011). Understanding the synergistic effect of arginine and glutamic acid mixtures on protein solubility. *J Phys Chem B*. 115:11831-839.

Sundlass NK. (2011). Arginine residues are more effective than Lysine residues in eliciting the cellular uptake of onconase. *Biochemistry*. 293-299.