



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Morfología, estructura y composición de agregados de esfingomielinasa D y
fosfolipasa A2 recombinante producidos en *Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Andrea Eugenia Castellanos Mendoza

MÉXICO, D. F. 27 de noviembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TUTORA

Dra. Norma Adriana Valdez Cruz

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Norma Adriana Valdez Cruz. Instituto de Investigaciones Biomédicas
(UNAM)**

Dr. Julio César Carrero Sánchez. Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

Dr. Enrique García Hernández. Instituto de Química (UNAM)

MÉXICO, D. F. 27 de noviembre, 2014

Jurado Revisor

Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química (UNAM)

Dr. Alejandro Alagón Cano

Instituto de Biotecnología (UNAM)

Dra. Clarita Olvera Carranza

Instituto de Biotecnología (UNAM)

Dra. Liliana Pardo López

Instituto de Biotecnología (UNAM)

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Facultad de Medicina (UNAM)

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz. Los experimentos fueron llevados a cabo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, en los laboratorios C-132 y C-036, así como en la Unidad de Bioprocesos (a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán) del Departamento de Biotecnología y Biología Molecular.

Durante el trabajo experimental recibí una beca de maestría de CONACyT, además de haber contado con el apoyo económico otorgado a la Dra. Valdez del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 220795, 178528, 181895 y 104951-Z) y del programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT 209113, 210013).

Agradecimientos

En primer lugar a la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz por la dirección de este trabajo y permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Mauricio Trujillo por permitirme trabajar en su laboratorio y en la UBP.

A los miembros del Comité Tutoral, el Dr. Julio Cesar Carrero y el Dr. Enrique García por su tutoría y ayuda desde el inicio del proyecto.

Al Dr. Alejandro Alagón por proporcionarnos las cepas con las construcciones modelo.

A la Dra. Guadalupe Zavala Padilla de la Unidad de Microcopía del Instituto de Biotecnología, UNAM por su apoyo técnico en la realización de las micrografías.

Al M. en C Ramsés Gamboa y M. en C Ramsés García por su colaboración en la realización de las cinéticas de cultivo en la UBP.

Al M. en C. Ricardo Castro por su apoyo en los ensayos de unión a Tioflavina y Light Scattering, y la revisión del escrito.

Al Dr. O. Tonatiuh Ramírez y la Dra. Laura Palomares por permitirme trabajar en su laboratorio.

Al M. en C. Alejandro Olvera y al Ing. Miguel Ángel Mendoza en su ayuda y enseñanza de los ensayos de actividad enzimática y por el tiempo dedicado al proyecto.

Agradecimientos personales

En primer lugar y sobre todo a mis padres, Manuel y Magda, por siempre confiar en mi y mi potencial, por apoyarme cada día, cada momento durante mi maestría, así como lo han hecho en todos los aspectos de mi vida. Los amo intensamente y son mi ejemplo a seguir, sin ustedes no sería lo que soy.

A mi hermano Arturo “Cano” Castellanos por ser mi fan número 1, por siempre echarme porras. Te quiero manito.

A mis abuelitas, Geña y Lucha, porque son las mejores abuelitas del mundo, por siempre consentirme y apoyarme. De igual modo a mi abuelito por ser el abuelito más increíble del universo, por escucharme y por quererme tanto como yo lo quiero a él.

A Alejandro, por empezar conmigo este reto. Porque has estado todo el tiempo a mi lado, porque eres mi compañero mi cómplice y mi amor. Te amo

A Sarahí y Ana por ser las mejores amigas del mundo, por entenderme en las buenas y en las malas, y porque aún sabiendo como soy me quieren. De igual modo a Bere y Ahira que siempre me hacen reír y se que siempre cuento con ustedes.

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo, agradezco muchísimo todo su apoyo tanto académico como personal durante la elaboración de esta tesis. Gracias por mantener siempre la puerta abierta y por su amistad.

Al Dr. Mauricio Trujillo por su amistad y amabilidad y por siempre ofrecer una tazita de café colombiano. Gracias por su gran ayuda durante mi estancia en el lab.

A Ram por ser el mejor hámster del mundo, por ir a comprar semillas conmigo y por ser un gran amigo. Deisy y Monchis por ser las mujeronas que son, Deisy gracias por todo el colombian power que le inyectó a mi maestría y por ser una amiga increíble. Monchis por que aunque no me hayan hecho en Michoacán me supiste valorar. A los 3 los quiero profundamente y compartir mis días con ustedes ha sido increíble. Gracias porque aparte de ser mis colegas son mis amigos, definitivamente mi estancia en el laboratorio estuvo llena de momentos dulces y divertidos y se los debo principalmente a ustedes 3.

A mis hermanitos de arriba Andrea y Giroshi porque siempre me cuidaron y me vieron como la hermana chiquita. Memin gracias por tu inocencia siempre tan refrescante. Pedro porque aunque siempre me haces enojar sabes que te queremos, y Dany darks por oscurecerme y enseñarme que no todos pueden ser darks, (tu tmp puedes serlo).

A tod@s los colombian power por ponerle sabor a mi estancia en el Instituto, Andresico, Andrés, Sarah, Diana, fui muy feliz de compartir su estancia, se les quiere mucho y son ustedes muy bacanos.

A la buena gente de planta Chucho, Ulises, Dany boy (a.k.a Dany planta), Greta, Karen, Adrianita, Ram colita, Martuki, gente buena que trabaja que vive y que siente. Gracias por todas esas tazitas de café que saben a gloria. Mención honorífica a Mafer que siempre ha estado presente y jamás se ha rendido, Mafer todos somos tus fans. Al inge Abel, por ser un gran amigo y por todos sus consejos.

Y sobretodo, un agradecimiento a mi *Alma Mater*, la UNAM, por birndarme la oportunidad de crecer personalmente y como profesionista, por tener las puertas abiertas para todos los que buscamos superarnos, por crear gente capacitada, conciente y trabajadora. Gracias a mi universidad por recibir gente nacional y extranjera sin hacer distinciones. Es un orgullo poderme decir egresada de tus aulas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1 RESUMEN	3
2 ABSTRACT	5
3 INTRODUCCIÓN	7
3.1 <i>E. coli</i> y la producción de proteínas recombinantes	7
3.2 Agregación proteica y formación de cuerpos de inclusión	8
3.3 Chaperonas como sistema de control de calidad en el plegamiento	9
4 ANTECEDENTES	13
4.1 Características de los cuerpos de inclusión	13
4.2 Composición proteica de los cuerpos de inclusión	16
4.3 Proceso de agregación	17
4.4 Solubilización y plegamiento de los cuerpos de inclusión	18
4.5 Las condiciones de cultivo y su relación con la formación de cuerpos de inclusión	20
4.6 La variación en el pH provoca estrés en las bacterias	22
4.7 Aplicaciones de los cuerpos de inclusión	23
4.8 Proteínas modelo	25
4.8.1 Esfingomielinasa	25
4.8.2 Esfingomielinasa D de <i>Loxocles reclusa</i>	25
4.9 Fosfolipasa A2 de <i>Micrurus laticollaris</i>	27
5 JUSTIFICACIÓN	29
6 HIPÓTESIS	31
7 OBJETIVOS	31

7.1	Objetivo general	31
7.2	Objetivos particulares	31
8	MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1	Medio de cultivo y Soluciones	32
8.2	Cepas bacterianas y plásmido	33
8.3	Proteínas modelo	33
8.4	Clonación y expresión de las proteínas modelo	34
8.4.1	Extracción de ADN plasmídico	34
8.4.2	Preparación de células quimiocompetentes	34
8.4.3	Transformación de células quimiocompetentes	34
8.4.4	Selección de los clones transformantes de <i>E. coli</i> .	34
8.4.1	Comprobación de la expresión de los clones transformantes de <i>E. coli</i> .	36
8.5	Elaboración de los bancos de trabajo (BT)	36
8.6	Caracterización cinética de los cultivos en matraz y biorreactor	37
8.6.1	Condiciones de cultivo de <i>E. coli</i> .	37
8.6.2	Cultivo en lote y evaluación de producción en biorreactor de 1.0 L	37
8.7	Caracterización de los cuerpos de inclusión	37
8.7.1	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	37
8.7.2	Purificación de cuerpos de inclusión	38
8.7.3	Cuantificación de proteína por el método de Bradford	38
8.7.4	Cuantificación de proteína en CI mediante unión a Cobre	38
8.7.5	Ensayo de unión a Tioflavina-T	38
8.7.6	Ensayo de unión a Rojo Congo	39
8.7.7	Digestión con proteinasa K de los Cuerpos de Inclusión	39
8.7.8	Estudios de disolución con agentes desnaturalizantes	39
8.7.9	Análisis de tamaño de los Cuerpos de Inclusión	39
8.7.10	Ánalysis de morfología por micrografía de transmisión electrónica	40
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
9.1	Descripción de las proteínas modelo	41
9.2	Caracterización inicial de las cepas productoras	41
9.2.1	Evaluación de diferentes medios de cultivo con la cepa BL21-Gold(DE3) productora de esfingomielinasa D de garrapata	41
9.2.2	Caracterización cinética de la cepas BL21 gold (DE3) productoras de las proteínas modelo, en matraces	44
9.2.3	Mejoramiento del proceso de purificación de CI	45

9.3	Caracterización cinética de <i>E.coli</i> BL21 gold (DE3) productora de las proteínas modelo en biorreactores	46
9.3.1	Cinética de crecimiento de la cepa productora de esfingomielinasa de garrapata	47
9.3.2	Cinética de crecimiento de la cepa productora de esfingomielinasa D mutante de garrapata	48
9.3.3	Cinética de crecimiento de la cepa productora esfingomielinasa D de <i>L. reclusa</i>	48
9.3.4	Cinética de crecimiento de fosfolipasa A2 de <i>Micrurus laticollaris</i>	49
9.3.5	Comparación de variación del pH durante los cultivos sin control de pH	50
9.4	Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los diferentes cultivos	51
9.4.1	Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) que expresa esfingomielinasa D de garrapata	51
9.4.2	Análisis de la composición proteica de los cuerpos de inclusión de esfingomielinasa D de garrapata cosechados a diferentes tiempos de cultivo en ambas estrategias de cultivo	53
9.4.3	Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) que expresa esfingomielinasa D mutante de garrapata	54
9.4.4	Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3) que expresa esfingomielinasa D de <i>Loxocles reclusa</i>	55
9.4.5	Separación electroforética de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de <i>E. coli</i> BL21 gold (DE3) que expresa fosfolipasa A2 de <i>M. laticollaris</i>	56
9.5	Caracterización morfológica de cuerpos de inclusión en cultivos de <i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) productores de esfingomielinasa D de garrapata, mediante microscopía de transmisión electrónica	57
9.6	Caracterización fisicoquímica de los cuerpos de inclusión	60
9.6.1	Determinación de la estructura secundaria de los CI mediante ensayos de unión a colorantes amiloidogénicos	60
9.7	Determinación de población de tamaños de cuerpos de inclusión mediante dispersión dinámica de luz	63
9.8	Resistencia a la degradación	66
9.8.1	Proteólisis con proteinasa K	66
9.8.2	Solubilización de CI con Cloruro de guanidinio	68
10	CONCLUSIONES	73
11	ANEXO 1	75
12	BIBLIOGRAFÍA	76

ABREVIATURAS

A	Amperes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BM	Banco maestro
BSA	Suero de albúmina bovino (“Bovine serum Albumin”)
BT	Banco de Trabajo
CI	Cuerpo de Inclusión
CL	Cultivo en lote
Da	Daltones
DAAO	Oxidasa de aminoácidos D (“D-amino acid oxidase”)
DC	Dicroísmo Circular
DO	Densidad Óptica
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Furier (“Fourier Transform Infrared Spectroscopy”)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (“Green Fluorescent Protein”)
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro (“Generally Recognized As Safe”)
H+/D	Hidrógeno/Deuterio
hDHFR	Dihidrofolato reductasa humana (“Human dihidrofolate Reductase”)
HGdn	Cloruro de Guanidinio
Ibp	Proteínas de cuerpos de inclusión (“Inclusion bodies proteins”)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
L.	Loxocelas
LB	Luria Bertani
LC	Loxocelismo cutáneo
M	Molar
ND	No Determinado
nm	Nanómetro
PBS	Amortiguador fosfato salino (“Phosphate buffer saline”)
PLA2	Fosfolipasa A2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase chain reaction”)
PR	Proteína recombinante
PS	Proteína soluble
RC	Rojo Congo

RCT	Respuesta de Choque Térmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SB	“Super Broth”
SDS	Dodecil sodio sulfato (“Sodium dodecil sulfate”)
SDS-PAGE	Electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecil sodio sulfato (“Sodium dodecil sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis”)
SM	Esfingomielina
SMDg	Esfingomielinasa D de garrapata
SMDgm	Esfingomielinasa D con mutaciones de garrapata
SMD-Lr	Esfingomielinasa D de la araña <i>Loxocles reclusa</i>
Th-T	Tioflavina-T
Tm	Temperatura de fusión
TOD	Tensión de Oxígeno Disuelto
UA	Unidad de Absorbancia
VP1GFP	Proteína de fusión de la proteína de cápside VP1 y la proteína verde fluorescente
VP1LAC	Proteína de fusión de la proteína de cápside VP1 y la β galactosidasa
VVM	Área por volúmenes de medio por minuto
X_{max}	Biomasa máxima

1 RESUMEN

La necesidad de producir proteínas recombinantes (PR) aumenta a medida que su demanda crece, así como sus aplicaciones en la industria farmacéutica, veterinaria, alimentaria, entre otras. Entre los sistemas más utilizados para producir PR se encuentran los bacterianos. Por ejemplo, la bacteria *E. coli* es ampliamente utilizada en diferentes bioprocesos ya que puede producir altas cantidades de PR alcanzando hasta 30 g/L (Starndberg et al., 1994; Sorensen y Mortensen, 2005; Ferrer-Miralles et al., 2009; Peternel y Komel, 2011).

Durante los procesos de producción de PR comúnmente se busca obtener altas concentraciones de producto. Sin embargo, los organismos huésped en algunas ocasiones rebasan su capacidad biosintética lo que puede afectar su fisiología (García-Fruitos et al., 2011). La sobre-expresión de PR puede representar hasta un 50% del contenido total de proteínas, las cuáles pueden agregarse afectando su correcto plegamiento (Valdez-Cruz et al., 2010; Marisch et al., 2013). *E. coli* cuenta con una maquinaria sencilla para estructurar las proteínas y la cual no puede realizar modificaciones post-traduccionales complejas. Debido a que el ambiente citoplasmático es reductor, la producción de proteínas que poseen puentes disulfuro representa un reto en el plegamiento. Estos factores conducen a la agregación, que a menudo da lugar a la formación de cuerpos de inclusión (CI). Anteriormente se consideraba a los CI como agregados amorfos y sin uso. Sin embargo, se ha demostrado que algunas de las proteínas contenidas en los CI se encuentran ordenadas y estructuradas, pudiendo ser bioactivas (Carrió et al., 2005).

Las condiciones ambientales de los cultivos bacterianos son importantes en la producción de PR, las cuales también pueden influir en el tamaño y morfología de los CI (Sorensen & Mortensen, 2005). Por ejemplo, el incremento de la temperatura favorece la agregación proteica (Rinas et al., 2007), mientras su disminución evade la agregación e incluso mejora la obtención de proteína soluble (de Groot & Ventura, 2006a; García-Fruitos et al., 2007). Así mismo, el aumento en el tiempo de cultivo después de la inducción favorece el incremento del tamaño de los CI (Margreiter et al., 2008b). Por otro lado, la co-expresión con chaperonas en algunos casos ayudan a aumentar el rendimiento de proteína soluble (García-Fruitos et al., 2010; Hoffmann & Rinas, 2004; Thomson et al., 2013). Hasta ahora, varias de las caracterizaciones de CI se han realizado a partir de cultivos en matraz, en los que las condiciones ambientales propias de este sistema varían (pH y oxígeno) y que a su vez podrían influenciar su formación. De hecho, pocos estudios se ha realizado sobre la influencia de las condiciones de cultivo en la formación y estructuración de los CI. Particularmente, se ha reportado que los cultivos sin control de pH realizados en matraces y en biorreactor, favorecen la acumulación de CI con respecto al tiempo, en un sistema termoinducible (Strandberg y Enforce, 1991), sin embargo los CI no fueron caracterizados. De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la variación de pH sobre las características fisicoquímicas de los CI formados por las PR esfingomielinasa D de garrapata (SMDg), esfingomielinasa D de garrapata mutante (SMDgm), esfingomielinasa-D de la araña *Loxosceles reclusa* y la fosfolipasa A2 de la serpiente *Micrurus laticollaris*, expresados en *E. coli* BL21-Gold (DE3) usando dos estrategias de cultivo (pH 7.5 y pH sin control).

En este trabajo se presentan las cinéticas de cultivo realizadas con las 4 cepas, así como el análisis de la acumulación de proteína en forma de CI, y la caracterización de los CI obtenidos. Particularmente, los CI de SMDg fueron caracterizados de forma cinética y con mayor profundidad. Estos CI fueron además observados mediante microscopía de transmisión electrónica en diferentes tiempos del cultivo. Se observaron variaciones en el tamaño de los CI, en función de la variación del pH. Los CI de SMDg producidos bajo condiciones sin control de pH fueron aumentando su tamaño con respecto al tiempo y fueron claramente observados después de 5 h de inducción química, mientras que los CI sintetizados en condiciones controladas de pH presentaron un incremento de tamaño en las primeras horas de cultivo y después aparentemente se compactan. Estos resultados además fueron confirmados con estudios de dispersión dinámica de luz. Los CI de las diferentes proteínas analizados mediante esta técnica presentaron diferentes tamaños. Con el fin de analizar el efecto de la variación del pH sobre la conformación de los CI de SMDg, SMDgmut, SMD-Lr y de PLA2, se realizaron experimentos de hidrólisis con proteinasa-K. Los CI producidos en condiciones sin control de pH fueron más propensos a la degradación proteolítica. Los CI de SMDg aumentaron su resistencia a la proteólisis con respecto al tiempo de cultivo. Mientras los CI producidos bajo condiciones controladas presentaron mayor resistencia a la degradación. En este trabajo proponemos que los CI producidos bajo condiciones controladas de pH presentan una mayor estructura β -laminar, posiblemente amiloide. De igual forma, se necesitaron concentraciones más bajas de cloruro de guanidinio para solubilizar los cuatro tipos de CI producidos sin control de pH. Esta característica representa una ventaja en el proceso de recuperación de PR, pues se requieren menores concentraciones de agente desnaturalizante para solubilizar los agregados favoreciendo el proceso de re-plegamiento. Los CI obtenidos además presentaron unión a colorantes amiloidogénicos, donde los CI de SMDg, producidos sin control de pH, presentan un aumento gradual en la afinidad por Tioflavina-T y Rojo Congo. Por el contrario, los CI de esta misma proteína producidos bajo condiciones controladas de pH presentaron una disminución en su afinidad a Tioflavina-T, provocada probablemente por un cambio conformacional de los sitios de unión de la Tioflavina-T.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la importancia del pH de cultivo el cual puede modificar las características particulares de los CI producidos. Además se demostró que la variación del pH externo modifica el ambiente citoplasmático en el que se forman los CI, provocando por lo tanto diferencias en la agregación y formación de los CI.

2 **ABSTRACT**

Recently, the demand of recombinant proteins (RP) has been increased in areas like the pharmaceutical, veterinary and food industry, thus the necessity of producing them is essential. Bacterial systems such as *E. coli* bacteria are most commonly used to produce RP. *E. coli* is used in different bioprocesses because it can produce high amounts of PR reaching up to 30 g/L (Strandberg et al., 1994; Sorensen & Mortensen, 2005, Ferrer-Miralles et al., 2009; Peternel & Komel, 2011).

The production of high industrial levels of RP is a common aim during bioprocesses. However, the host organisms sometimes exceed their biosynthetic rate, therefore their physiology is affected (Garcia-Fruitos et al., 2011). Overexpression of RP can represent up to 50% of the total content of protein, which can not be processed and could result in the accumulation of misfolded proteins (Valdez-Cruz et al., 2010; Marisch et al., 2013). *E. coli* has a simple machinery for protein folding, which is not capable of performing complex post-translational modifications. Since the reducing environment characteristics in the cytoplasm of the bacteria the production of corrected folded proteins possessing disulfide bonds is challenging. These factors, along with excess RP overexpressed leads to aggregation, which often results in the formation of inclusion bodies (IB). IB used to be considered as amorphous, useless aggregates, due to the belief that they were formed of RP. However, it has been demonstrated that the proteins contained in the IB contain segments of ordered β -folded structure, which may be bioactive (Carrio et al., 2005).

It has been reported that changes in the conditions of the bacterial cultures influence the size and morphology of the CI (Mortensen and Sorensen, 2005). For example, increased temperature favors protein aggregation (Rinas et al., 2007), while temperature diminution evade aggregation obtaining improved soluble protein yield (de Groot and Ventura 2006a. Garcia-Fruitos et al., 2007). Also the increase in the culture time favors the increase in the size of the IB (Margreiter et al., 2008b). On the other hand, co-expression with chaperones in particular cases help to increase the yield of soluble protein (Hoffmann & Rinas, 2004; Garcia-Fruitos et al., 2010, Thomson et al., 2013). Until now, various studies have characterized various IB produced under flask conditions, hence the variation in environmental conditions could influence their formation. It has been reported that no pH control cultures either in flasks or in a bioreactor, favors the accumulation of IB versus time in a thermosetting system (Strandberg & Enforce, 1991). However, few studies have been conducted to understand how culture conditions affect protein aggregation. The aim of this study was to understand the effect of pH variation on the physicochemical characteristics of the IB formed by RP tick sphingomyelinase D (SMDg), tick sphingomyelinase D mutant (SMDgm), recluse spider *Loxosceles* sphingomyelinase-D and snake *Micrurus laticollaris* phospholipase A2 expressed in *E. coli* BL21-Gold (DE3), using two culture strategies (pH 7.5 and no pH control).

Culture kinetics performed with the strains, and the analysis of protein aggregation and the IB characterization obtained are presented in this work. Particularly, the IB of SMDg were characterized in extensively way, including kinetic experiments to evaluate the influence of the culture conditions vs time. These IB were observed by transmission electron microscopy at different times of the culture, as a result

variations in the size of the IB were observed, depending on the change in pH. The SMDg IBs produced under conditions without pH control increased in size over time and were clearly observed after 5 h of chemical induction, in the other hand IB synthesized under controlled pH conditions show an increase in size in the first hours of culture and then apparently compacted. These results also were confirmed by studies of dynamic light scattering. The four IB analyzed using this technique, presented variations in size. In order to analyze the effect of pH variation on the conformation of the SMDg IB, SMDgmut, SMD-Lr and PLA2, experiments with proteinase-K were performed. The IB produced in uncontrolled pH conditions were more prone to proteolytic degradation, and increased resistance to catalysis culture over time. While IB produced under controlled conditions showed higher resistance to degradation. Hence it was proposed that IB produced under controlled pH conditions have a higher content of β -sheet structure, possibly amyloid. Also, lower concentrations of guanidinium chloride is needed to solubilize all four types of IBs produced without pH control, due to the weaker intermolecular forces holding the protein aggregates, as compared to those produced under controlled conditions. This feature provides an advantage in the recovery of RP as lower concentrations of chaotropic agent are required to solubilize the IB, which favors the process of refolding. These results were further corroborated by binding assays amyloidogenic dyes, where SMDg IB produced without pH control with a gradual increase in affinity for Thioflavine-T and Congo Red. By contrast, the IB of the same protein have a reduced affinity to Thioflavine-T, probably caused by a conformational change in the binding sites of the Thioflavine-T.

The results presented here demonstrate the importance of culture pH, which could affect the particular characteristics of the IB produced. It was further demonstrated that the external pH variation modifies the cytoplasmic environment in which the IB are formed, thereby causing differences in the aggregation and formation of the IB.

3 INTRODUCCIÓN

Desde hace poco más de 30 años se han producido diferentes proteínas recombinantes (PR) (Itakura et al., 1977), con fines descriptivos, algunas con fines terapéuticos y otras con aplicaciones industriales. Las herramientas esenciales para la producción de proteínas heterólogas son: un gen que codifica la proteína o cADN deseado, un vector y un sistema biológico (sistema de expresión), que puede transcribir y traducir el transgen (Desai et al., 2010).

Durante la producción de PR algunas tienden a agregarse formando los llamados cuerpos de inclusión (CI). Hasta hace poco, los CI fueron considerados como depósitos de proteínas inactivas, mal plegadas y representaban un cuello de botella en la producción de PR (de Groot et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las proteínas contenidas en CI no necesariamente están inactivas (Peternel et al., 2008), sino que pueden ser empleadas con fines biotecnológicos e incluso en su forma agregada se pueden usar como biomateriales o catalizadores ya que aún agregadas mantienen sus propiedades catalíticas (Nahalka et al., 2006; 2007; 2008; 2009), inmunógenos (Yang et al., 2011) o moléculas liberadoras de péptidos (Díez-Gil et al., 2010; Vázquez et al., 2012; García-Fruitós et al., 2010; Seras-Franzoso et al., 2012). Por lo tanto, los estudios de agregación de las proteínas son un tema importante en muchos campos, incluyendo la biología, la medicina y la biotecnología (Smith, 2003).

3.1 *E. coli* y la producción de proteínas recombinantes

A pesar de la existencia de múltiples sistemas de expresión (tabla 1), la bacteria *Escherichia coli* sigue siendo el hospedero preferido para la producción de PR (Yin et al., 2007) debido a que crece rápidamente en medios de bajo costo, se pueden lograr cultivos de alta densidad y la acumulación de PR es alta comparada con otros sistemas de expresión, llegando a valores hasta de 30 g/L (Sørensen & Mortensen, 2005; Ferrer Miralles et al., 2009; Castanié-Cornet et al., 2010). Además, algunas cepas de laboratorio de *E. coli* son consideradas como organismos GRAS, por sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe (Swartz, 2001). *E. coli* fue el sistema celular pionero de la expresión de proteínas terapéuticas al expresar exitosamente la somatostatina (Itakura et al., 1977), mientras la insulina fue la primera proteína terapéutica aprobada por la FDA producida en *E. coli* (Pillai y Pachagnula, 2001).

En la Tabla 1 se muestra la comparación de diferentes sistemas de expresión, enfatizando las ventajas de *E. coli* en cuestión de tiempo de duplicación y costo de producción. Aunque existen diferentes cepas de *E. coli* que son utilizadas para la producción de PR, la cepa *E. coli* BL21 se ha usado pues tiene ventajas para la producción de PR como su deficiencia en las proteasas *lon* y *OmpT* lo que disminuye la proteólisis y permite obtener mejores rendimientos de PR (Gottesman, 1989; Gottesman, 1996). Además, esta cepa produce una menor cantidad de acetato que las cepas derivadas de *E. coli* K12 (Shiloach et al., 1996), lo que favorece la producción de PR, ya que la producción de acetato a concentraciones por arriba de 0.5 g/L inhibe el crecimiento y la producción de proteína heteróloga (Contiero et al., 2000; Nakano et al., 1997).

Tabla 1. Comparación de los sistemas de expresión de PR (Modificado de Francis y Page, 2010).

	<i>E. coli</i>	Levaduras	Células de insecto	Células de mamífero	Sistemas libres de células de <i>E. coli</i>
Tiempo de división celular promedio	30 min	90 min	18 horas	24 hrs	N/A
Costo de expresión	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Alto
Nivel de expresión	Alto	Bajo-Alto	Bajo-Alto	Bajo- Moderado	Bajo- Alto
% soluble	40-60	50-70	50-70	85-90	Variable
Ventajas	Simple, bajo costo, robustez, altos rendimientos, fácil marcaje para estudios estructurales	Simple y de bajo costo	Modificaciones post- traduccionales	modificaciones post-traduccionales,	Altos rendimientos, rápida, flexible, puentes de azufre y proteínas de membrana, fácil marcaje para estudios estructurales
Desventajas	Sin modificaciones post-traduccionales, proteínas insolubles, la producción de puentes de sulfuro o proteínas de membrana es difícil	Pocas modificaciones post-traduccionales, la producción de proteínas de membrana es difícil	Lento, alto costo, la producción de proteínas de membrana es difícil	Lento, costo alto, bajo rendimiento	alto costo, pocas modificaciones post- traduccionales

Algunas PR se han producido en la cepa BL21 combinadas con vectores como los pET, o aquellos regulados por los promotores pLac. Este sistema se utiliza ampliamente debido a su eficiencia en la producción de PR (Graumann & Premstaller, 2006), permitiendo obtener hasta 50% del total de la proteína (Peternel et al., 2008), por ejemplo: 9.7 g/L de leptina (Jeong & Lee, 1999), 7.0 g/L mini pro insulina (Shin et al., 1997) y 5.6 g/L de endorfina β (Jeong & Lee, 2002).

3.2 Agregación proteica y formación de cuerpos de inclusión

Durante la producción de PR en altas concentraciones, el organismo huésped en algunas ocasiones rebasa su capacidad biosintética lo que afecta su fisiología (García-Fruitós et al., 2011). En algunos sistemas bacterianos la sobre-expresión de PR no puede ser procesada por la maquinaria celular, dando lugar a la acumulación de proteína (Gatti-Lafranconi et al., 2011; Villaverde, 2012; García-Fruitós et al., 2012).

E. coli cuenta con una maquinaria sencilla para el plegamiento de proteínas, la cual carece de elementos necesarios para realizar modificaciones post-traduccionales complejas, además de un ambiente reductor

citoplasmático, de ahí que la producción de proteínas que poseen puentes disulfuro siga siendo un reto (Georgiou, 1988; Fischer et al., 1993; Sørensen & Mortensen, 2005; Thomas et al., 1997). La combinación de estos factores, junto con el exceso de PR sobre-expresada conduce a la agregación de proteínas, que a menudo da lugar a la formación de CI (Choi et al., 2006).

3.3 Chaperonas como sistema de control de calidad en el plegamiento

En bacterias, diferentes condiciones de estrés causan el deterioro del sistema de control de calidad celular, lo que induce el plegamiento parcial, la acumulación de proteínas y la consecuente formación de agregados insolubles, o CI. En *E. coli* las principales condiciones que causan estrés celular son el envejecimiento, la velocidad de síntesis de proteína, las mutaciones y la biogénesis de proteínas aberrantes, así como el medio ambiente por ejemplo la variación en la temperatura (Guisbert et al., 2004; Valdez-Cruz et al., 2011; Grossman et al., 1987), la osmolaridad (Gutierrez et al., 1987; Clark & Parker, 1984), el pH (Taglicht et al., 1987; Lu et al., 2009) o la variación de oxígeno. Particularmente, se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas heterólogas causa una respuesta similar a la provocada por el aumento en la temperatura (Gatti-Lafranchi et al., 2011; Gill et al., 2000; Valdez-Cruz et al., 2011) debido a la acumulación de proteínas no plegadas (Goff & Goldberg, 1985). Gill et al., (2000) demostraron mediante RT-PCR que la inducción usando IPTG en cepas de *E. coli* productoras de cinco diferentes tipos de PR, induce también la transcripción de genes de estrés como los que pertenecen a la respuesta de choque térmico (*groEL*, *lon*, *IbpA*, *clpP*, *ompT*), SOS/respuesta a daño de DNA (*recA*, *lon*, *trasposasa*), relacionando así, la sobreproducción de PR con las respuestas de estrés ya caracterizadas.

En los sistemas bacterianos, el plegamiento de proteínas ocurre constitutivamente permitiendo que algunas de las proteínas lleguen a su estado nativo de manera eficiente. Sin embargo, en ocasiones las moléculas no alcanzan su conformación nativa, formándose intermediarios, o quedando desplegadas, lo que puede provocar su agregación (de Groot et al., 2009; Morell et al., 2008; Oberg et al., 1994). El evento de desregulación del plegamiento de proteínas es favorecido por el estrés. No obstante, la célula contiene con las proteínas mal plegadas a través de mecanismos que favorecen el plegamiento “de novo”, disolviendo agregados y eliminando proteínas que no pueden recuperar su estructura. Uno de éstos mecanismos es la respuesta de choque térmico (RCT) o “heat shock response”, la cual es inducida cuando las células son expuestas a un aumento de temperatura u otro tipo de estrés (Valdez-Cruz et al., 2011; Taglicht et al., 1987; Heyde & Portalier, 1990). La RCT está controlada por el factor sigma 32 (σ^{32}) codificado por el gen *rpoH* (Yamamori, 1980; Grossman et al., 1987; Grossman et al., 1984). Este factor dirige la unión e iniciación específica de la RNA polimerasa a los promotores de los genes de la RCT (Bloom et al., 1986; Morita et al., 2000; Morita et al., 1999; Dartigalongue et al., 2001). El factor σ^{32} regula la expresión de por lo menos 120 genes codificantes para proteínas de choque térmico (que incluyen chaperonas y proteasas) y su actividad depende de las mismas chaperonas que regula, como DnaK y DnaJ (Nonaka et al., 2006; Maurizi et al., 1990; Chuang & Blattner, 1993; Grossman et al., 1987; Bloom et al., 1986).

Las chaperonas desempeñan un papel central en el control de calidad conformacional del proteoma mediante la estructuración y estabilización de una amplia gama de polipéptidos. Las chaperonas de estabilización como IbpA/B, Hsp31 y Hsp33 se unen temporalmente a la superficie de las proteínas mal plegadas (Allen et al., 1992), para presentarlas a DnaK/J o GroEL/ES (70/40 y 60/10 kDa, respectivamente), también llamadas chaperonas de plegamiento (Hartl & Hayer-Hart, 2009; Baneyx & Mujacic, 2004; Bukau & Horwich, 1998). Estas chaperonas dependen de un cambio conformacional adquirido por el gasto de ATP para lograr la estructuración de los polipéptidos sin estructura nativa. Por otro lado, las proteasas AAA+ actúan sobre los agregados formados provocando la degradación de las proteínas mal plegadas, mientras que la familia de proteasas Clp (chaperonas de “desagregación”) promueven la solubilización de las proteínas que se agregan (Schirmer et al., 1996; Baneyx & Mujacic, 2004). En resumen, bajo condiciones fisiológicas, este sistema de control de calidad puede censar, reaccionar, controlar y reducir la cantidad de proteínas agregadas en el citoplasma de *E. coli* (Gatti-Lafranconi et al., 2011; Gao et al., 1992; Freeman & Morimoto, 1996) (Figura 1). Sin embargo, bajo condiciones sin estrés las chaperonas DnaK/J inhiben la actividad de σ^{32} , capturándolo y llevándolo a su degradación mediante la proteasa de membrana FtsH (Morita et al., 2000; Straus et al., 1990; Craig & Gross, 1991; Bukau, 1993; Guisbert et al., 2004).) Cuando el número de proteínas mal plegadas aumenta en la célula, las chaperonas se saturan y el equilibrio se desplaza hacia la versión libre de σ^{32} , lo que induce la respuesta al estrés activando la transcripción de las chaperonas de RCT (Straus et al., 1990; Craig & Gross, 1991; Bukau, 1993; Schlieker et al., 2002).

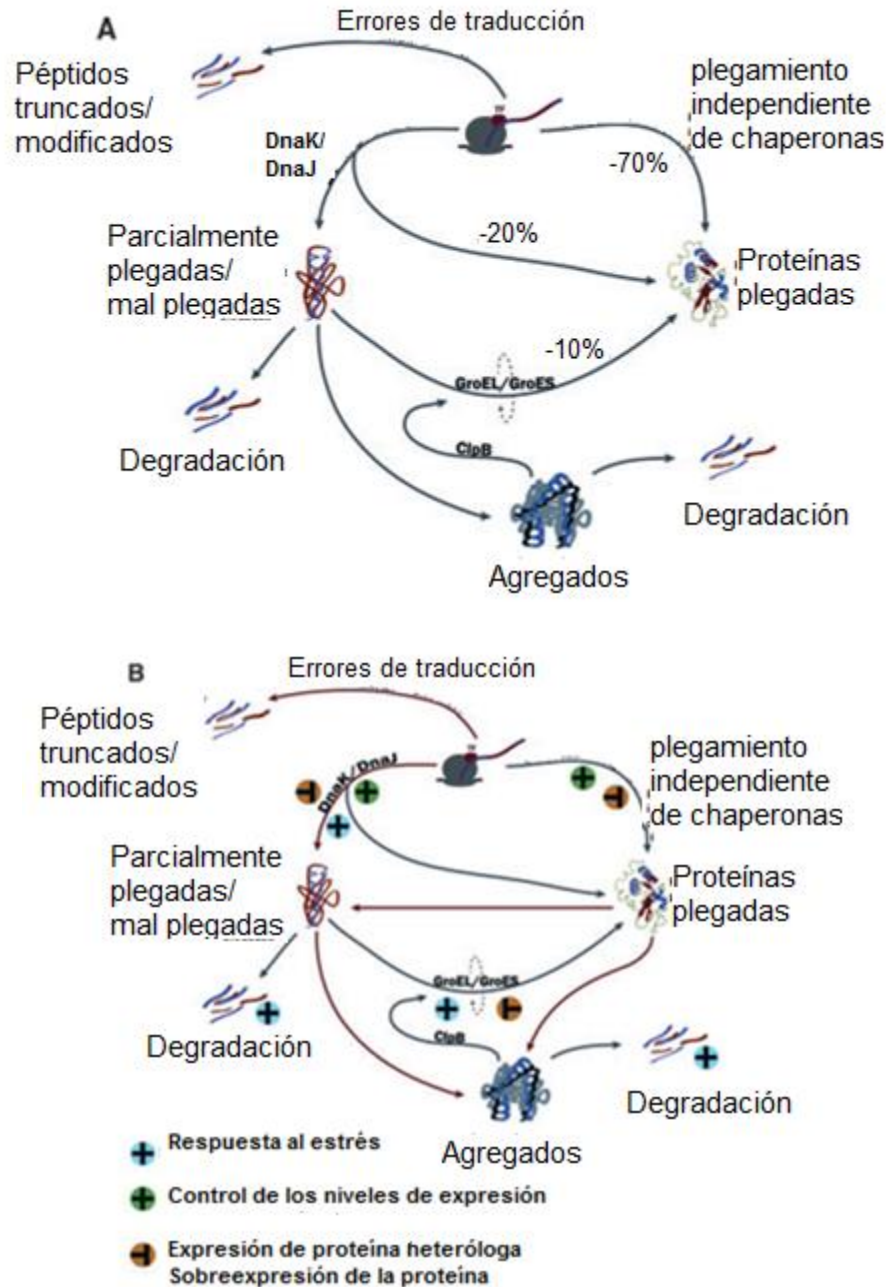


Figura 1 . La biosíntesis de proteínas en condiciones normales y la agregación en condiciones de estrés. (A) En condiciones normales, los polipéptidos nacientes puede plegarse de forma autónoma sin requerir ayuda de chaperonas para su plegamiento. Los productos aberrantes debido a errores de traducción y mal plegamiento son manejados por el sistema de control de calidad (chaperonas y proteasas). El sistema es demandante energéticamente (la mayoría de los procesos dependen de ATP), pero mantiene el equilibrio hacia la forma nativa (Hartl & Hayer-Hart, 2009). (B) En condiciones de estrés el equilibrio se desplaza hacia la formación de productos aberrantes (líneas rojas). Esto es contrarrestado por estrategias celulares como la regulación positiva de la maquinaria de control de calidad. Sin embargo, la sobreproducción de PR, puede afectar el equilibrio de los recursos como ribosomas, chaperonas y ATP (Tomado de Gatti-Lafranconi et al., 2011).

Se ha demostrado que los CI citoplasmáticos *in vivo* no son tóxicos en las células de *E. coli*, sin embargo son nocivos en las cepas carentes de las chaperonas DnaK y GroEL, así como de sus cochaperonas DnaJ-GrpE y GroEs respectivamente (González-Montalbán et al., 2005). La chaperona DnaK, en cooperación con ClpB, desagrega de manera eficiente los depósitos de proteínas de choque térmico. Por lo tanto, en ausencia de DnaK, los CI son más grandes que en las células parentales (Carrió & Villaverde 2003). Por otra parte, el déficit de GroEL resulta en CI pequeños y numerosos, así como un incremento en la cantidad de PR soluble (Carrió & Villaverde, 2003) (Figura 2).

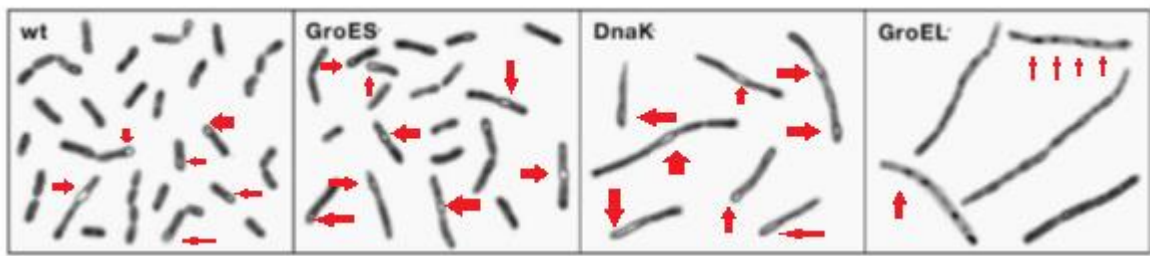


Figura 2. CI producidos en cepas de *E. coli* mutantes. wt) genotipo silvestre de *E. coli* MC4100, en el que se observa un CI por bacteria. GroES⁻) genotipo que provoca un efecto similar a lo observado en wt. DnaK⁻) genotipo que resulta en una mayor cantidad de agregados de proteínas VP1LAC y en grandes CI. GroEL⁻) genotipo que provoca varios agregados citoplasmáticos pequeños. La capacidad de la cepa DnaK⁻ para eliminar la proteína de los CI es comparable a la observada en GroEL⁻ (Tomado de Carrió & Villaverde, 2003). Los CI fueron marcados con flechas rojas.

4 ANTECEDENTES

4.1 Características de los cuerpos de inclusión

Los CI se encuentran comúnmente en el citoplasma bacteriano, aunque algunas construcciones envían a las PR al periplasma donde también pueden agregarse (Georgiou et al., 1986). El análisis de los CI por microscopía tanto *in vivo* como después de su purificación ha revelado que a pesar de que éstos son partículas densas, están hidratadas (Taylor et al., 1986). Algunos CI muestran una estructura porosa (Carrió et al., 2000;

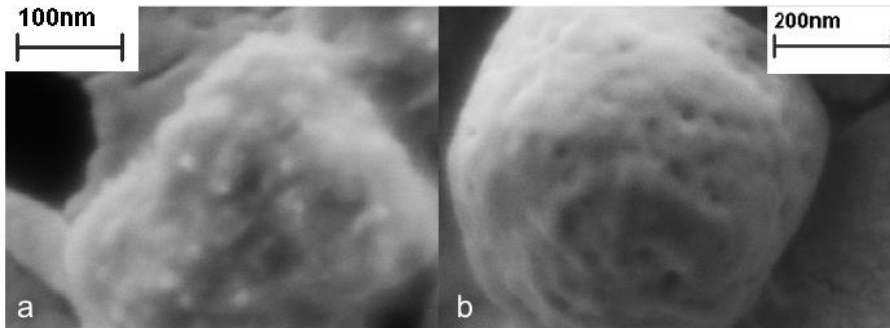


Figura 3) con una topología que varía de áspera a lisa (Bowden & Paredes, 1991). Sin embargo, el limitado número de estudios morfológicos existentes no permite relacionar las propiedades de forma y superficie con las características de la PR.

Se ha reportado que la forma y el tamaño de los CI depende de la cepa y de su fondo genético (García-Fruitós & Seras-Franzoso, 2010). Se han observado CI de entre 50 a 700 nm (García-Fruitós et al., 2010; Peternel et al., 2008) con forma esférica (Peternel et al., 2008), elipsoidal (Carrió et al., 2000) o cilíndrica (Peternel & Komel, 2010). Con el propósito de modificar la morfología de los agregados se han obtenido CI en forma de lágrima en cepas deficientes de la proteasa ClpP y agregados de mayor tamaño en cepas mutantes de la chaperona DnaK (García-Fruitós & Seras-Franzoso, 2010).

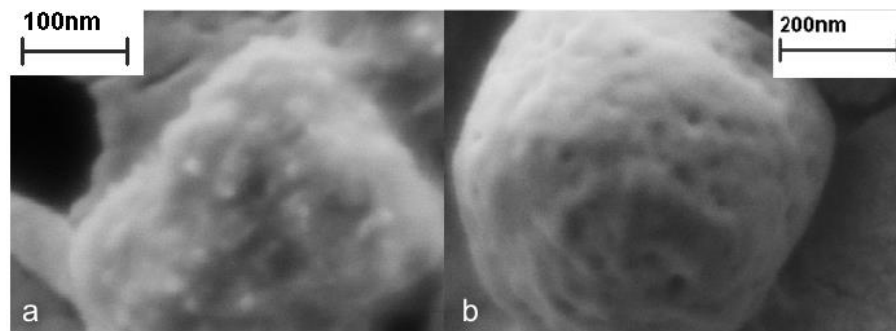


Figura 3. CI vistos con un microscopio electrónico de barrido. (a) CI lavados con un detergente suave y (b) lavados con agua. Los CI se componen de pequeños proto-agregados incrustados en una matriz amorfa (a). Sin embargo, los espacios entre los proto-agregados incrustados brindan una superficie porosa (b). Imagen tomada de Peternel & Komel, 2011.

Se solía considerar a los CI como agregados amorfos, sin embargo, se ha demostrado que contienen segmentos ordenados de estructura β -plegada, de los cuales el número, longitud y forma de sus láminas son determinados por la secuencia de aminoácidos de la proteína (Przybycien et al., 1994; Carrió et al., 2005; Ignatova et al., 2007; Wang et al., 2008). Debido a esta estructura laminar se ha demostrado que los CI tienen afinidad por colorantes de tinción amiloidogénica como por ejemplo Tioflavina-T y Rojo Congo (Carrió et al., 2005). El análisis de CI por espectrofotometría de radiación Infrarroja mediante la transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés Fourier transform infrared spectroscopy) han mostrado en contra de la opinión convencional, que los CI son agregados de proteínas ordenadas que presentan una estructura secundaria particular caracterizada por una señal en torno a 1620 cm^{-1} en la región de amidas I y II característica del enlace peptídico (González-Montalbán et al., 2008; Ami et al., 2006; Carrió et al., 2005). Los análisis por FTIR también revelaron la existencia tanto de una fracción ordenada, del tipo amiloide, como de cadenas polipeptídicas condensadas en una estructura β -plegada y de una fracción significativa con estructura nativa, así como de conformaciones desordenadas (Carrió et al., 2005; García-Fruitós et al., 2005) (Figura 4). Asimismo, espectros de dicroísmo circular (DC) de UV lejano, resonancia magnética nuclear (RMN) y de difracción de rayos X corroboraron conformaciones tipo amiloide en el interior de los CI (Carrió et al., 2005), destacando el predominio de estructura secundaria del tipo β laminar (de Groot et al., 2009; Wang et al., 2008). Wasmer et al., (2009), demostraron una organización equivalente entre CI y fibrillas amiloides a nivel molecular utilizando RMN en estado sólido e intercambio H+/D, obteniendo espectros indistinguibles entre CI del prión fúngico HET-s y las fibrillas.

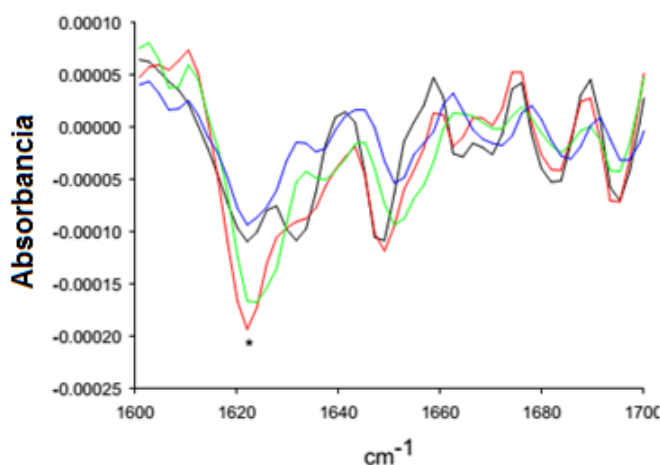


Figura 4. Espectro FTIR de CI de: VPILAC (negro), hDHFR (verde), VPIGFP (rojo) A β 42(F19D)-BFP (azul). El asterisco señala la señal típica de estructura β laminar en CI. Tomado de García-Fruitós et al., 2005.

Aunque se creía que las proteínas incorporadas en CI eran biológicamente inactivas se ha reportado que algunas de ellas mantienen actividad enzimática (Worral & Goss, 1989; Tokatlidis et al., 1991). Mediante el uso de dos proteínas fluorescentes (García-Fruitós et al., 2005) se ha demostrado que la agregación de PR en bacterias provoca una pérdida moderada de actividad biológica, sin embargo se obtienen CI con fluorescencia (Figura 5). También se ha demostrado que en los CI se pueden agrupar proteínas con actividad enzimática y

que se pueden utilizar eficientemente para procesos de catalíticos en condiciones complejas que usualmente desnaturalizan a las proteínas solubles (Nahálka, 2007, 2008; 2009). Además se ha reportado que la actividad enzimática de las proteínas dihidrofolato reductasa, β -galactosidasa y la proteína capsídica VP1 expresadas en CI varía entre 6 y 166% con respecto a su contraparte soluble, indicando que la inactivación debida al proceso de agregación depende de cada proteína (Tabla 2).

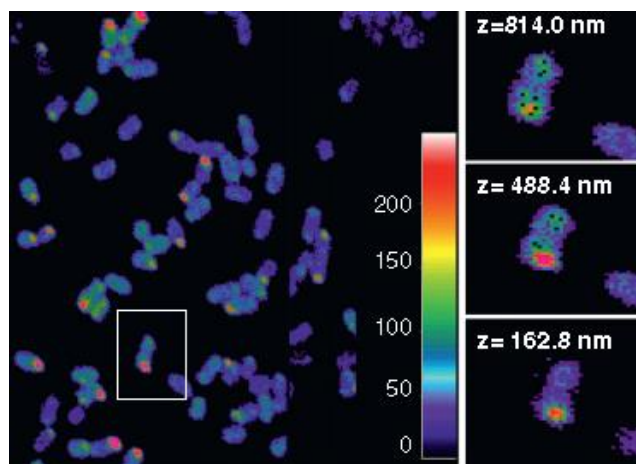


Figura 5. Imágenes de CI conteniendo proteína verde fluorescente (GFP) producidos en *E. coli*. Microscopía confocal de células (cuadro izquierdo) y su ampliación en diferentes niveles sobre el plano z, (cuadros de la derecha), que muestran la mayor intensidad de fluorescencia en el núcleo del CI y menor en la capa superficial. El valor de z representa la altura a la que se hizo el corte. Tomado de García-Fruitós et al., 2012.

Tabla 2. Reportes de CI bacterianos con estructura y actividad biológica (Modificada de Ventura & Villaverde, 2006).

Proteína en CI	Estructura (método de determinación)	Actividad biológica (% actividad con respecto a la proteína soluble)	Referencia
Proteínas verde y azul fluorescente (GFP Y BFP)	ND	Emisión fluorescente de CI <i>in vivo</i> (20% o 30%)	(García-Fruitós, et al., 2005)
β galactosidasa		Actividad específica en CI purificados (20 a más del 100%)	(Worral & Goss, 1989; García-Fruitós et al., 2005)
Endoglucanasa D	ND	Actividad en CI purificados (25%)	(Tokatlidis et al., 1991)
β lactamasa		Actividad detectable en CI purificados	(Kuczyńska-Wiśnik et al., 2005)
HtrA1 serina proteasa	ND	Actividad detectable en CI purificados	(Kuczyńska-Wiśnik et al., 2005)
Interleucina 1 β	Estructura secundaria similar a la nativa (FTIR)	ND	(Oberg et al., 1994)
TEM- β lactamasa	Estructura secundaria similar a la nativa (FTIR)	ND	(Przybycien et al., 1994)
Lipasa	Estructura secundaria similar a la nativa (FTIR)	ND	(Ami et al., 2005)
Hormona de crecimiento	Estructura secundaria similar	ND	(Ami et al., 2006)

humano		a la nativa (FTIR)		
Factor estimulador de colonias de granulocitos		Estructura secundaria similar a la nativa (FTIR)	ND	(Jevsevar et al., 2005)
Interferon $\alpha 2b$		Estructura secundaria similar a la nativa (FTIR)	ND	(Ami et al., 2006)

ND: No Determinado

4.2 Composición proteica de los cuerpos de inclusión

La proteómica de los CI ha permitido la identificación de su composición (Valax & Georgiou, 1993; Rinas & Bailey, 1992; Rinas et al., 1993). Por ejemplo, la producción de β -lactamasa provoca la formación de CI con un contenido de entre el 50 y el 95% de PR (Valax & Georgiou, 1993) y este valor puede ser extendido a otras PR (Rinas & Bailey, 1992; Rinas et al., 1993; Carrió & Villaverde, 2002; Peternel & Komel, 2011). A pesar de que los CI están compuesto casi exclusivamente de la proteína heteróloga, en el proceso de agregación pueden quedar atrapadas otras proteínas citoplasmáticas (Carrió et al., 2005; García-Fruitós et al., 2011), o versiones truncadas de la proteína de interés (Speed et al., 1996; Morell et al., 2008). El resto de componentes del agregado son proteínas relacionadas con la estructuración de proteínas como chaperonas DnaK, GroEL (Carrió & Villaverde, 2002), IbpA e IbpB (Ibp por sus siglas en inglés Inclusion Bodies proteins) (Allen et al., 1992; Veinger et al., 1998; Gill et al., 2000; Kuczyńska-Wiśnik et al., 2004; Kuczyńska-Wiśnik et al., 2005; Lethanh et al., 2005).

El estudio de localización de chaperonas mediante inmunohistoquímica permitió detectar a la chaperona DnaK principalmente en la superficie de los agregados, mientras que fue pobremente detectada en el citoplasma (Figura 6A, B, y C). Por el contrario, GroEL se encontró ampliamente distribuida en el citoplasma de la célula, y no se localizó en la superficie de los CI (Figura 6D, E, y F). La exclusión de DnaK del interior de los CI bacterianos indica que la asociación de esta chaperona con estos agregados no se debe a su coprecipitación con los polipéptidos mal estructurados durante la agregación, sino que sugiere la interacción de esta chaperona con los agregados ya formados. Asimismo, DnaK se ha descrito como una proteína involucrada con la desagregación de proteínas, incluso durante la precipitación de éstas, por lo tanto el crecimiento volumétrico de estos agregados es el resultado de un equilibrio dinámico entre la agregación y desagregación (Carrió & Villaverde, 2001). Así, DnaK podría participar activamente en la transición dinámica observada entre las formas soluble e insoluble de PR. Por otro lado, la distribución de GroEL permitió inferir que no tiene actividad biológica asociada directamente a la transferencia de la proteína al CI (Carrió & Villaverde 2005) y su presencia dentro de lo CI solo se debe a su captura inespecífica durante la agregación (Carrió & Villaverde, 2005) (Figura 6D, E y F). Por lo anterior se ha propuesto que las chaperonas están involucradas en la disolución de los agregados, particularmente en aquellos formados en respuesta al incremento de temperatura ($> 37^{\circ}\text{C}$) (Schlieker et al., 2002; Caspeta et al., 2009; Hoffmann & Rinas, 2000).

A pesar de que la mayoría de los contaminante de los CI son de origen proteico, también es posible encontrar restos de DNA, lípidos o componentes de la membrana que pueden quedar atrapados en el agregado durante

su proceso de formación, o bien son componentes que coprecipitan durante el proceso de purificación (Jürgen et al., 2010; Villaverde et al., 2012; Vázquez et al., 2012).

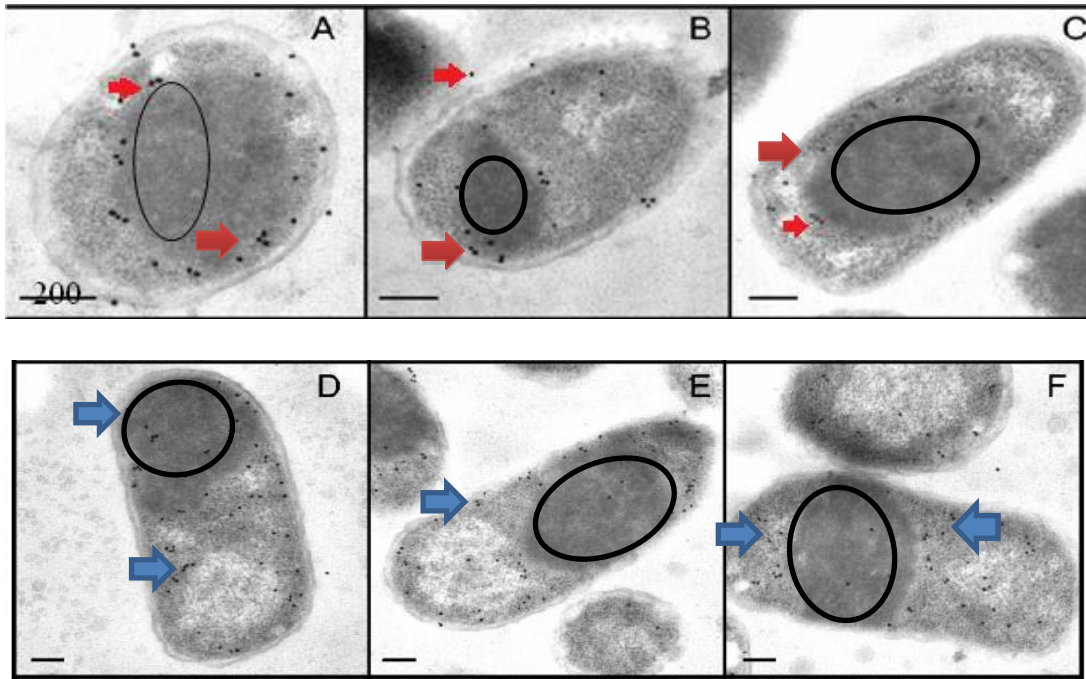


Figura 6. Inmunodetección *in situ* de las chaperonas DnaK (A, B, C) y GroEL (D, E, F) en células *E. coli* BL21/pJVP1LAC productoras de CI de la proteína VP1LAC. Las flechas indican la chaperona de interés detectada por la técnica (roja: DnaK, azul: GroEL) mientras que el círculo denota las zonas en las que no se detectó señal, señalando la ausencia de ésta. La barra representa 200 nm (Tomado de Carrió & Villaverde, 2005).

4.3 Proceso de agregación

Existen dos modelos del proceso de agregación de los CI. El primer modelo propone la formación de los CI como un conjunto de agregados, donde los de menor tamaño tienden a asociarse para dar lugar a uno o más agregados de mayor tamaño (Carrió et al., 2005). Debido a que en los sistemas bacterianos no hay compartimentos, las proteínas se sintetizan de forma simultánea en varios lugares del citoplasma y se forman varios estados de transición de plegado de la proteína diana. Algunas proteínas que no se pliegan en una conformación natural son degradadas por los mecanismos de reparación celulares, mientras que otras se agregan en pequeños proto-agregados ("agregados solubles") (Schrodel et al., 2005; De Marco et al., 2007). Durante la nucleación, la PR en conjunto con otras proteínas accesorias para su estructuración se incorporan en el proto-agregado por medio de interacciones moleculares estereoespecíficas, mientras que el resto de las proteínas no homólogas e incluso otras recombinantes, son excluidas (García-Fruitós et al., 2011). Esto genera un crecimiento de los proto-agregados, que luego se fusionan en un CI que sigue creciendo (Peternel & Komel, 2011) (Figura 7).

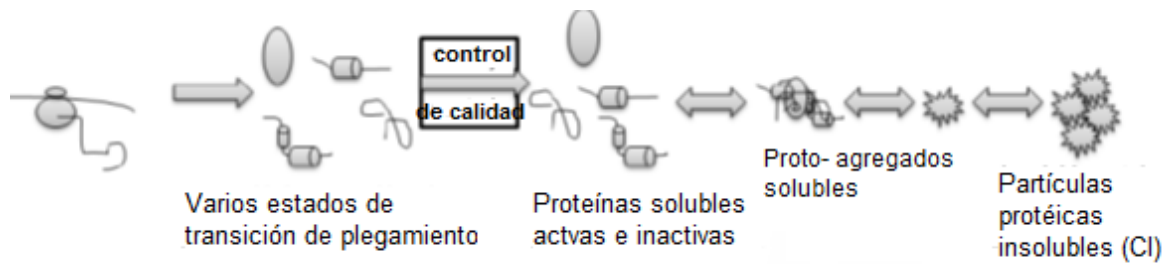


Figura 7. Estructuración de proteínas y agregación en *E. coli*. Muchas proteínas no logran plegarse hasta la conformación nativa durante la síntesis, por lo tanto, varios estados de transición de plegamiento están presentes en la célula junto con las proteínas plegadas correctamente. La maquinaria de control de calidad mantiene el equilibrio entre las formas solubles y agregadas de la proteína. La fracción soluble está compuesta de proteínas, así como de agregados solubles. Las proteínas correctamente plegadas también son atrapadas dentro de los agregados solubles. Posteriormente, varios proto-agregados se unen formando CI. El proceso es reversible (Tomado de Peternel & Komel, 2011).

El segundo modelo propone que los CI se forman a partir de la acumulación de intermediarios mal plegados. Ya que estos centros de nucleación son entidades termodinámicamente estables, que favorecen la adición de monómeros mal plegados. Upadhyay et. al., (2012) respaldaron esta teoría mediante el seguimiento cinético de la formación de CI de la hormona de crecimiento humana, demostrando la formación de agregados que aumentaban de tamaño (de 150 nm a un intervalo de entre 200 y 800 nm) con respecto al tiempo.

4.4 Solubilización y plegamiento de los cuerpos de inclusión

El replegamiento *in vitro* para la obtención de PR activa de los CI se lleva a cabo a través de cuatro procesos: el aislamiento del CI, la solubilización, el replegado, y la purificación (Lilie et al., 1998; Clark, 2001; Vallejo & Rinas 2004b). La solubilización y el plegamiento son pasos cruciales para obtener un alto rendimiento de recuperación de proteína activa.

Los CI generalmente son separados de los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad después de la lisis celular. Después del aislamiento de los CI, la proteína de interés necesita ser solubilizada, lo cual generalmente se realiza mediante el uso de altas concentraciones de agentes desnaturizantes tales como 6-8 M de urea o cloruro de guanidinio (Gn-HCl) (Fischer et al., 1993; Rudolph et al., 1997). Además se pueden añadir aditivos al amortiguador de plegamiento para disminuir la agregación y la formación de proteínas mal plegadas, éstos pueden ser clasificados en dos grupos: los potenciadores del plegamiento y los supresores de la agregación. En teoría, los potenciadores de plegamiento favorecen la interacción proteína-proteína y aumentan su estabilidad, mientras que los supresores reducen las interacciones de las cadenas laterales de los intermediarios de plegamiento sin interferir con el proceso de estructuración (Tsumoto et al., 2003; Wang & Engel, 2009). Algunos aditivos utilizados son detergentes como el SDS (Stockel et al., 1997), cloruro de N-cetil trimetil amonio (Cardamone et al., 1995) y sarcosil (N-lauroil sarcosilato de sodio) (Burgess, 1996)

(Tabla 3). También se utilizan agentes reductores tales como β -mercaptoetanol, ditioneitol o cisteína para la solubilización (Fischer et al., 1993). Esto ayuda a mantener los residuos de cisteína en un estado reducido y evita la formación de puentes disulfuro no estructurales en soluciones proteicas concentradas a pH alcalino. Los agentes quelantes como el EDTA se utilizan frecuentemente para evitar la oxidación de cisteínas.

Tabla 3. Ejemplos de aditivos para facilitar el plegamiento (Modificada de Alibolandi & Mirzahoseini, 2011).

Aditivo	Concentración	Efecto
CHAPS	30 Mm	Detergente
EDTA	20 mM	Quelante
Glicerol	10-50%	Estabilizador
Cloruro de guanidinio	0.1-1M	Caotrópico
L-arginina	0.5-5 M	Estabilizador
Lauroyl sarcosina	Más de 4M	Detergente
MgCl₂/CaCl₂	2-10 Mm	Catión
NaCl/ sulfato de amonio	0.2-0.5 M	Sal
PEG 3350	Más del 0.5% p/v	Osmolito
SDS	0.1%	Detergente
Citrato/sulfato de sodio	0.2-0.5 M	Sal
Sacarosa/ glucosa	Más de 0.75 M	Estabilizador
TMAO	1-3 M	Osmolito
Tris	0.4-1M	Amortiguador
Tritón X-100	0.1-1%	Detergente
Tween 80	0.01%	Detergente
Glicina	Más de 1M	Osmolito
Prolina	Más de 1M	Osmolito
Urea	0.1-2 M	Caotrópico

La solubilización de proteínas a partir de los CI usando altas concentraciones de agentes caotrópicos puede llevar a la exposición de superficies hidrofóbicas y la formación de estructura sin conformación “random coil” (Dill & Shortle, 1991). La pérdida de estructura secundaria durante la solubilización y la interacción entre las proteínas desnaturalizadas en algunos casos provoca agregación. De hecho, la agregación está considerada entre los principales problemas en la recuperación de PR activa de los CI, siendo el rendimiento de recuperación de alrededor del 15-25% de la proteína total (Datar et al., 1993). Después de que los CI son solubilizados, éstos se someten para el replegado en condiciones específicas. El proceso de replegamiento depende de factores como son el método de solubilización, la eliminación del desnaturalizante, y la asistencia de replegamiento (Alibolandi & Mirzahoseini, 2011). Las proteínas que tienen múltiples enlaces disulfuro necesitan un proceso de replegado más elaborado, en el que se utilizan agentes oxidantes y reductores para la formación de enlaces disulfuro (Fischer et al., 1993; Rudolph & Lillie 1996; Thomas et al., 1997; Vallejo &

Rinas 2004b). La oxidación generalmente se lleva a cabo mediante la adición de una mezcla de reactivos tiólicos en su forma oxidada y reducida, los reactivos más ampliamente utilizados son el glutatión oxidado y reducido GSH/GSSH, dithiothreitol TDT/GSSH, cisteína/cistina, y cisteamina/cistamina (Rudolph & Lillie, 1996; Vallejo & Rinas, 2004a). El uso de disulfuros mixtos aumenta la solubilidad de la proteína durante el replegamiento y por lo tanto ayuda a reducir la probabilidad de formación enlaces disulfuro erróneos (Singh & Panda, 2005).

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el replegado de proteínas a partir de CI (Tsumoto et al., 2003; Middelberg, 2004) como la separación por dilución, diálisis o fase sólida para la renaturalización de CI (Clark, 1998) junto con el uso de aditivos (Tsumoto et al., 2003). La cromatografía de exclusión (Batas & Chaudhuri, 1996) y de adsorción (Li et al., 2004) son los procesos más utilizados para una mejor recuperación de proteína soluble (Singh & Panda, 2005).

4.5 Las condiciones de cultivo y su relación con la formación de cuerpos de inclusión

A nivel de bioproceso, la modificación de las condiciones de cultivo ha sido una herramienta que ha permitido mejorar la producción de PR soluble citoplasmática, disminuyendo a su vez la formación de CI (García-Fruitós et al., 2012). Sin embargo, actualmente algunos bioprocesos consideran la producción de PR en CI como una estrategia para obtener altos rendimientos (Kim et al., 2014; Khalilzadeh et al., 2008; Zhou et al., 2012). Esto se debe a que se mejora el primer paso de separación, el cual depende de sólo una operación unitaria que es la centrifugación por las características de densidad de los CI. De ahí que sea importante caracterizar cómo los cambios en las condiciones de cultivo afectan las propiedades de los CI.

Una de las técnicas más utilizadas para evitar la agregación durante la producción de PR consiste en realizar los cultivos a temperaturas reducidas (Schein, 1989; García-Fruitós et al., 2006). Dicha estrategia ha demostrado mejorar la solubilidad de diferentes PR entre las que se encuentra el interferón humano α -2, la subtilisina E, la luciferasa bacteriana, los fragmentos Fab, β -lactamasa, la lipoxigenasa L-2 de arroz, entre otras (Schein & Noteborn, 1988; Takagi et al., 1988; Cabilly, 1989; Escher et al., 1989; Chalmers et al., 1990; Schirano & Shibata, 1990; Vasina & Baneyx, 1997).

Se ha demostrado que disminuir la temperatura en el cultivo, aumenta la estabilidad proteica, disminuyendo la velocidad de síntesis lo que permite el plegamiento adecuado, favoreciendo la obtención de una mayor proporción de proteína soluble y CI de menor dimensión con respecto a los cultivos a 37°C (García-Fruitós et al., 2006; Margreiter, Schwanninger, et al., 2008; Peternel et al., 2008). Asimismo, favorece la proporción de PR activa dentro de los CI, por ejemplo en CI de VPIGFP la proporción PR correctamente plegada fue del doble en cultivos realizados a 16°C con respecto a los de 30° (García-Fruitós et al., 2006) (Figura 8).

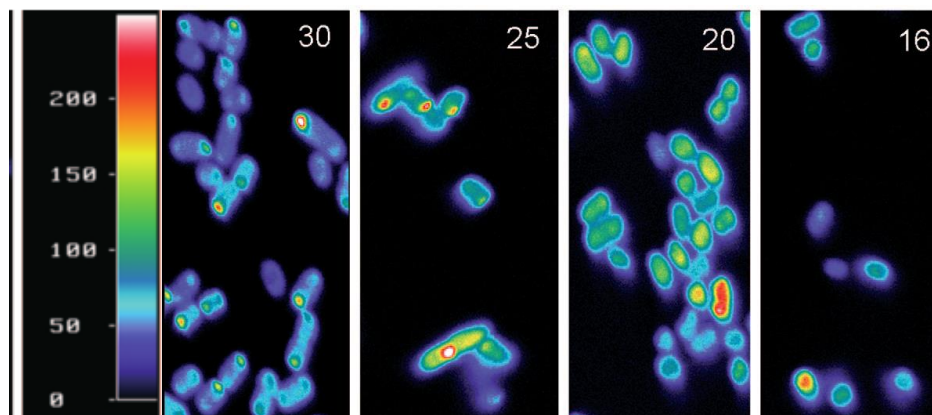


Figura 8. Imágenes analizadas con Metamorph (Adobe Photoshop) de CI de VP1GFP producidos en *E. coli* MC4100 a 30°, 25°C, 20°C y 16°C. La temperatura es indicada en la parte superior de cada cuadro. La escala de intensidad de fluorescencia se presenta en el primer cuadro a la izquierda (Tomada de García-Fruitós et al., 2006).

Se ha descrito que la forma y el tamaño de los CI dependen de la cepa hospedera (Peternel et al., 2008; Carrió et al., 2000; Peternel & Komel 2010; García-Fruitós et al., 2010), así como del tiempo del cultivo. Margreiter et. al. (2008) reportaron que en cultivos alimentados de *E. coli* K12 productora de β -lactamasa el tamaño de los CI aumentaba durante el cultivo ya que después de 4 h de inducción con IPTG (1 μ M) observaron CI de aproximadamente 359 nm, y a las 29 h alcanzaron alrededor de 502 nm (Margreiter et al., 2008). Carrió et al., (2000) reportaron que el tiempo de cultivo aumentó la estabilidad de los CI pues en tiempos finales de cultivo presentaron mayor resistencia a la degradación proteolítica. También se ha demostrado que la agregación de las PR sobreexpresadas puede ser en parte controlada mediante la disminución de la velocidad de expresión, esto reduciendo la cantidad inductor (IPTG) lo que provoca CI de diferentes tamaños en *E. coli* K12 productora de β -lactamasa (Bowden & Georgiou, 1990; Margreiter et al, 2008). Asimismo, se ha observado que la forma de los CI está determinada por el tiempo de cultivo, al principio se forman CI esféricos y cuando el CI crece y llega a la pared celular bacteriana comienza a tomar forma cilíndrica (Figura 9). Por lo tanto, la población de CI después de largo plazo cultivo (24 h) es diversa (Peternel & Komel, 2011).

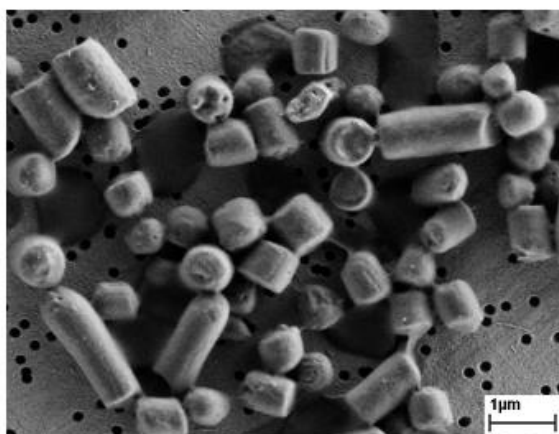


Figura 9. Micrografía electrónica que muestra la diversidad de morfologías y tamaños de CI del factor de proliferación de granulocitos producidos en *E. coli* BL21(DE3). La barra representa 1 μ m (Tomada de Peternel & Komel, 2011).

Por otro lado, los reportes del efecto de variaciones de pH sobre la morfología y características fisicoquímicas de los CI son escasos. Aunque estudios *in vitro* han demostrado que el pH afecta la tendencia a formar depósitos de péptidos- β amiloides (Barrow et al., 1992), lo que podría indicar que la variación en el pH podría favorecer la agregación y formación de CI. También, se ha reportado que el cambio en el pH del cultivo puede desplazar la relación entre proteína soluble y agregada. Schneider et al. (1997) reportaron un cambio en la relación de proteína soluble y en CI de la proteína SPARC al crecerla a pH 6.0 y 5.5. Mientras, Strandberg y cols. (1987) reportaron que la tendencia a formar cuerpos de inclusión de la proteína A de *Staphylococcus aureus* fusionada con β -galactosidasa de *E. coli* era mayor en cultivos en matraces agitados en comparación con cultivos con condiciones controladas en un biorreactor. Esto debido a que en matraces agitados las condiciones del proceso, como el pH o el oxígeno, no están controlados en comparación con los cultivos en biorreactor. El mismo grupo de trabajo reportó que la disminución en el pH hasta 4.8 en conjunto con el incremento de la temperatura (42°C) en sistemas termoinducibles, favorecía la formación de CI, tanto en matraces como en biorreactores sin control de pH. Sin embargo, en condiciones controladas de pH la agregación disminuyó 50% (Strandberg & Enfors, 1991).

Otros estudios realizados *in vitro* usando diferentes pH mostraron que CI conformados por el Factor de estimulación de granulocitos recombinante (G-CSF) al ser transferidos de una solución pH 7 a pH 4 provocó la disminución de su tamaño de forma irreversible. Esto podría asociarse a una concentración alta de protones que en amortiguadores ácidos induce un cambio en la interacción de aminoácidos provocando una contracción de la red proteica y la formación de CI más compactos. En consecuencia, la solubilidad del CI se ve reducida, mientras que a pH neutro la interacción de la red proteica es más débil, formándose CI más solubles en detergentes como N-laurilsarcosina (Peternel et al., 2008).

4.6 La variación en el pH provoca estrés en las bacterias

En su hábitat natural las bacterias sufren diversos cambios ambientales a los que responden con mecanismos que regulan la homeostasis celular para sobrevivir (De Angelis & Gobbetti, 2004). Entre los cambios que las afectan se encuentra variaciones en la temperatura, estrés oxidativo, presión osmótica y pH, entre otros.

En respuesta al estrés por pH ácido muchas bacterias, incluyendo *E. coli*, poseen sistemas de descarboxilasas de aminoácidos (glutamato, arginina, o lisina). Cada uno de estos sistemas consiste en una descarboxilasa citoplasmática, que convierte su sustrato en la amina correspondiente (ácido γ -aminobutírico, agmatina, o cadaverina, respectivamente), y un antiporter, que introduce el aminoácido específico y lo intercambia por la amina producida (Small & Waterman, 1998; De Angelis & Gobbetti, 2004; Foster 2004; Richard & Foster, 2004). Este proceso conduce a la alcalinización citoplasmática y periplásmica (Kern et al., 2007). Además, las bacterias pueden invertir sus potenciales de membrana citoplásmica a un potencial positivo en el interior, que retarda la afluencia de protones (Foster, 2004; Richard & Foster 2004). También pueden orientar su metabolismo hacia vías que disminuyen la producción de protones, el aumento de la producción de aminas y disminución de ácidos orgánicos (Yohannes et al., 2004). Estudios de proteómica han mostrado que *E. coli* responde al pH ácido (< 4.3) mediante la respuesta provocada por el factor σ^{32} (Heyde & Portalier, 1990).

Por otro lado, el pH básico en bacterias neutrófilas, provoca una serie de cambios a nivel metabólico que intentan mantener el intervalo de pH citoplasmático entre pH 7.4 a 7.8 mientras el pH externo es más básico (Slonczewski et al., 1981; Padan et al., 2005; Martínez et al., 2012). Las respuestas ante dicho estímulo favorecen el aumento de la concentración de protones en el citoplasma. Algunas respuestas son: el cambio en la estructura de la membrana con el objetivo de retener protones, la producción de metabolitos ácidos y el aumento en la actividad de transportadores de protones que favorecen su importe (Padan et al., 2005). Las bacterias como *E. coli* inducen el catabolismo de aminoácidos usando deaminasas y la fermentación de azúcares, lo que favorece la liberación de ácidos que neutralizan la alcalinidad (Blankenhorn et al., 1999). La activación de antiporters de cationes/ H^+ favorecen el transporte activo de protones hacia el interior de la célula (Slonczewski et al., 1981; Padan et al., 2005). Una de las respuestas más conocida al pH básico es la activación del anti-transportador Na^+/H^+ que ayuda a mantener el pH interno próximo a 7.4 y protege las células del exceso de sodio (Karpel et al., 1991). De igual forma se activa el antiportador K^+/H^+ que realiza una función similar. Además se ha sugerido el favorecimiento de la captura de protones vía la F_1F_0 -ATPase y la reducción de la pérdida de protones (Slonczewski et al., 1981; Stancik et al., 2002; Padan et al., 2005; Slonczewski et al., 2009). De forma similar al estrés ácido, pH alcalinos inducen una respuesta transcripcional que involucran genes como *ibpB*, *lon*, *dnaJ*, *dnaK*, *clpB*, *clpX* y *grpE*, similares a los activados por la RCT regulada por el gen *rpoH* (Schuldiner et al., 1986; Maures et al., 2005). Por ejemplo, en cultivos de *E. coli* K12 bajo condiciones de pH básico se observó el aumento de la síntesis de las chaperonas DnaK y GroEL (Taglicht et al., 1987).

4.7 Aplicaciones de los cuerpos de inclusión

A partir de que los CI son mecánicamente estables como para soportar procedimientos agresivos aplicados para ocasionar lisis celular (Georgiou & Valax 1999) y no presentan cambios perceptibles en tamaño, geometría y actividad biológica bajo largos períodos de almacenamiento e incubación (García-Fruitós et al., 2009), se ha propuesto usarlos como materiales. Otras ventajas que presentan son una buena tolerancia a los procesos de liofilización y congelación-descongelación (García-Fruitós et al., 2012). Esta estabilidad puede mejorarse aún más mediante la inmovilización de los CI en matrices de gel o microcápsulas semi-permeables elaboradas con agar- TiO_2 , alginatos o celulosa (Nahalka et al., 2006; 2007; 2008).

Por ejemplo, diversas enzimas recombinantes utilizadas en procesos industriales han sido producidas en forma de CI y éstos han sido inmovilizados (Nahalka et al., 2006; 2007; 2008; 2009), con lo que se ha demostrado que este tratamiento minimiza las fugas de enzima y la contaminación del producto. Además se pueden usar en procesos complejos en los que las proteínas solubles pierden actividad rápidamente. Por otro lado, se han desarrollado métodos de inmunización utilizando CI como antígeno, que en comparación con otras rutinas para inmunizar animales, es un método sencillo y de bajo costo para preparar antígenos. Además es un método que enriquece la proteína, el número de epítomos, así como el tamaño de la molécula por ser presentada (Yang et al., 2011). De hecho, el uso de PR evita algunos problemas inherentes a vectores vivos

para vacunas, tales como el riesgo de transferencia, eficacia impredecible, y el escaso reconocimiento del antígeno (Makela, 2000; Schoedel, 1990).

A partir de que los CI tienen diferentes formas y tamaños, se propuso que éstos podrían modificar el nano y micro-ambiente (Dalby, 2005) conformando soportes para mejorar la proliferación celular o la diferenciación (Nahálka et al., 2008; García-Fruitós et al., 2007; Biggs et al., 2010; Dalby, 2009), similar al empleo de nanotubos (Jan & Kotov, 2007; Keefer et al., 2008) y partículas esféricas (Samaroo et al., 2008; Lipski et al., 2008). En este contexto, CI fijados en superficies de sílice estimularon la proliferación celular (

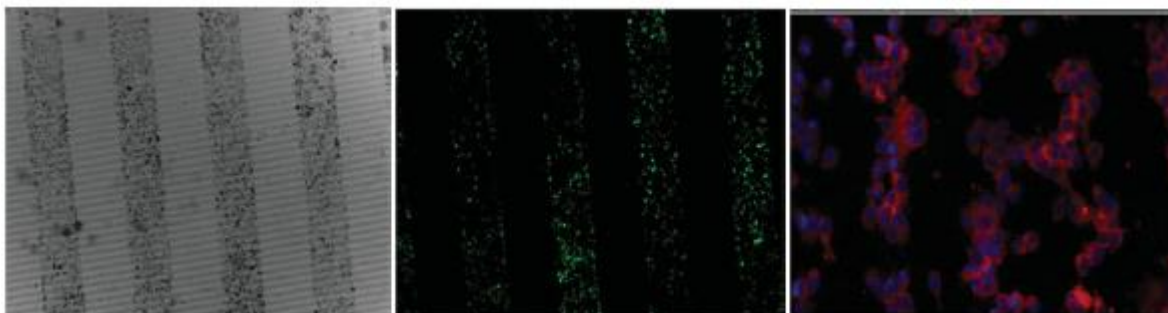


Figura 10) (García-Fruitós et al., 2009). Además, se encontró que la forma de los CI es importante, pues los CI con forma de gota obtenidos en *E. coli* MC4100 ClpP⁺, mejoraron 125% y 150% la proliferación de células BHK21 y de PC12, respectivamente (García-Fruitós & Seras-Franzoso 2010). Asimismo, Seras-Franzoso et al., (2012) reportaron adhesión de las líneas 1BR3G y HepG2 al soporte con CI producidos en *E. coli* DnaK⁻.

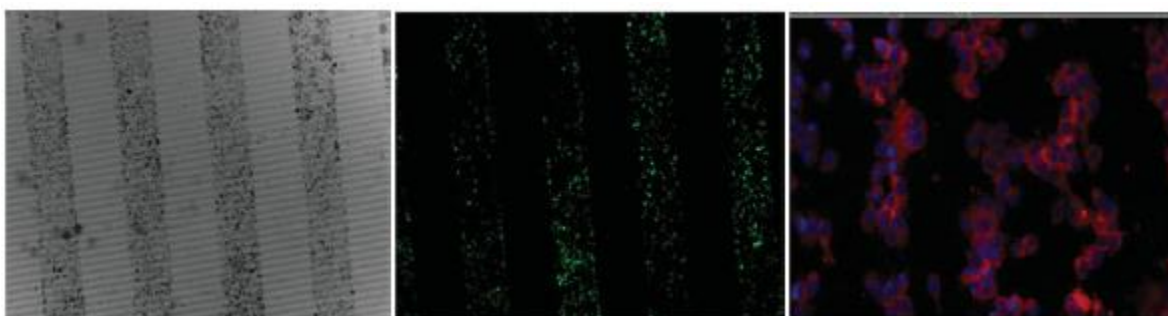


Figura 10. Microscopía de la superficie de sílice con CI de GFP adheridos por microcontacto, convencional (izquierda), confocal (centro) y células BHK después de 48 h de crecimiento (azul núcleos). Tomada de García-Fruitós et al., 2009.

Recientemente, se ha probado que los CI pueden liberar péptidos funcionales en cantidades significativas bajo condiciones no desnaturizantes (De Marco et al., 2007), con lo que se propuso usarlos como sistemas de liberación proteica. Vázquez et al. (2012) probaron la eficacia de CI como sistema de liberación proteica con usos terapéuticos en distintas líneas celulares dañadas, observando su recuperación. Del mismo modo, Liovic et al., (2012) introdujeron por electroporación CI de queratina K14 a cultivos de células SW13, deficientes en queratina y demostraron que una porción de la proteína K14 se liberó y fue capaz de producir heterodímeros de queratina, proponiendo su posible uso en terapia celular.

4.8 Proteínas modelo

4.8.1 Esfingomielinasa

Las esfingomielinasas (E.C.3.1.4.12) son enzimas que catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster, actuando sobre la esfingomielina (SM), produciendo fosfocolina y ceramida o colina y fosfoceramida según su especificidad (Figura 11) (Carbajal-Saucedo 2014). La SM o ceramida fosforilcolina, consiste de una unidad de ceramida y una molécula de colina unidas. Es un componente de las membranas plasmáticas de las células eucariotas y su contenido varía de 2 al 15% del valor de fosfolípidos totales (Barenholz & Thompson 1980; Koval & Pagano 1991). La SM junto con otros lípidos funciona como componente estructural de las membranas y participa en la señalización celular (Hannun et al., 2001) y los productos de su metabolismo como la ceramida, esfingosina, esfingosina-1-fosfato y diacilglicerol, son efectores en la apoptosis, el envejecimiento y el desarrollo celular (Hannun et al., 2001; Merrill et al., 1997). En la última década se ha incrementado el interés en las esfingomielinasas debido al descubrimiento de la vía de señalización mediada por la SM (Okazaki et al., 1989; 1990; Kolesnick 1991; Mathias et al., 1991).

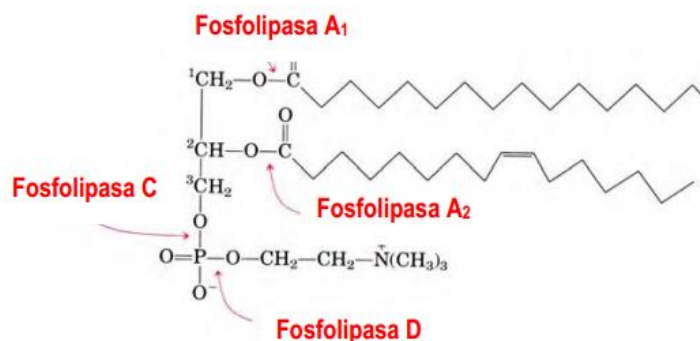


Figura 11. Tipos de fosfolipasas. Fosfolipasas A₁ y A₂ hidrolizan los enlaces éster del glicerofosfolípido en los C-1 y C-2 del glicerol, respectivamente, Fosfolipasas C y D actúan sobre los enlaces fosfodiéster en la cabeza polar. (Tomado de la tesis de Jiménez Martínez, 2009).

4.8.1.1 *Esfingomielinasa D de Loxoceles reclusa*

La esfingomielinasa D (SM-D) es una enzima de 32 kDa que cataliza la ruptura de la esfingomielina en 1-fosfoceramida y colina (Figura 12) (Ramos & Vázquez, 2000). Es el principal componente proteico del veneno de las arañas del género *Loxosceles* (constituye alrededor del 50%) y es considerado como el responsable de la respuesta tóxica (Kurpiewski et al., 1981; Binford & Wells, 2003).

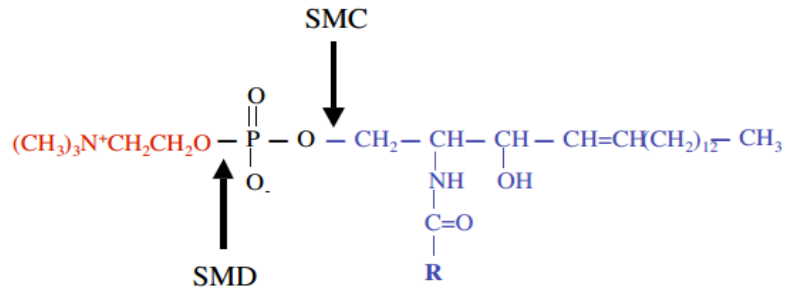


Figura 12. Sitio de hidrólisis de las esfingomielinasas: SMC: Esfingomielinasa tipo C hidroliza SM liberando fosfocolina y ceramida, SMD: esfingomielinasa tipo D hidroliza SM liberando colina y fosfoceramida (Carbajal-Saucedo 2014).

El envenenamiento causado por la mordedura de las arañas de este género se conoce como Loxocelismo, el cuál puede presentarse como: Loxocelismo cutáneo (LC) y sistémico (LS) (83.3% y 16.7% de los casos, respectivamente) (Schenone et al., 1989). La sintomatología típica del LC son dolor, edema, y como rasgo predominante la presentación de necrosis. El LS es menos común, pero es la principal causa de muerte asociada a envenenamiento por *Loxosceles* (Fernandes et al., 2002). Uno de los tratamientos contra el envenenamiento por dichas arañas es el uso del antiveneno (Pauli et al., 2006). Sin embargo, actualmente los anticuerpos terapéuticos se obtienen por inmunización de caballos con venenos extraídos de animales, lo que dificulta su obtención (Olvera et al., 2006). Por lo que, se han buscado nuevas alternativas para la obtención de antisueros, como la utilización de SM-D recombinante. Esto ha permitido obtener anticuerpos con mayor efecto neutralizante que aquellos obtenidos con veneno completo (Fernandes et al., 2002; de Almeida et al., 2008; Tambourgi et al., 2004) y podrían clasificarse como “anticuerpos de cuarta generación” pues se obtienen por inmunización con PR (Olvera et al., 2006).

4.8.1.2 Esfingomielinasa D de garrapata

La esfingomielinasa D de garrapata (SMDg) tiene un peso molecular de 32 kDa con una estructura teórica $(\alpha/\beta)_8$ y se encuentra presente en las glándulas salivales de las garrapatas. Las garrapatas son los parásitos externos que más daño causan en la producción ganadera de leche, carne y cuero, ya que se obtienen vacas enfermas, y con material de menor calidad debido a las cicatrices derivadas de sus mordeduras (Guglielmo & Mangold, 2002). Las garrapatas además transmiten enfermedades bacterianas o fúngicas y otras parasitosis (Jongejan & Uileneberg, 2004; Cardozo & Frachi, 1995), como la babesiosis y anaplasmosis (Bock et al., 2004; Chauvin et al., 2009). De forma global, se estima que el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas, provocando pérdidas de 2 000 a 3 000 millones de USD (Pedroso et al., 2007).

Las garrapatas (*Boophilus microplus*) tienen un ciclo parasítico breve sobre los bovinos el cuál se inicia con la fijación de larvas de garrapatas que se desarrollan hasta ninfas y posteriormente maduran como macho o hembra. Las garrapatas se fijan a su piel mediante la inserción de su órgano dentado y perforación de la piel del huésped y para asegurar el anclaje segregan el llamado “cemento de unión” que es un fluido rico en proteínas, lipoproteínas, lípidos y carbohidratos (Sonenshine 1991; McGinley-Smith & SS 2003). Una vez

fecundadas las hembras ingurgitadas de sangre se desprenden del bovino, una vez en el suelo, la hembra ingurgitada se refugia para colocar una masa de huevos que darán lugar a una nueva generación de larvas que infestarán nuevamente a los vacunos (Guglielmone & Mangold, 2002). El método más empleado para su control es el tratamiento con acaricidas químicos, que tienen acción eficaz y rápida sobre las garrapatas que se encuentran sobre el animal, pero no sobre las larvas. Por lo que se realizan baños químicos continuos que acentúan los efectos colaterales, como poblaciones resistentes. Para aumentar la efectividad de los tratamientos químicos se ha propuesto el uso de vacunas. Uno de los antígenos propuestos es la SMDg, pues se encuentra presente en las glándulas salivales del parásito formando parte de un conjunto de enzimas de la saliva, que contribuye a que la hemorragia se mantenga abierta para asegurar su alimentación (Kazimirova & Štibrániová 2013; Kaufman, 1989; Sauer et al., 1995).

4.8.2 Fosfolipasa A2 de *Micrurus laticollaris*

Las serpientes de coral pertenecen a la familia *Elapidae* y están agrupadas en tres géneros: *Micrurus*, *Micruroides* y *Leptomicrurus* (Roze 1996). El 59 % de las serpientes de coral se encuentra en América (Uetz et al., 2010). Los géneros *Micruroides* y *Micrurus* (ahora incluyendo *Leptomicrurus*), se distribuyen desde el sur de EE.UU. hasta Argentina, siendo, *Micrurus* el género más diverso de las serpientes venenosas, contando hasta ahora con 76 especies (Carbajal-Saucedo et al., 2013). Las serpientes de coral se caracterizan generalmente por la presencia de anillos rojos y negros separados por anillos angostos de color amarillo o rojo, pero este patrón varía dependiendo de la especie (Bautista & Arizmendi 2004).



Figura 13. La Serpiente de Coral *Micrurus nigrocinctus*. Especimen adulto de 80 cm de largo común en Centroamérica Tomada de Bolaños 1982.

Las mordeduras de las serpientes del género *Micrurus* son raras en los seres humanos pero 5 mg de veneno pueden ser letales, de ahí su importancia médica (Russell et al., 1997; Fix 1980; Gold et al., 2004). Los síntomas incluyen dolor local, sialorrea, parestesias, debilidad, visión borrosa, parálisis y en los casos graves, paro respiratorio que conduce a la muerte (Vital Brazil 1987; de Roodt et al., 2004). Los efectos neurotóxicos del veneno de las serpientes *Micrurus* se atribuyen a la neurotoxina post-sináptica (α -neurotoxina) y a la

neurotoxina presináptica con actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) (Rosso et al., 1996; Olamendi-Porugal et al., 2008; Dokmetjian et al., 2009; Ciscotto et al., 2011; Correa-Netto et al., 2011; Carbajal-Saucedo et al., 2013). La α -neurotoxina actúa sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina como un antagonista del neurotransmisor (Nirathanan & Gwee, 2004). El mecanismo de acción de PLA2 no está bien caracterizado, pero los mecanismos propuestos sugieren que PLA2 se une a una zona activa en la membrana plasmática presináptica e hidroliza los fosfolípidos de la capa externa, alterando la conformación de la membrana. Esto promueve la exocitosis de la acetilcolina, seguido por la inhibición de los mecanismos de fusión y reciclaje de vesículas (Rosetto & Montecucco, 2008). Después de eso, la toxina entra en la neurona y se une específicamente con las mitocondrias, promoviendo la formación de poros, lo que conduce a la degeneración axonal (Rigoni et al., 2008; Barrientos et al., 2011).

El único tratamiento para el envenenamiento por la mordedura de *M. laticollaris* es la aplicación del antiveneno, cuya obtención es por medio de la inmunización con el veneno lo que dificulta técnicamente su producción debido al poco veneno que se obtiene por serpiente (de Roodt et al., 1998). De ahí que se proponga usar las α neurotoxinas y las PLA2 producidas de forma recombinante para la producción de antivenenos neutralizantes específicos.

5 JUSTIFICACIÓN

A nivel de bioproceso, la modificación de las estrategias de cultivo ha sido una herramienta que ha permitido mejorar la producción de PR soluble citoplasmática, disminuyendo a su vez la formación de CI (García-Fruitós et al., 2012). Esto debido a que los CI han sido considerados como el principal obstáculo en la producción de PR activas, sin embargo, algunos CI están compuestos por proteínas correctamente estructuradas y biológicamente activas (Carrió y Villaverde 2005, García Fruitós 2005). Debido a sus características fisicoquímicas, los CI han sido propuestos para diversas aplicaciones como agentes catalíticos inmovilizados, material de soporte de proliferación celular, agentes liberadores en terapia celular e inmunógenos. Generalmente, las condiciones de cultivo se modifican con el fin de mejorar la productividad y rendimiento de proteína recombinante soluble, sin embargo, se ha observado que éstas también tienen un efecto sobre las características de los agregados y los CI. De hecho el tamaño, composición, contenido de proteína activa así como forma de los agregados han logrado ser modificados a través cambios en temperatura, pH o tiempo de inducción. Margreiter et al. (2008) reportaron el aumento de tamaño de CI con de hasta 200 nm con respecto al tiempo de cultivo. Del mismo modo, el tiempo de cultivo tiene un impacto en la morfología de los CI, observándose que los CI cosechados a tiempos tempranos resultaron con una morfología principalmente esférica que tiende a tornarse cilíndrica en tiempos avanzados. El tamaño también puede ser modificado por la concentración de inductor, Margreiter et al. (2008) observaron que la disminución en la concentración de inductor resultaba en CI de menor tamaño. Asimismo la disminución de la temperatura es una estrategia usada en la producción de PR para disminuir la formación de agregados insolubles, resultando en CI de menor tamaño. Por el contrario, hasta el momento no se ha reportado que la concentración de oxígeno disuelto tenga efecto en la formación de CI (Strandberg & Enfors, 1991).

Se ha demostrado que la morfología y tamaño de los CI son importantes características para ser usados como soportes de proliferación celular (García-Fruitós et al., 2010), para la liberación péptidos (Vázquez et al., 2012) y su uso como catalizadores (Nahálka et al., 2007). Hasta ahora se conoce que la mutación de la proteasa ClpP deriva en CI con forma de gota, con mejor desempeño como soporte de proliferación. Sin embargo, la mayoría de CI caracterizados fisicoquímicamente han sido producidos en matraces cuyas condiciones no controladas favorecen su acumulación (Strandberg & Enfors, 1991; Carrió et al., 2005; Espargaró et al., 2008b; Peternel et al., 2008a; Peternel et al., 2008b; Upadhyay et al., 2012). Entre las condiciones que varían en matraces están el pH, la concentración de oxígeno disuelto debido al metabolismo de cada bacteria, y la potencia por unidad de volumen y el estrés hidrodinámico (Büchs, 2001; Gamboa-Suasnavart et al., 2011). A partir del aumento en la acumulación de CI en matraces, comparado con cultivos controlados en biorreactor (Strandberg & Enfors, 1991), se propuso estudiar el efecto del pH sobre la formación de cuatro CI de PR modelo. De ahí que se realizaran dos estrategias en biorreactor: cultivos sin control de pH (con pH inicial 7.5), o bajo condiciones controladas de pH 7.5 mediante la adición de ácido o base; ambas con oxígeno y temperatura controladas, y usando medio SB. La realización de los experimentos también fue sustentada con

el estudio *in vitro* en el que se demostró que el pH afecta la tendencia a formar depósitos de péptidos- β amiloides (Barrow et al., 1992).

Por otro lado, algunos estudios indican que variaciones en pH extracelular provoca pequeñas variaciones de pH durante la adaptación homeostática en el citoplasma de células bacterianas (Magill, Cowan, Koppel, & Setlow, 1994; Wilks & Slonczewski, 2007). Por lo que, se propuso que el pH de cultivo podría ser una condición que modificaría la formación de CI. Todo lo anterior podría entonces ser útil en la comprensión de los mecanismos de agregación de proteínas en bacterias, la estabilidad de los CI, y que servirá para mejorar los bioprocesos de PR soluble o agregada en CI. Pudiendo regular la conservación de actividad enzimática, estabilidad mecánica y tamaño, para poder dirigirlos hacia sus posibles aplicaciones.

6 HIPÓTESIS

La variación del pH (entre 6.5 a 8.5) en cultivos de la cepa BL21 Gold (DE3) aumenta el tamaño y la estructuración de los cuerpos de inclusión de las proteínas recombinantes modelo (esfingomielinasa-D de garrapata, esfingomielinasa D de *Loxoceles reclusa* y Fosfolipasa A2 de *Micrurus laticollaris*), con respecto a aquellos producidos bajo condiciones controladas de pH 7.5.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto de la variación del pH en cultivos de la cepa BL21 Gold (DE3) de *E. coli* sobre las características físicas de los cuerpos de inclusión de las proteínas esfingomielinasa-D recombinante de garrapata, esfingomielinasa D recombinante de *Loxoceles reclusa* y Fosfolipasa A2 de *Micrurus*, como son tamaño, morfología, estructura y composición.

7.2 Objetivos particulares

- Caracterización cinética de cepas productoras de CI, crecidas en matraces en cultivos en lote a 37°C.
- Realizar cultivos en lote de *E. coli* en biorreactor de 1L de 4 diferentes cepas productoras de proteína recombinante en CI en condiciones de pH 7.5 y sin control de pH.
- Caracterizar la morfología de los CI mediante microscopía electrónica.
- Caracterizar la distribución de tamaños de los CI obtenidos en las dos condiciones de cultivo.
- Comparar la composición de los CI producidos en las dos condiciones de pH, mediante la disolución de los CI en cloruro de guanidinio, su degradación con proteinasa-K, y su unión a colorantes amiloidogénicos.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Medio de cultivo y Soluciones

Medios:

- Medio Luria Bertani (LB): extracto de levadura 5 g/L; Triptona 10 g/L; cloruro de sodio 5 g/L.
- Medio Super Broth (SB): extracto de levadura 32 g/L; Triptona 20 g/L; cloruro de sodio 5 g/L.
- Medio Terrific: extracto de levadura 24 g/L; Triptona 12 g/L; glicerol .4%
- Medio 2xYT: extracto de levadura 10 g/L; Triptona 16 g/L; cloruro de sodio 5g/L
- Medio SOC: extracto de levadura 5 g/L; Triptona 20 g/L; cloruro de sodio 0.5 g/L, cloruro de potasio 0.18g/L, sulfato de magnesio 4.8 g/L, dextrosa 3.603 g/L.

Soluciones:

- Soluciones para purificación de CI
 - Amortiguador de lisis: 50 mM TrisCl (1mM EDTA, 100 mM NaCl pH 7.5)
 - Amortiguador Fosfato Salino, PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4)
 - Amortiguador desnaturalizante: 250 mM TrisHCl, 40% Glicerol, 5% SDS,
- Soluciones para geles de poliacrilamida:
 - Solución I al 30%: Acrilamida 29.2%, bisacrilamida 0.8%
 - Solución II pH 8.8 (gel separador): Tris-HCl 0.75M, SDS 0.2%
 - Solución III pH 6.8 (gel concentrador): Tris-HCl 0.25 M, SDS 0.2%
 - Solución de tinción: 1.25 g de azul de coomasie, 250 mL de metanol
 - Solución de desteñido: metanol 30%, ácido acético 7%
- Soluciones para Western Blot
 - Amortiguador de transferencia: Tris-base 3.03 g/L, glicina 14.4 g/L, metanol 200 ml/L, SDS 0.5g/L pH 8.3
 - TBS: Tris HCl 200 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6
 - TBS-Tween 200 0.05%
 - BSA 0.1%
 - Leche al 5%
- Soluciones para ensayo de unión a Tioflavina T
 - Amortiguador de fosfatos 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7.0.
- Soluciones para ensayo de fluorimetría
 - Amortiguador fosfatos: 50 mM: Fosfato de sodio 50 mM , 100 mM KCl, 1 mM EDTA, y 1 mM DTT y lo ajuste a pH 7.4
 - Urea 8 M

8.2 Cepas bacterianas y plásmido

Se utilizaron dos cepas de *E. coli*. La cepa Origami DE3 con genotipo $\Delta ara-leu7697\ araD139\ \Delta lacX74\ galE\ galK\ rpsL\ \Delta phoAPvuII\ phoR\ F'[lac+(lacIq)pro]\ gor522::Tn10$ (*Tetr*) *trxB::kan(DE3)* con mutaciones en los genes tioredoxina reductasa (*trxB*) y la glutatión reductasa (*gor*), que favorecen la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. La cepa BL21 Gold (DE3) con genotipo *E. coli B F- dcm ompT lon hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3)*, deficiente de las proteasas intra y extracelulares OmpT y Lon, respectivamente. El vector utilizado fue PQE30 (QIAGEN, NV), que contiene el promotor lacZ inducible con Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y el gen *bla* que le confiere resistencia a ampicilina. Los vectores contenían los genes codificantes para las 4 PR modelo, la SMD de la araña *L. reclusa* (Gen Bank. Lr1,AY559846), SMD de garrapata *B. microplus* (GenBank KJ85238), SMD de garrapata *B. microplus* mutante y PLA2 de la serpiente *M. laticollaris*. Estos plásmidos pertenecen a la colección del Dr. Alejandro Alagón, IBt-UNAM.

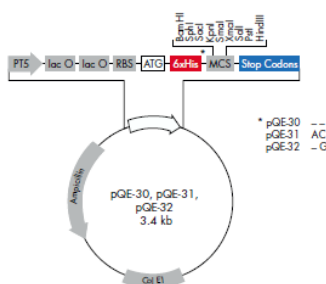


Figura 14. Plásmido PQE30 Qiagen, USA.

8.3 Proteínas modelo

Se utilizaron 4 PR con la característica de formar CI (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas modelo y características de su sistema de expresión

Proteína	Cepa	Plásmi	Resistencia	Peso molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (PI)
PLA2 de la serpiente <i>M. laticollaris</i>	BL21 Gold (DE3)	PQE30	Ampicilina	14.7	6.8
SMD de garrapata <i>B. microplus</i> (SMDg)	BL21 Gold (DE3)	PQE30	Ampicilina	31.7	6.04
SMD de la araña <i>L. reclusa</i> (SMD-Lr)	BL21 Gold (DE3)	PQE30	Ampicilina	31.2	6.6
SMD de garrapata con mutaciones <i>B. microplus</i> (SMDgm)	BL21 Gold (DE3)	PQE30	Ampicilina	32.3	6.12

PLA2: fosfolipasa A2, SMDg: Esfingomielinasa D de garrapata, SMDgm: Esfingomielinasa D de garrapata con mutaciones, SMD-Lr: Esfingomielinasa D de *L. reclusa*.

8.4 Clonación y expresión de las proteínas modelo

8.4.1 Extracción de ADN plasmídico

Con la finalidad de tener el mismo fondo genético de las construcciones, se decidió expresar todas las PR en la cepa BL21-Gold(DE3). A partir de que los vectores con genes codificantes para SMDg y la PLA2 de *M. laticollaris*, se encontraban clonados en la cepa *E. coli* Origami, éstos fueron extraídos y clonados en la cepa BL21-Gold(DE3). Los plásmidos fueron extraídos usando el kit comercial QIAprep Miniprep (Quiagen), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Birnboim y Doly 1979; Birnboim 1983).

8.4.2 Preparación de células quimiocompetentes

Para obtener células competentes de *E. coli* BL21 Gold (DE3), éstas se cultivaron en medio LB con tetraciclina (30 µg/mL) a 37°C con hasta una DO₆₀₀ de 0.8. La biomasa obtenida se centrifugó a 8000 g durante 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en una solución de CaCl₂ (100 mM) y MgCl₂ (20 mM), incubando las células en hielo durante 2 h. Después de la incubación se centrifugaron a 8000 g durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en CaCl₂ (0.1 M) y se agregaron 88 µL de DMSO por cada mL. La solución obtenida se alícuotó y almacenó a -80 °C (Sambrook et al., 1989).

8.4.3 Transformación de células quimiocompetentes

El proceso de transformación de *E. coli* se realizó mediante choque térmico. Las células competentes se descongelaron y se les añadió 20 ng de ADN plasmídico y se mantuvieron a 4°C durante 30 min. Después, la mezcla se incubó a 42°C durante 1 min y nuevamente se mantuvo a 4°C durante 5 min. Finalmente, se añadió 1 mL de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37°C para permitir la recuperación de las bacterias.

8.4.4 Selección de los clones transformantes de *E. coli*.

Las bacterias transformadas se recuperaron y fueron plaqueadas en cajas Petri con agar LB-ampicilina y se incubaron a 37°C por 12 h. Las clonas positivas se seleccionaron por medio de la resistencia a ampicilina. Se eligieron 10 colonias, con las que se realizó una PCR con oligos específicos del gen codificante de la SMD y PLA2 (Tabla 5). La reacción de PCR se realizó conforme a las condiciones mostradas en la Tabla 6. Los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (figuras 15 y 16).

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar el inserto transformado

Proteína	Oligonucleótido (5'3')	Nucleótidos	Tm (°C)	
SMD	Fw	CCCCGGATCCGCTTCCACTGGGCTGCG	27	58
	Rw	CCCCAAGCTTTCAAACAATACGCTTCCATG	30	56
PLA	Fw	GGATCCAACCTCATTCACTTCAAAAAC	27	56
	Rw	AAGCTTTCACCGGCAACGTTTGAG	24	56

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizadas para amplificar el ADN codificantes para las diferentes variantes

Ciclos	Proceso	Tiempo	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	5 min	94
	Desnaturalización	1 min	94
35	Hibridación	40 seg	55
	Amplificación	40 seg	72
1	Amplificación	5 min	72

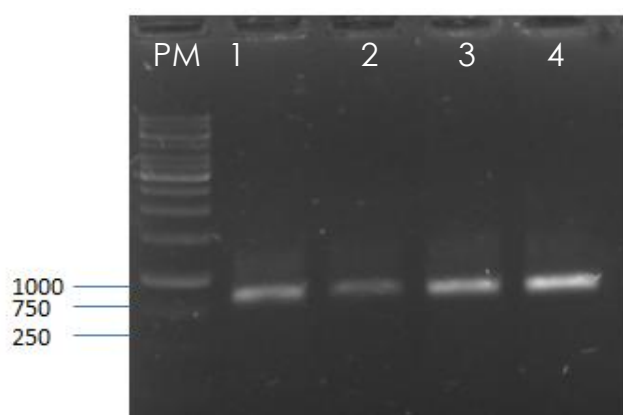


Figura 15. Gel de agarosa al 1% de una PCR de colonia de *E.coli* B121 Gold (DE3) transformada con el plásmido PQE30 con el gen codificante para la proteína SMDg. Cada carril corresponde a una de las 4 cepas transformantes seleccionadas. El tamaño del amplicón corresponde a 852 pb. PM, Marcador de tamaño en pb #SM0312 (Fermentas, USA).

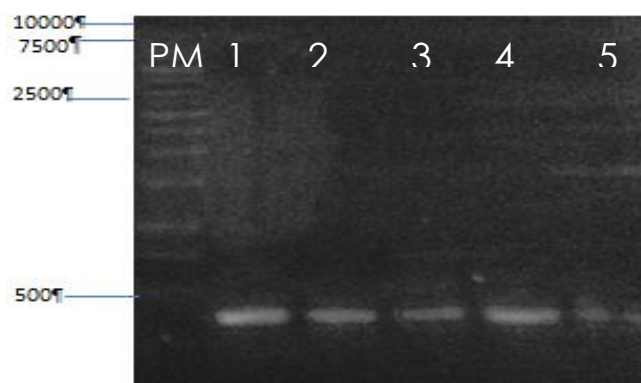


Figura 16. Gel de agarosa al 1% de una PCR de colonia de *E.coli* B121-Gold (DE3) transformada con el plásmido PQE30 (QIAGEN, USA) con el gen codificante para la PLA2 de *M. laticollaris*, cada carril corresponde a una de las 4 cepas transformantes seleccionadas. El tamaño del amplicón corresponde a 397 pb. PM, Marcador de tamaño en pb #SM0312 (Fermentas, USA).

8.4.1 Comprobación de la expresión de los clones transformantes de *E. coli*.

Se llevaron a cabo cultivos de 4 colonias transformantes de *E. coli* BL21-gold(DE3) en 5 mL de medio LB con 50 µg/mL de ampicilina. Los cultivos fueron incubados a 37°C e inducidos con 0.05 mM de IPTG después de 5 h de crecimiento para evaluar la producción de la PR de interés. Después de 20 h de inducción los cultivos fueron centrifugados para recuperar la biomasa y se procedió a purificar los CI. Los CI obtenidos fueron suspendidos en urea 8 M y se realizó una separación electroforética en SDS-PAGE. En el caso de las clonas transformadas con el inserto de PLA2 de *M. laticollaris* se probaron 4 clonas para evaluar la producción de la PLA2 de un peso molecular de ~14.7 kDa. Se observó que la clona 1 fue la mejor productora, por lo que esta clona fue seleccionada para realizar el BM (Figura 17A). Del mismo modo se evaluó la producción de SMDg. La PR de un peso molecular de ~32 kDa se observó en las clonas 1 y 4, siendo la clona 4 seleccionada para hacer el BM (Figura 17B).

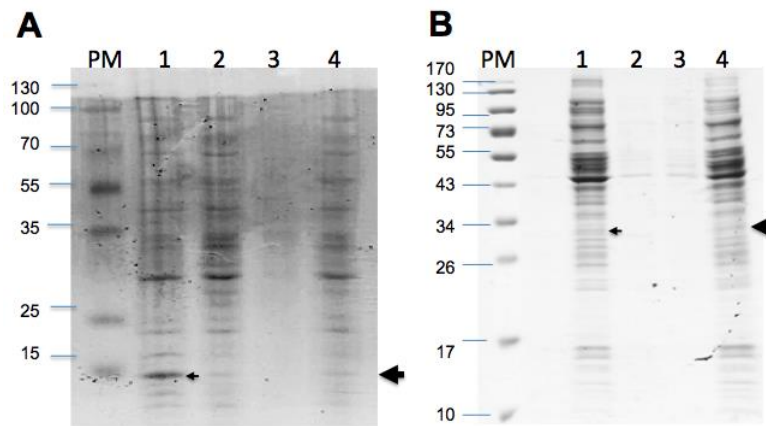


Figura 17. Electroforesis SDS PAGE de los CI purificados y disueltos en urea 8 M de los cultivos de las cepas transformadas de *E. coli* BL21-gold (DE3) (medio LB, 200 rpm, 37°C). A) 4 clonas con el plásmido PQE30 con el gen codificante para la PLA2 de *M. laticollaris* (~14kDa); PM: marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (#26619, Fermentas). B) 4 clonas transformadas con el plásmido PQE30 con el gen codificante para la SMDg (~32 kDa); PM: marcador Page Ruler Prestained Protein ladder, SM0671 de Fermentas. Cada carril corresponde a los CI extraídos de cada una de las 4 cepas transformantes seleccionadas. Las bandas correspondientes a las PR fueron marcadas con flechas.

8.5 Elaboración de los bancos de trabajo (BT)

De cada cepa se tomaron 0.5 mL de un criovial del Banco Maestro y se inoculó un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/mL). Se incubó a 37 °C a 150 g hasta obtener una DO₆₀₀ de 2.0. Se transfirió a un tubo de 50 mL con 30 mL de cultivo y 20 mL de glicerol estéril, agitando suavemente para mezclar ambas fases. La mezcla se conservó en 50 crioviales con 1 mL y se almacenaron a -80°C.

8.6 Caracterización cinética de los cultivos en matraz y biorreactor

8.6.1 Condiciones de cultivo de *E. coli*.

Las diferentes cepas de *E. coli* se cultivaron en medio SB a 37 °C durante 12 h. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio a 200 rpm. Los medios se inocularon a partir del banco de trabajo. Para la selección de clonas por resistencia ampicilina, ésta se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 50 µg/mL.

8.6.2 Cultivo en lote y evaluación de producción en biorreactor de 1.0 L

El inóculo para realizar los cultivos en biorreactor se preparó a partir de 2 matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/mL) con 200 µL tomados de un criovial del BT y se incubó 12 h a 37°C y 200 rpm en una incubadora con agitación orbital PsycoTherm™ (New Brunswick Scientific). Los reactores se inocularon a partir de este cultivo para iniciar la cinética a una DO₆₀₀ de 0.1.

Los cultivos se realizaron en los biorreactores Applikon (Applikon, Schiedam, PB) de volumen total 1.0 L con un volumen de trabajo de 600 mL, equipados con dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas. Los biorreactores controlados a 37°C ± 1°C por medio de una mantilla térmica de 110 W. En los cultivos realizados bajo condiciones controladas de pH, éste fue mantenido en 7.5 ± 0.2 mediante adiciones automáticas de NaOH y HCL 1 M. Mientras en los cultivos sin control de pH, éste se dejó libre y varió conforme cambió el metabolismo de las bacterias. El oxígeno disuelto fue controlado por arriba del 30% (con respecto al valor de saturación del aire) mediante un control Proporcional-Integral-Derivativo (PID), por incrementos automáticos en la velocidad de agitación. La velocidad de agitación inicial fue de 300 rpm con un flujo constante de aire de 1 vvm. Los cultivos fueron monitoreados y controlados mediante el Biocontrolador ADI 1010, la adquisición de datos se llevó a cabo por medio del software BioXpertR Lite (Applikon™) instalada en una PC conectada al controlador. La evaluación de los cultivos se realizó en medio SB con ampicilina (50 µg/mL). Todos los cultivos se realizaron por triplicado y los resultados presentan la desviación estándar de los mismos. Los cultivos fueron inducidos a las 4 h con 0.1 mM de IPTG. Para evaluar las cinéticas de crecimiento se tomaron muestras cada h durante los cultivos de 24 h. A partir de las gráficas obtenidas se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td).

8.7 Caracterización de los cuerpos de inclusión

8.7.1 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Los SDS-PAGE se prepararon según Laemmli et.al. (1970). El gel separador se preparó al 15% y fue precedido por un gel concentrador al 4%. En cada carril se cargaron de 15 a 30 µg de proteína total cuantificada previamente por el método de Bradford o con el kit 2D-Quant (G-Biosciences, USA). Los geles se corrieron a 30 mA y posteriormente fueron revelados usando la solución de Coomassie. El exceso de colorante, fue removido con una solución de destañido.

8.7.2 Purificación de cuerpos de inclusión

La biomasa de los cultivos fue recuperada a las 20 h de la inducción por centrifugación a 7,000 g por 10 minutos y el pellet celular fue suspendido en amortiguador regulador (amortiguador de fosfatos 40 mM, pH 7.4, 40 mM EDTA y 1 mM de PMSF). La suspensión celular fue sonicada para su lisis en un SoniPrep 150 (Sanyo™) a una amplitud de 10 micrones en 10 pulsos de 30 segundos con descansos de 30 seg en hielo y después centrifugada a 8,000g por 10 min para aislar los CI de los restos celulares. El pellet obtenido fue resuspendido en PBS y NP-40 al 0.1 % e incubado a 4°C durante 2 h, después se centrifugó y recuperó el pellet. Después se hizo un tratamiento con 20 µL de DNAsa (6 mg/mL) a 37°C durante 3 h y se centrifugó, el pellet fue recuperado y lavado con Tritón al 0.5% incubándose 2 h a 4°C. Posteriormente, se realizaron lavados con agua para remover sales y detergente. La solución fue centrifugada a 8,000 g por 30 min y se eliminó el sobrenadante. Los sólidos obtenidos se lavaron con agua de baja conductividad 3 veces. Finalmente, se eliminó la fracción soluble por centrifugación, y los CI se almacenaron a -80°C (Carrió et al., 2000)

8.7.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad, USA), para lo cual se midió la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas (Bradford, 1976), que fue determinado en un espectrofotómetro UV-2450 (DU 730 Beckman coulter USA). Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (BSA), en un intervalo de concentración de 5 a 45 µg/mL. Tanto las muestras como los estándares se prepararon por duplicado.

8.7.4 Cuantificación de proteína en CI mediante unión a Cobre

Los CI purificados fueron centrifugados, resuspendidos en SDS 5% e incubados a temperatura ambiente por 12 h. La cuantificación de proteína se determinó mediante el kit 2D Quant (G-Biosciences, USA), para lo cual se midió la absorbancia a 480 nm en un lector de placas Synergy H4 (BioTek Instruments, USA). El método se basa en la unión específica de los iones de cobre al enlace peptídico. De ahí que se cuantificó el cobre libre en solución. Se realizaron curvas de calibración con estándares de BSA, en un intervalo de concentración de 0 a 50 µg/mL. Tanto las muestras como los estándares se prepararon por duplicado.

8.7.5 Ensayo de unión a Tioflavina-T

La mezcla de reacción del ensayo de unión a Tioflavina-T (Th-T) consistió en 50 µg/mL de proteína de los CI cuantificados por el método de unión a cobre, amortiguador de fosfatos (10 mM de fosfatos, 150 mM de NaCl, pH 7,0) y 75 mM de Th-T. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de 460 a 600 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 440 nm (espectrofotómetro LS55, Perkin Eimer, USA). Los espectros de emisión fueron tomados cada hora durante un periodo de 4 h. Se fijó un ancho de rendija de 10 nm tanto para la emisión como para la excitación. El espectro control de Th-T fue restado en todos los experimentos, así como el espectro de los CI en agua (Upadhyay et al., 2012). Los resultados fueron realizados por duplicado.

8.7.6 Ensayo de unión a Rojo Congo

La mezcla de reacción del ensayo de unión a Rojo Congo (RC) consistió en 50 mg/mL de proteína de los CI cuantificados por el método de unión a cobre, amortiguador de fosfatos (10 mM de fosfatos, 150 mM de NaCl, pH 7,0) y 10 μ M de RC. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. Los espectros de absorbancia de la muestra y el colorante fueron tomados junto con los controles (CI en ausencia de colorante y colorante solo) en un barrido de 400 a 700 nm en un espectrofotómetro UV-2450 (DU 730 Beckman coulter USA). La contribución del espectro de los CI en suspensión fue restada del espectro de la mezcla de CI y colorante (Upadhyay et al., 2012). Los experimentos se realizaron con los CI purificados a 1, 3, 5, 7 y 12 h después de la inducción para las dos condiciones de cultivo estudiadas.

8.7.7 Digestión con proteinasa K de los Cuerpos de Inclusión

La digestión proteolítica de los CI se llevó a cabo en amortiguador (50 mM de Tris-HCl y 50 mM de NaCl, pH de 8.0) con una concentración 150 μ g/mL de proteína (cuantificada por el método de unión a cobre) de CI purificados y 2 μ L de un stock de Proteinasa K (2 mg/mL), la solución tuvo una concentración final de 4 μ g/mL de proteinasa K. La digestión proteolítica fue monitoreada por 100 min, registrando cada min los cambios en la absorbancia a 350 nm en un “UV-2450 spectrophotometer” (DU 730 Beckman coulter USA).

8.7.8 Estudios de disolución con agentes desnaturalizantes

Los CI de las proteínas modelo fueron purificadas de la fracción soluble. Los CI previamente cuantificados por método de unión a cobre, se incubaron 24 h a 25°C en disoluciones de cloruro de guanidinio (0-5M) a una concentración de 1 mg/mL de proteína. La suspensión fue centrifugada a 8000 g durante 10 min, y la proteína de la fracción soluble se cuantificó mediante el kit 2d-Quant (G-Biosciences, USA).

8.7.9 Análisis de tamaño de los Cuerpos de Inclusión

El tamaño hidrodinámico de los CI cosechados en diferentes tiempos después de la inducción se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLD) realizado en un Zetasizer Nano (Malven Inst. Ltd, Worcestershire, Reino Unido) a 173° de retrodispersión usando una cubeta de cuarzo de 50 μ L (Castro-Acosta et al., 2014). Las muestras se analizaron con y sin centrifugación para evaluar el tamaño de CI utilizando el modo de resolución normal. Se midió la absorbancia a 350 nm y las muestras se diluyeron con agua para obtener un valor de absorbancia de 0.5 DO₆₀₀ antes de llevar a cabo la medición por DLD. Los tamaños se reportan como el diámetro de la esfera equivalente de las partículas analizadas (Castro-Acosta et al., 2014). Cada muestra se midió por triplicado y el diámetro hidrodinámico representa el valor promedio. Los dispersantes utilizados fueron agua y amortiguador de fosfatos pH 7.0. Las muestras fueron analizadas a 27 °C.

8.7.10 Análisis de morfología por micrografía de transmisión electrónica

El análisis microscópico de los CI en células, así como los purificados fueron realizados con un microscopio electrónico (Zeiss EM900 80 Kv) con una cámara CCD Dual Vision 300 W (Gatan Inc). Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Microscopía del IBt-UNAM en colaboración con la Dra. Guadalupe Zavala. El corte de los bloques con las muestras se realizó con un ultramicrotomo (LEICA Ultracut R). Las muestras fueron fijadas por 4 h con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio (0.16 M pH 7.2). Para la postfijación se aplicó tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h a 4°C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron gradualmente con etanol y óxido de propileno, después se aplicó óxido de propileno y resina araldita -epon para embeber las muestras antes de aplicar la mezcla de resina pura (EPON -Araldita-DDSA -DMP 30). Se polimerizó a 60 °C por 12 h. Las muestras se tiñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Descripción de las proteínas modelo

Las cuatro proteínas modelo usadas en este trabajo fueron: Esfingomielinasa D de garrapata *B. microplus* (SMDg), esfingomielinasa D mutante de garrapata *B. microplus* (SMD-gm), la esfingomielinasa de la araña *L. reclusa* (SMD-Lr) y una Fosfolipasa A2 (PLA2) de la serpiente *M. Laticollaris* (Tabla 4).

Se ha reportado que variaciones en la estructura primaria de un polipéptido tienen impacto en la formación de CI sugiriendo que la estructura primaria determina su propensión a agregarse (Ventura & Villaverde 2006). De ahí que se propusiera trabajar con las 4 PR modelo, 3 de las cuales son SMD y presentan similitud por arriba del 90%. Además, con esta premisa se modificó la secuencia de aminoácidos de la proteína SMD-g para mejorar su solubilidad, mutándose G56D, H58G, G60T, E62T, R63K.V67M y M131I, según información del grupo del Dr. Alagón. A partir de la secuencia de aminoácidos de cada proteína se realizó una predicción de estructura secundaria usando programas como Gor y SOPMA, del servidor ExpPASy (<http://www.expasy.org>). Mediante este análisis se determinaron los porcentajes de contenido de α hélices, hojas β y regiones sin conformación en cada una de las proteínas (Tabla 7). Además, se comprobó que las mutaciones en la secuencia peptídica de la SMD-gm no sólo modifican la solubilidad de la proteína sino que repercuten en su estructura secundaria, principalmente en las láminas β y las regiones sin conformación.

Tabla 7. Estructura secundaria de las proteínas modelo.

Proteína	α hélice (%)	Láminas β (%)	Estructura sin conformación (%)
SMDg	38.03±6.96	24.36±8.12	37.61±7.96
SMDgm	38.41±5.64	18.35±4.15	43.23±9.73
SMD-Lr	28.78±7.68	21.26±27	49.94±2.90
PLA2	18.93±8.20	24.79±15.9	63.00±23.4

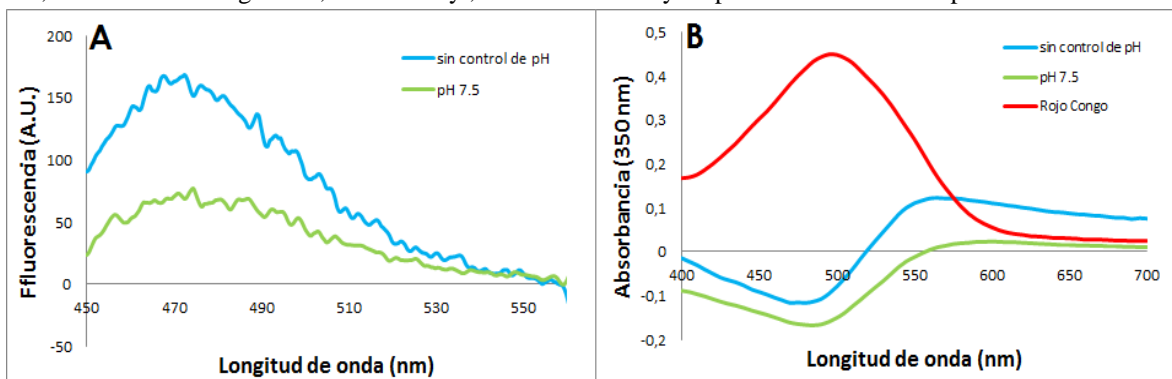
SMD-g: Esfingomielinasa D de garrapata, SMDgm: Esfingomielinasa D con mutaciones de garrapata, SMD-Lr: Esfingomielinasa D de *L. reclusa*, PLA2 :Fosfolipasa A2 de *M. laticollaris*

9.2 Caracterización inicial de las cepas productoras

9.2.1 Evaluación de diferentes medios de cultivo con la cepa BL21-Gold(DE3) productora de esfingomielinasa D de garrapata

Con la finalidad de evaluar el mejor medio para producir las PR, se evaluó el crecimiento y la producción de la cepa BL21-Gold (DE3) productora de SMDg en diferentes medios de cultivo. Los medios evaluados fueron

LB, LB con 2% de glucosa, medio 2Xyt, Medio Terrific y Super Broth. Como se puede observar en la



y la tabla 8, las biomásas máximas alcanzadas, así como las velocidades de crecimiento son similares en los diferentes medios de cultivo.

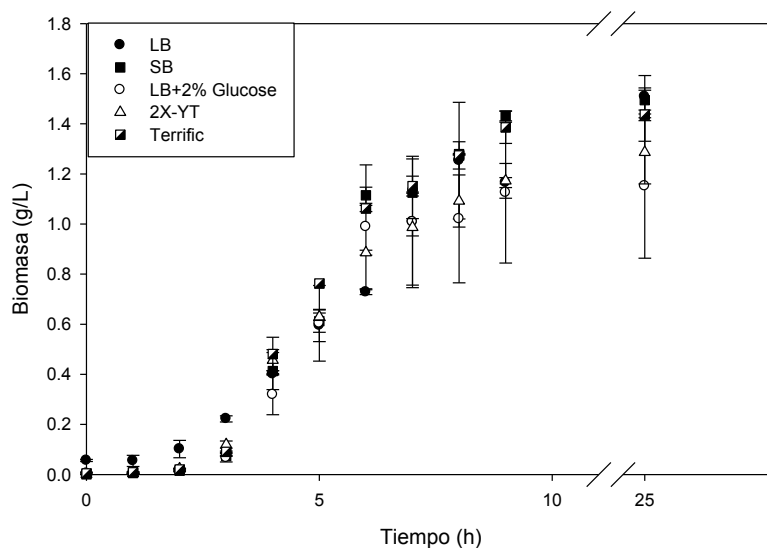
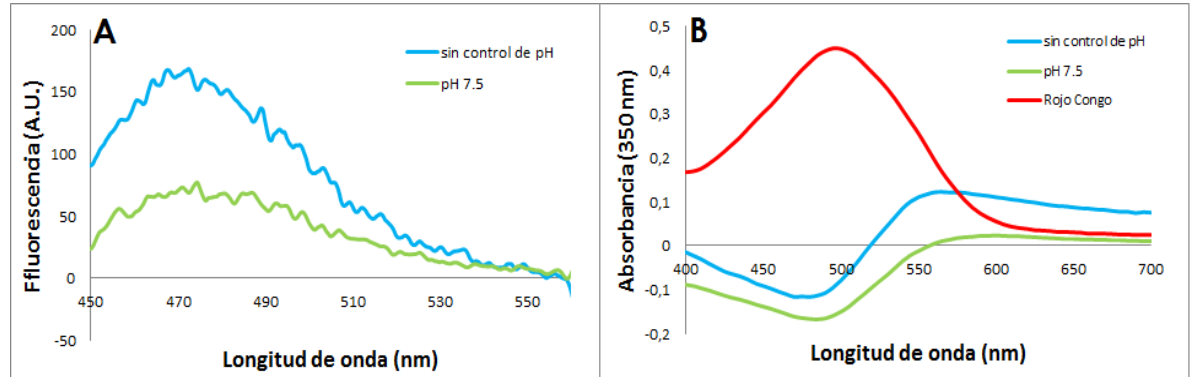


Figura 18 Cinética de crecimiento con diferentes medios de la cepa *E. coli* BL21 DE3 gold productora de SMD de garrapata en matraces convencionales de 20 mL con 50 mL de medio, a 37°C y 200 rpm. ●Medio LB Medio Super Broth OMedio LB+2% de glucosa Δ Medio 2x-Yt ■Medio Terrific.

Tabla 8. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa *E.coli* BL21 gold (DE3) productora de SMDg.

Medio	μ (h^{-1})
LB	1.4730±0.04
LB+2%	1.4386±0.05
Terrific	1.3529±0.06
Super broth	1.4302±0.03
2x Yt	1.5258±0.12

En algunos estudios de producción de PR, se utiliza el medio complejo LB (Hansen et al., 1998; Neves-Petersen et al., 2001; Becker et al., 2005; Gordon et al., 2008; Lee & Keasling 2008; Shitu & Woodley 2009). Este medio puede ser modificado, aumentando o disminuyendo la concentración de sus componentes o agregando fuentes de carbono inmediatas tales como glucosa o glicerol, para aumentar la densidad celular final. También se eligieron medios complejos para evitar el estrés por falta de aminoácidos, ya que puede ser perjudicial para la calidad de la PR (Tsai et al., 1988; Donovan et al., 1996). Por lo anterior se usaron los siguientes medios de cultivo: LB, Terrific Broth, Super Broth, y LB complementado con 2% de glucosa. Las cinéticas de la



, mostraron que la cepa recombinante es capaz de crecer en medios complejos. La evaluación de medios se realizó únicamente con la cepa productora de SMDg. Al comparar el medio de cultivo LB con medios enriquecidos como Terrific Broth y 2x Yt, se observó que el medio LB provocó un ligero aumento en la acumulación de biomasa de entre el 5 y 10%, respectivamente (figura 18). Posteriormente se determinó cuál medio de cultivo mejoraba la acumulación la PR. La biomasa obtenida después de 24 h de cultivo fue separada por centrifugación, y se determinó que la PR se producía mayoritariamente en CI, los cuáles fueron lavados y disueltos con urea 8 M.

En la figura 19 se muestran la electroforesis de los CI solubilizados, que permitió observar que la mayor acumulación de SMDg se produjo en el medio Super Broth (carril 2, figura 19).

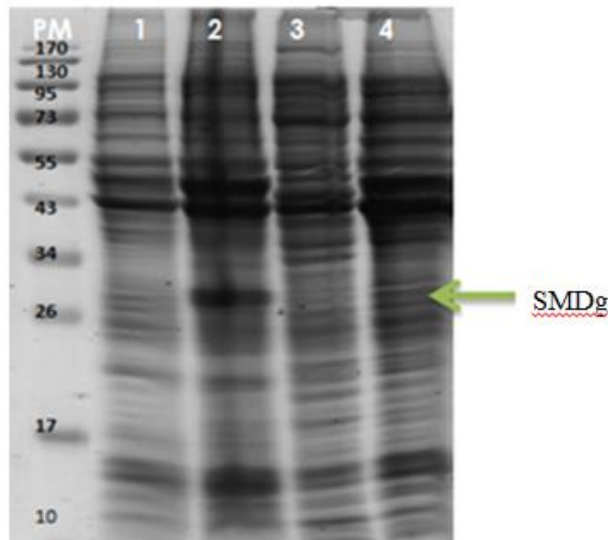


Figura 19 Electroforesis SDS-PAGE de CI purificados a partir de la biomasa al tiempo final (24 h) de la cinética de crecimiento de la proteína SMD de garrapata (~31.7 kDa) de la cepa *E. coli* BL21-Gold(DE3) en diferentes medios de cultivo. Carriles 1: crecimiento en medio 2x YT, 2: crecimiento en medio Super Broth, 3: crecimiento en medio LB con 2% de glucosa, 4: crecimiento en medio Terrific. Se utilizó el marcador Page Ruler Prestained Protein ladder, SM0671 de Fermentas. La PR se encuentra señalada por una flecha.

9.2.2 Caracterización cinética de la cepas BL21 gold (DE3) productoras de las proteínas modelo, en matraces

La caracterización cinética inicial de las cuatro cepas recombinantes se realizó en cultivos en matraces agitados Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio LB utilizando inóculos derivados del Banco de Trabajo (BT). Los cultivos fueron inducidos con IPTG (0.1mM) a las 4 h. Se comprobó que la inducción química con IPTG no afectó la velocidad de crecimiento (figura 20; Tabla 9), como ha sido reportado para otras cepas (Villar et.al. 2003).

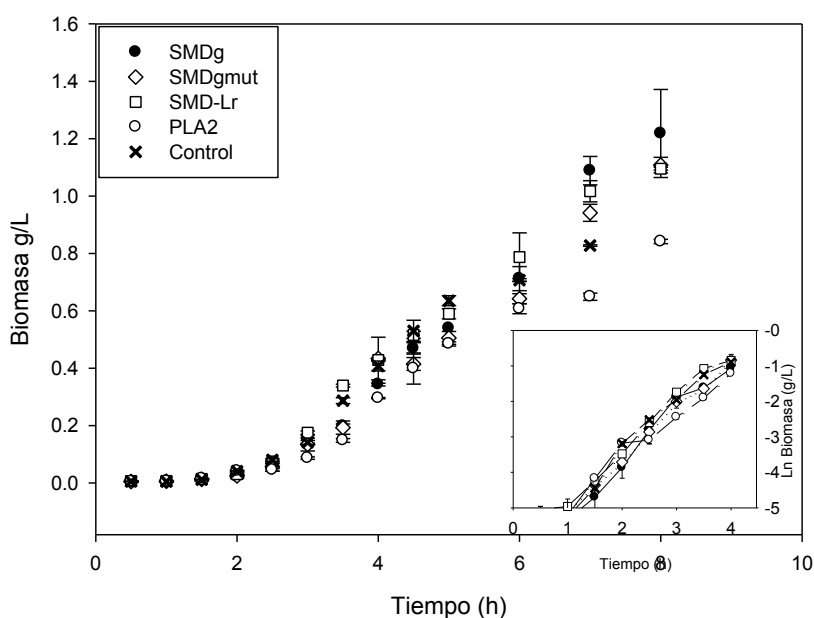


Figura 20. Comparación de las cinéticas de crecimiento en matraces (250 mL) con 50 mL de medio LB a 200 rpm e incubados a 37°C de la cepa *E. coli* BL21 gold (DE3) que expresa las 4 diferentes proteínas modelo. Se tomó como control la cepa de BL21 sin inducir. SMDg: esfingomielinasa de garrapata. SMDg mut: esfingomielinasa mutante de garrapata SMD-Lr: esfingomielinasa de *L. reclusa*. PLA2: fosfolipasa A2 de *M. laticollaris*, Control: cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) sin inducir.

En la Tabla 9 se muestran las velocidades de crecimiento (μ) calculadas en las cinéticas para los cultivos control y los inducidos. A partir de que la inducción se realizó al final de la etapa exponencial de crecimiento (5 h), no se observaron diferencias entre las velocidades de crecimiento

Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento (μ) en los cultivos control e inducidos con 0.1 mM de IPTG.

	μ (h ⁻¹)	Td (h)
SMDg	1.75±0.03	0.39
SMDgm	1.59±0.16	0.44
SMD-Lr	1.64±0.05	0.42
PLA2	1.36±0.005	0.51
BL21 gold (DE3) con el inserto de SMDg (control sin inducción)	1.37±0.05	0.50

SMDg mut: esfingomielinasa mutante de garrapata SMD-Lr: esfingomielinasa de *L. reclusa*. PLA2: fosfolipasa A2 de *M. laticollaris*, Control: cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) sin inducir.

9.2.3 Mejoramiento del proceso de purificación de CI

Con la finalidad de mejorar el proceso de extracción de PR a partir de CI, se probaron cinco protocolos encontrados en la literatura (Carrió et al., 2000; Rodríguez-Carmona et al., 2010; Patra et al., 2000). La purificación de los CI se realizó a partir de la biomasa a tiempo final de un cultivo en matraz en medio SB de *E. coli* BL2 gold (DE3) productora de SMDg. Se tomaron 4 muestras de 0.5 g de biomasa y a cada muestra se le realizó un protocolo de extracción diferente (figura 21).

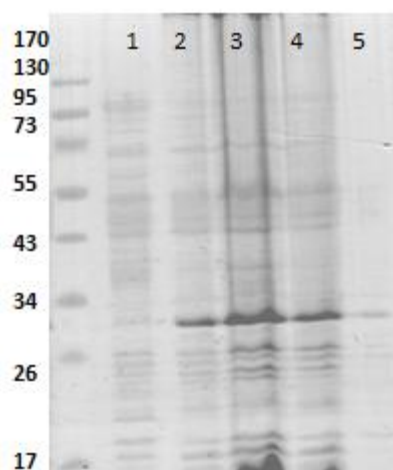


Figura 21 Electroforesis SDS-PAGE de CI purificados por diferentes protocolos a partir de la biomasa al tiempo final (24 h) de un cultivo en matraz convencional de 250 mL con 50 mL de medio de la cepa *E. coli* BL21 gold (DE3) productora de SMDg (~31.7 kDa) en medio SB. Carriles 1: Proteína total 2: Lavado con Nonidet P-40 0.1% y Triton X-100 al 0.5%; 3: Lavado con Triton al 1.0%, 4: Lavado con Nonidet p-40 al 0.1%, 5: Lavado con SDS al 1%. Se utilizó el marcador Page Ruler Prestained Protein ladder, SM0671 de Fermentas. La PR es la banda intensa en el carril 2, 3 y 4 entre el marcador de 26 y 34 kDa.

Para la recuperación de los CI, las células bacterianas fueron lisadas mediante sonicación. Posteriormente, la solución fue centrifugada. A partir del precipitado se recuperan los CI y contaminantes como las proteínas de

la envoltura celular (Rinas & Bailey 1992). Con el fin de eliminar estos contaminantes se adicionan detergentes o bajas concentraciones de agentes caotrópicos (Lilie et al., 1998; Georgiou & Valax 1999; Singh & Panda 2005). De ahí que se utilizaran tres métodos de extracción con los detergentes Nonidet-P40, Triton X-100 y SDS. Al finalizar los lavados se cuantificó el contenido de proteína de los CI, a partir de una fracción de CI solubilizada con SDS usando el kit 2D-Quant. Los CI tratados fueron solubilizados con urea 8 M, y 30 µg de proteína fue introducida en un gel SDS-PAGE para evaluar el contenido de la PR. En la figura 21 se observa que con los protocolos de lavado con Nonidet P-40 y Triton X1-100 se obtienen resultados similares. Sin embargo, al combinar ambos protocolos se logró obtener agregados con menor contaminación de proteínas citoplasmáticas. Por otra parte, el protocolo con SDS solubiliza los CI, dejando una fracción insoluble reducida, por lo que el carril 5 de la figura 21 contiene menos proteína que el resto, así que no resultó en un método apropiado para la purificación de CI. A partir de esta observación se eligió el SDS como agente para la disolución total de los CI en el proceso de cromatografía en gel para la separación de los componentes de los CI.

9.3 Caracterización cinética de *E.coli* BL21 gold (DE3) productora de las proteínas modelo en biorreactores

Las condiciones ambientales a las que están expuestos los microorganismos en cultivo sumergido tales como, pH, temperatura, oxígeno disuelto, estrés hidrodinámico, entre otros, influyen en el metabolismo, repercutiendo en el crecimiento y en la productividad (Ospina et al., 1996; Neves-Petersen et al., 2001; Gamboa-Suasnavart et al., 2011). Muchos de los procesos biotecnológicos emplean matraces para el crecimiento de microorganismos, en los que presentan diversas limitaciones en el control de las condiciones de cultivo, como el control de pH y la tensión de oxígeno disuelto (Gamboa-Suasnavart et al., 2013; Büchs 2001) y en los que se han caracterizado un buen número de CI. Es importante remarcar que la estrategia de cultivo depende del sistema de producción y el producto deseado. Por lo que hay algunos bioprocesos con altos requerimientos de TOD, mientras que otros necesitan un control estricto para lograr una adecuada transferencia de oxígeno y por lo tanto buenos rendimientos de producto (Çalık et al., 1994; 1998; 2000). De igual manera el control de pH es determinante en la obtención de biomasa y PR (Strandberg et al., 1987; Ospina et al., 1996; Neves-Petersen et al., 2001).

Olsen y colaboradores (2002) reportaron que el pH intracelular de *E. coli* (7.4 - 7.6) permanece constante ante cambios de pH extracelular en un rango de 5.5 a 8.5. Esto es debido a que la bacteria posee mecanismos para regular la homeostasis (Small et al., 1994; Foster 2004; Castanie-Cornet et al., 1999; Georgiou et al., 1988). Dichos mecanismos consumen energía y cuando las células están cercanas a los límites de pH de su rango de crecimiento, la transición en el pH intracelular es abrupta y puede llevar a una pérdida parcial en la homeostasis (Slonczewski et al., 2009).

Por lo anterior se planteó determinar si el control de pH afectaba la densidad celular, así como la productividad de PR y las características de los CI en los que se agregaban las proteínas modelo. Por lo que se realizaron cultivos en biorreactor de 1 L (Applikon, BV) de las cepas de *E. coli* BL21 Gold (DE3)

productoras de las 4 proteínas modelo, con el objetivo de estudiar el efecto del pH controlado a 7.5 y sin control de pH, y manteniendo controladas la temperatura y la TOD. Los cultivos se indujeron con IPTG (0.1 mM) al inicio de la fase estacionaria (4 h), para iniciar la producción de las proteínas modelo.

9.3.1 Cinética de crecimiento de la cepa productora de esfingomielinasa de garrapata

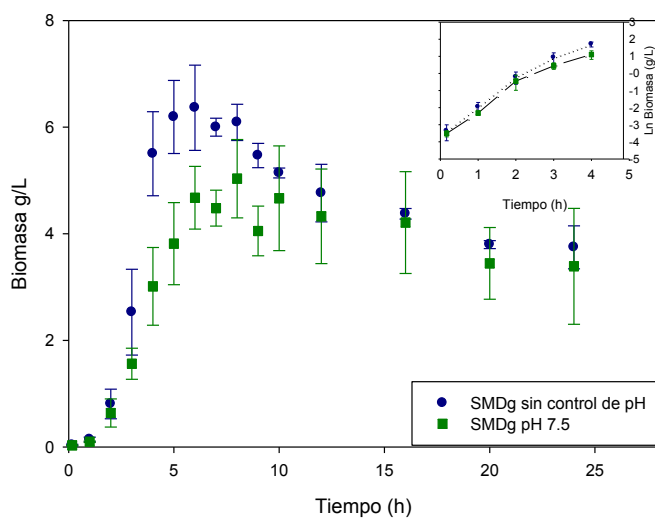


Figura 22. Cinéticas de crecimiento en biorreactor en 600 mL de medio SB de la cepa *E. coli* BL21-Gold (DE3) productora de SMDg, realizadas a 37°C con $TOD \geq 30\%$, en condiciones controladas a pH 7.5 y sin control de pH. La inducción se hizo con IPTG 0.1 mM a las 4 h de cultivo. En el inserto se muestra la fase exponencial en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras representan la desviación estándar.

9.3.2 Cinética de crecimiento de la cepa productora de esfingomielinasa D mutante de garrapata

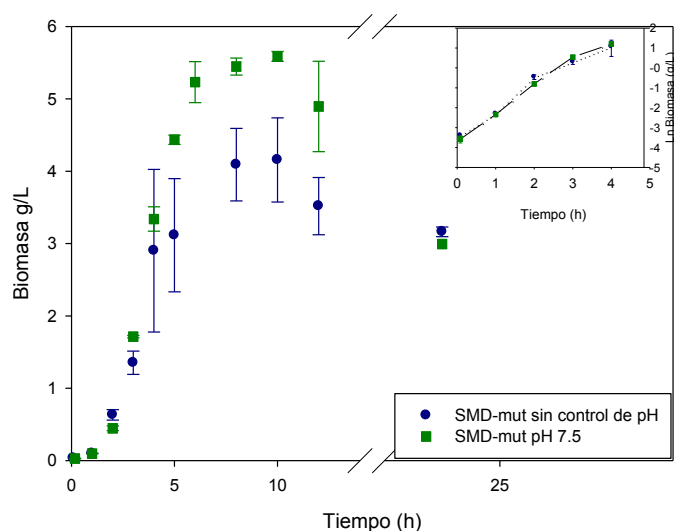


Figura 23. Cinética de crecimiento en biorreactor en 600 mL de medio SB de la cepa *E. coli* BL21 Gold (DE3) productora de SMDgm realizados a 37°C con $TOD \geq 30\%$, en condiciones controladas a pH 7.5 y sin control de pH. La inducción se hizo con IPTG 0.1 mM a las 4 h de cultivo. En el inserto se muestra la fase exponencial en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

9.3.3 Cinética de crecimiento de la cepa productora esfingomielinasa D de *L. reclusa*

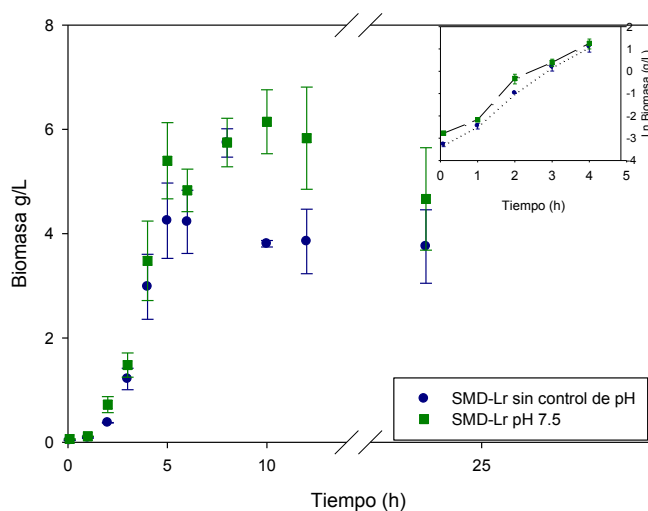


Figura 24. Cinética de crecimiento en biorreactor en 600 mL de medio SB de la cepa *E. coli* BL21Gold (DE3) productora de SMD-Lr, realizados a 37°C con $TOD \geq 30\%$, en condiciones controladas a pH 7.5 y sin control de pH. La inducción se hizo con IPTG 0.1 mM a las 4 h de cultivo. En el inserto se muestra la fase exponencial en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

9.3.4 Cinética de crecimiento de fosfolipasa A2 de *Micrurus laticollaris*

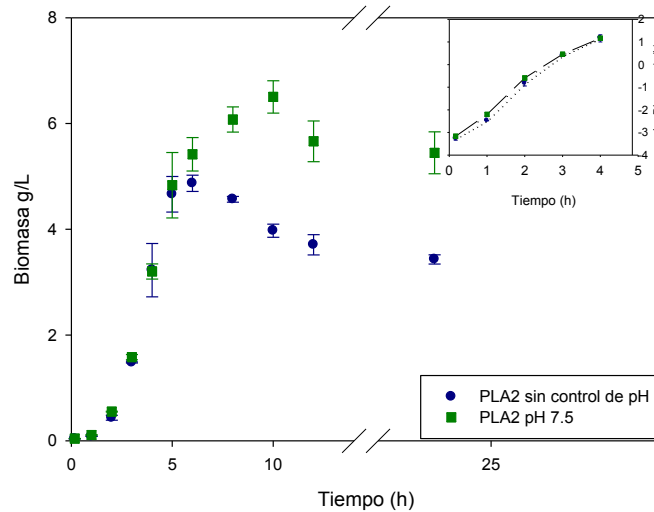


Figura 25. Cinética de crecimiento en biorreactor en 600 mL de medio SB de la cepa *E. coli* BL21 Gold (DE3) productora de PLA2, realizados a 37°C con $TOD \geq 30\%$, en condiciones controladas a pH 7.5 y sin control de pH. La inducción se hizo con IPTG 0.1 mM a las 4 h de cultivo. En el inserto se muestra la fase exponencial en escala logarítmica. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

En las Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 se muestran las diferentes cinéticas de crecimiento de las 4 proteínas modelo. La menor densidad celular se obtuvo en los cultivos sin control de pH productores de SMDgm, SMD-Lr y PLA2 con respecto a los controles realizados a pH 7.5 (Figura 23, Figura 24, Figura 25). Esto podría ser atribuido a variaciones propias de cada cultivo provocadas por la PR producida en conjunto con la pérdida de homeostasis causada por la variación en el pH. Ambas estrategias de cultivo también causaron la disminución en la densidad celular en los tiempos finales de cultivo de las 4 cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL2-Gold (DE3) productoras de las proteínas modelo (Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25).

La biomasa máxima (X_{max}) alcanzada en la cinética de crecimiento de la cepa productora de SMDg (figura 22) fue de 6.2 g/L bajo condiciones sin control. Mientras bajo condiciones controladas se alcanzaron 4.3 g/L. La velocidad de crecimiento en la etapa exponencial en ambas condiciones fue similar (tabla 10). La cepa productora de SMDgm (figura 23) presentó una cinética de crecimiento alcanzando una X_{max} de 5.58 g/L a las 10 h de cultivo en condiciones sin control de pH. Bajo condiciones controladas de pH se alcanzó una X_{max} de 4.16 g/L en el mismo tiempo. De forma similar la X_{max} alcanzada por la cepa productora de SMD-Lr fue de 4.12 g/L en condiciones sin control, después de 10 h de cultivo, en contraste, en los cultivos con pH controlado se alcanzó una X_{max} de 6.14 g/L en la quinta hora de cultivo (figura 24). La cepa productora de PLA2 (figura 25) presentó un comportamiento distinto a las cepas productoras de SMD ya que la cinética realizada bajo condiciones controladas de pH, alcanzó una X_{max} de 6.15 g/L después de 10 h de cultivo siendo

mayor que la X_{max} alcanzada bajo condiciones sin control de pH (4.78 g/L). En la cinética sin control después de la inducción se observó una rápida disminución de la biomasa.

En la tabla 10 se presentan las velocidades específicas de crecimiento de los 4 cultivos en sus dos condiciones de cultivo. Se puede observar que en los cultivos sin control de pH la velocidad específica de crecimiento disminuye levemente. En general, en las cinéticas realizadas sin control de pH la fase exponencial de crecimiento se presentó a pH entre 6 y 7.5. Es posible que la ligera disminución de la velocidad de crecimiento sea provocada por el gasto metabólico causado por el bombeo de protones fuera del espacio intracelular para mantener la homeostasis (Slonczewski et al., 1981; Foster, 2004; Padan et al., 2005).

Tabla 10. Comparación de velocidades de crecimiento de las cepas *E. coli* BL21Gold (DE3) productoras de las cuatro proteínas modelo.

Proteína recombinante	μ (h^{-1})	
	Sin Control de pH	pH 7.5
SMDg	1.34±0.05	1.36±0.09
SMDgm	1.35±0.13	1.44±0.01
SM-D de <i>L. reclusa</i>	1.03±0.11	1.07±0.08
PLA2 de <i>M. laticollaris</i>	1.22±0.04	1.32±0.04

9.3.5 Comparación de variación del pH durante los cultivos sin control de pH

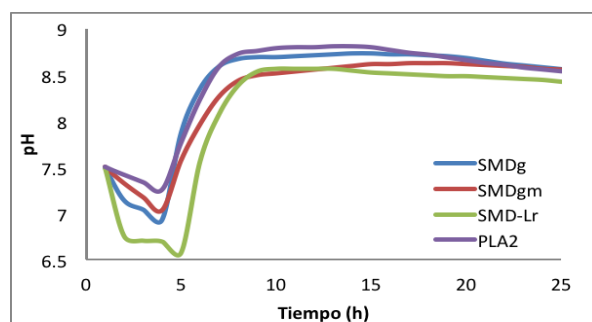


Figura 26. Cambio del pH con respecto al tiempo en cultivos en biorreactor en 600 mL de medio SB de *E. coli* BL21 Gold (DE3) productoras de las 4 proteínas modelo realizados a 37°C con $TOD \geq 30\%$ en medio SB, en condiciones sin control de pH.

La variación del pH debido al metabolismo de cada cepa se presenta en la figura 26. Se observó que en todos los cultivos sin control de pH, éste varió con respecto al tiempo. En las primeras horas disminuyó de 7.5 a aproximadamente 6.5 ± 0.2 , y después de 3 h comenzó a incrementar hasta alcanzar aproximadamente 8.5 ± 0.4 después de 5 h. La inducción se realizó cuando el pH se encontraba alrededor de 7.4. A las 7 h cuando los cultivos alcanzan el pH más básico, se observó la disminución en la densidad celular, lo que puede ser asociado a una necrosis celular debida al estrés, provocada por la variación del pH por arriba de 8.5, el cual se ha demostrado como un punto limitante para alcanzar la homeostasis celular (Slonczewski et al., 2009).

9.4 Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los diferentes cultivos

Durante la obtención de PR, la productividad depende de la concentración de biomasa y de las condiciones de cultivo las cuales también pueden afectar la calidad de la PR (Shojaosadati et al., 2008; Jana & Deb 2005; Strandberg & Enfors, 1991; Ospina et al., 1996). Investigaciones recientes sobre agregación y formación de CI sugieren que algunas condiciones de cultivo favorecen la producción de PR de forma soluble o agregada (González-Montalbán et al., 2007). Particularmente, se ha propuesto que el pH ácido favorecía la agregación y formación de CI en cultivos en matraces agitados en comparación con cultivos en biorreactor con condiciones controladas (Strandberg et. al. 1987; Strandberg & Enfors, 1991). Para evaluar el efecto del control de pH sobre la solubilidad de las proteínas modelo se comparó la producción de PR en la fracción soluble y en los CI en dos condiciones de cultivo: con control de pH (7.5) y sin control de pH. Las comparaciones se realizaron a partir de la biomasa recolectada a las 24 h de cultivo. La proteína soluble fue obtenida a partir del lisado celular y los CI fueron obtenidos como se especificó en la metodología. Las proteínas recuperadas fueron separadas por cromatografía en gel, cargándose en cada carril 30 µg. La Figura 27 muestra la relación de PR obtenida tanto en la fracción soluble como agregada en las condiciones de cultivo estudiadas.

9.4.1 Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) que expresa esfingomielinasa D de garrapata

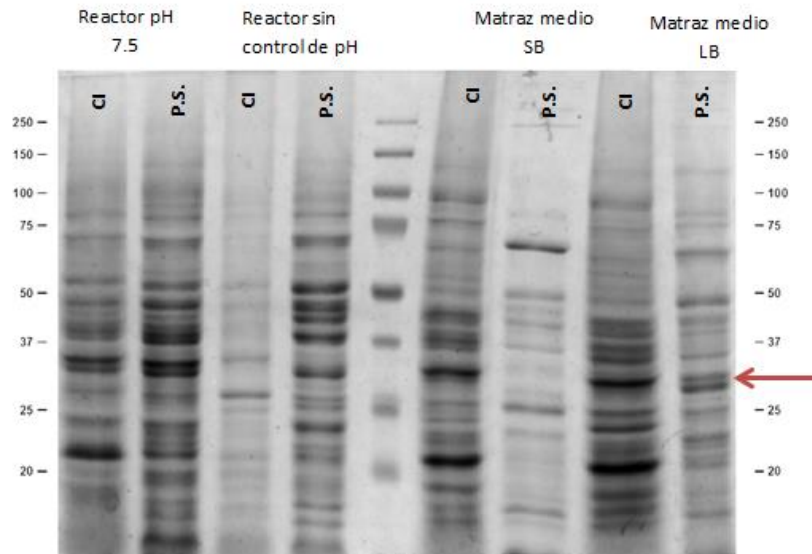


Figura 27. Electroforesis SDS-PAGE de Proteína soluble (P.S.) y CI purificados a partir de la biomasa colectada a las 24 h del cultivo en biorreactor de la cepa productora de SMDg (~31.7 kDa) y comparada con la PS y CI obtenidos de la biomasa colectada a partir de cultivos en matraces de 250 con 50 mL de medio SB o LB a las 24 h. Los CI fueron disueltos en SDS. La flecha marca la banda correspondiente a la SMDg.

En la figura 27 se observa la comparación del contenido de proteínas de la fracción soluble y de los CI obtenidas a las 24 h en los cultivos productores de SMDg, en matraz y biorreactor. En la separación electroforética de las fracciones soluble y de CI de SMDg (figura 27), la banda correspondiente a la PR se encuentra en un peso de ~32 kDa. Además se pueden observar diferencias en la composición proteica de los CI producidos en biorreactor en condiciones sin control y con pH controlado.

En términos de la productividad de PR en los cultivos en biorreactores, en la fracción soluble de SMDg fue favorecida en los cultivos con pH 7.5, lo que se corroboró mediante inmunodetección (figura 28). Como se puede observar en la figura 28 y 29, los CI producidos en condiciones controladas de pH a las 24 h se encuentran más enriquecidos en cuanto a la PR y menor cantidad de contaminantes. La diferencia en la composición de contaminantes y de SMDg en las condiciones controladas y sin control de pH, puede deberse a variaciones en el citoplasma mientras *E. coli* alcanza la homeóstasis de pH (entre 7.4 a 7.8) (Bowden & Georgiou, 1990; Olsen et al., 2002). Para lo cual suceden una serie de cambios a nivel metabólico que favorecen el aumento de la concentración de protones en el citoplasma como la producción de metabolitos ácidos y el aumento en la actividad de transportadores de protones que favorecen su importe y retención (Slonczewski et al., 1981; Padan et al., 2005; Martínez et al., 2012). Sin embargo, cambios por arriba de 8 afectan la homeostasis del citoplasma (Martínez et al., 2012). De cualquier forma la homeostasis se alcanza en minutos después de causar estrés ácido o básico en bacterias neutrófilas (Martínez et al., 2012; Wilks and Slonczewski 2007). Cabe remarcar que la síntesis de proteínas ocurre en tiempo similar (Yu et al., 2006). Entonces la variación de pH en el cultivo sin control permitiría suponer la formación de microambientes menos básicos comparados con el exterior. Esto en las zonas cercanas a los antiporters, así como en donde se producen protones o aminoácidos, que pueden modificar la estructura secundaria de proteínas endógenas y PR, así como la agregación y el contenido de los CI, en conjunto con una respuesta al estrés por la variación del pH (Maurer et al., 2005).

9.4.1.1 Identificación de la proteína Esfingomielinasa D de garrapata por Western Blot

Se realizó la identificación de la proteína SMDg en la fracción protéica soluble y en los CI de la cepa *E. coli* B121 Gold (DE3) producidos en biorreactor, mediante western blot. En el inmunoensayo (figura 28) se identificó la PR producida en biorreactor a pH 7.5 en la fracción soluble y en CI, y solo se observó en la fracción insoluble de los cultivos sin control de pH.

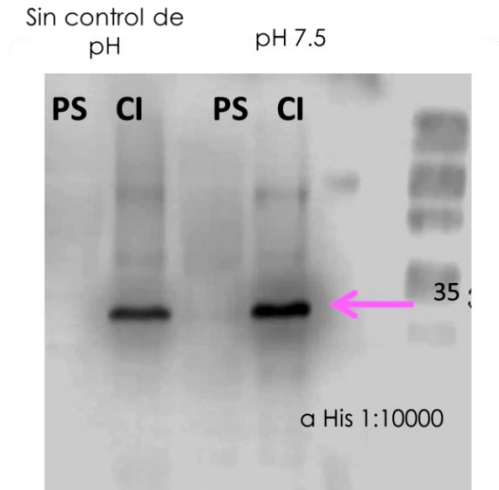


Figura 28. Inmunodetección de SMDg en la fracción soluble y CI obtenidos de los cultivos de BL21 Gold (DE3) de *E. coli*. Ambas fracciones fueron obtenidas a las 24 h de cultivo. La flecha marca la detección de la proteína y la banda marcada con 35 refiere ese peso molecular.

9.4.2 Análisis de la composición proteica de los cuerpos de inclusión de esfingomielinasa D de garrapata cosechados a diferentes tiempos de cultivo en ambas estrategias de cultivo

En la figura 30 se muestra el rendimiento del SMDg en CI (SMDg / CI), cuantificado por densitometría a partir de los geles de separación electroforética de CI cosechados a diferentes tiempos después de la inducción (Figura 29). Se observó un enriquecimiento gradual conforme pasa el tiempo después de la inducción de SMDg en los CI producidos a pH controlados (0.16 ± 0.01 g SMDg / ji). Por el contrario en los CI de los cultivos sin control de pH se observó una disminución en el rendimiento de SMDg (0.09 ± 0.01 gSMDg / gCI). Estos datos demostraron que la acumulación de PR se produce preferentemente bajo condiciones controladas de pH (figuras 29 y 30).

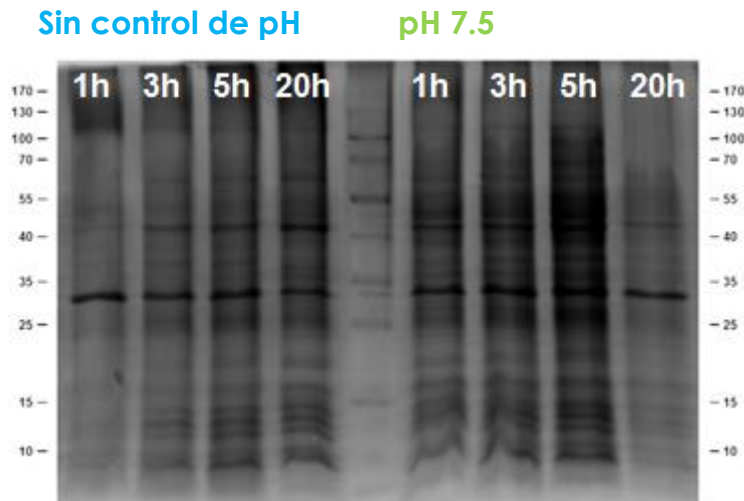


Figura 29. Electroforesis SDS-PAGE de CI purificados producidos en biorreactor de la cepa productora de SMDg (~32 kDa) cosechados a diferentes tiempos de cultivo (1 h, 3 h, 5 h y 20 h después de la inducción).

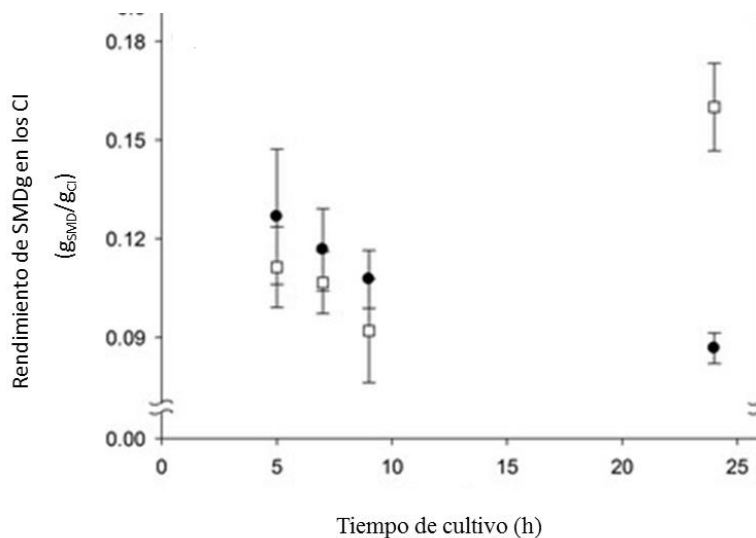


Figura 30. Relación de proteína recombinante en los CI de SMDg producidos en biorreactor en ambas estrategias de cultivo (sin control de pH y pH 7.5), cosechados a diferentes tiempos después de la inducción. ●= CI producidos sin

9.4.3 Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) que expresa esfingomielinasa D mutante de garrapata

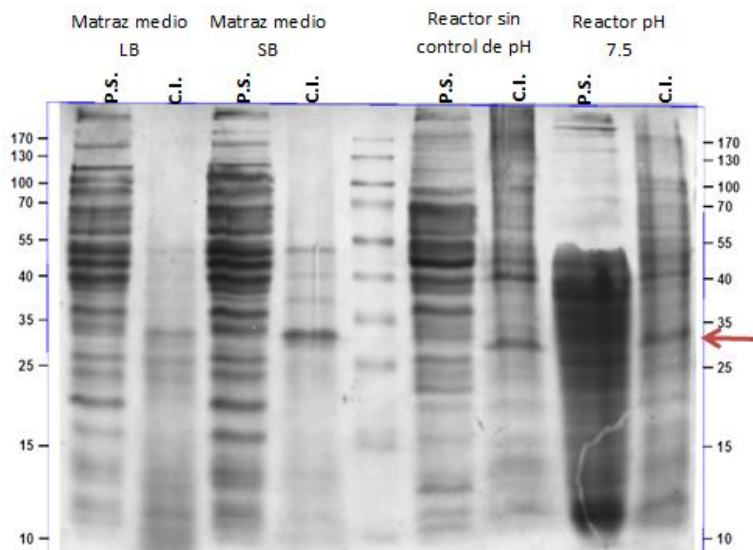


Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de Proteína soluble (P.S.) y CI purificados a partir de la biomasa colectada a las 24 h del cultivo en biorreactor de la cepa productora de SMDg (~32.3 kDa) y comparada con la P.S. y CI obtenidos de la biomasa colectada a partir de cultivos en matraces de 250 con 50 mL de medio SB o LB a las 24 h. Los CI fueron disueltos en SDS.

En la figura 31 se muestra el perfil electroforético de las fracciones de proteína soluble y de CI de SMDgm obtenidos en matraz y biorreactor. Como se puede observar la SMDgm se acumuló preferentemente en CI en todas las condiciones probadas. En los cultivo en matraz se observó un enriquecimiento en los CI obtenidos en el medio SB. Por otra parte, en el perfil electroforético de la fracción de la PR soluble no permitió la correcta cuantificación, además de que se apreció en repetidas ocasiones. Particularmente, se observó SMDgm en la fracción de CI de los cultivos en biorreactor en ambas estrategias de pH.

9.4.4 Análisis de la composición proteica de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de *E. coli* BL21-Gold (DE3) que expresa esfingomielinasa D de *Loxocles reclusa*

Al igual que en los geles anteriores, la separación de las fracciones proteicas de los cultivos de SMD-Lr resultaron en diferencias entre la relación de PR soluble e insoluble (Figura 32). De manera similar a los cultivos con SMDg (Figura 27), se observa una mayor producción de PR en CI en los cultivos en matraz (28.9% en medio SB) con respecto a la obtenida en biorreactor (5.0% y 22.2% en cultivo a pH 7.5 y sin control de pH, respectivamente; tabla 11). Asimismo, podemos observar que la composición proteica de los CI obtenidos en biorreactor es diferente, obteniendo CI más enriquecidos de PR en cultivos donde el pH fue controlado.

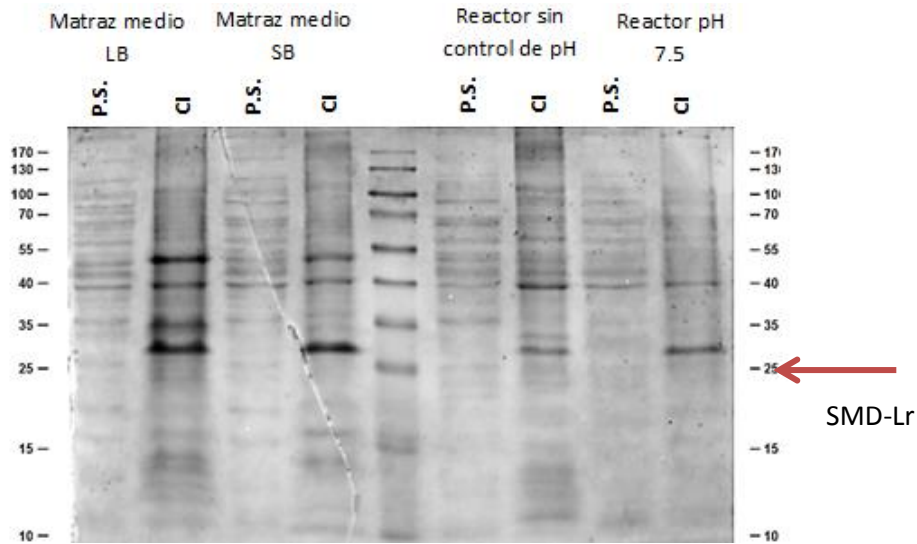


Figura 32. Electroforesis SDS-PAGE de Proteína soluble (P.S.) y CI purificados a partir de la biomasa colectada a las 24 h del cultivo e biorreactor de la cepa productora de SMD-Lr (~31.2 kDa) y comparada con la PS y CI obtenidos de la biomasa colectada a partir de cultivos en matraces de 250 con 50 mL de medio SB o LB a las 24 h. Los CI fueron disueltos en SDS.

9.4.5 Separación electroforética de la fracción soluble y cuerpos de inclusión de los cultivos de *E. coli* BL21 gold (DE3) que expresa fosfolipasa A2 de *M. laticollaris*

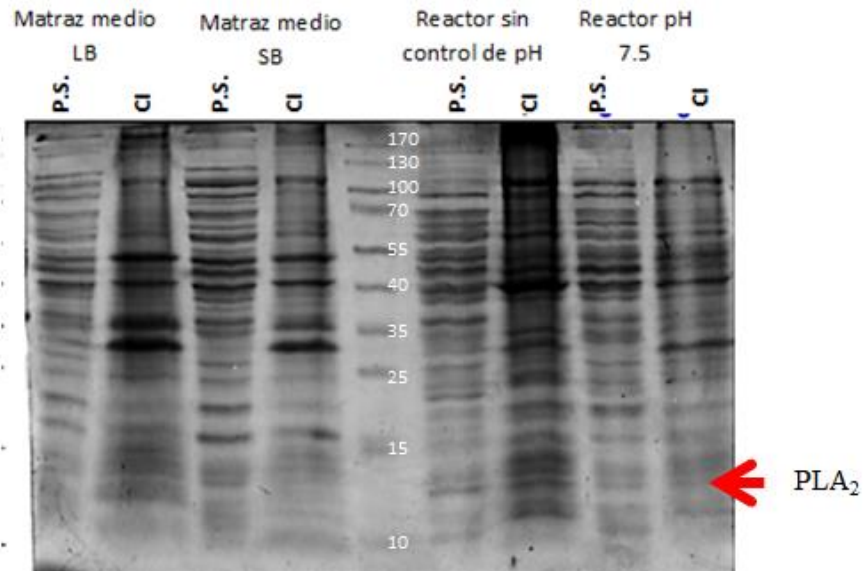


Figura 33. Electroforesis SDS-PAGE de Proteína soluble (P.S.) y CI purificados a partir de la biomasa colectada a las 24 h del cultivo e biorreactor de la cepa productora de PLA2 (~14.07 kDa) y comparada con la PS y CI obtenidos de la biomasa colectada a partir de cultivos en matraces de 250 con 50 mL de medio SB o LB a las 24 h. Los CI fueron disueltos en SDS.

La PR PLA2 de *M. laticollaris* presenta un peso teórico de ~14.07 kDa. Como se puede observar en la figura 33, la banda correspondiente a la PLA2 es poco clara, por lo que se puede afirmar que comparada con las clonas productoras de esfingomielinasas, es la de menor productividad. En este caso la relación de PR en forma soluble e insoluble es similar en los cultivos en matraces (tabla 11. Anexo 1). Aparentemente en los cultivos en biorreactor, la productividad de PLA2 en CI no fue modificada por las condiciones de pH en el medio. Sin embargo, en términos de la proteína soluble producida, los cultivos sin control de pH permiten obtener mayor cantidad de PR (5.0%), como se aprecia en la Figura 33.

9.5 Caracterización morfológica de cuerpos de inclusión en cultivos de *E. coli* BL21 Gold (DE3) productores de esfingomielinasa D de garrapata, mediante microscopía de transmisión electrónica

Aunque poco se ha reportado sobre cómo las condiciones de cultivo afectan la agregación de los CI de forma cinética, nosotros evaluamos la formación de CI dentro de las células en diferentes tiempos de cultivo, con el objetivo visualizar el tamaño de los CI *in vivo*. Para lo cual se realizó microscopía de transmisión electrónica con células completas productoras de SMDg a partir de la biomasa recolectada a las 5 y 24 h (1 y 20 h después de la inducción) de los cultivos realizados en biorreactor. En la figura 34 A y B en el lado izquierdo, se muestran micrografías de *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformadas sin inducir. Se observan células con morfología de bacilo con un tamaño de aproximadamente 0.5 μm de ancho por 3 μm de largo. Ya que los cultivos no fueron inducidos no se observa la formación de CI.

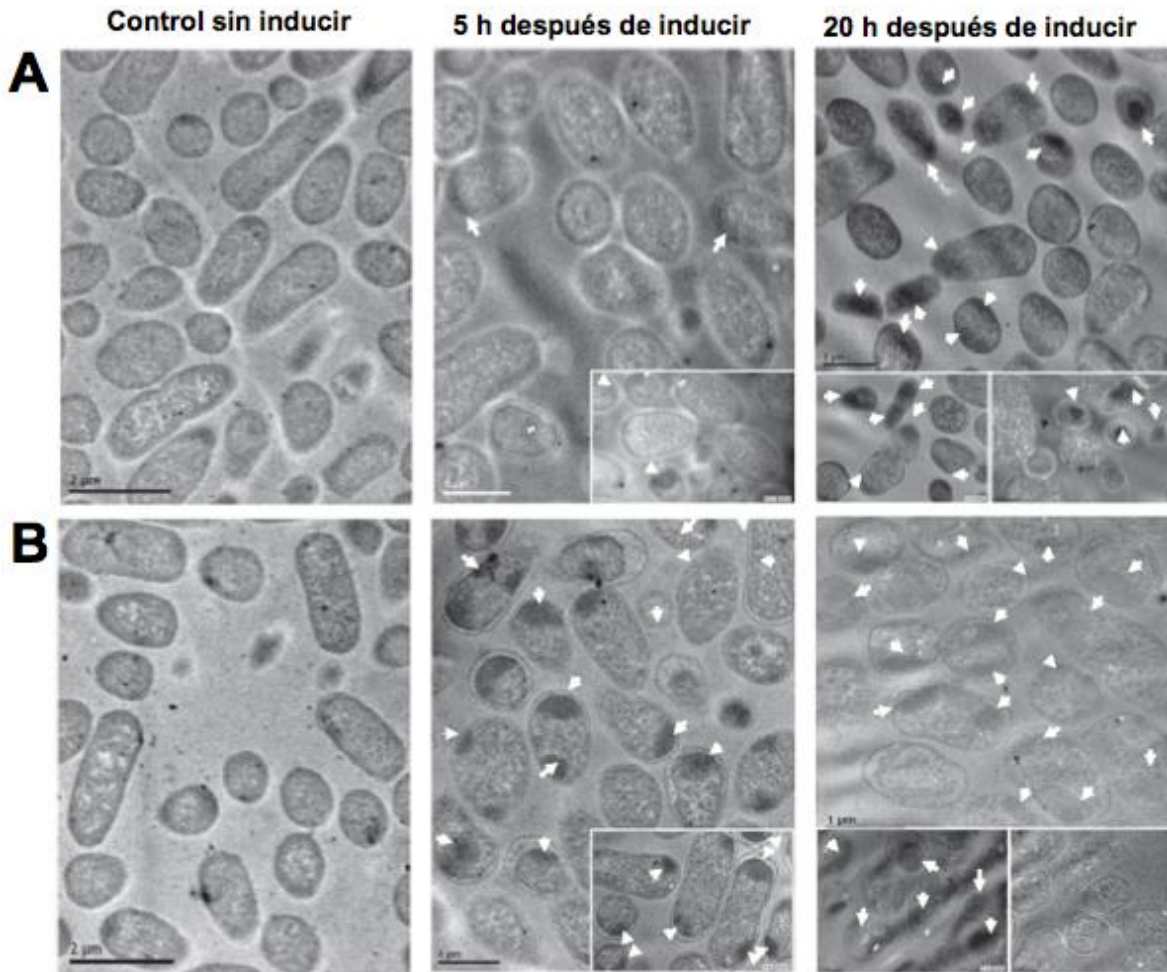


Figura 34. Cuadro comparativo de micrografías de transmisión electrónica de *E. coli* productora de SMDg. A. Micrografías de *E. coli* BL21 Gold (DE3) cultivadas bajo pH controlado a 7.5. B. Micrografías de *E. coli* BL21 Gold (DE3) cultivadas sin control de pH. Células cosechadas antes de inducir (izquierda) (la barra representa 2.0 μm), 5 h después de la inducción (centro), y 20 h después de inducir (derecha) (las barras representan 0.5 y 1.0 μm) Los CI están marcados con flechas. (Tomada de Castellanos-Mendoza et al., 2014).

Como se puede observar en la figura 34 la variación en el pH externo provoca la modificación de la velocidad de agregación. Se observó que las condiciones sin control de pH favorecieron la formación de agregados más grandes (≥ 500 nm). En los cultivos sin control de pH después de 5 h de la inducción, se observó que alrededor de 61% de células contenían al menos un CI (figura 34A, centro). Por el contrario, a pH 7.5 la formación de CI fue lenta ya que a las 5 h sólo 7% de las células presentaron CI (figura 35B). Después de 20 h de inducción, cerca del 58% y 31% de células presentaron al menos un CI en condiciones sin control y con control de pH, respectivamente. Respecto a los tamaños observados, 65% de las células crecidas en condiciones sin control produjeron CI ≥ 500 nm, mientras el mismo porcentaje de células crecidas en condiciones controladas de pH 7.5, fueron < 500 nm. Se ha reportado que la velocidad de agregación es un factor que repercute en la actividad y composición de los CI. de Groot & Ventura (2006), sobre-expresaron 20

mutantes puntuales de la proteína GFP cuyas mutaciones repercutían en la velocidad de agregación y en la actividad (intensidad de fluorescencia) de los CI, concluyendo que la mayor actividad se observó en los CI sintetizados lentamente (de Groot & Ventura 2006). Esta información es congruente con las características de los CI formados en las condiciones sin control de pH, a una mayor velocidad de agregación, los cuales contienen una mayor cantidad de proteínas citoplasmáticas dentro de los CI (figura 30) y son de mayor tamaño (figura 35B). En contraparte, los CI producidos a pH 7.5 tienen menor cantidad de proteínas exógenas, debido probablemente, a una mayor especificidad causada por una agregación más lenta. Estos resultados sugieren que variaciones en el pH favorecen la velocidad de formación de los CI, debido posiblemente a variaciones en la protonación de los aminoácidos de la PR, haciendo que sean más propensos a agregarse. En la figura 35 se muestran los CI obtenidos en diferentes tiempos después de la inducción. Se puede observar que los CI obtenidos de los cultivos bajo condiciones controladas de pH son de menor tamaño que los producidos bajo condiciones sin control. Aunque en los CI se observan algunos CI de gran tamaño, esto aparentemente son formados por pequeños CI agregados.

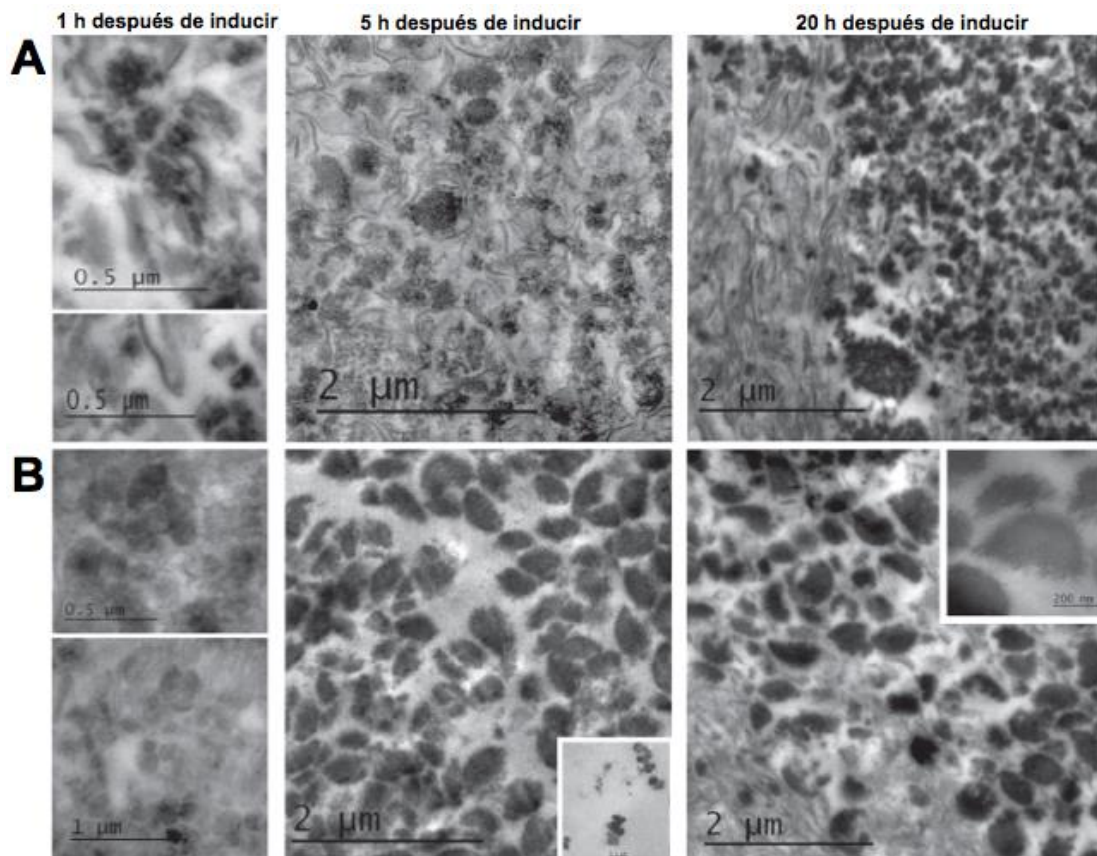


Figura 35. Micrografía de CI purificados de cultivos productores de SMDg. A, CI de cultivos con control de pH. B, CI de cultivos sin control de pH. Izquierda, CI obtenidos después de 1 h de inducción (barras de escala de 0.5 y 1.0 μm). Centro, CI obtenidos después de 5 h de inducción (barra de escala 2.0 μm; inserto B 0.1 μm). Derecha, CI obtenidos después de 20 h de inducción (barra de escala de 2.0 μm; inserto B 200 nm).

9.6 Caracterización fisicoquímica de los cuerpos de inclusión

9.6.1 **Determinación de la estructura secundaria de los CI mediante ensayos de unión a colorantes amiloidogénicos**

Recientemente en algunos bioprocesos de PR se han identificado algunos CI que contienen proteínas con estructura similar a la nativa y otra parte está estructurada en dominios β laminares del tipo amiloide (Ventura & Villaverde 2006). Debido a su plegamiento amiloide los CI tienen afinidad a colorantes como el Rojo Congo (RC) $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ (Glenner et al., 1972) y la Tioflavina-T (Th-T) $C_{17}H_{19}ClN_2S$ (LeVine 1993), por lo que se ha usado éstos colorantes para su estudio. La Th-T ha sido descrita como un marcador específico para la conformación laminar de la estructura amiloide uniéndose particularmente a la superficie de canales formados por hojas- β entrecruzadas (Naiki et al., 1989; LeVine, 1993; Biancalana et al., 2008). Cuando este colorante se une a fibrillas amiloides hay un incremento en la fluorescencia de Th-T con respecto al colorante solo (LeVine 1993). Por otra parte, se ha sugerido que el RC se une a las estructuras fibrilares en conformación β -plisada (Peternel et al., 2008). El RC presenta una absorbancia máxima a 490 nm que se recorre a rojo hasta 550-570 nm una vez que se une al material amiloide (Glenner et al., 1972). Entonces para determinar la presencia de estructura amiloide en los CI de SMDg se evaluó la unión de los CI purificados con ambos colorantes. Esto para poder comparar de forma cinética la estructuración de CI de SMDg en las diferentes condiciones de cultivo.

Los CI del cultivo sin control de pH mostraron un aumento gradual en la intensidad de fluorescencia en el ensayo de unión a Th-T (figura 36A). Esto indica que la cantidad de estructura amiloide aumentó a lo largo del tiempo de cultivo alcanzando su máximo a las 24 h (20 h después de la inducción).

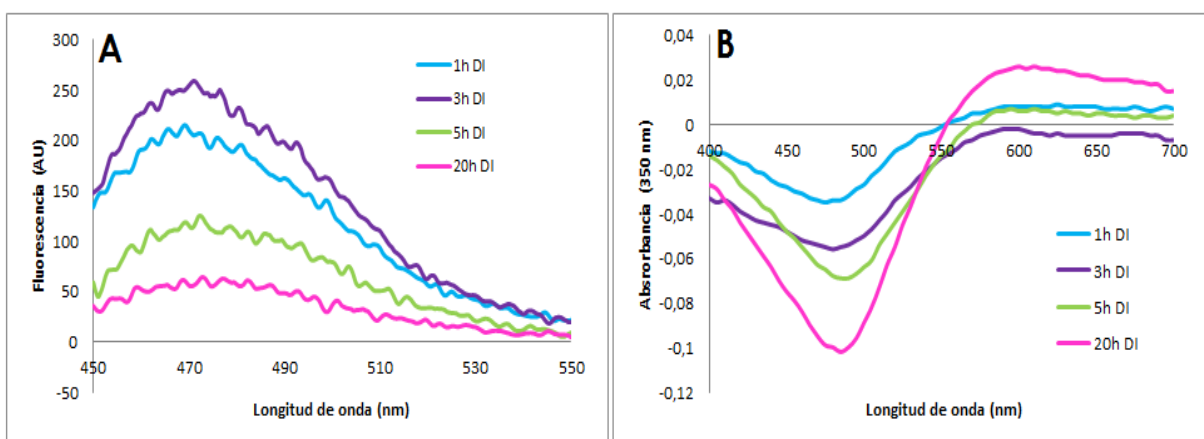


Figura 36. Unión a colorantes amiloidogénicos de CI de SMDg cultivados sin control de pH, cosechados a diferentes tiempos después de la inducción. A) Espectro de fluorescencia de CI en presencia de Tioflavina- T. B) Espectro de absorbancia de CI en presencia de Rojo Congo.

Por otro lado, en los cultivos con pH controlado, los CI mostraron una mayor intensidad de fluorescencia al unirse a la Th-T a las 3 h y 5 h después de la inducción. Después de este tiempo la unión al colorante fue disminuyendo progresivamente. Sin embargo, estos CI que mostraron un ligero aumento en la afinidad por el colorante RC conforme aumenta el tiempo de cultivo después de la inducción (figura 37B). Esto, aunado a los resultados obtenidos por microscopía electrónica, donde se observan CI de mayor tamaño a las 5 h de cultivo (figura 34A centro) y que van disminuyendo su medida respecto al tiempo después de la inducción (figura 34A derecha). Estos datos sugieren que hay una compactación de los agregados que ocasiona la pérdida de estructura β laminar o bien que dificulta la interacción entre las fibras amiloides y la Th-T.

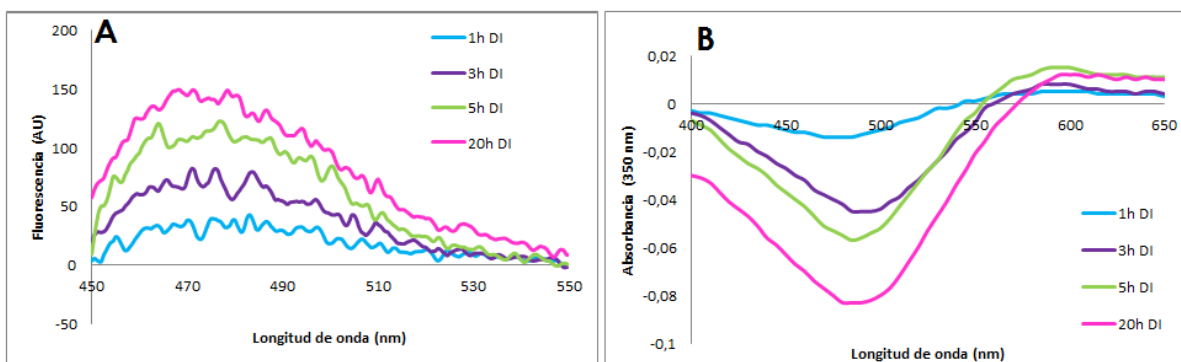


Figura 37. Unión a colorantes amiloidogénicos de CI de SMDg cultivados a pH 7.5, cosechados a diferentes tiempos después de la inducción. A) Espectro de fluorescencia de CI en presencia de Th-T. B) Espectro de absorbancia de CI en presencia de Rojo Congo.

Por otro lado, se evaluó la unión de los otros CI modelo obtenidos a las 24 h después de la inducción con los colorantes Th-T y RC. Los CI de SMDgm obtenidos en las dos condiciones de cultivo presentaron un comportamiento diferente respecto a la unión de colorantes. Los CI producidos sin control de pH incubados con Th-T mostraron un mayor grado de estructuración, reflejado en una mayor intensidad de fluorescencia (figura 38 A). De igual modo al incubarlos con RC se observó un desplazamiento en la absorbancia de 490 nm a 550 nm (Klunk et al., 1989), siendo mayor la absorbancia para éstos CI comparados con los producidos en condiciones controladas de pH (figura 38B), sugiriendo su composición amiloide.

Interesantemente los valores de intensidad de fluorescencia en el ensayo de Tioflavina T en los CI de SMDg y SMDgm es similar (~50 A.U.) a las 24 h de cultivo tanto en los CI producidos a pH 7.5 como en los producidos sin control de pH (~150AU). Esto indica que para el caso de la esfingomielinasa D de garrapata *B. microplus*, las mutaciones puntuales no tienen un efecto directo en la estructuración amiloide de los CI.

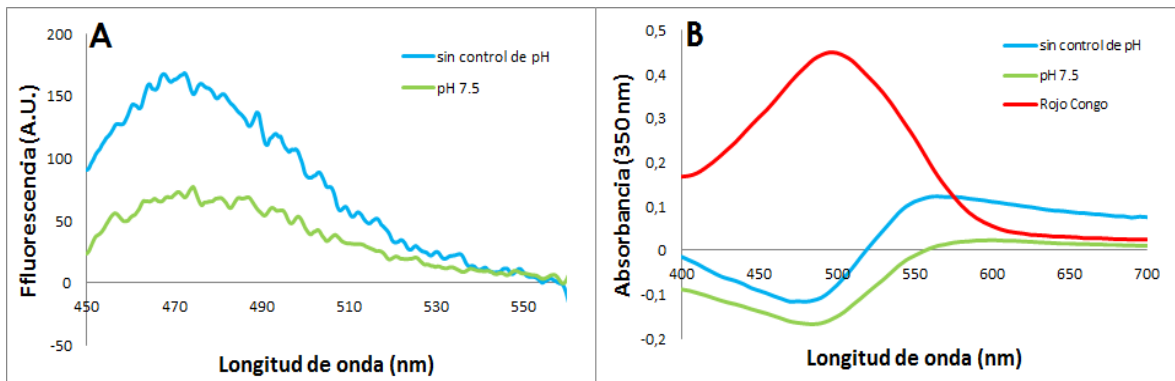


Figura 38. Unión de colorantes a CI de SMDgm cosechados a las 24 h en ambas condiciones de cultivo. A) Espectro de fluorescencia de CI en presencia de Th-T. B) Espectro de absorbancia de CI en presencia de Rojo congo.

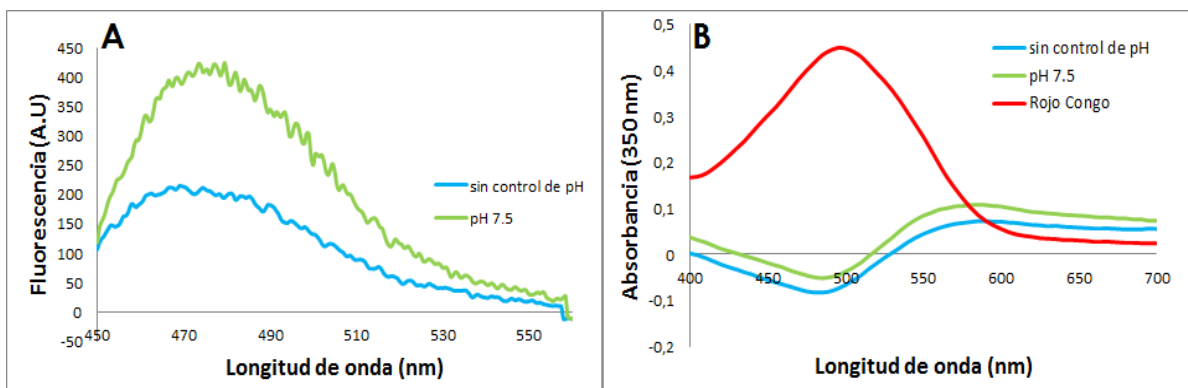


Figura 39. Unión de colorantes a CI de SMD de *L. reclusa* cosechados a las 24 h en ambas condiciones de cultivo. A) Espectro de fluorescencia de CI en presencia de Th-T. B) Espectro de absorbancia de CI en presencia de Rojo congo.

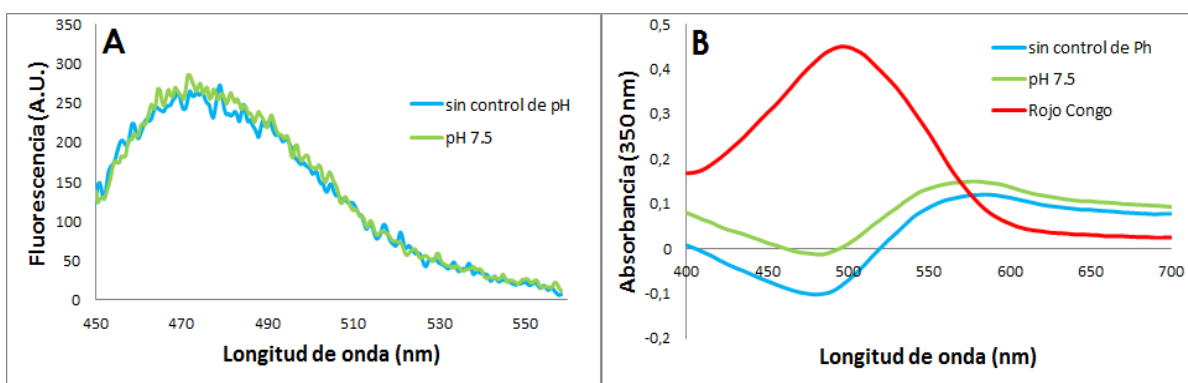


Figura 40. Unión de colorantes a CI de PLA2 cosechados a las 24 h en ambas condiciones de cultivo. A) Espectro de fluorescencia de CI en presencia de Th-T. B) Espectro de absorbancia de CI en presencia de Rojo Congo.

A diferencia de los CI de SMDg y SMDgm, los CI de SMD de *L. reclusa* presentaron mayor proporción de estructura amiloide en los cultivos realizados con condiciones controladas de pH (Figura 39). Además la unión a Th-T causó la mayor intensidad de fluorescencia comparada con la de todos los experimentos (figura 39A).

Por último los CI de fosfolipasa A2 de *M. laticollaris* (Figura 40) no mostraron diferencias en cuanto a la unión con Th-T, y solo se observó una pequeña variación en cuanto al pegado de RC. Estos resultados sugieren que los CI formados en este cultivo presentan estructuras similares probablemente debido a la baja concentración de PR y a que estén conformados principalmente de proteína endógena.

9.7 Determinación de población de tamaños de cuerpos de inclusión mediante dispersión dinámica de luz

La distribución de tamaños de los CI producidos bajo las 2 estrategias de cultivo (pH sin control y pH 7.5) cosechados a diferentes tiempos de cultivo (3, 5, 7 y 20 h después de la inducción) fueron analizados mediante dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano, Malvern Inst.UK). Los CI de SMDg fueron comparados mediante la distribución del tamaño máximo alcanzado por el 50% de la población de CI (CI₅₀). El valor de tamaño máximo de CI₅₀ de CI SMDg producidos en condiciones sin control de pH se incrementó gradualmente conforme al tiempo de cultivo. En la primera hora después de la inducción se observaron CI₅₀ de alrededor de 320 nm y en la tercera hora después de la inducción fueron de aproximadamente 458 nm. A las 5 y 20 h después de la inducción hay una conservación del valor de tamaño de CI₅₀ de entre 432 nm a 430 nm. La presencia de una población de pequeños agregados tanto a las 7 como a las 9 h del cultivo indica que nuevos CI se están formando, mientras los que se formaron al principio del cultivo siguen creciendo (figura 41).

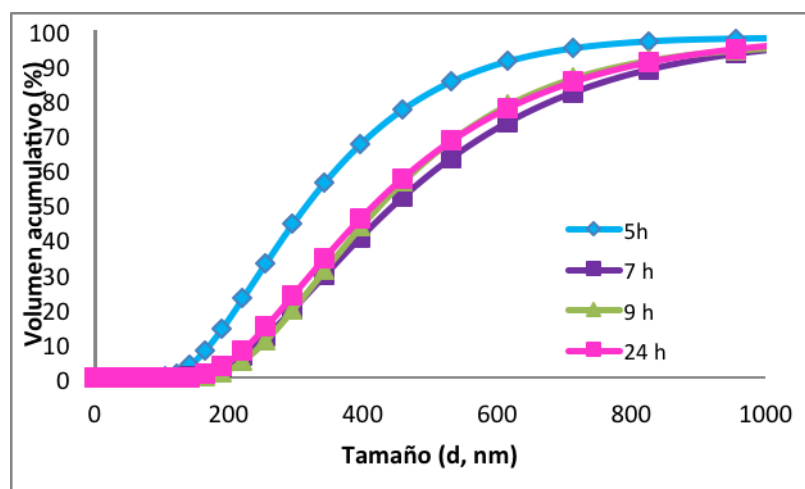


Figura 41. Distribución de volumen acumulativo de tamaño de CI de SMDg obtenidos de cultivos sin control de pH, en diferentes tiempos del cultivo (5, 7 9 y 24 h), determinada por Dispersión Dinámica de luz. La gráfica muestra la desviación estándar de los valores acumulados de los experimentos realizados por triplicado.

En los cultivos con pH 7.5 (figura 42), el CI_{50} fue de 458 nm la primera hora después de la inducción. A las 3 h después de la inducción, éste tamaño se incrementó hasta 615 nm. Posteriormente, a las 5 h después de la inducción los CI sufrieron una disminución en su tamaño presentando una media de alrededor de 396 nm, y finalmente a las 20 h después de la inducción presentaron un CI_{50} de 341 nm.

Al igual que en los resultados obtenidos por microscopía electrónica (figura 34B), por dispersión dinámica de luz se observó que en condiciones sin control de pH los CI producidos son de más de 400 nm después de 5 y 20 h (aunque también se observaron algunos CI <100 nm). Sin embargo, los CI obtenidos en condiciones controladas de pH, después de 5 h aparentemente se conforman de pequeños agregados que se conjuntan para formar CI de mayor tamaño, aunque la población es heterogénea (figura 34A y 35A). Más aún, las micrografías en conjunto con datos de dispersión dinámica de luz, sugieren que después de 20 h estos agregados de SMDg se compactan. Esta aparente compactación puede ser la responsable de un cambio en la estructuración de la PR, y por lo tanto un cambio en la afinidad de los CI por los colorantes amiloidogénicos.

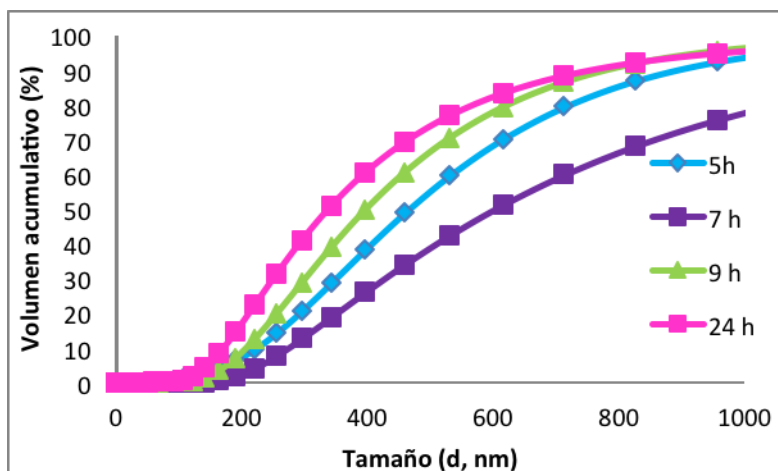


Figura 42. Distribución de volumen acumulativo de tamaño de CI de SMDg obtenidos de cultivos con control de pH (7.5), en diferentes tiempos del cultivo (5, 7 9 y 24 h), determinada por Dispersión Dinámica de luz. La gráfica muestra la desviación estándar de los valores acumulados de los experimentos realizados por triplicado.

Al contrario que en los CI de SMDg, no se observaron variaciones en el tamaño de los CI de SMDgm cosechados en las diferentes condiciones de pH a las 24 h (figura 43). Esto puede ser debido a que la secuencia polipeptídica de estas PR es diferente y que los núcleos de agregación no se ven afectados por el pH del medio. En el caso de los CI de SMD-Lr se observó una población ligeramente menor en los agregados producidos a pH 7.5, ya que se encuentran en el intervalo de 340 a 1720 nm de diámetro, mientras que en las condiciones sin control de pH se obtuvieron agregados de entre 530 a 1720 nm (figura 44). Los CI de PLA2 de *M. laticollaris* (figura 45) presentaron un comportamiento similar a SMD-Lr, donde los agregados

producidos a pH 7.5 se encuentran en un intervalo más amplio de tamaño (350-2200 nm de diámetro) comparado con el de los CI producidos en condiciones sin control de pH (450-1300 nm).

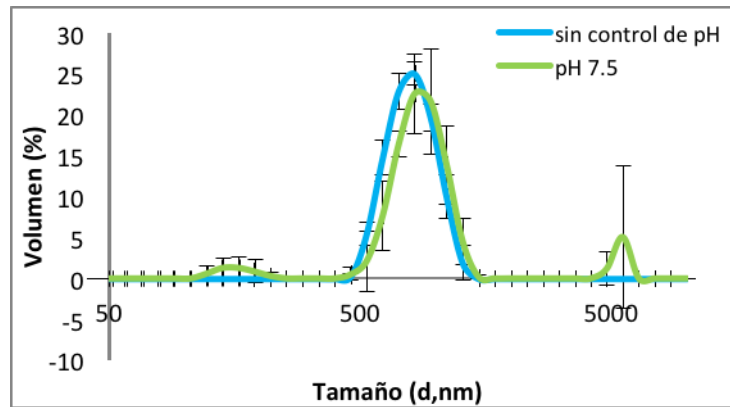


Figura 43. Distribución de tamaño determinada por Dispersión Dinámica de luz de CI de SMDgm cosechados a las 24 h, de cultivos de biorreactor bajo condiciones controladas (línea verde) y no controladas de pH (línea azul).

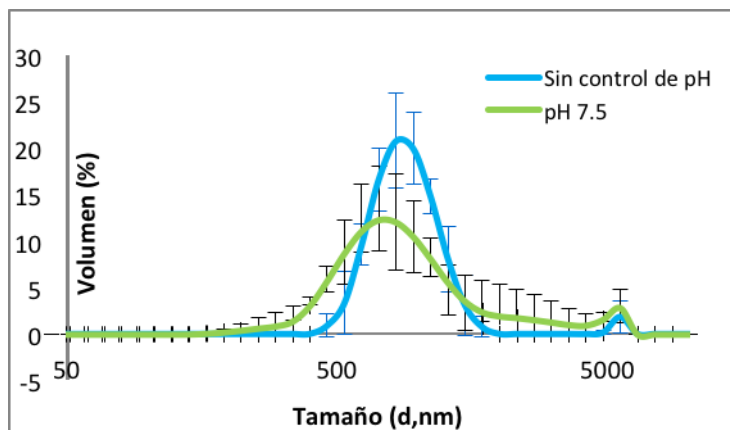


Figura 44. Distribución de tamaño determinada por Dispersión Dinámica de luz de CI de SMD-Lr cosechados a las 24 h, de cultivos de biorreactor bajo condiciones controladas (línea verde) y no controladas de pH (línea azul).

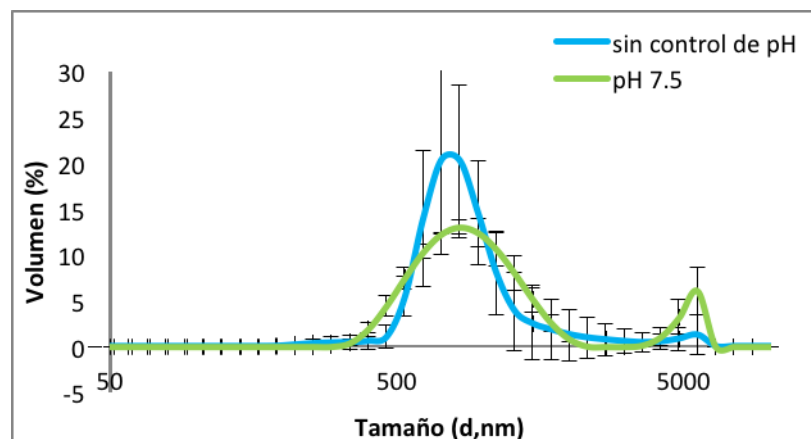


Figura 45. Distribución de tamaño determinada por Dispersión Dinámica de luz de CI de PLA2 de *M. laticollaris* cosechados a las 24 h, de cultivos en biorreactor bajo condiciones controladas (línea verde) y no controladas de pH (línea azul).

9.8 Resistencia a la degradación

9.8.1 Proteólisis con proteinasa K

La proteinasa K es una proteasa utilizada para el mapeo de estructuras amiloides debido a que es altamente activa contra dominios globulares o regiones desordenadas, mostrando baja actividad contra las conformaciones β -laminares densamente empaquetadas, características de las estructuras amiloides (Wilson et al., 2007). Con el objetivo de determinar la organización molecular de los CI, éstos se sometieron a una degradación proteolítica. Se añadió Proteinasa K a los CI purificados obtenidos en las dos condiciones de cultivo a las 24 h y se midió su accesibilidad a los dominios correctamente plegados mediante la medición de la turbidez a 350 nm a lo largo del tiempo. Los CI de las 4 proteínas modelo cosechados a partir de cultivos sin control de pH fueron más propensos al ataque proteolítico, mostrando una pendiente más pronunciada ante la digestión con proteinasa K, disminuyendo la turbidez en menor tiempo, lo que indicó la desintegración de los agregados. Este fenómeno sugiere que la estructura en los CI producidos en cultivos donde el pH no es controlado presentan menos dominios amiloides y que las fuerzas de estabilización entre los centros de nucleación son débiles e inestables.

Por otra parte, los CI cultivados en condiciones de pH controlado presentaron mayor resistencia a la degradación con proteinasa K. Estos resultados sugieren que el mantenimiento del pH externo controlado provoca una mayor estructuración del tipo amiloide en los CI (figuras 46, 47, 48 y 49).

Se ha demostrado que la variación en secuencia de aminoácidos afecta la agregación (Carrió et al., 2005; Peternel et al., 2008b; Upadhyay et al., 2012). Sin embargo, aquí se utilizaron 3 SMD de estructura similar (α/β), con más del 90% de similitud, y en general presentaron una agregación similar que puede ser catalizada por proteinasa-K, siguiendo cinéticas parecidas.

Los CI que presentan una alta cantidad de proteína correctamente plegada, son menos densos, solubles ante menores concentraciones de agentes desnaturizantes y más susceptibles al ataque proteolítico, se les ha denominado CI no clásicos (Peternel et al., 2008). La digestión con proteinasa K de los CI de SMDg (Figura 46) producidos en condiciones sin control de pH, indica que tienen características que los engloban en este grupo siendo menos resistentes a la proteólisis y presentando un mayor contenido de estructura β -laminar en los ensayos de tinción con colorantes amiloidogénicos (figura 36). En contraparte los CI producidos en condiciones de pH controlado fueron más resistentes a la degradación proteolítica (figura 46) y presentaron un menor grado de estructuración amiloide (figura 37) por lo que se podrían clasificar en el grupo de CI clásicos. De igual manera, los CI de las proteínas SMDgm y SMD-Lr producidos sin control de pH resultan menos resistentes a la proteólisis que aquellos producidos a pH 7.5 (figura 47 y 48). Si bien, con estas proteínas no se presentaron diferencias en el grado de unión de colorantes amiloidogénicos a los CI (figura 38 y 39), los geles

de separación electroforética demostraron que el contenido proteico de los agregados era diferente dependiendo de la condición de cultivo. Debido a que la proteinasa K también tiene especificidad proteolítica por los aminoácidos no polares, diferencias en la composición proteica de los agregados puede resultar en diferencias en la velocidad proteolítica de la enzima (Espargaró et al., 2008).

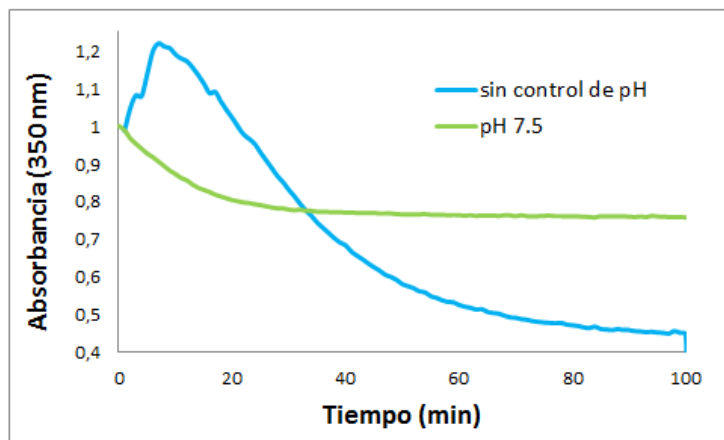


Figura 46. Cinética de degradación proteolítica con proteinasa K de 150 µg/mL de CI de SMDg cosechados a las 24 h a partir de cultivos sin control de pH (línea azul) y cultivos con condiciones controladas (línea verde).

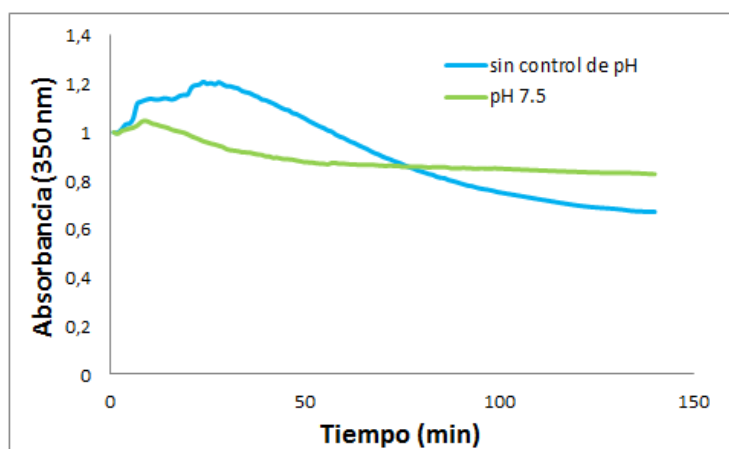


Figura 47. Cinética de degradación proteolítica con proteinasa K de 150 µg/mL de CI de SMDgm cosechados a las 24 h a partir de cultivos sin control de pH (línea azul) y cultivos con condiciones controladas (línea verde).

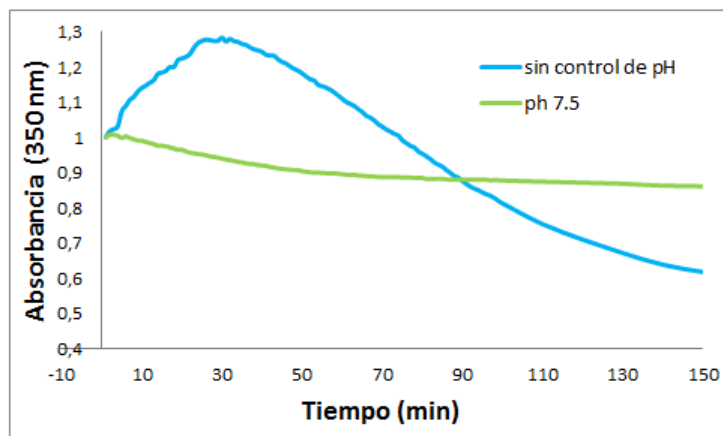


Figura 48. Cinética de degradación proteolítica con proteinasa K de 150 µg/mL de CI de SMD-Lr cosechados a las 24 h partir de cultivos sin control de pH (línea azul) y cultivos con condiciones controladas (línea verde).

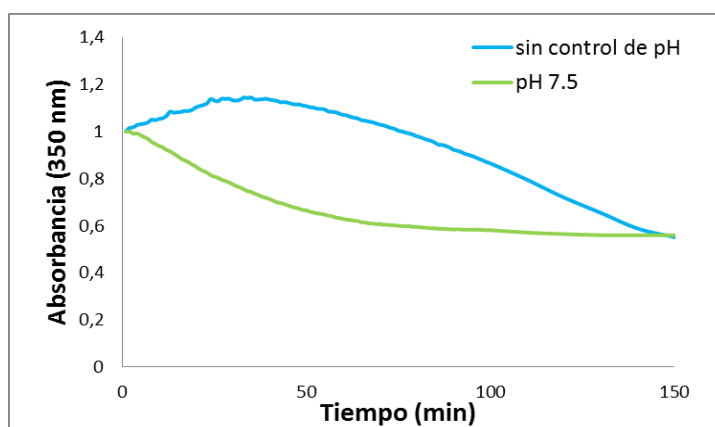


Figura 49. Cinética de degradación proteolítica con proteinasa K de 150 µg/mL de CI de PLA2 cosechados a las 24 h, a partir de cultivos sin control de pH (línea azul) y cultivos con condiciones controladas (línea verde).

9.8.2 Solubilización de CI con Cloruro de guanidinio

La interacción de cadenas polipeptídicas con agentes caotrópicos, como urea o cloruro de guanidinio, provoca su desnaturalización y pérdida de estructura secundaria (Patra et al., 2000). Los agentes caotrópicos impiden la formación de puentes de hidrógeno y estabilizan regiones hidrofóbicas favoreciendo su exposición al solvente, provocando la pérdida de estructura. Con el objetivo de evaluar las diferencias en la estructura y composición de los agregados, se determinaron los perfiles de solubilización de los CI de las cuatro proteínas modelo producidos en biorreactor, en las dos estrategias de cultivo (pH 7.5 y sin control de pH) y cosechados a las 24 h de los cultivos. Se analizaron diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio con una concentración conocida de CI cuantificándose la proteína liberada después de 24 h.

En el perfil de disolución de los CI de SMDg (figura 50) se observa que aquellos producidos sin control de pH son más susceptibles a la degradación con cloruro de guanidinio. A una concentración 5 M del agente caotrópico, el 100% de la proteína agregada fue solubilizada, mientras que a la misma concentración sólo el 50% de los CI producidos a pH 7.5 fueron solubilizados. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en microscopía electrónica (figura 35) y dispersión dinámica de luz (figura 41 y 42), los cuales indican que los CI producidos a pH 7.5 son más pequeños que aquellos producidos en condiciones sin control de pH. Es posible que la disminución de tamaño se deba a la compactación de los CI, lo cual provoca interacciones más estrechas entre los componentes, y por lo tanto aumenta la dificultad de que el cloruro de guanidinio desnaturalice los agregados obtenidos bajo condiciones controladas de pH.

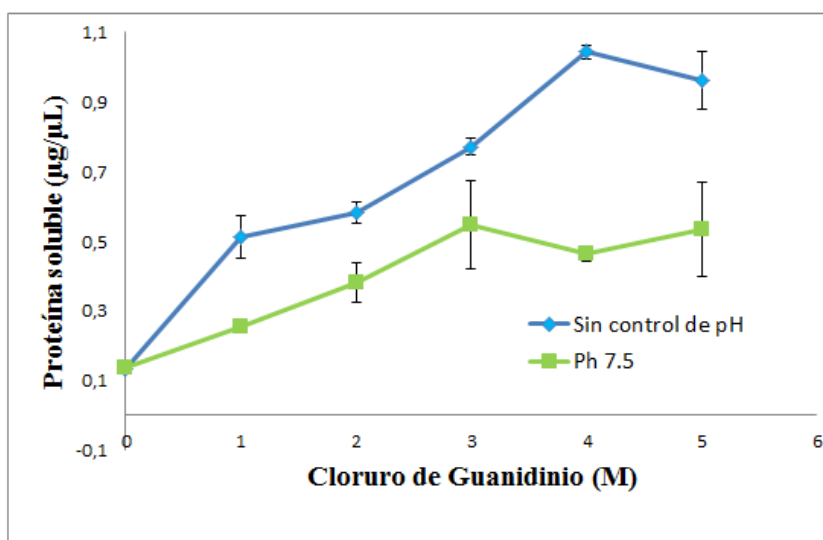


Figura 50. Disolución de 1 µg/µL de CI de SMDg cosechados a las 24 h de los cultivos mantenidos bajo las dos estrategias usadas (pH 7.5 y sin control de pH) en cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína disuelta en el medio después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h.

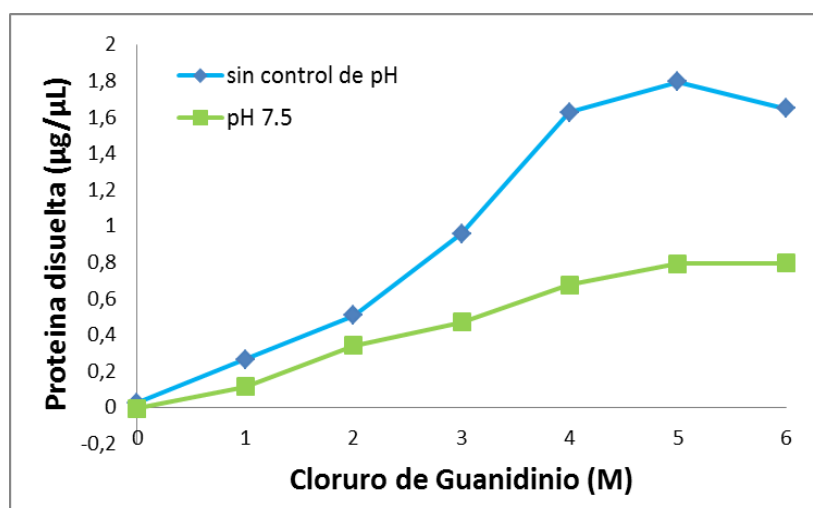


Figura 51. Disolución de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CI de SMDgm cosechados a las 24 h de los cultivos mantenidos bajo las dos estrategias usadas (pH 7.5 y sin control de pH). La gráfica muestra la cantidad de proteína disuelta en el medio después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h.

Por su parte, los CI de SMDgm y SMD-Lr siguen la misma tendencia en el perfil de disolución, siendo más susceptibles al despegamiento los CI producidos sin control de pH. En la figura 51 se aprecia que 5 M de cloruro de guanidinio solubiliza el 100% de los CI producidos sin control de pH, mientras el 45% de los CI producidos a pH 7.5 se mantienen insolubles. Para el caso de SMD-Lr a 6 M de cloruro de guanidinio se obtiene 0.35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína solubilizada a partir de los CI producidos sin control de pH y 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en los producidos a pH 7.5 (figura 52).

Estos resultados sugieren que la secuencia de la PR no es el factor determinante en la estabilidad de los agregados y que la condición de cultivo determina la fuerza de las interacciones. El pH del cultivo probablemente provoca cambios en la protonación de la proteína que favorece la repulsión o atracción de aminoácidos modificando así la manera en que éstos interactúan.

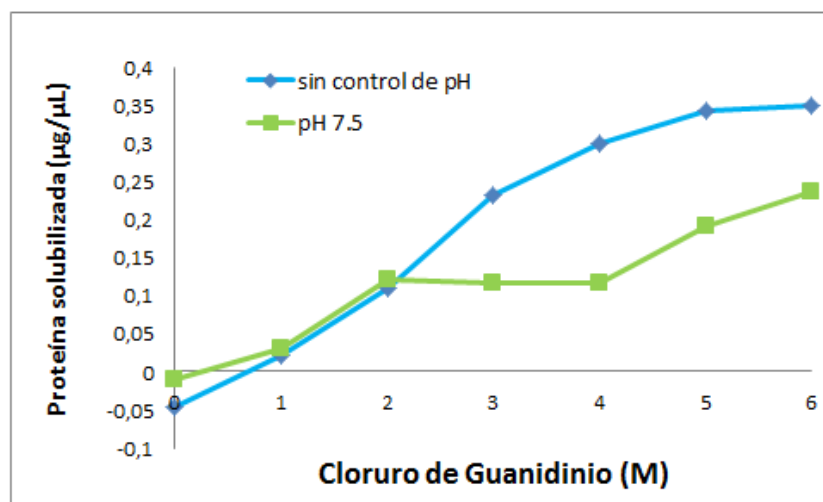


Figura 52. Disolución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CI de SMD-Lr cosechados a las 24 h de ambas condiciones de cultivo (pH 7.5 y sin control de pH) en cloruro de guanidinio. La gráfica muestra la cantidad de proteína disuelta en el medio después de la incubación con el agente caotrópico durante 24 h.

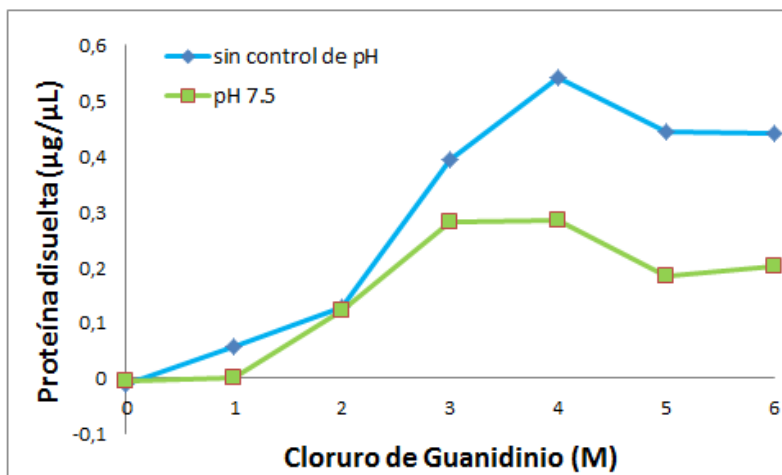


Figura 53 Disolución en cloruro de guanidinio de CI de PLA2 de *M. laticollaris* cosechados a las 24 h de ambas condiciones de cultivo. La gráfica muestra la cantidad de proteína disuelta en el medio después de incubación en el agente caotrópico durante 24 horas

La disolución de CI de PLA2 de *M. laticollaris* sigue el mismo comportamiento que los CI de las diferentes esfingomielinasas, siendo más resistentes a la disolución en cloruro de guanidinio los CI producidos a pH 7.5, en comparación con aquellos que se obtuvieron sin control de pH (Figura 53). Sin embargo, no se logró la disolución total de los CI.

Los resultados obtenidos sugieren que los CI producidos a pH 7.5 presentan características similares a los denominados “clásicos” (Peternel et al., 2008). Esto debido a su resistencia tanto a la proteólisis enzimática, como a la disolución en agentes desnaturizantes. En términos de solubilidad ante agentes caotrópicos se ha reportado que para solubilizar los llamados CI clásicos es necesario utilizar altas concentraciones de agentes caotrópicos como 8 M de urea o 6 M de cloruro de guanidinio (Cabrita & Bottomley 2004; Wang 2009; Upadhyay et al., 2012). Por el contrario, los CI producidos sin control de pH requirieron de menores concentraciones de agente caotrópico para desplegarse, indicando que podrían ser clasificados como “no clásicos”.

Es importante remarcar que en bioprocesos de proteínas terapéuticas, uno de los pasos para la recuperación de PR a partir de CI involucra la solubilización de los agregados en agentes caotrópicos (Singh & Panda 2005; Vallejo & Rinas 2004b). De hecho, los CI son la materia prima para purificar PR, de ahí que la caracterización de los perfiles de disolución de CI cultivados a diferentes condiciones de cultivo ofrece la ventaja de optimizar el proceso de replegamiento mediante la utilización de menores cantidades de agente caotrópico. De esta manera, con los resultados obtenidos se puede afirmar que la producción de SMDg, SMDgm, SMD-Lr y PLA2 en condiciones donde no se controla el pH del cultivo permite la obtención de CI que son más fáciles de solubilizar y por lo tanto, representa una ventaja en el proceso de recuperación.

10 CONCLUSIONES

- El medio Super Broth permitió duplicar la acumulación de SMDg de la cepa *E. coli* BL21 Gold (DE3) comparado con la producida en medio LB. De ahí que, todas las cinéticas estudiadas se realizaran con dicho medio. Los cuatro cultivos de *E. coli* BL21 Gold (DE3) productores de las proteínas modelo (SMDg, SMDgm, SMD-Lr y PLA2), presentaron velocidades de crecimiento similares. Sin embargo, en los cultivos con SMDgm, SMD-Lr y PLA2, en condiciones sin control de pH se observó una menor acumulación de biomasa de alrededor del 35%, mientras en la cinética de *E. coli* BL21 Gold (DE3) productora de SMDg se obtuvo mayor acumulación de biomasa.
- Se determinó que la variación del pH externo influye en la producción de proteína soluble y agregada. El control de pH favoreció la recuperación de proteína soluble en las cepas productoras de esfingomielinasa D (SMDg, SMDgm, SMD-Lr). Mientras, la variación del pH hacia valores básicos, favoreció la formación de CI de las diferentes proteínas modelo. También la variación del pH modificó la composición proteica de los CI, disminuyendo el enriquecimiento de PR en éstos. Particularmente, los CI de SMDg producidos en condiciones controladas de pH fueron enriquecidos en PR con respecto al tiempo. En cultivos sin control de pH la agregación de SMDg fue favorecida, ya que un mayor número de células (61%) presentaron al menos un CI a las 5 h después de la inducción, comparadas con las células crecidas bajo condiciones controladas (7%).
- Los CI de SMDg, SMDgm y PLA2 producidos sin control de pH presentaron un mayor tamaño. Los CI de SMDg obtenidos bajo condiciones sin control de pH incrementaron de tamaño con respecto al tiempo. Mientras los CI de SMDg producidos en condiciones controladas de pH aumentaron de tamaño en las primeras horas y después se compactaron.
- Los CI de SMDg y SMDgm producidos sin control de pH, presentaron mayor unión por Tioflavina-T que los producidos en condiciones controladas. Los CI de SMDg producidos sin control de pH presentaron un incremento de unión por Tioflavina-T, con respecto al tiempo de cultivo, lo que sugiere un aumento en su estructuración amiloide. Por el contrario, los CI producidos a pH constante perdieron afinidad, debido probablemente a un cambio conformacional causado por la compactación de los agregados que sucede a las 7 h después de la inducción.
- Los CI formados bajo condiciones sin control de pH fueron más accesibles para ser catalizados por la proteinasa-K o para ser solubilizados con cloruro de guanidinio comparados con aquellos sintetizados bajo condiciones controladas de pH. De ahí que se proponga que los CI formados en condiciones sin control de pH presentan menos estructuras de hoja- β , y que su estructura y composición son diferentes a los formados con condiciones controladas de pH, indicando que el pH

de cultivo influye en las interacciones que mantienen los CI agregados. Los CI producidos sin control de pH presentan una ventaja en el proceso de recuperación de PR, dado que requieren menores concentraciones de agente caotrópico para lograr su disolución.

- A partir de las características fisicoquímicas que presentan los CI producidos bajo condiciones sin control se pueden clasificar como “no clásicos”, siendo menos resistentes a la degradación por proteinasa-K y cloruro de guanidinio y menor unión con la Th-T. Del mismo modo debido a sus características los CI producidos a pH 7.5 pueden ser denominados “clásicos”.

11 ANEXO 1

Con el objetivo de evaluar las diferencias en el contenido de proteínas citoplasmáticas en los CI de las cuatro proteínas modelo producidos bajo pH controlado a 7.5 y sin control de pH se realizó electroforesis de la fracción soluble y agregada separadas en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-Page (figura 27, 29, 30 y 31).

Las imágenes de los geles de poliacrilamida se capturaron digitalmente y la densitometría de las bandas de proteína se realizó usando el equipo Gel Doc EZ System (Bio-Rad, USA). El porcentaje de PR de las cuatro proteínas modelo en la fracción soluble y en los CI cosechados a las 24 de cultivo fueron evaluado para cada una de las proteínas modelo en los cultivos producidos en matraz en los dos medios de cultivo evaluados y en biorreactor en los cultivos efectuados a pH controlado a 7.5 y sin control de pH. La densitometría se realizó a partir de la banda protéica que se presentaba en el peso molecular correspondiente al de la PR en cuestión

Tabla 11. Porcentaje de PR de las proteínas modelo en la fracción soluble y agregada producidas en cultivos en matraz agitado con medio LB y SB y cultivos en biorreactor cosechados a las 24 h en las dos condiciones estudiadas.

		% de PR (determinada por densitometría)			
		SMDg	SMDgm	SMD-Lr	PLA2
PS	Matraz medio LB	6.6	1.5	0.6	1.0
	Matraz medio SB	2.4	1.5	0.7	1.6
	Biorreactor pH 7.5	2.7	4.2	0.3	3.8
	Biorreactor sin control de pH	1.5	1.8	0	5.0
CI	Matraz medio LB	2.9	34.7	9.0	1.2
	Matraz medio SB	16.4	37.0	28.9	1.1
	Biorreactor pH 7.5	7.5	8.8	5.9	0.8
	Biorreactor sin control de pH	12.3	12.9	22.2	0.7

En la tabla 11 se muestra la cuantificación mediante densitometría de la producción de las PR. Se puede observar que la producción de esfingomielinasa de manera soluble se ve favorecida en cultivos con control de pH, aunque la productividad de PR total se ve disminuida en dichos cultivos. En contraparte los cultivos sin control de pH producen menor cantidad de PR en forma soluble, pero hay una mayor producción de PR en forma de CI.

Como perspectiva se propone realizar ensayos de inmunodetección para detectar la presencia de SMD-Lr, SMD-gm y PLA en las fracciones soluble y agregadas en las condiciones de cultivo estudiadas.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Alibolandi, M., & Mirzahoseini, H. (2011). Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochemistry Research International*, 2011, 631607.
- Allen, S., Polazzi, J., Gierse, J., & Easton, A. (1992). Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(21), 6938–47.
- Ami, D., Natalello, A., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M., & Doglia, S. M. (2005). Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS Letters*, 579(16), 3433–6.
- Ami, D., Natalello, A., Taylor, G., Tonon, G., Doglia, M., & Maria Doglia, S. (2006). Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764(4), 793–9.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–408.
- Barenholz, Y., & Thompson, T. E. (1980). Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta*, 604, 129–158.
- Barrientos, S., Martinez, N., Yoo, S., Jara, J., Zamorano, S., & Hetz, C. (2011). Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci*, 31, 966–78.
- Batas, B., & Chaudhuri, J. (1996). Protein folding at high concentration using size exclusion chromatography. *Biotechnol. Bioeng*, 50, 16–23.
- Bautista, R., & Arizmendi, A. M. C. (2004). Información general Información taxonómica Distribución.
- Becker, S., Theile, S., Heppler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Kolmar, H. (2005). A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. Federation of European Biochemical Societies. *Federation of European Biochemical Societies*, 579(5), 1177–1182.
- Biggs, M., Richards, R., & Dalby, M. (2010). Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions. *Nanomedicine (London, England)*, 6(5), 619–633.
- Binford, G., & Wells, M. (2003). The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 135, 25–33.
- Blankenhorn, D., Phillips, J., & Slonczewski, J. L. (1999). Acid- and Base-Induced Proteins during Aerobic and Anaerobic Growth of *Escherichia coli* Revealed by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Jour*, 181(7), 2209–16.
- Bloom, M., Skelly, S., R., V., Neidhardt, F., Brot, N., & Weissbach, H. (1986). In vitro effect of the *Escherichia coli* heat shock regulatory protein on expression of heat shock genes. *Journal of Bacteriology*, 166, 380–384.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, S247.269.

- Bolaños, R. (1982). LAS SERPIENTES VENENOSAS DE CENTROAMÉRICA Y EL PROBLEMA DEL OFIDISMO. *Rev. Cost. Cienc. Méd.*, 3(2), 165–184.
- Bowden, G., & Georgiou, G. (1990). Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16760-16766).
- Bowden, G., & Paredes, A. (1991). Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 9, 725–730.
- Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J*, 7, 91–98.
- Bukau, B. (1993). Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Molecular Microbiology*, 9(4), 671–80.
- Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 92, 351–356.
- Burgess, R. (1996). NPurification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase sigma factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. *Methods in Enzymology*, 273, 145–149.
- Cabilly, S. (1989). Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. *Gene*, 85, 553–557.
- Cabrita, L., & Bottomley, S. P. (2004). Protein expression and refolding – A practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnology Annual Review*, 10, 31–50.
- Çalık, P., Çalık, G., & Özdamar, T. H. (1994). Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: effects of oxygen transfer rate. *Biotechnol. Bioeng*, 64, 151–67.
- Çalık, P., Çalık, G., & Özdamar, T. H. (1998). Oxygen transfer effects in serine Citric, alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of acid as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 23.
- Çalık, P., Çalık, G., & Özdamar, T. H. (2000). Oxygen transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng*, 69(3), 301–11.
- Carbajal-Saucedo, A. (2014). *Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de Micrurus laticollaris: bases para el desarrollo de un antiveneno de amplio espectro contra coralillos*.
- Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., Smith, E. N., Zamudio, F., de Roodt, A. R., & Olvera-Rodríguez, A. (2013). Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 66, 64–74.
- Cardamone, M., Puri, N., & Brandon, M. (1995). Comparing the refolding and reoxidation of recombinant porcine growth hormone from a urea denatured state from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biochemistry*, 34, 5773–5794.
- Cardozo, H., & Frachi, M. (1995). Garrapata. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. In *Enfermedades Parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención*. (pp. 369 – 402.).

- Carrió, M. M., Cubarsi, R., & Villaverde, a. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, *471*(1), 7–11.
- Carrió, M. M. M., González-Montalbán, N. N., Vera, A., Villaverde, A., & Ventura, S. (2005). Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *Journal of Molecular Biology*, *347*(5), 1025–1037.
- Carrió, M. M., & Villaverde, a. (2001). Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters*, *489*(1), 29–33.
- Carrió, M. M., & Villaverde, a. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*, *96*(1), 3–12.
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2005). Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *187*(10), 3599–3601.
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2003). Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters*, *537*(1-3), 215–221.
- Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N., Bolivar, F., & Ramírez, O. T. (2009). The effect of heating rate on Escherichia coli metabolism, physiological stress, transcriptional response and production of temperature-induced recombinant protein: a scale-down study. *Biotechnol. Bioeng*, *102*, 468–82.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. a, Smith, D., Elliott, J. F., & Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *181*(11), 3525–35. Retrieved from
- Castanié-Cornet, M.-P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P., & Gutierrez, C. (2010). Acid stress response in Escherichia coli: mechanism of regulation of gadA transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Research*, *38*(11), 3546–54.
- Castro-Acosta, R., Rodriguez-Limas, W., Valderrama, B., Ramirez, O., & Palomares, L. (2014). Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microbial Cell Factories*, *13*(25).
- Chalmers, J. J., Kim, E., Telford, J. N., Wong, E. Y., Tacon, W. C., Shuler, M. L., & Wilson, D. B. (1990). Effects of temperature on Escherichia coli overproducing B- lactamase or epidermal growth factor. *Appl Environ. Microbiol.*, *56*, 104–111.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res*, *40*.
- Chen, G. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chem. Soc. Rev*, 2434–46.
- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. *Chemical Engineering Science*, *61*(3), 876–885.
- Chuang, S., & Blattner, F. (1993). Characterization of twenty-six new heat shock genes of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *175*, 5242–5252.
- Ciscotto, P., Rates, B., Silva, L., & Andrade Donato, M. (2011). Venomic analysis and evaluation of ativenom cross-reactivity of South American Micrurus species. *J. Proteomics*, *74*, 1810–25.
- Clark, D., & Parker, J. (1984). Proteins induced by high osmotic pressure in Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*, *25*(1), 81–83.

- Clark, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 157–163.
- Clark, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 202–7.
- Contiero, J., Beatty, C., Kumari, S., DeSanti, C., Strohl, W., & Wolve, A. (2000). Effects of mutations in acetate metabolism on high-cell-density growth of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 421–430.
- Correa-Netto, C., IDL, J.-A., DA, S., Ho, P., Leitao-de-Araújo, M., & Alves, M. (2011). Snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics*, 74, 1795–809.
- Craig, E., & Gross, C. (1991). Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends in Biochemical Sciences*, 16(4), 135–40.
- Dalby, M. (2009). Nanostructured surfaces: cell engineering and cell biology. *Nanomedicine (London, England)*, 4, 247–8.
- Dartigalongue, C., Missiakas, D., & Raina, S. (2001). Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 20866–208675.
- Datar, R., Cartwright, T., & Rosen, C. (1993). Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study of analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology*, 11, 349–357.
- De Almeida, D. M., Fernandes-Pedrosa, M. F., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Marcelino, J., Gondo-Higashi, H., De Azevedo, I. L. M., ... Tambourgi, D. V. (2008). A new anti-loxoscelisc serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 79, 463–470.
- De Angelis, M., & Gobetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4, 106–122.
- De Groot, N. S., Sabate, R., & Ventura, S. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology*, 34(8), 408–416.
- De Groot, N. S., & Ventura, S. (2006). Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 110–3.
- De Marco, A., Deurling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2007). Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 7.
- De Roodt, A., Dolab, J., Galarce, P., Litwin, S., Dokmetjian, J., Segre, L., & Vidal, J. (1998). A study on the venom yield of snake species from Argentina. *Toxicon*, 36(12).
- De Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Dolab, J., Estévez-Ramírez, J., Ramos-Cerillo, B., & Litwin, S. (2004). Effectiveness of two common antivenoms for Noth, Centrol, and South American *Micrurus* envenomations. *Clin Toxicol*, 42, 171–8.
- Desai, P. N., Shrivastava, N., Padh, H., & Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28(4), 427–435.
- Díez-Gil, C., Krabbenborg, S., García-Fruitós, E., Vazquez, E., Rodríguez-Carmona, E., Ratera, I., ... Veciana, J. (2010). The nanoscale properties of bacterial inclusion bodies and their effect on mammalian cell proliferation. *Biomaterials*, 31(22), 5805–12.

- Dill, K., & Shortle, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 60, 795–825.
- Dokmetjian, J., Del Canto, S., Vinzón, S., & de Jiménez Bonino, M. (2009). Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*, 53(375-82).
- Donovan, R., Robinson, C., & Glick, B. (1996). Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 16(3), 145–54.
- Dulgar-Tulloch, A., Bizios, R., & Siegel, R. (2009). Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. *J. Biomed. Mat. Res. A*, 90, 586–94.
- Escher, A., O’Kane, D. J., Lee, J., & Szalay, A. A. (1989). Bacterial luciferase ab fusion protein is fully active as a monomer and highly sensitive in vivo to elevated temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6528–6532.
- Fernandes, M. de F., Junqueira de Azevedo Ide, L., Gonçalves-de-Andrade, R., van den Berg, C., Ramos, C., Ho, P., ... Gonçalves de Andrade, R. (2002). Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(5), 638–45.
- Ferrer.Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8(17).
- Fischer, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng*, 41, 3–13.
- Fix, J. (1980). No TitleVenom yield of the North American coral snake and its clinical significance. *South Med J*, 73, 737–41.
- Foster, J. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 898–907.
- Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.], Chapter 5(August)*, Unit 5.24.1–29.
- Freeman, B., & Morimoto, R. (1996). The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO*, 15, 2969–2979.
- Gamboa-Suasnavart, R., Marín-Palacio, L. D., Martínez-Sotelo, J. A., Espitia, C., Servin-González, L., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2013). Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 29, 1421–1429.
- Gamboa-Suasnavart, R., Valdez-Cruz, N. A., Cordova-Dávalos, L., Martínez-Sotelo, J., Servin-González, L., Espitia, C., & Trujillo-Roldán, M. A. (2011). The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 10(110).
- Gao, Y., Thomas, J., Chow, R., Lee, G., & Cowan, N. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes b-actin folding. *Cell*, 69, 1043–1050.

- García-Fruitós, E., Arís, A., & Villaverde, A. (2006). Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 289–94.
- García-Fruitós, E., Carrió, M. M., Arís, A., & Villaverde, A. (2005). Folding of a misfolding-prone betagalactosidase in absence of DnaK. *Biotechnol. Bioeng*, 90(7), 869–875.
- García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., Ventura, S., Villaverde, A. (2005). Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microbial Cell Factories*, 4, 27.
- García-Fruitós, E., Martínez-Alonso, M., González-Montalbán, N., Valli, M., Mattanovich, D., & Villaverde, A. (2007). Divergent genetic control of protein solubility and conformational quality in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 374(1), 195–205.
- García-Fruitós, E., Rodríguez-Carmona, E., Dez-Gil, C., Ferraz, R. M., Vázquez, E., Corchero, J. L., Cano-Sarabia, M., Ratera, I., Ventosa, N., Veciana, J., Villaverde, A. (2009). Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial. *Advanced Materials*, 21(42), 4249–4253.
- García-Fruitós, E., Sabate, R., de Groot, N. S., Villaverde, A., & Ventura, S. (2011). Biological role of bacterial inclusion bodies: a model for amyloid aggregation. *The FEBS Journal*, 278(14), 2419–27.
- García-Fruitós, E., Seras-Franzoso, J., Vazquez, E., & Villaverde, A. (2010). Tunable geometry of bacterial inclusion bodies as substrate materials for tissue engineering. *Nanotechnology*, 21(20), 205101.
- García-Fruitós, E., Vázquez, E., Díez-Gil, C., Corchero, J. L., Seras-Franzoso, J., Ratera, I., Veciana, J., Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends in Biotechnology*, 30(2), 65–70.
- Gatti-Lafranconi, P., Natalello, A., Ami, D., Doglia, S. M., & Lotti, M. (2011). Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. *The FEBS Journal*, 278(14), 2408–18.
- Georgiou, G. (1988). Optimizing the production of recombinant protein in microorganism. *American Institute of Chemical Engineers*, 34(8).
- Georgiou, G., Shuler, M., & DB, W. (1988). Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of beta-lactamase overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng*, 32(6), 741–8.
- Georgiou, G., Telford, J., Shuler, M., & DB, W. (1986). Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or alkaline phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1157–61.
- Georgiou, G., & Valax, P. (1999). Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods in Enzymology*, 309, 48–58.
- Gill, R. T., Valdes, J. J., & Bentley, W. E. (2000). A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2(3), 178–89.
- Glenner, G., Eanes, E., & Page, D. (1972). The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the b-conformation. *J Histochem Cytochem*, 20, 821–826.

- Goff, S., & Goldberg, A. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell*, *41*(2), 587–95.
- Gold, B. S., Barish, R. A., & Dart, R. C. (2004). North American snake envenomation: diagnosis, treatment and management. *Emerg. Med. Clin. N. Am.*, 423–443.
- González-Montalbán, N., Carrió, M. M., Cuatrecasas, S., Arís, A., & Villaverde, A. (2005). Bacterial inclusion bodies are cytotoxic in vivo in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *Journal of Biotechnology*, *118*(4), 406–12.
- González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2007). Recombinant protein solubility-does more mean better? *Nature Biotechnology*, *25*, 718–720.
- González-Montalbán, N., Natalello, A., García-Fruitós, E., Villaverde, A., & Doglia, S. M. (2008). In situ protein folding and activation in bacterial inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.*, *100*(4), 797–802.
- Gordon, E., Horsefield, R., Swars, H., De Pont, J., Neutze, R., & Snijder, A. (2008). Effective high throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *62*, 1–8.
- Gottesman, S. (1989). Genetics of proteolysis in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, *23*, 163–198.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, *30*, 465–506.
- Graumann, K., & Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, *1*, 164–186.
- Grossman, A., Erickson, J., & Gross, C. (1984). The *htpR* gene product of *E. coli* is sigma factor for heat shock promoters. *Cell*, *38*, 383–390.
- Grossman, A., Straus, D., Walter, W., & Gross, C. (1987). Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, *1*, 179–184.
- Guglielmo, A., & Mangold, A. (2002). Garrapata Común de los Bovinos. *IDIAXXI*, *2*(2), 132–136.
- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C., & Gross, C. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes & Development*, *18*(22), 2812–2821.
- Gutierrez, C., Brondess, J., Manoil, C., & Beckwith, J. (1987). The use of transposon *TnphoA* to detect genes for cell envelope proteins subject to a common regulatory stimulus. Analysis of osmotically regulated genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, *195*(2), 289–97.
- Hannun, Y., Luberto, C., & Argraves, K. (2001). Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, *40*(16), 4893–903.
- Hansen, L. H., Knudsen, S., & Sorensen, S. J. (1998). The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*, *36*(6), 341–347.
- Hartl, F., & Hayer-Hart, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*, 574–581.

- Hersh, B., Farooq, F., Barstad, D., Blankenhorn, D., & JL, S. (1996). A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *178*, 3978–3981.
- Heyde, M., & Portalier, R. (1990). Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *57*(1-2), 19–26.
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2000). Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, *16*, 1000–1007.
- Ignatova, Z., Krishnan, B., Bombardier, J., Marcelino, A., Hong, J., & Gierasch, L. (2007). From the test tube to the cell: exploring the folding and aggregation of a beta-clam protein. *Biopolymers*, *88*(2), 157–163.
- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H., Bolivar, F., & Boyer, H. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, *198*(4321), 1056–1063.
- Jan, E., & Kotov, N. (2007). Successful differentiation of mouse neural stem cells on layer-by-layer assembled single-walled carbon nanotube composite. *Nano. Lett.*, *7*, 1123–8.
- Jana, S., & Deb, J. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, *7*, 289–298.
- Jeong, K., & Lee, S. (1999). High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 3027–3032.
- Jeong, K., & Lee, S. (2002). Excretion of human beta-endorphin into culture medium by using outer membrane protein F as a fusion partner in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 4979–4985.
- Jevsevar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., & Menart, V. (2005). Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology Progress*, *21*, 632–639.
- Jiménez Martínez, L. (2009). *Neutralización de esfingomielinasa D recombinante de *Loxocles boneti* con varias preparaciones derivadas de suero hiperinmune de caballo.*
- Jongejan, F., & Uileneberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, *129*.
- Jürgen, B., Breitenstein, A., Urlacher, V., Büttner, K., Lin, H., Hecker, M., ... Neubauer, P. (2010). Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *9*, 41. doi:10.1186/1475-2859-9-41
- Karpel, R., Alon, T., Glaser, G., Schuldiner, S., & Padan, E. (1991). Expression of a sodium proton antiporter (NhaA) in *Escherichia coli* is induced by Na and Li ions. *Journal of Biological Chemistry*, *266*, 21753–59.
- Kaufman, W. (1989). Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitology Today*, *5*, 47–56.
- Kazimirova, M., & Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Cell Infect Microbiol*, *3*(43).

- Keefe, E., Botterman, B., Romero, M., Rossi, A., & Gross, G. (2008). Carbon nanotube coating improves neuronal recordings. *Nat. Nanotechnol*, 3, 434–9.
- Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourti, J., & Richarme, G. (2007). Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 603–10.
- Khalilzadeh, R., Mohammadian-Mosaabadi, J., Bahrami, A., Nazak-Tabbar, A., Nasiri-Khalili, M. A., & Amouheidari, A. (2008). Process development for production of human granulocyte-colony stimulating factor by high cell density cultivation of recombinant Escherichia coli. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 35, 1643–1650.
- Kim, C. K., Choi, J. H., Lee, S. B., Lee, S. M., & Oh, J. W. (2014). Expression and Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Fed-Batch Culture of Escherichia coli. *Appl Biochem. Biotechnol*.
- Klunk, W. E., Pettegrew, J. W., & Abraham, D. J. (1989). Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 1273–1281.
- Kolesnick, R. (1991). Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Progress in Lipid Research*, 30(1), 1–38.
- Koval, M., & Pagano, R. (1991). Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*, 1082(2), 113–25.
- Kuczyńska-Wiśnik, D., Zurawa-Janicka, D., Narkiewicz, J., Kwiatkowska, J., Lipińska, B., & Laskowska, E. (2004). Escherichia coli small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies. *Acta Biochimica Polonica*, 51(4), 925–31.
- Kuczyńska-Wiśnik, D., Zurawa-Janicka, D., Narkiewicz, J., Kwiatkowska, J., Lipińska, B., & Laskowska, E. (2005). Escherichia coli small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies. *Acta Biochimica Polonica*, 51(4), 925–31.
- Kurpiewski, G., Forrester, L. J., Barrett, J. ., & Campbell, B. (1981). Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim Biophys Acta*, 678, 467–476.
- Lee, S., & Keasling, J. (2008). Heterologous protein production in Escherichia coli using the propionate inducible pPro system by conventional and auto induction methods. *Protein Expression and Purification*, 61, 197–203.
- Lethanh, H., Neubauer, P., & Hoffmann, F. (2005). The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant Escherichia coli and delay degradation of inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 6.
- LeVine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sciences*, 2, 404–410.
- Li, M., Su, Z., & Janson, J. (2004). In vitro refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33, 1–10.
- Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, E. (1998). Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 497–501.

- Liovic, M., Ozir, M., Zavec, A. B., Peternel, S., Komel, R., & Zupancic, T. (2012). Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells. *Microbial Cell Factories*, *11*(1), 67.
- Lipski, A., Pino, C., Haselton, F., Chen, I., & Wand Shastri, V. (2008). The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function *Biomaterials*. *Biomaterials*, *29*, 3836–46.
- Lu, S., Eiteman, M. a, & Altman, E. (2009). pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(8), 1101–9.
- Magill, N. G., Cowan, A. E., Koppel, D. E., & Setlow, P. (1994). The internal pH of the forespore compartment of *Bacillus megaterium* decreases by about 1 pH unit during sporulation. *Journal of Bacteriology*, *176*, 2252–2258.
- Makela, P. (2000). Vaccines, coming of age after 200 years. *FEMS Microbiology Rev.*, *24*, 9–20.
- Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D., & Bayer, K. (2008). Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *Journal of Biotechnology*, *138*(3-4), 67–73.
- Margreiter, G., Schwanninger, M., Bayer, K., & Obinger, C. (2008). Impact of different cultivation and induction regimes on the structure of cytosolic inclusion bodies of TEM1-beta-lactamase. *Biotechnology Journal*, *3*(9-10), 1245–55.
- Mathias, S., Dressler, K., & Kolesnick, R. (1991). Characterization of a ceramide-activated protein kinase: Stimulation by tumor necrosis factor α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(22), 10009–10013.
- Maurizi, M., Clark, W., Kim, S., & Gottesman, S. (1990). Clp P represents a unique family of serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, *265*, 12546–12552.
- McGinley-Smith, D., & SS, T. (2003). Dermatoses from ticks. *J Am Acad Dermatol*, *49*(3), 393–6.
- Merill, A. J., Schmelz, E., Dillehay, D., Spiegel, S., Shayman, J., Schroeder, J., ... E, W. (1997). Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl Pharmacol*, *142*(1), 208–25.
- Middelberg, A. (2004). Preparative protein folding. *Trends in Biotechnology*, 433–437.
- Morell, M., Bravo, R., Espargaró, A., Sisquella, X., Avilés, F. X., Fernández-Busquets, X., & Ventura, S. (2008). Inclusion bodies: specificity in their aggregation process and amyloid-like structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1783*(10), 1815–25.
- Morita, M. T., Kanemori, M., Yanagi, H., & Yura, T. (2000). Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the sigma 32 level in *Escherichia coli*. *National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(11), 5860–5865.
- Morita, M. T., Tanaka, Y., Kodama, T., Kyogoku, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (1999). Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & Development*, *13*, 655.665.

- Nahálka, J. (2007). Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to alpha-D-glucose-1-phosphate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(4), 219–23.
- Nahalka, J., Dib, I., & Nidetzky, B. (2007). Encapsulation of *Trigonopsis variabilis* D -Amino Acid Oxidase and Fast Comparison of the Operational Stabilities of Free and Immobilized Preparations of the Enzyme, 99(2), 251–260.
- Nahálka, J., Mislovicová, D., & Kavcová, H. (2009). Targeting lectin activity into inclusion bodies for the characterisation of glycoproteins. *Molecular bioSystems*, 5(8), 819–21.
- Nahalka, J., & Nidetzky, B. (2006). Fusion to a Pull-Down Domain : A Novel Approach of Producing *Trigonopsis variabilis* D -Amino Acid Oxidase as Insoluble Enzyme Aggregates, 97(3), 454–461.
- Nahálka, J., & Patöprsty, V. (2009). Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3). *Org Biomol Chem*, 7(9), 1778–80.
- Nahálka, J., Vikartovská, A., & Hrabárová, E. (2008). A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis. *Journal of Biotechnology*, 134(1-2), 146–53.
- Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., & Märkl, H. (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during highcell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 597–601.
- Neves-Petersen, M., Petersen, E. I., Fojan, P., Noronha, M., & Pertersen, S. (2001). Engineering the pH optimum of a triglyceride lipase: from predictions based on electrostatic computations experimental results. *Journal of Biotechnology*, 87, 225–254.
- Nirthanan, S., & Gwee, M. (2004). Three finger a-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharm Sci*, 94, 1–17.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C., & Rhodius, V. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes & Development*, 20, 1776–1789.
- Oberg, K., Chrnyk, B., Wetzel, R., & Fink, A. (1994). Native-like secondary structure in interleukin-1-beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FT-IR. *Biochemistry*, 33, 2628–2634.
- Okazaki, T., Bell, R., & Hannun, Y. (1989). Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(32), 19076–19080.
- Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R., & Hannun, Y. (1990). Role of ceramide as a lipid mediator of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15823,15831.
- Olamendi-Porugal, T., Batista, C. V. F., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villa-Hernandez, O., & Zavaleta-Martínez-Vargas, A. (2008). Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*, 53, 375–82.
- Olsen, Budde, B., Siegumfeldt, H., Rechinger, K., Jakobsen, M., & Ingmer, H. (2002). Noninvasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 60.

- Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solis, J., ... Alagón, A. (2006). North and South American Loxosceles spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon*, 48(1), 64–74.
- Ospina, S., Barzaua, E., Ramirez, O. T., & Lopez-munguia, A. (1996). Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase, 0229(96), 462–469.
- Patra, a K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, a, Garg, L. C., & Panda, a K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 18(2), 182–92.
- Pauli, I., Puka, J., Guberte, I. C., & Minozzo, J. C. (2006). The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*, 48(2), 123–137.
- Pedroso, M. S., Méndez Mellor, L., Valdez, M., de Moura Sousa, R., Dos Reis Camargo, A. J., Constanza, N., & Ascanio Evanoff, E. (2007). Control de las infestaciones de la garrapata Boophilus microplus en la ganadería Cubana y en regiones de latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac dentro de un programa de lucha integral. *Red Electrónica de Garrapatas Y Enfermedades Transmitidas Por Garrapatas Para America Latina Y El Caribe, RedEctopar*, 6.
- Peternel, S., Jevsevar, S., Bele, M., Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2008). New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 49(Pt 4), 239–46.
- Peternel, S., & Komel, R. (2010). Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microbial Cell Factories*, 9, 66.
- Peternel, S., & Komel, R. (2011). Active Protein Aggregates Produced in Escherichia coli. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 8275–87.
- Pillai, O., & Pachagnula, R. (2001). Insulin therapies- past, present and future. *Drug Discovery Today*, 6(20), 1056–1061.
- Przybycien, T., Dunn, J., Valax, P., & Georgiou, G. (1994). Secondary structure characterization of beta-lactamase inclusion bodies. *Protein Engineering*, 7, 131–126.
- Remminghorst, U., & Rehm, B. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, 28, 1701–12.
- Richard, H., & Foster, J. (2004). Escherichia coli glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology*, 186, 6032–6041.
- Rigoni, M., Paoli, M., Milanesi, E., Caccin, P., Rasola, A., & Bernardi, P. (2008). Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons bind specifically to mitochondria and open their transition pores. *J Biol Chem*, 283, 34013–20.
- Rinas, U., & Bailey, J. (1992). Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 609–14.
- Rinas, U., Boone, T., & Bailey, J. (1993). Characterization of inclusion bodies in recombinant Escherichia coli producing high levels of porcine somatotropin. *Journal of Biotechnology*, 28.

- Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A., & García-Fruitós, E. (2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 9, 71. doi:10.1186/1475-2859-9-71
- Rosetto, O., & Montecucco, C. (2008). Pharmacology of neurotransmitter release. *Handbook of Experimental Pharmacology Berlin:Springer-Verlag*, 129–70.
- Rosso, J., O, V.-R., Gutiérrez, J., Rochat, H., & Bougis, P. (1996). Characterization of α neurotoxin and Phospholipase A2 activities from Micrurus Venoms. *Eur J Biochem*, 238, 231–9.
- Roze, J. A. (1996). Coral snakes of the americas: Biology, identification and venoms. In *Krieger Pub Co* (p. 340).
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., & Jaenicke, R. (1997). *Folding Proteins. In Protein Function, a Practical Approach* (pp. 57–99).
- Rudolph, R., & Lillie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal*, 10, 49–56.
- Russell, F. ., Walter, F. G., Bey, T. A., & Fernandez, M. C. (1997). Snakes and snakebites in Central America. *Toxicon*, 35, 1469–1522.
- Samaroo, H., Lu, J., & Webster, T. (2008). Enhanced endothelial cell density on NiTi surfaces with sub-micron to nanometer roughness. *Int. J. Nanomed.*, 3, 75–82.
- Sauer, J., J.L. M., Bowman, A. ., & Essenberg, R. C. (1995). Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol*, 40, 245–267.
- Schein, C. (1989). Production of soluble recombi- nant proteins in bacteria. *Biotechnology*, 7, 1141–1149.
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperatures. *Bio/Technology*, 6, 291–294.
- Schenone, H., Saavedra, T., Rojas, A., & Villarroel, F. (1989). Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical, and experimental studies. *Rev. Inst. Med. Trop*, 31, 403–415.
- Schirano, Y., & Shibata, D. (1990). Low temperature cultivation of Escherichia coli carrying a rice lipoxigenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at high levels. *FEBS Letters*, 271, 128–130.
- Schirmer, E., Glover, J., Singer, M., & Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 289–296.
- Schlieker, C., Bukau, B., & Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in theE. coli cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 96, 13–21.
- Schneider, L., Thomas, J., Bassuk, J., Sage, H., & Baneyx, F. (1997). Manipulating thE aggregation and oxidation of human SPARC in the cytoplasm of Escherichia coli. *Nature Biotechnology*, 15, 581–585.
- Schoedel, F. (1990). Oral vaccination using recombinant bacteria. *Semin. Immunol.*, 2, 341–349.

- Schrodel, A., Volz, J., & De Marco, A. (2005). Fusion tags and chaperone co-expression modulate both the solubility and the inclusion body features of the recombinant CLIPB14 serine protease. *Journal of Biotechnology*, *120*, 2–10.
- Schuldiner, S., Agmon, S., Brandsma, J., Cohen, A., & Friedman, E. (1986). Induction of SOS functions by alkaline intracellular pH in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *168*, 936–939.
- Seras-Franzoso, J., Díez-Gil, C., Vazquez, E., García-Fruitós, E., Cubarsi, R., Ratera, I., ... Villaverde, A. (2012). Bioadhesiveness and efficient mechanotransduction stimuli synergistically provided by bacterial inclusion bodies as scaffolds for tissue engineering. *Nanomedicine (London, England)*, *7*(1), 79–93.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A., & Fass, R. (1996). Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnology and Bioengineering*, 421–428.
- Shin, C., Hong, M., Bae, C., & Lee, J. (1997). Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress*, *13*, 249–257.
- Shitu, J. O., & Woodley, J. M. (2009). Induction studies with *Escherichia coli* expressing recombinant Interleukin 13 using multiparameter flow cytometry. *Biotechnology Letters*, *31*(4), 577–584.
- Shojaosadati, S., Varedi Kolaei, S., Babaeipour, V., & Farnoud, A. (2008). Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian J. Bio5technol*, *6*, 63–84.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(4), 303–10.
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. a. (2009). *Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. Advances in microbial physiology* (Vol. 55, pp. 1–79, 317).
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., & Slonczewski, J. L. (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *Journal of Bacteriology*, *176*(6), 1729–37.
- Small, P., & Waterman, S. (1998). Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, *6*, 214–216.
- Smith, A. (2003). Protein misfolding. *Nature*, *426*, 883–909.
- Sonenshine, D., Roe, M., (1991). *Biology of ticks*, Oxford University Press, USA, Vol 1 (p. 472).
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *4*(1), 1.
- Speed, M., Wang, D., & King, J. (1996). Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology*, *14*, 1283–1287.
- Stockel, J., Doring, K., Molotka, J., Jahnig, F., & Dornmair, K. (1997). Pathway of detergent-mediated and peptide ligand-mediated refolding of heterodimeric class II major histocompatibility complex (MHC) molecules. *Eur. J. Biochem*, *248*, 684–691.

- Strandberg, L., & Enfors, S. S. (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6).
- Strandberg, L., Veide, A., & Enfors, S. (1987). Production of the hybrid protein staphylococcal protein A1 *Escherichia coli* f-galactosidase with *E. coli*. *J. Biotechnol.*, 6, 225–238.
- Straus, D., Walter, W., & Gross, C. (1990). DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes & Development*, 4(12A), 2202–9.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 195–201.
- Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A. B., & Schuldiner, S. (1987). An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169(2), 885–7. Retrieved from
- Takagi, H., Morinaga, Y., Tsuchiya, M., Ikemura, H., & Inouye, M. (1988). Control of folding of proteins secreted by a high expression secretion vector, pINIIIompA: 16-fold increase in production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 6, 948–950.
- Tambourgi, D. V., Fernandes Pedrosa, M., van den Berg, C., Gonçalves de Andrade, RM Ferracini, M., Paião Cavalcante, D., Morgan, B., & Rushmere, N. (2004). Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol*, 41, 831–840.
- Taylor, G., Hoare, M., Gray, D., & Marston, F. (1986). Size and Density of Protein Inclusion Bodies. *Nature Biotechnology*, 4, 553–557.
- Thomas, J. G., Ayling, a, & Baneyx, F. (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66(3), 197–238.
- Tokatlidis, K., Dhurjati, P., Millet, J., Beguin, P., & Aubert, J. (1991). High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *FEBS Letters*, 282, 205–208.
- Tsai, L., Lu, H., WC, K., Curless, C., Klein, M., Lai, P., ... Mann, M. (1988). Control of misincorporation of de novo synthesized norleucine into recombinant interleukin-2 in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 156(2), 733–9.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arawaka, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusio bodies. *Protein Expression and Purification*, 28, 1–8.
- Uetz, P., Goll, J., & Hallerman, J. (2010). The TIGR Reptile Database.
- Upadhyay, A. K., Murmu, A., Singh, A., & Panda, A. K. (2012). Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PloS One*, 7(3), e33951. 1
- Valax, P., & Georgiou, G. (1993). Molecular Characterization of β -Lactamase Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnology Progress*, 9(5), 539–47.

- Valdez-Cruz, N. a, Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. a. (2011). Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioengineered Bugs*, 2(2), 105–110.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004a). Optimized procedures for renaturation of recombinant human bone morphogenic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnol. Bioeng*, 85, 601–609.
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004b). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3(1), 11.
- Vasina, J. A., & Baneyx, F. (1997). Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the *Escherichia coli* cspA and tacPromoter Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 9(2), 211–218.
- Vázquez, E., Corchero, J. L., Burgueño, J. F., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Bosser, R., ... Villaverde, A. (2012). Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 24(13), 1742–7.
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., & Goloubinoff, P. (1998). The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11032–11037.
- Ventura, S., & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 179–85. 7
- Villaverde, A. (2012). Bacterial inclusion bodies: an emerging platform for drug delivery and cell therapy. *Nanomedicine (London, England)*, 7(9), 1277–9.
- Villaverde, A., García-Fruitós, E., Rinas, U., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Corchero, J. L., & Vazquez, E. (2012). Packaging protein drugs as bacterial inclusion bodies for therapeutic applications. *Microbial Cell Factories*, 11, 76. 6
- Vital Brazil, O. (1987). Mode of action and pathology of experimental evenomation. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 29, 119–26.
- Wang, L. (2009). Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. *Prion*, 3(3), 139–45.
- Wang, L., Maji, S. K., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., & Riek, R. (2008). Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biology*, 6(8), e195.
- Wang, X., & Engel, P. (2009). An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *BMC Biotechnology*, 9(19).
- Wasmer, C., Benkemoun, L., Sabaté, R., Steinmetz, M., Couлары-Salin, B., Wang, L., Meier, B. (2009). Solid-state NMR spectroscopy reveals that *E. coli* inclusion bodies of HET-s(218-289) are amyloids. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(26), 4858–60.
- Wilks, J. C., & Slonczewski, J. L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by GFP fluorimetry. *Journal of Bacteriology*, 189, 5601–5607.
- Wilson, L. ., Mok, Y. F., Binger, K., Griffin, M., Mertens, H., Lin, F., Howlett, G. (2007). A structural core within apolipoprotein C-II amyloid fibrils identified using hydrogen exchange and proteolysis. *Journal of Molecular Biology*, 366.

- Worral, D., & Goss, N. (1989). The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Australian Journal of Biotechnology*, 3, 28–32.
- Wu, Q., Wang, Y., & Chen, G. (2009). Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.*, 37(1), 1–12.
- Yamamori, T., & T., Y. (1980). Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*. Evidence for transcriptional control. *Journal of Bacteriology*, 142, 843–851.
- Yang, H., Zhang, T., Xu, K., Lei, J., Wang, L., Li, Z., & Zhang, Z. (2011). Full Length Research Paper A novel and convenient method to immunize animals : Inclusion bodies from recombinant bacteria as antigen to directly immunize animals, 10(41), 8146–8150.
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347.
- Yohannes, E., Barnhart, D., & Slonczewski, J. (2004). pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 186, 192–199.
- Zhou, Y., Ma, X., Hou, Z., Xue, X., Meng, J., Li, M., ... Lou, X. (2012). High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for prodrug of recombinant human GLPs production. *Protein Engineering*, 85, 38–43.