



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Evaluación del efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano en un sistema termoinducido de *Escherichia coli*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
I.B.T. XIMENA GÓMEZ GIL

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Antonino Baez Rogelio
Instituto de Ciencias, BUAP
Dr. Leobardo Serrano Carreón
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Agosto, 2020



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.

Gómez Gil Ximena
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presenta

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 10 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Evaluación del efecto de la tensión de oxígeno disuelto sobre la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano en un sistema termoinducido de Escherichia coli**", dirigida por el/la Dr(a). **Trujillo Roldán Mauricio Alberto**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Martínez Jiménez Alfredo
VOCAL	Galindo Fentanes Enrique
VOCAL	Córdova Aguilar María Soledad
VOCAL	Poggio Ghilarducci Sebastián
SECRETARIO	Ruiz Terán Francisco

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 10 de febrero de 2020


Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
COORDINADORA

Jurado revisor

Presidente:

Dr. Martínez Jiménez Alfredo (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Vocales:

Dr. Galindo Fentanes Enrique (Instituto de Biotecnología, UNAM).

Dra. Córdova Aguilar María Soledad (Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM).

Dr. Poggio Ghilarducci Sebastián (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Secretario:

Dr. Ruiz Terán Francisco (Facultad de Química, UNAM).

Agradecimientos

Agradezco los apoyos económicos recibidos durante la realización de este proyecto de maestría, los cuales fueron la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número CVU: 894768, así como de los proyectos CONACyT 247473 y 220795. Asimismo, se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414).

Por otra parte, también se agradece al programa de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia al XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2019.

Durante este proyecto, se utilizó la cepa *E.coli* W3110, proporcionada por la empresa PROBIOMED S.A. de C.V, que tiene una copia de la proteína represora termosensible, cl857, en cromosoma y la expresa de forma constitutiva. Esta cepa, derivada de K-12, está transformada con el plásmido pV3-uri200N (también propiedad de PROBIOMED S.A de C.V.), que contiene el gen optimizado del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) humano.

Agradecimientos personales.

A mis padres y hermano, por confiar en mí y por apoyarme en todo momento y en cada decisión que tomo. Son mis padres mi modelo a seguir, gracias por escucharme y darme sus consejos.

Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por haberme recibido en su grupo de investigación, y haberme guiado en este proyecto.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Leobardo Serrano Carreón y el Dr. Antonino Báez Rogelio por sus constantes opiniones y el tiempo que le dedicaron a este proyecto.

A la Dra. Norma Adriana Valdez Cruz por apoyar constantemente en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del laboratorio, por su apoyo y amistad brindada en este tiempo. A Sara y Greta que me enseñaron muchas cosas desde que llegué a este laboratorio y siempre estuvieron ahí para resolver mis dudas.

En especial, a Paola, Mayra, Alberto, Jesús y Daniel, que juntos hemos vivido esta etapa de nuestras vidas, que hacen mis días más divertidos y que se convirtieron en más que compañeros de laboratorio y ahora son mis mejores amigos. También a Alma y Alan que después de tomar clases juntos, se convirtieron también en mis mejores amigos.

Al Ing. Abel Blancas y la Sra. María Elena, quienes son parte esencial de este grupo de trabajo y quienes siempre estuvieron apoyándome.

A la Dra. Nuria Sánchez por su apoyo en la realización de los análisis de fluorescencia con Th-T y los consejos brindados para la realización de éstos.

Al Dr. Néstor Pérez, por proporcionarnos la cepa para este proyecto y por sus críticas y propuestas en el desarrollo del mismo.

Nuevamente, al Dr. Mauricio y la Dra. Adriana por hacerme partícipe de un proyecto simultáneo, la Red LIDA y confiar en mí para las actividades realizadas en el mismo. Aprendí muchísimo trabajando en este proyecto y espero poder seguir siendo parte de ello.

Contenido

INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS.....	14
ABREVIATURAS.....	15
1 RESUMEN.....	16
2 INTRODUCCIÓN.....	18
2.1 FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS Y GRANULOCITOS (GM-CSF).....	19
2.2 <i>Escherichia coli</i> COMO PRODUCTOR DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	22
2.3 CUERPOS DE INCLUSIÓN	25
2.3.1 ¿POR QUÉ SE FORMAN LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN?.....	25
2.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN.....	27
2.4 SISTEMAS DE EXPRESIÓN POR TERMOINDUCCIÓN.....	30
2.5 RESPUESTA DE CHOQUE TÉRMICO EN <i>Escherichia coli</i>	32
2.6 ¿CÓMO SENSAS OXÍGENO <i>Escherichia coli</i> ?	34
3 ANTECEDENTES.....	41
3.1 Estudio de TOD.....	39
3.2 ANTECEDENTES DE CARACTERIZACIÓN DE ARQUITECTURA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	43
3.2.1.1 Resistencia a la degradación proteolítica.....	43
3.2.1.2 Ensayos de estabilidad ante solubilidad química	44
3.2.1.3 FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared Spectroscopy)	45
3.2.1.4 Ensayos de unión a Tioflavina T (Th-T)	47
4 HIPÓTESIS:.....	50
5 OBJETIVO GENERAL	50
5.1 Objetivos particulares:.....	50
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
6.1 Cepa y banco de trabajo	51

6.2	Factor de conversión de equivalencia de DO (U.A. 600 nm) – Biomasa (g/L) de <i>E. coli</i> W3110.....	51
6.3	Medio mineral.....	53
6.4	Cultivo en matraces.....	54
6.5	Cultivo en reactores.	54
6.6	Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos.....	55
6.7	Cálculo de parámetros cinéticos	56
6.8	Recuperación de cuerpos de inclusión.....	57
6.9	Determinación de proteína total, soluble y presente en cuerpos de inclusión por método de Bradford	58
6.10	Detección y análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	58
6.11	Degradación proteolítica por Proteinasa K.....	59
6.12	Ensayos de estabilidad ante solubilidad química con Gn•HCl	59
6.13	ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	59
6.14	Ensayos de unión a Thioflavina T (Th-T)	60
6.15	Microscopía electrónica.....	60
6.16	Estadística.....	61
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
7.1	Caracterización cinética	62
7.2	Evaluación de la producción de proteína total y rHuGM-CSF en <i>E.coli</i> W3110 bajo un sistema de inducción por temperatura	72
7.3	Análisis de cuerpos de inclusión de rHuGM-CSF.....	80
7.3.1	Detección y análisis de proteína en CI por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de Coomasie	80
7.4	Arquitectura de cuerpos de inclusión	82
7.4.1	Degradación proteolítica por Proteinasa K	83
7.4.2	Ensayos de estabilidad ante solubilidad química con Gn•HCl.....	85
7.4.3	FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	87
7.4.4	Ensayos de unión a Thioflavina T (Th-T).....	92
7.4.5	Microscopía electrónica de cuerpos de inclusión.....	94

7.4.6	DISCUSIÓN DE ARQUITECTURA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN .	97
8	CONCLUSIONES:	105
9	Perspectivas	106
10	Bibliografía	107
11	Anexos	131
11.1	Curva estándar para proteína total y proteína en cuerpos de inclusión y proteína soluble	131
11.2	Curvas estándar para proteína soluble en diferentes concentraciones de Gn•HCl	131
11.3	Caracterización a nivel matraz	132
11.4	Perfiles de control	135
11.5	Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa	137
11.6	. Densitometría de geles de proteína total para condiciones con control de TOD postinducción	138
11.7	Perfiles de degradación de CI con Proteinasa K	138

INDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Árbol familiar de granulocitos y macrófagos. Se muestran las citocinas que controlan cada paso de diferenciación/proliferación. G: linaje celular granulocítico; GM: linaje celular granulocito-macrófago; M: linaje celular macrófago, DC: linaje celular dendrítico (Modificado al español de Metcalf, 2013). 20

Figura 2-2. Representación de la estructura de rHuGM-CSF (PDB 1CSG, Walter et al., (1992) Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Imagen hecha con PyMOL 2.2.3. Las hélices se representan en color naranja, las láminas β en verde y los puentes disulfuro en amarillo. Los sitios de N-glicosilación se muestran en azul y los de O-glicosilación en morado. 21

Figura 2-3. Número de nuevas entidades moleculares (NME) y licencias biológicas (Biologic) aprobadas por la FDA desde 1998 hasta 2019. Tomado de Morrison (2020). 22

Figura 2-4. a) Número de Nuevas Entidades Moleculares aprobadas por la FDA en el 2019 por área terapéutica. (Datos tomados de Morrison, 2020) b) Fábricas

celulares utilizadas para la producción de proteínas recombinantes contra cáncer. (Datos tomados de Sánchez-García et al., 2016). 24

Figura 2-5. Modelo de chaperonas bacterianas involucradas en el plegamiento de novo de proteínas..... 26

Figura 2-6. Representación de la regulación del promotor pL/pR por la proteína represora CI. (Tomado de Sarkar-Banerjee et al. 2018). 31

Figura 2-7. Generación de especies reactivas de oxígeno durante la reducción de oxígeno molecular. Tomado de Imlay, 2013..... 35

Figura 2-8. a) Rutas de activación de acetato en E.coli. Las enzimas se representan por rectángulos. Pta: fosfotransacetilasa; ackA: acetato quinasa; acs: acetil-CoA sintasa; poxB: piruvato oxidasa. B) Principales vías metabólicas de E.coli. Flechas rojas punteadas: ciclo TCA en condiciones aerobias; flechas negras: vías anaerobias utilizadas por E.coli en ausencia de oxígeno para la producción de succinato, oxalacetato, formiato, etanol, lactato y acetato. 37

Figura 3-1. A) Estructura química de una molécula Th-T. I: Anillo benzotiazol, II. Benceno, III: Grupo dimetilamina. B). Modelo espacial de Th-T (Tomado de Stsiapura et al., 2007). 49

Figura 3-2. Modelo de "canal" de unión de Th-T a lámina β similar a fibrillas amiloides. (Tomado de Biancalana & Koide, 2010). 49

Figura 6-1. Factor de equivalencia DO (U.A. 600 nm) - Biomasa (g/L) para cultivos sin (●) y con inducción (■) de la expresión de la proteína recombinante rHuGM-CSF. 52

Figura 7-1. Ejemplo representativo de perfiles de control de TOD, pH y temperatura de las cinéticas de crecimiento de E.coli W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF. TOD: línea continua negra, temperatura: línea punteada, pH: línea intermitente. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD..... 63

Figura 7-2. Comparación de cinéticas de crecimiento de E. coli W3110 recombinante como biomasa (g/L) y Ln (g/L) bajo diferentes condiciones de control de TOD postinducción. El cambio del cultivo a una temperatura de 42° C se muestra con una línea vertical. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (○) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control. 64

Figura 7-3.a) μ postinducción de *E.coli* W3110 a 70%, 30%, 10% y 5% de control de TOD a 42°C. b) μ postinducción como función de la velocidad específica de consumo de sustrato de *E. coli* W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF.

..... 66

Figura 7-4. Comparación de cinéticas de consumo de glucosa en cultivos de *E. coli* W3110 recombinante como glucosa residual (g/L) bajo diferentes condiciones de control de TOD postinducción a nivel biorreactor. El cambio y periodo de tiempo del cultivo a una temperatura de 42° C se muestra una línea. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (o) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control..... 67

Figura 7-5. Acumulación extracelular de ácidos orgánicos al momento de la inducción, y 1, 3 y 15 h después de la inducción, a diferentes condiciones de control de TOD postinducción. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (o) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control..... 69

Figura 7-6. a) Producción de proteína total; b) rendimiento proteína total/biomasa; c) rendimiento proteína insoluble/proteína total, en diferentes tiempos postinducción y distintas condiciones de control de TOD postinducción. Se muestra el promedio y la desviación estándar de muestras de tres cultivos por condición. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción y se muestra con letras minúsculas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p>0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p<0.05$)...... 73

Figura 7-7. a) SDS-PAGE de lisado celular de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF a diferentes % de control de TOD postinducción. En cada carril se cargó, 25 μ g de lisado celular. b) SDS-PAGE de proteína total, cargado volumétricamente (15 μ L) partiendo de 1 U.A. a 15 h postinducción. Las condiciones de %TOD postinducción se indican en la parte superior y los números indican las horas postinducción. En los últimos carriles (st) de cada gel, 2 μ g de rHuGM-CSF estándar. La banda correspondiente a rHuGM-CSF se indica con una flecha. PM: Marcador de peso molecular (kDa), st: Estándar de rHuGM-CSF. 76

Figura 7-8. Producción de rHuGM-CSF en *E.coli* W3110. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción y se muestra con letras minúsculas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p>0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p<0.05$). 78

Figura 7-9. SDS-PAGE de cuerpos de inclusión purificados, cargando 20 μ g de CI cuantificados por Bradford. Los números indican las horas postinducción para cada

uno de las condiciones de control de % de TOD postinducción utilizadas, indicadas en la parte superior. En los últimos carriles (st) de cada gel, se cargó 2 µg de rHuGM-CSF estándar. La banda correspondiente a rHuGM-CSF se indica con una flecha.

PM: Marcador de peso molecular (kDa), st: Estándar de rHuGM-CSF. 81

Figura 7-10 % rHuGM-CSF en CI por densitometría de geles en el programa Image Lab de BioRad, a diferentes tiempos postinducción y diferentes %TOD. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$). 81

Figura 7-11. Perfiles de degradación con proteinasa K (50 µg/mL), de CI purificados, obtenidos a diferente control postinducción de %TOD post. 3 h (Superior) y 15 h (Inferior) después de la inducción. Se muestra el promedio del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (○) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control 84

Figura 7-12. Proteína solubilizada de CI purificados, formados a diferente % de control de TOD postinducción a 3h (a) y 15 h (b) posterior a la inducción después de 24 h de incubación a diferentes concentraciones de Gn•HCl. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. 85

Figura 7-13. Comparación de proteína solubilizada de CI obtenidos a diferente control de %TOD postinducción después de 24 h de incubación en diferentes concentraciones de Gn•HCl de CI. 3 h después de la inducción: barra rellena y 15 h después de la inducción: barra sin rellena. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Se muestra con (*) para diferencias de forma significativa ($p < 0.05$). 87

Figura 7-14. Segundas derivadas de los espectros IR por ATR-FTIR después de un suavizado de 13 puntos por el método Savitzky-Golay con el software IR Solutions (Shimadzu, Japón) para CI purificados obtenidos a 3 h (a) y 15 h (b) después de la inducción en 5 condiciones diferentes de control de TOD postinducción. Los valores se encuentran normalizados al pico de tirosina ($\sim 1508 \text{ cm}^{-1}$). Se señala la posición de las bandas correspondientes a las estructuras α -hélice ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$), random coil ($\sim 1647 \text{ cm}^{-1}$), hojas β ($\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$) y estructuras tipo amiloide ($\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$). Se muestran los promedios de los perfiles de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas. 88

Figura 7-15. Mínimos de la segunda derivada normalizada de los espectros IR correspondientes a las bandas de α - hélice (a), hojas β (b) y agregados (c) para CI purificados a 3 h y 15 h postinducción. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa. Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa. Se muestra con letras minúsculas para $p < 0.05$ y con mayúsculas para $p < 0.01$ 91

Figura 7-16. Comparación de los mínimos de la segunda derivada normalizada de los espectros IR correspondientes a las bandas de α - hélice (a), hojas β (b) y agregados (c) para CI purificados respecto al tiempo de inducción. 3h: barra rellena y 15 h: barra sin relleno. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Se muestra con (*) para diferencias con $p < 0.05$ 92

Figura 7-17. Comparativo de espectros de fluorescencia de Th-T incubada con CI formados a diferentes valores de control de TOD postinducción, obtenidos después de 3 h (a) y 15 h (b) de inducción. c) Análisis estadístico de los máximos de fluorescencia de Th-T Se muestra el espectro de Th-T libre como control, y el promedio y desviación estándar de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas. 93

Figura 7-18. Espectros de fluorescencia de Th-T incubada con CI formados a 5 condiciones diferentes de control de TOD postinducción (70%, 30%, 10%, 5%, sin control) después de 3 h (línea negra) y 15 h de inducción (línea roja). En la gráfica final se observa la comparación de los máximos de fluorescencia a diferentes tiempos de inducción: 3h: barra rellena; 15 h: barra sin relleno. Se muestra el espectro de Th-T libre como control (línea punteada negra), y el promedio y desviación estándar de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas. Las diferencias de forma significativa $p < 0.05$ se muestran con (*)..... 94

Figura 7-19. Micrografías de CI purificados obtenidos 3 h después de la inducción, formados a diferentes % de control de TOD postinducción. Las barras representan la escala. Izquierda: barra representa 2 μm , centro: barra representa: 1 μm , derecha: barra representa 0.5 μm o 1 μm 96

Figura 7-20. Histograma de los diámetros máximos de CI purificados formados a diferentes % de control de TOD obtenidos a 3 h después de la inducción medidos mediante el programa ImageJ. a) 5% de TOD (N=193), b) 10% de TOD (N=98), c) 30% de TOD (N=312), d) 70% de TOD (N=300), e) Sin control de TOD (N=153). f) Frecuencia acumulada de los diámetros máximos de CI obtenidos después de 3 h

de inducción. 5% de TOD (línea-punto-línea), 10% de TOD (línea punteada), 30% de TOD (línea continua), 70% de TOD (línea discontinua), sin control de TOD (línea-punto-punto)..... 97

Figura 11-1. Curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) + IEF (1:5) (●) en un rango de 0 - 0.5 mg/mL y de BSA (■) en un rango de 0 - 0.75 mg/mL..... 131

Figura 11-2. Curvas estándar de albumina de suero bovino (BSA) + 0 M (○), 2 M (■), 4 M (Δ), 6 M (▼) en un rango de 0-0.375 mg/mL..... 131

Figura 11-3. Cinéticas de E.coli W3110 productora de rHuGM-CSF a) Cinética de crecimiento (g/L), b) Glucosa residual en el medio (g/L), c) Perfiles de TOD (%), d) Perfiles de pH. Los cultivos a 30°C sin inducción, se muestran con (○) y TOD con línea punteada, y los inducidos a 42°C, se muestran con (●) y TOD con línea continua..... 134

Figura 11-4. Perfiles de control de las cinéticas de crecimiento de E.coli recombinante productora de rHuGM-CSF. TOD: línea continua, temperatura: línea punteada, pH: línea intermitente. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD. Se muestran 3 réplicas biológicas por condición... 136

Figura 11-5. Cinéticas de crecimiento de E. coli W3110 recombinante como biomasa (g/L) (●) y consumo de glucosa (g/L) (○) en los diferentes esquemas de control de TOD postinducción. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD. 137

Figura 11-6. % rHuGM-CSF en proteína total por densitometría de geles en el programa Image Lab de BioRad, a diferentes tiempos postinducción y diferentes %TOD. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción y se muestra con letras minúsculas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$). 138

Figura 11-7. Perfiles de degradación con proteinasa K (50 µg/mL), de CI purificados, obtenidos a diferente control postinducción de %TOD post a 3 h y 15 h después de la inducción. Se muestra el promedio del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (○) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control. 138

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Ejemplos de proteínas recombinantes para uso terapéutico aprobadas por la FDA entre enero 2018 y abril 2020.....	22
Tabla 2-2. Principales parámetros de proceso que tienen un efecto sobre las propiedades de cuerpos de inclusión (Datos tomados de de Marco et al., 2019).	29
Tabla 3-1. Antecedentes de estudios de oxígeno disuelto sobre producción de proteínas recombinantes	42
Tabla 3-2. Bandas de adsorción de IR en región amida I	46
Tabla 6-1. Composición de medio mineral descrito por Caspeta et al, 2013	53
Tabla 6-2. Tiempos de retención para la cuantificación de ácidos orgánicos en una columna Aminex HPX-87H.....	56
Tabla 7-1. Parámetros cinéticos y estequiométricos a nivel biorreactor, para los diferentes % de control de TOD postinducción utilizados (70%, 30%, 10%, 5% de TOD y sin control de TOD).....	65
Tabla 7-2. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas en citoplasma como CI, expresadas en E.coli utilizando un sistema de inducción por temperatura a nivel biorreactor.	77
Tabla 7-3. Velocidades de degradación ($\times 10^{-3}$) con proteinasa K.....	84
Tabla 7-4. Resumen de los resultados de caracterización de arquitectura de CI obtenidos para CI formados a diferentes % de control de TOD postinducción.	98
Tabla 11-1. Parámetros cinéticos estimados para cultivos de E.coli W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF en matraces en agitación orbital, a 200 rpm con y sin inducción a 42°C	133
Tabla 11-11-2. Análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías y comparaciones múltiples, para resultados de fluorescencia de Th-T tras la unión a CI obtenidos por diferentes condiciones de control de TOD postinducción.....	140

ABREVIATURAS

ATR	Reflectancia total atenuada
CI	Cuerpos de inclusión
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO 600nm	Densidad óptica a 600 nm
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
Gn•HCl	Cloruro de Guanidinio
h	Horas
HSP	Proteínas de choque térmico
IEF	Amortiguador para muestras de isoelectroenfoque
IPTG	Isopropil- β -D-1tiogalactopiranosido
IR	Infrarrojo
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
μ	Velocidad específica de crecimiento
nm	Nanómetros
PK	Proteinasa K
rHuGM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos recombinante humano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TB	Medio Terrific Broth
Th-T	Tioflavina T
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
U.A.	Unidades de absorbancia
Y p/x	Rendimiento proteína total/biomasa
Y _{pl} /PT	Rendimiento proteína insoluble/proteína total
Y _{rP} /PT	Rendimiento proteína recombinante/proteína total
Y rP/x	Rendimiento proteína recombinante/biomasa
Y x/s	Rendimiento biomasa/sustrato
Y _{ace} /s	Rendimiento acetato/biomasa
qs	Velocidad específica de consumo de sustrato
qs _{Glu}	Velocidad específica de consumo de glucosa

1 RESUMEN

La producción de proteínas recombinantes en *E. coli* presenta el gran reto de agregación de éstas en forma de cuerpos de inclusión (CI). Sin embargo, la obtención de proteínas como CI a nivel industrial se ha vuelto atractiva, pues se ha reportado que los CI contienen altos porcentajes de la proteína en cuestión, con actividad biológica y que puede recuperarse a través de un proceso de replegamiento *in vitro*. Además, se ha reportado que las características fisicoquímicas y estructurales de los CI dependen de las condiciones de cultivo, pero el efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) no se encuentra bien caracterizado. En este proyecto se propuso evaluar el efecto del control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), después de la inducción, sobre la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (rHuGM-CSF) y sobre las características de los CI en un sistema λ pL-cl857 de inducción por temperatura en *Escherichia coli*.

Se realizó la caracterización cinética de *E. coli* W3110 transformada con el plásmido pV3-uri200N (propiedad de PROBIOMED S.A. de C.V.) productora del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (rHuGM-CSF), bajo el control del sistema λ -cl857, inducible por temperatura, a 70%, 30%, 10%, 5% de TOD y sin control de TOD postinducción.

Para todas las condiciones controladas, se alcanzó una biomasa máxima similar (4.34 ± 0.4 g/L), mientras que para el cultivo sin control de TOD postinducción, se observó una disminución en la generación de biomasa, aproximadamente el 50% (2.30 ± 0.3 g/L). La velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad específica de consumo de glucosa ($q_{S_{Glu}}$), ambas después de la inducción, disminuyeron cuando los cultivos se controlaron a 5 y 10% de TOD post inducción (0.35 y 0.44 veces, así como 0.46 y 0.42 veces, respectivamente, comparada a las obtenidas a 30% de TOD). Asimismo, se observaron cambios significativos en la producción de proteína total y de la proteína recombinante, en los cultivos a 10% y 5% de TOD postinducción, comparados con los cultivos a 30% de TOD siendo, en promedio, 1.4 y 1.8 veces, respectivamente.

El efecto de la TOD sobre la arquitectura de los cuerpos de inclusión se evaluó mediante su resistencia a la degradación proteolítica con proteinasa K, su estabilidad ante la solubilidad química con $Gn \cdot HCl$, unión a Th-T, un agente de tinción específico para estructuras amiloides, análisis de bandas en el espectro infrarrojo mediante ATR-FTIR y microscopía electrónica.

Aunque no se observaron cambios en los perfiles electroforéticos de la composición de proteínas en los cuerpos de inclusión, en función del tiempo ni la TOD postinducción utilizada, los CI formados a 70% de TOD y sin control de TOD fueron menos resistentes a la degradación proteolítica y menos estables frente a la solubilización química a las 3 h postinducción. Por otro lado, los resultados mediante FTIR sugieren que los CI formados a 5% y 10% de TOD postinducción podrían tener menor proporción de estructuras tipo amiloide. Respecto al tamaño, los CI formados a 5% y 10% de control de TOD postinducción, presentaron diámetros más grandes comparados con los obtenidos a 30% y 70% de control de TOD postinducción. Los datos obtenidos sugieren que, los CI formado a 70% de control de TOD y sin control de TOD, pueden ser menos compactos comparados con los obtenidos a 5% y 10% de control de TOD postinducción. Así, obtener CI sin control postinducción de TOD, posdría facilitar los porcesos de recuperación, solubilización y replegamiento de la proteína, al mismo tiempo que podría resultar más práctico y representar menos costos en un proceso.

Este proyecto presenta evidencias de que la TOD tiene un papel importante en la producción de proteínas como CI, pues sus características tendrán un impacto en la recuperación, replegamiento y purificación de las proteínas recombinantes producidas.

2 INTRODUCCIÓN

Debido a las ventajas que presentan los sistemas de inducción por temperatura, bajo el control del sistema λ -cI857, han sido utilizados exitosamente para la producción de proteínas recombinantes de grado farmacéutico. Estos sistemas, basados en el uso de promotores fuertes, como pL o pR, pueden ser finamente regulados por el represor termolábil, cI857. La expresión heteróloga es reprimida a valores de temperatura entre 28°C y 32°C, lo cual, permite la obtención de altas densidades celulares antes de la fase de inducción. Por otro lado, el aumento de temperatura por arriba de los 37°C, da como resultado la acumulación de la proteína recombinante (Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Villaverde *et al.*, 1993). Lo anterior es muy conveniente, ya que al no utilizar inductores químicos que pueden ser tóxicos y de precio elevado, no es necesaria su eliminación en el producto final. Asimismo, los riesgos de contaminación se reducen al realizar el incremento de temperatura por medios externos, sin necesidad de manipulación del cultivo (Figge *et al.*, 1988, Caspeta *et al.*, 2013; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Bajo condiciones de estrés, como la sobreexpresión de proteínas, éstas pueden agruparse formando agregados, llamados cuerpos de inclusión (CI). Los CI, además de contener proteínas del hospedero, podrían estar conformados por proteínas mal plegadas y, por lo tanto, no ser deseados en un proceso (García-Fruitós *et al.*, 2012; González-Montalbán *et al.*, 2007). Diferentes estudios han demostrado que los CI contienen altos porcentajes de la proteína de interés, parcialmente plegada, con una estructura secundaria similar a la nativa y pueden tener actividad biológica. Además, las proteínas obtenidas en CI pueden ser posteriormente sometidas a un proceso de solubilización y replegamiento *in vitro* de la proteína solubilizada (García-Fruitós *et al.*, 2012; Jevševar *et al.*, 2005; Ramón *et al.*, 2014). Por otro lado, se sabe que, las condiciones de cultivo pueden afectar las características de las CI obtenidos (de Marco *et al.*, 2019; Slouka *et al.*, 2018). Aunque se ha estudiado el efecto de utilizar aire enriquecido con oxígeno puro para la obtención de cultivos de alta densidad celular (Lara *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2009), y también el efecto que tiene la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo (Baez *et al.*, 2013; Castan *et al.*, 2002), cuando se da la formación de CI, pocos estudios han abordado cómo el oxígeno disuelto en un cultivo puede afectar las características de éstos (Dela Coletta *et al.*, 2019; Kischnick *et al.*, 2006). Por lo anterior, es de gran interés evaluar la respuesta ante condiciones de estrés, generadas por la tensión de oxígeno disuelto utilizada durante un cultivo, que pueda alterar la cantidad o cualidad de la proteína producida.

Es por eso, que este proyecto tiene como objetivo general, evaluar el efecto de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), en la producción de una proteína recombinante en *E. coli*, acumulado como cuerpos de inclusión, en un sistema de expresión termoinducible, utilizando como modelo al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinantes humano (rHuGM-CSF), una proteína de interés clínico y comercial, utilizada principalmente para el tratamiento pacientes con neutropenia.

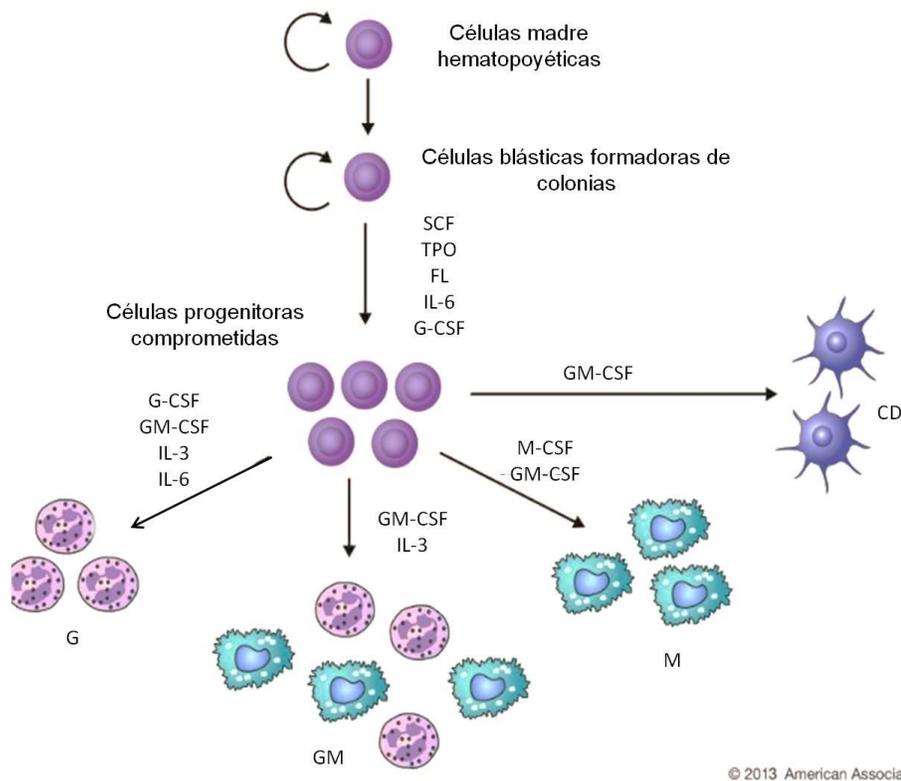
2.1 FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS Y GRANULOCITOS (GM-CSF)

Debido a la vida corta de las células sanguíneas en humanos, éstas requieren ser reemplazadas constantemente mediante hematopoyesis. Los diferentes tipos celulares provienen de células madre pluripotentes que se dividen, diferencian y maduran en células específicas, en respuesta a un estímulo específico. Estos estímulos son conocidos como citocinas, y aquellos que estimulan el crecimiento y la proliferación de colonias hematopoyéticas en sangre, son llamados factores estimulantes de colonias (CSF, colony stimulating factors) (Metcalf, 2013; Wood *et al.*, 1992).

Los CSF son una familia de glicoproteínas clasificadas con base en el tipo de células maduras que resultan (Figura 2-1):

- Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)
- Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)
- Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)
- Interleucina 3 (IL-3)

De los cuatro factores estimulantes de colonias, el GM-CSF, es una de las citocinas de mayor relevancia a nivel clínico y, por ende, se ha tornado de interés industrial (Becher *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2018; Lotfi *et al.*, 2019). El GM-CSF es sintetizado por diferentes células como macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a señales específicas de activación. Estimula el crecimiento de neutrófilos y macrófagos, así como la proliferación y diferenciación de colonias hematopoyéticas en células sanguíneas.



© 2013 American Association for Cancer Research

Figura 2-1. Árbol familiar de granulocitos y macrófagos. Se muestran las citocinas que controlan cada paso de diferenciación/proliferación. G: linaje celular granulocítico; GM: linaje celular granulocito-macrófago; M: linaje celular macrófago, DC: linaje celular dendrítico (Modificado al español de Metcalf, 2013).

También, se ha demostrado que el GM-CSF es la citocina más importante en la estimulación de formación y el aumento de la actividad de células dendríticas (Briseño *et al.*, 2016; Metcalf, 2013; Zhan *et al.*, 2019). Es generalmente utilizado para en el tratamiento de neutropenia pero recientemente se ha demostrados su capacidad de lisis de células tumorales, ha sido utilizado exitosamente como adyuvante en vacunas y como potente inmunomodulador (Arellano & Lonial, 2008; Zhao *et al.*, 2017).

El GM-CSF humano (HuGM-CSF) es sintetizado como una proteína precursora, conteniendo 144 residuos de aminoácidos con un péptido señal de 17 aminoácidos, el cual es procesado para dar una proteína madura de 127 aminoácidos con una masa molecular teórica de 14.459 kDa. La masa molecular está en función del grado de glicosilación, que a su vez, depende del sistema de expresión y se encuentra en el rango de 14.5-32 kDa (Forno *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1985).

Esta citocina tiene de manera natural, sitios propensos a *N*-glicosilación en los residuos Asn27 y Asn37 y múltiples sitios propensos a *O*-glicosilación en los residuos Ser5, Ser7, Ser9 y Ser10 (Forno *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2016). Sin embargo, Moonen *et al.* (1987) y Burgess *et al.* (1987) encontraron que la glicosilación no era requerida para su actividad biológica. De hecho, la ausencia de la glicosilación, ya sea por síntesis bacteriana o por desglicosilación enzimática, incrementaba la actividad específica de la proteína. Cebon *et al.*, (1990), demostraron que, el receptor mostraba menor afinidad por las moléculas de GM-CSF altamente glicosiladas en comparación con las menos glicosiladas o las no glicosiladas producidas en *E. coli*.

La estructura tridimensional fue determinada en 1992 por Walter y colaboradores (Walter *et al.*, 1992) como una estructura altamente compacta y globular, con un núcleo predominantemente hidrofóbico. Tiene 4 α -hélices con 2 conexiones y entre éstas, 2 láminas β antiparalelas, así como 4 residuos de cisteína que forman 2 puentes disulfuro (Figura 2-2), entre Cys54-Cys96 y Cys88-Cys121, que son esenciales para el mantenimiento de su conformación nativa y el primero de ellos, para su actividad biológica (Shanafelt & Kastelein, 1989; Wingfield *et al.*, 1988).

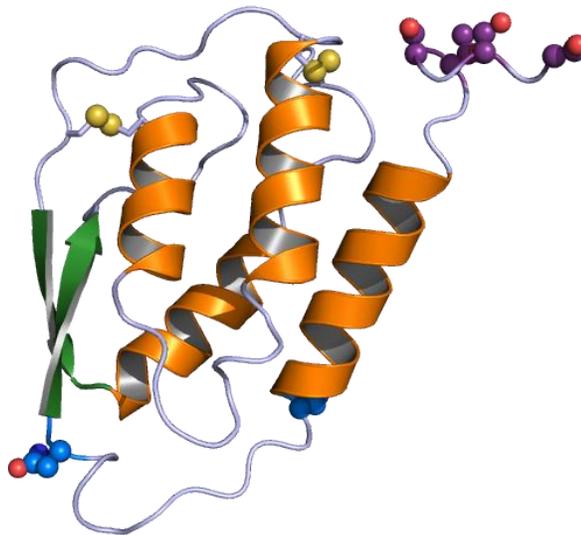


Figura 2-2. Representación de la estructura de rHuGM-CSF (PDB 1CSG, Walter *et al.*, (1992) Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Imagen hecha con PyMOL 2.2.3. Las hélices se representan en color naranja, las láminas β en verde y los puentes disulfuro en amarillo. Los sitios de *N*-glicosilación se muestran en azul y los de *O*-glicosilación en morado.

2.2 *Escherichia coli* COMO PRODUCTOR DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

En la última década, las biofarmacéuticas han tenido un gran impacto en el mercado farmacéutico global, donde cada año son aprobados un mayor número de medicamentos de origen biotecnológico (Figura 2-3), específicamente en el ámbito de las proteínas recombinantes (Tabla 2-1), y se espera que esta tendencia se mantenga (Morrison, 2020; Walsh, 2018).

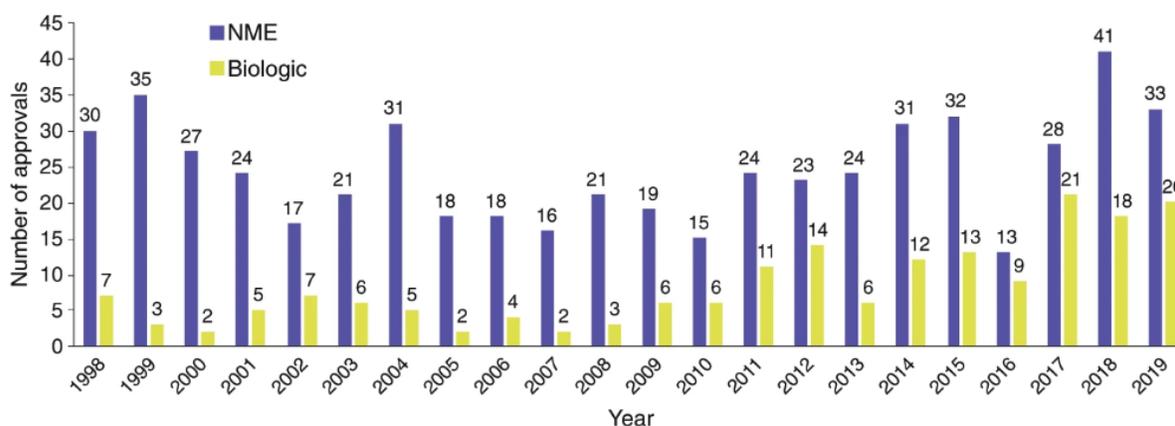


Figura 2-3. Número de nuevas entidades moleculares (NME) y licencias biológicas (Biologic) aprobadas por la FDA desde 1998 hasta 2019. Tomado de Morrison (2020).

Tabla 2-1. Ejemplos de proteínas recombinantes para uso terapéutico aprobadas por la FDA entre enero 2018 y abril 2020.

Proteína recombinante	Nombre comercial	Plataforma de expresión	Uso terapéutico	Compañía productora y año de aprobación por FDA
Isatuximab	Sarclisa	Células CHO	Mieloma múltiple	Sanofi (2020)
Eptinezumab	Vyepti	<i>Pichia pastoris</i>	Tratamiento preventivo de la migraña	Lundbeck A/S (2020)
Teprotumumab	Tepezza	Células CHO	Enfermedad ocular tiroidea	Horizon Pharma (2020)
Fam-trastuzumab deruxtecan	Enhertu	Células CHO	Cáncer de seno metastásico	Daiichi Sankyo (2019)
PEG-rFactor VII	Esperoct	Células CHO	Hemofilia A	Novo Nordisk (2019)
Polatuzumab	Polivy	Células CHO	Linfoma difuso de células B grandes	Roche (2019)

Brolucizumab	Beovu	<i>Escherichia coli</i>	Degeneración macular húmeda relacionada con la edad	Novartis (2019)
Risankizumab	Skyrizi	Células de mamífero	Psoriasis en placa	AbbVie (2019)
Romosozumab	Evenity	Células CHO	Osteoporosis	Amgen (2019)
Caplacizumab	Cablivi	<i>Escherichia coli</i>	Púrpura trombocitopénica trombótica adquirida	Sanofi/Ablynx (2019)
Tagrazofusp	Elzonris	<i>Escherichia coli</i>	Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas	Stemline Therapeutics (2018)
Calaspargasa PEG-asparaginasa	Asparlas	<i>Escherichia coli</i>	Leucemia linfoblástica	Servier Pharma (2018)
Emapalumab	Gamofant	Células CHO	Linfocitosis hemofagocítica	Novimmune (2018)
Elapegamase PEG-adenosina desaminasa	Revcovi	<i>Escherichia coli</i>	Inmunodeficiencia combinada severa por déficit de adenosina desaminasa	Leadiant Biosciences (2018)
Cemiplimab	Libtayo	Células CHO	Carcinoma de células escamosas	Regeneron Pharmaceuticals (2018)
Fremanezumab	Ajovy	Células CHO	Tratamiento preventivo de la migraña	Teva Pharms (2018)
Moxetumomab pasudotos-tdfk	Lumoxiti	<i>Escherichia coli</i>	Leucemia de células pilosas	AstraZeneca AB (2018)
Mogamulizumab	Poteligeo	Células CHO	Linfoma no Hodgkin	Kyowa Kirin (2018)
PEG-rAvPAL	Palynziq	<i>Escherichia coli</i>	Fenilcetonuria	BioMarin Pharmaceutical (2018).
Ibalizumab	Trogarzo	Células NS0	Pacientes con VIH con opciones de tratamiento limitadas	Taimed Biologics (2018)

Datos tomados de [fda.gov/drugs](https://www.fda.gov/drugs)

De las proteínas recombinantes disponibles en el mercado, el 46% son producidas por microorganismos, representando entre el 20-30%, las producidas en *E. coli*, seguido por *S. cerevisiae* y *P. pastoris* (Baeshen *et al.*, 2015; Ferrer-Miralles *et al.*, 2009; Gupta & Shukla, 2017; Walsh, 2018). A pesar de que con los años, *E. coli* ha perdido fuerza como sistema de expresión, en comparación con otros sistemas ofrece varias ventajas que lo hacen muy atractivo para la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Algunas de esas ventajas son: el relativo bajo costo de los medios de cultivo, rápido crecimiento, altos rendimientos de proteínas recombinantes (YrP/PT>0.20), altas productividades volumétricas y la posibilidad de obtención de altas densidades celulares, así como amplia caracterización y disponibilidad de herramientas genéticas (Baeshen *et al.*, 2015; Rosano *et al.*, 2019).

Dentro del mercado biofarmacéutico, el área dominante es la oncología, misma área con el mayor número de nuevas entidades moleculares y licencias biológicas aprobadas por la FDA en los últimos años (Figura 2-4) (Morrison, 2019, 2020). Del total de los productos en el mercado, alrededor del 24% son usados en terapias antitumorales, principalmente para minimizar los efectos de la quimioterapia, tales como neutropenia o anemia. Dentro de este 24%, que hasta el año 2014, era representado por 94 productos, 69% de ellos se producían en *E. coli* (Sanchez-Garcia *et al.*, 2016).

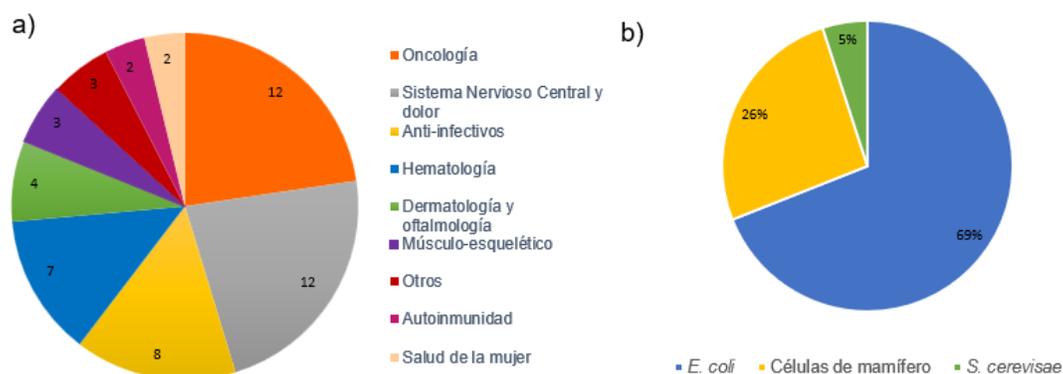


Figura 2-4. a) Número de Nuevas Entidades Moleculares aprobadas por la FDA en el 2019 por área terapéutica. (Datos tomados de Morrison, 2020) b) Fábricas celulares utilizadas para la producción de proteínas recombinantes contra cáncer. (Datos tomados de Sánchez-García *et al.*, 2016).

Cabe reconocer que, *E. coli* presenta algunas limitantes como sistema de expresión. La primera, la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales, por lo que

su uso se ha limitado a la obtención de proteínas que no requieren procesamiento postraducciona (Rosano & Ceccarelli, 2014; Yin *et al.*, 2007). La segunda de ellas, el hecho de que bajo condiciones de estrés, se da la agregación de proteínas en forma de cuerpos de inclusión, los cuales han sido ampliamente estudiados en los últimos años (de Marco *et al.*, 2019; Singhvi *et al.*, 2020).

2.3 CUERPOS DE INCLUSIÓN

2.3.1 ¿POR QUÉ SE FORMAN LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN?

Dado que la mayoría de las proteínas en la naturaleza son activas en forma soluble, la producción industrial busca su obtención en esta forma. La solubilidad de una proteína recombinante depende de muchos factores, como la secuencia de aminoácidos y aspectos fisiológicos multifactoriales y altamente dinámicos. Sin embargo, el plegamiento incorrecto y posterior agregación en el citosol o periplasma es un evento común en la producción de proteínas recombinantes en bacterias (de Marco *et al.*, 2019).

Las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar la agregación de proteínas. Pero diversas situaciones causan que estos mecanismos fallen, tales como condiciones de estrés y altas velocidades de síntesis de proteínas, como sucede con la sobreexpresión de proteínas heterólogas (Bednarska *et al.*, 2013; Schramm *et al.*, 2020).

Con respecto al plegamiento inicial, se ha estudiado el plegamiento de la cadena nascente en el túnel de salida de los ribosomas. Se ha encontrado que, aproximadamente los primeros 40 aminoácidos de la nueva cadena pueden ser ordenados dentro del túnel de salida, y que dentro de éste, se encuentran zonas de plegamiento que favorecen la formación, principalmente, de estructura α -hélice (Kramer *et al.*, 2009; Liutkute *et al.*, 2020; Lu & Deutsch, 2005). Una vez fuera del ribosoma, el plegamiento *de novo* de la cadena creciente es favorecido por chaperonas. En bacterias, (Figura 2-5), la chaperona asociada al ribosoma, Trigger factor (TF), interactúa con la cadena nascente, y permanece unida y moviéndose con la cadena por un tiempo limitado, promoviendo el plegamiento de entre el 60-80% de las proteínas. A pesar de ello, si la cadena no se ha plegado completamente, algunas proteínas requieren interactuar con otros complejos de chaperonas como el sistema Hsp70, compuesto por las chaperonas DnaK/DnaJ, y del factor intercambiador de nucleótido, GrpE o el complejo GroEL/GroES. Estos complejos se unen a los residuos hidrofóbicos de las cadenas nascentes y permiten a la

mayoría de las proteínas alcanzar su estado nativo, pero si no lo logran, pequeñas proteínas de choque térmico (HSPs), como las Hsp31 y Hsp33 o IbpA/B se unen temporalmente a la superficie de los péptidos no plegados y los presentan a los sistemas DnaK/J o GroEL/ES. Aquellas que no logran plegarse, son degradadas por proteasas (Ami *et al.*, 2009; Gatti-Lafranconi *et al.*, 2011; Kramer *et al.*, 2009).

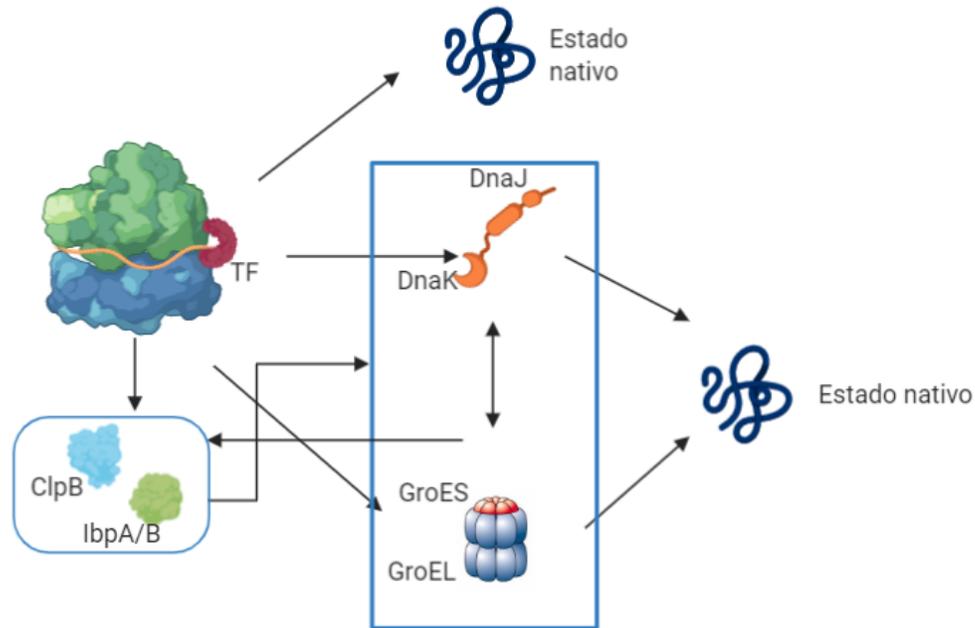


Figura 2-5. Modelo de chaperonas bacterianas involucradas en el plegamiento *de novo* de proteínas.

La capacidad del sistema de plegamiento es limitada, y en producción de proteínas heterólogas se presentan múltiples situaciones de estrés. Por un lado, utilizar un promotor fuerte tiene como resultado una alta velocidad de síntesis de la proteína heteróloga, lo que provoca que, la maquinaria de plegamiento de la célula sea insuficiente. Las proteínas mal plegadas o no plegadas exponen superficies hidrofóbicas que en su estado nativo se encuentran al interior, y estas tienden a asociarse entre sí para dar estabilidad al sistema, formando agregados proteicos, o bien cuerpos de inclusión (CI) (Díaz-Villanueva *et al.*, 2015; Ventura, 2005). El modelo clásico de formación de agregados proteicos, es a través de nucleación, donde se da la asociación inespecífica de los parches hidrofóbicos de los intermediarios formados. Sin embargo, algunos estudios *in vitro* han cuestionado este modelo, demostrando interacciones intermoleculares específicas entre regiones de proteínas (Nelson & Eisenberg, 2006b, 2006a; Speed *et al.*, 1996). En ellos se considera que la estructura β -cruzada interactúa a través de interacciones estereoespecíficas, lo que define un patrón de siembra en el proceso de agregación, restringiendo la heterogeneidad de composición de los agregados (Carrió *et al.*,

2005; Morell *et al.*, 2008; Schleegeer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008). Si bien estos datos pueden sugerir una especificidad durante la agregación, en ellos no se considera lo altamente complejo que es el entorno intracelular, donde los factores que pueden participar en esta agregación son varios (Morell *et al.*, 2008).

Por otro lado, se suele estar bajo más de una condición de estrés. Por ejemplo, se ha evaluado el efecto de la producción de proteínas recombinantes (1er condición de estrés) bajo diferentes esquemas de pH, concentración de inductor, temperatura y concentración de oxígeno disuelto (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Fathi-Roudsari *et al.*, 2016; Konz *et al.*, 1998; Margreiter *et al.*, 2008; Sandoval-Basurto *et al.*, 2005) (2da y/o 3er condición de estrés), donde se ha encontrado que se afectan tanto la cantidad como las características de las proteínas producidas.

2.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

Los CI son agregados proteicos observados, generalmente en el citoplasma, como partículas refráctiles, densas, largas y aparentemente esféricas o cilíndricas, con diámetros de entre 0.2-1.2 μm (Carrió *et al.*, 2000; Margreiter *et al.*, 2008a; Taylor *et al.*, 1986).

Pueden contener hasta el 95% de la proteína heteróloga expresada y aunque suele asociarse la agregación de proteínas con pérdida de funcionalidad, las proteínas que los conforman pueden estar parcialmente plegadas, con una estructura secundaria similar a la nativa e incluso tener actividad biológica (Baneyx & Mujacic, 2004; González-Montalbán *et al.*, 2007; Pesarrodonna *et al.*, 2019; Vázquez *et al.*, 2012)

Además, pueden ser purificados lisando las células y por centrifugación, debido a que tienen una mayor densidad que los componentes celulares (~1.3 mg/mL) (Margreiter *et al.*, 2008a; Taylor *et al.*, 1986), y aplicando tratamientos de solubilización suaves, que permitan solubilizar los agregados del CI preservando la estructura de la proteína nativa, o tratamientos severos, utilizando altas concentraciones de agentes caotrópicos (Singh *et al.*, 2015). Posteriormente, las proteínas pueden ser sometidas a un proceso de eliminación del desnaturizante para el replegamiento *in vitro* de las proteínas solubilizadas, con el fin de obtener la proteína en forma activa. Por esta razón, han dejado de ser considerados como productos no deseados, y su estudio busca, no solo optimizar los procesos de generación y obtención, sino comprender su composición y características

estructurales (Baneyx & Mujacic, 2004; de Marco *et al.*, 2019; García-Fruitós *et al.*, 2012; Margreiter *et al.*, 2008; Peternel *et al.*, 2008; Rodríguez-Carmona *et al.*, 2010).

Los CI pueden contener otros elementos, como pequeñas proteínas de choque térmico (HSPs), chaperonas, fosfolípidos de membranas, ácidos nucleicos y otras proteínas del hospedero (Jürgen *et al.*, 2010; Carrió & Villaverde, 2005; Valax & Georgiou, 1993). Se ha demostrado que, varias chaperonas relacionadas con condiciones de estrés, como DnaK y ClpB, están localizadas preferentemente en la superficie de los CI, mientras que, GroEL se ha encontrado en pequeñas cantidades dentro del CI y ausente en la superficie de los mismos (Carrió & Villaverde, 2005; Jürgen *et al.*, 2010).

Además, la composición celular de los CI evoluciona durante los primeros pasos de su formación, donde las proteínas heterólogas llegan a ser predominantes al final del cultivo (Jürgen *et al.*, 2010; Rinas & Bailey, 1992; Ventura & Villaverde, 2006). Estos cambios de composición también ocurren de acuerdo con la evolución de otros parámetros del crecimiento celular, tales como el tiempo de duplicación, la velocidad específica de crecimiento, la velocidad de transcripción y traducción, así como la velocidad de síntesis de la proteína recombinante. (Lindner *et al.*, 2008; Saarikangas & Barral, 2015).

Diferentes estudios han revelado que los CI presentan una estructura característica de hojas β cruzadas, similar a la que se encuentra en las fibras amiloides, que surge del entrelazado de los múltiples filamentos de láminas β (Elia *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2008; Wang, 2009). Lo anterior proporciona a los CI, estabilidad mecánica, resistencia a la degradación proteolítica y unión a colorantes amiloidotrópicos como rojo Congo y Tioflavina T, tal como sucede con las fibras amiloides (Schleeger *et al.* 2013; Wang *et al.*, 2008).

De manera interesante, las características físicas y estructurales de los CI, así como la distribución de los mismos, depende de las condiciones de cultivo (Tabla 2-1) (Ami *et al.*, 2005; Calcines-Cruz *et al.*, 2018; de Marco *et al.*, 2019; Jevševar *et al.*, 2005; Margreiter *et al.*, 2008; Parrilli *et al.*, 2010; Slouka *et al.*, 2018). Incluso se ha propuesto la posibilidad de tener cuerpos de inclusión “sobre diseño”, con características específicas, establecidas por el productor, al encontrar los parámetros de proceso adecuados para su obtención. No obstante, el efecto que puede tener el oxígeno disuelto sobre la arquitectura de los CI no se ha estudiado.

Tabla 2-2. Principales parámetros de proceso que tienen un efecto sobre las propiedades de cuerpos de inclusión (Datos tomados de de Marco *et al.*, 2019).

Parámetro	Características de los CI obtenidos	Referencia
Tiempo de cultivo	Cuando el tiempo de cultivo después de la inducción aumenta, el diámetro del CI se incrementa. Además, estos CI, presentaron una unión más fuerte a colorantes amiloides y mayor resistencia a la proteólisis.	Castellanos-Mendoza <i>et al.</i> , 2014.; Margreiter <i>et al.</i> , 2008a; Upadhyay <i>et al.</i> , 2012.
Velocidad de crecimiento	A bajas velocidades específicas de crecimiento, menor cantidad de CI, sin embargo, a mayores velocidades, la proporción de proteína recombinante dentro de los CI fue mayor	Iafolla <i>et al.</i> , 2008.
Temperatura	El incremento de temperatura promovió la agregación e incrementó la velocidad de producción de CI. Sin embargo, a menor temperatura, los CI presentaron algunas proteínas activas y correctamente plegadas con menor impureza, se solubilizaron y desnaturalizaron más rápido que las formadas a alta temperatura.	de Groot & Ventura, 2006; Jevševar <i>et al.</i> , 2005; Peternel <i>et al.</i> , 2008; Schein & Noteborn, 1988; Strandberg & Enfors, 1991.
pH	Los CI formados a pH básico, presentaron mayor proporción de α -hélices, así como menor resistencia a la degradación proteolítica y unión a un colorante amiloide, que los producidos a pH ácido.	Calcines-Cruz <i>et al.</i> , 2018; Castellanos-Mendoza <i>et al.</i> , 2014; Strandberg & Enfors, 1991.
Resonancia acústica vs agitación	Los CI producidos bajo resonancia acústica, a 20 g, fueron menos resistentes a la proteólisis que los generados a 200 rpm en agitación orbital y 7.5 g y 12.5 g en resonancia acústica.	Valdez-Cruz <i>et al.</i> , 2017.

Así, cuando se habla de producción industrial, la formación de CI presenta un gran reto en la purificación de la proteína recombinante en forma activa. Si bien la

obtención de las proteínas en forma de CI puede ser una ventaja dentro del proceso de purificación, es necesario llevar a cabo procesos de desnaturalización, que dependerán de las características de los CI y posterior replegamiento de la proteína recombinante, lo cual, incrementa los costos de producción y reduce los rendimientos del proceso. En consecuencia, el conocimiento de las características, en función de las condiciones de expresión, es necesario para el desarrollo de procesos con formación de CI (Jevševar *et al.*, 2005; Singh & Panda, 2005; Singh *et al.*, 2020; Upadhyay *et al.*, 2012).

2.4 SISTEMAS DE EXPRESIÓN POR TERMOINDUCCIÓN

Los sistemas de termoinducción bajo el sistema λ -cI857 han sido utilizados exitosamente para la producción de proteínas recombinantes de grado farmacéutico, debido a las ventajas que estos presentan. Primero, al no usar inductores químicos, que pueden resultar tóxicos y de precio elevado, no se requiere su eliminación en el producto final (Dvorak *et al.*, 2015; Figge *et al.*, 1988). Segundo, al realizarse el incremento de temperatura por medios externos, sin necesidad de manipulación del cultivo, los riesgos de contaminación se reducen. Además, el incremento de temperatura resulta relativamente sencillo en reactores de escala industrial (Caspeta *et al.*, 2013; Valdez-Cruz *et al.*, 2010; Villaverde *et al.*, 1993).

Estos sistemas se basan en la inserción del gen codificante de la proteína de interés en vectores con promotores fuertes, tales como pL y/o pR, que pueden ser finamente regulados por la mutante termolábil cI857 del bacteriófago λ (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). cI857 se une cooperativamente como un dímero, a través del dominio C-terminal, en dos de los tres sitios operadores, a oR1 y oR2 para formar un tetrámero, reprimiendo pR, y a oL1 y oL2 para formar un tetrámero, reprimiendo pL (Figura 2.-6). Aunque únicamente son necesarios los dos primeros operadores para reprimir el promotor, la unión del represor a oL3 aumenta la represión de la transcripción. Además, la interacción de los tetrámeros unidos a oL con los unidos a oR estabiliza aún más la unión al represor, al establecer octámeros con los tetrámeros represores haciendo un bucle en la región intermedia. La formación de este bucle permite la represión de pRM, limitando la concentración de CI para permitir un cambio eficiente al incrementar la temperatura (Dodd *et al.*, 2001; Dodd *et al.*, 2004; Sarkar-Banerjee *et al.*, 2018; Tyler *et al.*, 2004).

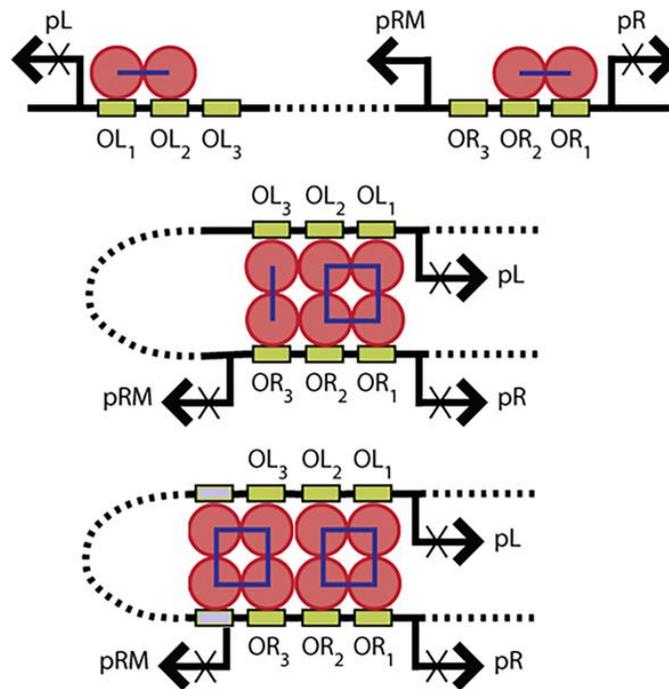


Figura 2-6. Representación de la regulación del promotor pL/pR por la proteína represora Cl. (Tomado de Sarkar-Banerjee *et al.* 2018).

Por debajo de los 37°C, la proteína cl857 se une a los dominios de la región operadora del promotor, a través de los dominios N-terminal, reprimiendo la expresión heteróloga. Esta unión impide la unión de la RNA polimerasa y, por ende, la transcripción, dando la oportunidad de obtener altas densidades celulares antes de la fase de inducción (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). La especificidad de unión del represor al operador reside en la segunda hélice del motivo hélice-giro-hélice de unión a DNA, presente en el dominio N terminal, mientras que la secuencia de aminoácidos que constituye el giro, es importante para el correcto posicionamiento de la segunda hélice al DNA. cl857 tiene la mutación A66T (Lieb, 1981). Ala66 se encuentra en el dominio N-terminal del represor, en un core hidrofóbico de unión al DNA. La sustitución da lugar a la distorsión de las interacciones hidrofóbicas locales, que hace que la unión de cl857 al operador sea inestable al aumentar la temperatura (Lieb, 1981; Lim & Sauer, 1989; Venema *et al.* 1999). De esta forma, al incrementar la temperatura por arriba de 37°C, se libera la proteína represora cl857, permitiendo así, que la RNA polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción, y se dé la producción de la proteína recombinante (Figura 2-6).

Respecto a la temperatura de inducción, el esquema clásico de inducción es subir y mantener la temperatura a 42°C durante todo el cultivo, pero se han propuesto

esquemas a menores temperaturas, e incluso esquemas oscilatorios, donde se obtiene mayor producción de proteína recombinante (Caspeta *et al.*, 2013). Asimismo, se ha evaluado el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la expresión heteróloga, encontrándose que se favorece a menores velocidades, donde también, la producción de ácidos orgánicos es menor. La mejor velocidad de calentamiento reportada en estos estudios fue de 0.4°C/min, que simula la velocidad en fermentadores de gran escala (Caspeta *et al.*, 2009; Caspeta *et al.*, 2013).

2.5 RESPUESTA DE CHOQUE TÉRMICO EN *Escherichia coli*

El aumento de temperatura por arriba de 34°C da como resultado la activación de respuestas a choque térmico en *E. coli* (Caspeta *et al.*, 2013; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Valdéz-Cruz *et al.*, 2010; Villaverde *et al.*, 1993). Además, la producción de proteínas recombinantes puede activar respuestas a estrés, tales como la respuesta de choque térmico, la respuesta estricta y la respuesta SOS, así como la degradación de ribosomas.

En *E. coli*, la activación de respuesta de choque térmico (HSR) es controlada por el factor de transcripción de choque térmico σ^{32} . σ^{32} sintetiza, poco después de que aumente la temperatura, proteínas que sirven en el control de la homeostasis al aumentar la tolerancia térmica, y chaperonas involucradas en el plegamiento y degradación de proteínas, entre ellas, ClpB, DnaK/J y GroEL/S, y proteasas como Lon, ClpP, ClpC y FtsH (Guisbert *et al.*, 2004; Maslowska *et al.*, 2019; Valdez-Cruz *et al.*, 2011).

Los cambios en la expresión de *rpoH* están mediados por la actividad y estabilidad de σ^{32} y el sistema de chaperonas DnaK/J y GrpE. A 30°C, la célula mantiene un nivel basal de σ^{32} , alrededor de 50 moléculas de σ^{32} por célula. DnaK interactúa con σ^{32} impidiendo su unión a la RNA polimerasa y media su degradación con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) < 1 min, por la proteasa FtsH (Arsène *et al.* 2000; Rodríguez *et al.*, 2008; Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Al elevar la temperatura arriba de 37°C, la cantidad de proteínas mal plegadas producidas compite con σ^{32} por DnaK. Las proteínas mal plegadas interactúan con DnaK, quedando el factor σ^{32} disponible para iniciar su traducción. Lo anterior provoca que se incremente, aproximadamente, 17 veces el número de moléculas de σ^{32} por célula y posteriormente, tras un periodo de adaptación (~15 minutos), se alcanza un nuevo nivel de estado basal, de aproximadamente 250 moléculas por célula (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Caspeta *et al.*, (2009) realizaron un análisis transcriptómico a

diferentes velocidades de calentamiento usando un sistema λ pL/pR-cl857 en *E.coli*, para la producción de pre-proinsulina humana. Observaron que, en comparación con los cultivos a 30°C, los niveles de mRNA de genes de choque térmico a 38°C y 42°C, aumentaron entre 2 y 42 veces cuando se indujeron los cultivo a velocidades de calentamiento de 6, 1.7, 0.8°C/min, pero no se observó un aumento a una velocidad de 0.4°C/min, sugiriendo que las células sometidas a aumentos lentos de temperatura pueden adaptarse al estrés producido.

La carga metabólica extra que representa la activación de la respuesta de choque térmico puede conducir a una disminución de la velocidad específica de crecimiento, que está inversamente relacionada con la síntesis de proteínas recombinantes, el aumento de la respiración, y cambios en la proporción de lípidos y proteínas en las membranas celulares (Hoffmann *et al.*, 2002; Mejía *et al.*, 1999).

En sistemas λ pL/pR-cl857, el incremento de temperatura y las altas velocidades de síntesis de proteínas recombinantes favorece la agregación de proteínas en forma de CI. El efecto que tiene la temperatura sobre los CI, ha sido evaluado por de Groot & Ventura (2006). En este estudio se evaluó la producción de A β 42(F19D)-GFP en *E. coli* BL21 (DE3) a temperaturas entre 18 y 42°C. Se encontró que, en los CI obtenidos a menor temperatura, las proteínas presentes en los CI mostraban actividad, y en composición, mostraban menos impurezas, comparados con los obtenidos a mayor temperatura. Además al incrementar la temperatura de producción, tanto la estabilidad de los CI como la resistencia a la degradación proteolítica, incrementaron. Strandberg & Enfors (1991) encontraron que, una mayor temperatura de producción, incrementa la velocidad de producción de la proteína, pero la proteína presenta baja actividad final y Singh y colaboradores (2010) encontraron que bajas temperaturas favorecían la producción de la proteína soluble, sugiriendo que menores temperaturas favorecen el correcto plegamiento de la proteína recombinante. Sin embargo, recientemente Singh y colaboradores (2020) evaluaron CI de asparaginasa II obtenidos a diferentes temperaturas de expresión en *E. coli*. En sus estudios encontraron que los CI expresados a temperaturas más altas tenían mayor actividad biológica y los resultados por unión a Th-T y FTIR sugieren un menor contenido de estructuras tipo amiloide. Además, los CI expresados a temperaturas más altas eran más susceptibles a la digestión en comparación con los expresados a bajas temperaturas. Los autores sugieren que las condiciones de expresión dependen de la naturaleza de la proteína y, por lo tanto, deben optimizarse individualmente.

2.6 ¿CÓMO SENSEA OXÍGENO *Escherichia coli*?

E. coli tiene varios mecanismos de respuesta ante la disponibilidad de oxígeno para asegurar un modo metabólico óptimo cuando las condiciones del ambiente son variables y/o hay un cambio drástico. Los más importantes son los sistemas reguladores OxyRS, SoxRS, que controlan la respuesta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y superóxido (O_2^-), respectivamente (Baez & Shiloach, 2013; Greenberg *et al.*, 1990), y los sistemas FNR y ArcAB, que responden a la disminución de los niveles de oxígeno (Georgellis *et al.*, 1999; Gunsalus & Park, 1994; Perrenoud & Sauer, 2005; Shalel-Levanon *et al.*, 2005).

Para satisfacer la demanda de oxígeno en un cultivo de *E. coli*, para la producción de proteínas recombinantes, se adiciona oxígeno puro a la entrada de aire (Castan *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2011). El oxígeno molecular genera, durante su reducción hacia agua mediante la respiración, especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como O_2^- , H_2O_2 y radicales hidroxilo (OH) (Figura 2-7) que pueden causar daños irreversibles a los componentes celulares (Fu *et al.*, 2015; Imlay, 2013, 2019)

E. coli tiene dos mecanismos de defensa a estrés oxidativo regulados por soxRS y oxyR. En el primero de ellos, la proteína reguladora SoxR, contiene un clúster [2Fe-2S] que se produce en forma inactiva bajo condiciones normales de crecimiento. Cuando se expone a superóxido o compuestos del ciclo redox, el cluster se oxida, lo que activa SoxR y al gen soxS. SoxS es un factor transcripcional secundario que activa a su vez, la expresión de aconitasa A y fumarasa C, isoenzimas resistentes a oxígeno, que remplazan a las enzimas sensibles a oxígeno, aconitasa B y fumarasa A (Ding *et al.*, 1996; Hidalgo & Demple, 1994; Imlay, 2013).

Por otro lado, el sistema OxyR, responde rápidamente a la presencia de H_2O_2 , donde la proteína OxyR, un factor transcripcional, se encuentra inactivo en aerobiosis. Cuando la concentración intracelular de H_2O_2 alcanza ~200 nM, OxyR se activa, mediante la formación de un enlace disulfuro intramolecular, e induce la transcripción de genes que incrementan la resistencia a peróxido de hidrógeno, como *katG*, *ahpCF*, *gor*, *grxA*, *trxC* y *oxyS* y la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual degrada superóxido, y en conjunto detoxifican a la célula de las ROS (Baez & Shiloach, 2013; Imlay, 2013; C. Lee *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 1998).

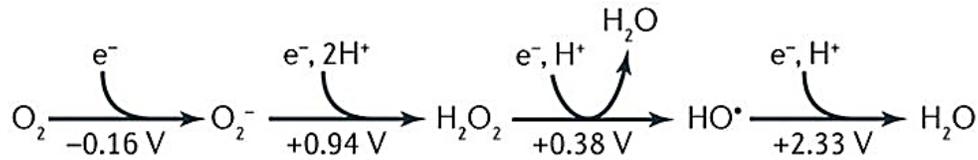


Figura 2-7. Generación de especies reactivas de oxígeno durante la reducción de oxígeno molecular. Tomado de Imlay, 2013.

Por otra parte, ante bajas concentraciones de oxígeno o en condiciones de anaerobiosis, *E. coli* tiene dos mecanismos de respuesta: el sistema de dos componentes ArcAB, y el sistema FNR.

FNR (fumarato nitrato reductasa), es un factor de transcripción con un dominio N-terminal sensor, con 4 residuos de cisteína que actúan como ligandos para un grupo hierro-azufre, mientras que, la región C-terminal consiste en un dominio de unión al DNA. FNR se activa en condiciones anaerobias formando dímeros a través de la presencia de un clúster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ que se unen a diferentes promotores (Crack *et al.*, 2004; Jervis & Green, 2007). FNR puede activar la transcripción cuando el sitio de unión río arriba se encuentra en posiciones diferentes. Sin embargo, se observa una fuerte represión cuando FNR se encuentra cerca de las posiciones -85 y -95 (Barnard *et al.*, 2003; Myers *et al.*, 2013). Tras la unión, se inicia la transcripción de genes de anaerobiosis, como *nirBD*, *nrfABC*, para utilizar reductasas alternativas para nitrato y *frdABCD* para fumarato y enzimas asociadas con la utilización de carbono anaeróbico. Además, FNR reprime la expresión de genes, como *ndh*, que codifica para la enzima respiratoria aeróbica NADH deshidrogenasa II y disminuye la expresión de genes que codifican para enzimas del ciclo TCA. Al tener presencia de oxígeno, el clúster se degrada a $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ haciéndole incapaz de unirse al DNA (Kang *et al.*, 2005; Mettert & Kiley, 2018, Perrenoud & Sauer, 2005).

En contraste, el sistema de dos componentes ArcAB (anoxic redox control) es un sensor de oxígeno indirecto. Se compone de la cinasa ArcB, una proteína de membrana y ArcA, un regulador de respuesta. Bajo condiciones microaeróbicas y con la estimulación de efectores, como D-lactato, acetato y piruvato, ArcB se autofosforila y el grupo fosfato se transfiere a ArcA. ArcA, ahora fosforilado, es una proteína de unión al DNA. ArcA modula la expresión de múltiples operones que codifican enzimas de metabolismo microaerobio o fermentativo en respuesta a condiciones redox y reprime la expresión de muchos operones involucrados en el metabolismo aerobio. En presencia de oxígeno, ArcB forma un dímero mediante un

enlace disulfuro y pasa a actividad fosfatasa (Georgellis *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.* 2004; Shalel-Levanon *et al.*, 2005; Teran-Melo *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2006).

El estado del ciclo de TCA, está determinado por la disponibilidad de oxígeno y el tipo de fuente de carbono. En ausencia de oxígeno y en condiciones que favorecen la represión de catabolitos, *E.coli* no realiza el ciclo completo. En su lugar, se tiene una versión ramificada que no genera energía sino produce metabolitos precursores, como ácidos orgánicos (Figura 2-8), que pueden ser tóxicos para las células, siendo acetato el principalmente producido (De Mets *et al.*, 2019; Shalel-Levanon *et al.*, 2005; Shimizu, 2013).

En *E.coli*, la principal vía de producción de acetato involucra dos enzimas que están conectadas con el metabolismo central, la fosfotransacetilasa (Pta) y la acetato quinasa (AckA) (Figura 2-8a). Durante el crecimiento exponencial, la acetil-CoA se puede convertir en acetilfosfato por Pta y luego en acetato por AckA. Otra ruta para formar acetato es a través de la descarboxilación oxidativa del piruvato por la piruvato oxidasa (PoxB). Se sabe que, *E.coli* puede tomar acetato, para la síntesis de acetil-CoA, usando la vía Pta-AckA a la inversa. Esto sucede a altas concentraciones de acetato extracelular (8 mM), debido a su baja afinidad, con una K_M para acetato entre 7-10 mM (De Mets *et al.*, 2019; Enjalbert *et al.*, 2017). Aunque esta vía es la principal cuando hay disponibles fuentes de carbono glicolítico, la acetil-CoA sintetasa (Acs), de alta afinidad, con una K_M para acetato de 200 μ M, cataliza una vía alternativa para la conversión de acetato a acetil-CoA (Figura 2-8a) cuando el carbono es limitante, durante la fase estacionaria y bajo bajas concentraciones de oxígeno (Enjalbert *et al.*, 2017; Wolfe, 2005).

En ausencia de oxígeno, la enzima succinato deshidrogenasa es reemplazada por la enzima fumarato reductasa, mientras que la 2-cetoglutarato deshidrogenasa es reprimida, bloqueando el ciclo en 2-oxoglutarato. De esta forma, el piruvato puede metabolizarse a D-lactato por la enzima lactato deshidrogenasa, o convertirse en acetil-CoA y formiato por la piruvato formiato liasa (PFL), que solo se activa en condiciones microaerobias o anaerobias. Acetil-CoA puede formar etanol o acetato en lugar de combinarse con oxaloacetato para formar citrato, como lo hace en condiciones aeróbicas. Por otro lado, pequeñas cantidades de succinato derivan de fosfoenolpiruvato (Figura 2-8b) (Förster & Gescher, 2014; Perrenoud & Sauer, 2005; Wolfe, 2005).

La producción de formiato es una característica durante la fermentación ácido mixta, donde hasta un tercio del carbono derivado de la glucosa se puede convertir en formiato. Para evitar la acidificación del citoplasma, el formiato es inicialmente

excretado (Sawers & Clark, 2004) y puede ser transformado a H₂ y CO₂ tras la activación del sistema FHL. Sin embargo, la formación de este sistema, requiere la ausencia de un aceptor de electrones exógeno, la presencia de formiato y molibdato y un pH ácido.

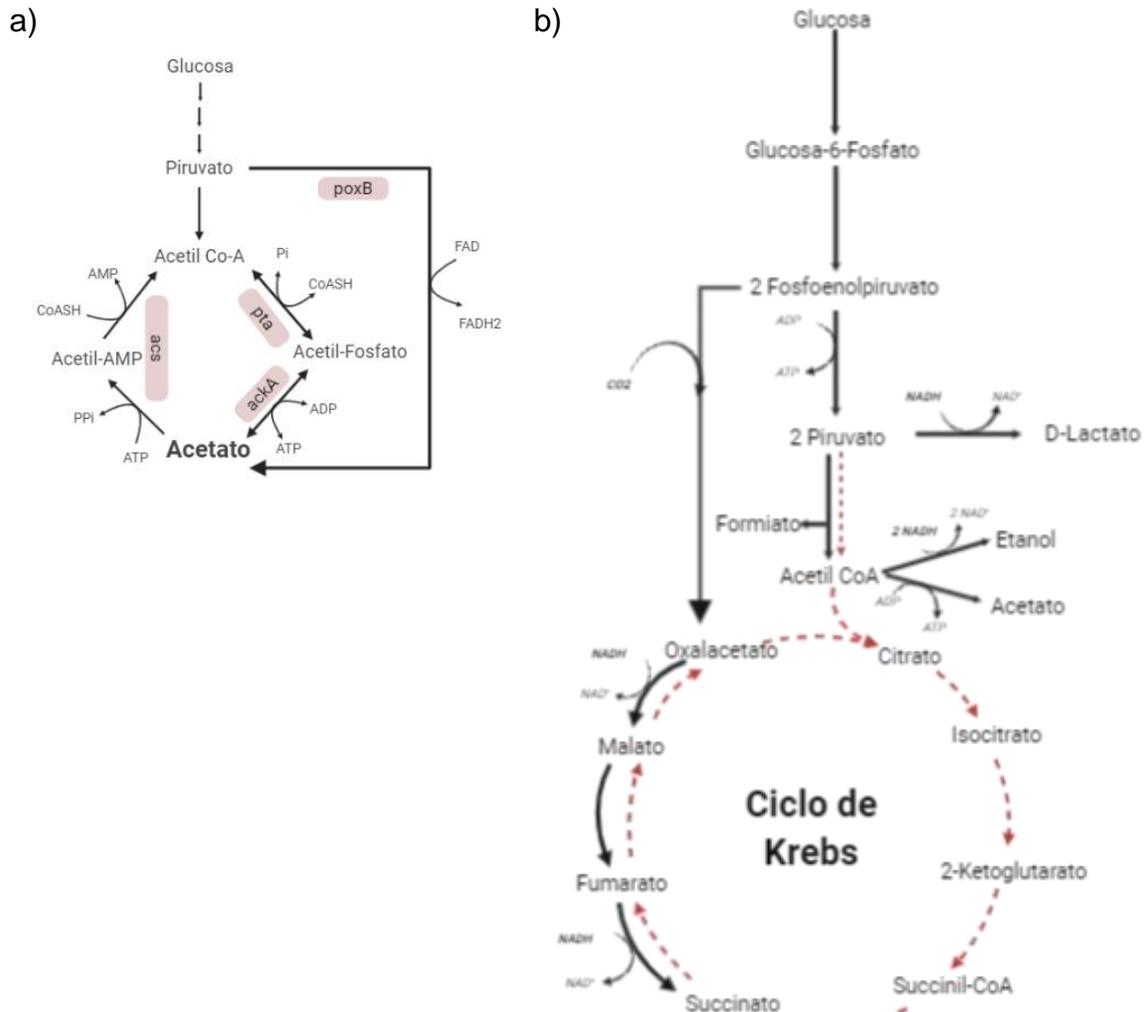


Figura 2-8. a) Rutas de activación de acetato en *E. coli*. Las enzimas se representan por rectángulos. Pta: fosfotransacetilasa; ackA: acetato quinasa; acs: acetil-CoA sintasa; poxB: piruvato oxidasa. B) Principales vías metabólicas de *E. coli*. Flechas rojas punteadas: ciclo TCA en condiciones aerobias; flechas negras: vías anaerobias utilizadas por *E. coli* en ausencia de oxígeno para la producción de succinato, oxalacetato, formiato, etanol, lactato y acetato.

Las vías naturales de asimilación de formiato comienzan con la condensación de la molécula con tetrahydrofolato (THF) para generar 10-formil-THF, que será reducido a 5,10-metilen-THF, el cual, dona el formaldehído a la glicina, dando lugar a serina,

que posteriormente entra en el metabolismo central a nivel de fosfoenolpiruvato, resultando en la producción de acetil-CoA (Bar-Even, 2016; Yishai *et al.*, 2017).

La acumulación de acetato y otros ácidos orgánicos, tienen un efecto negativo en la productividad, pues el acetato induce la expresión del regulón *rpoS* (Arnold *et al.*, 2001; Kirkpatrick *et al.*, 2001). Concentraciones de 0.5 g/L es suficiente para afectar el crecimiento de *E.coli* K12 (Nakano *et al.*, 1997) y concentraciones desde 0.1 g/L para reducirlo han sido reportadas (Pinhal *et al.*, 2019). También, hasta el 15% de la glucosa puede excretarse como acetato, lo que representa la pérdida del importante precursor Acetil-CoA (Holms, 1986; Zhang *et al.*, 2019). En consecuencia, se han propuesto estrategias de alimentación de glucosa, así como el uso de cepas con mutaciones en vías de producción de acetato, o bien, en las vías de transporte de glucosa y otros azúcares, para disminuir la capacidad de importación de la misma (Fragoso-Jiménez *et al.* 2019; Fuentes *et al.*, 2013)

3 ANTECEDENTES

3.1 Estudio de TOD

Sharma *et al.*, (2020) evaluaron la producción de rARU en *E.coli* en condiciones restringidas y no restringidas de oxígeno. A la condición control a 30% de TOD la llamaron no restringida, mientras a la condición en la que los cultivos se realizaron sin control de TOD, manteniendo una agitación de 500 rpm y 2 vvm durante todo el cultivo, la llamaron restringida, pues el perfil de TOD, muestra concentraciones de TOD cercanas a 0%. Los estudios de transcriptoma y proteoma mostraron que bajo condiciones restringidas, hubo 2.5 veces menos genes expresados diferencialmente. La biosíntesis de aminoacil-tRNA, biosíntesis de aminoácidos, vías de traducción y generación de energía estaban regulados negativamente en la condición no restringida, mientras que los mismos procesos celulares estaban regulados en exceso en la condición restringida. Además, en la condición restringida, se observaron aumentos en la expresión de genes relacionados en procesos como la traducción, metabolismo del RNA, metabolismo de proteínas y plegamiento (chaperonas y foldasas), y secreción de proteínas. Por otro lado, los genes relacionados con estrés por temperatura mostraron un aumento de 2 veces, en respuesta a la sobreexpresión de rARU. Mientras que en fase logarítmica la mayoría de vías se comportaron de manera similar, en fase log tardía, se observaron diferencias en metabolismo energético. De hecho, en la condición no restringida, se observaron aumentos de 4 veces en la expresión de genes asociados con el ciclo TCA y un aumento de 2 veces en la expresión de genes asociados con la respiración aerobia en la condición restringida. Cambios en glucólisis, ruta de las pentosas fosfato (PPP) y fermentación no se observaron.

Recientemente, Dela Coletta *et al.*, (2019), evaluaron el efecto del oxígeno disuelto sobre la producción recombinante de la proteína CFP10, un antígeno de 10 kDa de *Mycobacterium tuberculosis*, que es sintetizada, predominantemente, en forma insoluble al expresarse en *E. coli*. En este estudio, se buscó evaluar parámetros que afectan la producción de dicha proteína recombinante, al expresarse en *E.coli* BL21 pLysS, bajo el promotor T7, inducible con IPTG. A nivel biorreactor (5.5 L medio Luria Bertani (LB), 33.5 °C, pH 7.0, 1.8 vvm) se evaluó la concentración total de proteína insoluble y recombinante, llevando a cabo cultivos a 15% y 30% TOD. La inducción se realizó al alcanzar 0.8 U.A. con IPTG 0.13 mM. Se obtuvo una productividad máxima para ambos a las 1.5 h postinducción, con un rendimiento de 78.6 mg rP g⁻¹ de biomasa a 30% de TOD y de 62.9 mg rP g⁻¹ de biomasa a 15% de TOD. En términos de proteína total insoluble, una mayor concentración de

oxígeno favoreció su producción, siendo el rendimiento casi 3 veces mayor respecto a la obtenida a 15% de TOD (311 mg g⁻¹ de biomasa contra 109 mg g⁻¹ de biomasa). A pesar de ello, a menor TOD, aproximadamente el 72% de la proteína insoluble corresponde a la proteína recombinante, mientras que a 30% de TOD, sólo el 20% lo fue. Además, la concentración de proteína recombinante permaneció constante a 15% de TOD hasta 3 h después de la inducción, mientras que a 30% de TOD se observó una caída significativa, que podría estar dada por degradación proteolítica o debido a que a mayor TOD pueden existir estrés oxidativo y metabólico que podrían activar otras rutas biosintéticas. Por otro lado, a mayor TOD se favoreció la formación de biomasa, siendo 1.10 g/L a 30% contra 0.615 g/L obtenido a 15%, es decir, casi el doble en el punto de máxima productividad (1.5 h después de la inducción). Es importante destacar que en este artículo no se menciona el número de experimentos que se realizaron para cada condición, ni se muestran valores con desviaciones estándar.

Resultados similares fueron los obtenidos por Kischnick *et al.*, (2006), donde se produjo la proteína recombinante Ves v 5 (antígeno 5), el alérgeno mayor de avispa, en *E. coli* BL21 bajo condiciones limitantes de oxígeno. Dicha limitación de oxígeno incrementó los rendimientos y mejoró las características de los cuerpos de inclusión obtenidos. Los experimentos se realizaron en biorreactores de 1 L, con aireación constante de 1 vvm, velocidad de agitación constante a 800, 400 y 200 rpm y ningún otro parámetro controlado. A 800 y 400 rpm se observó un crecimiento semejante y un incremento de pH, sin embargo, mientras que a 800 rpm no hubo limitación de oxígeno disuelto, a 400 rpm se observó limitación de oxígeno a partir de la segunda hora de inducción. Por el contrario, a 200 rpm el crecimiento se redujo significativamente, la limitación de oxígeno fue a partir de la primera hora y hubo sólo un pequeño cambio de pH. No obstante, al analizar la proteína total, se encontró que a pesar que la proteína total disminuyó a menores velocidades de agitación, la proporción de proteína recombinante incrementó. Así, los rendimientos más altos se lograron usando 200 rpm. Después de la solubilización en 6M de Gn•HCl, los cuerpos de inclusión producidos a 200 rpm, se replegaron aproximadamente 77%, mientras que los derivados de 800 y 400 rpm, lo hicieron a tasas de 38% y 60%, respectivamente. De esta forma, se puede pensar que la limitación de oxígeno, no solo favorece la producción de la proteína recombinante, sino además, provoca un cambio en la arquitectura de los cuerpos de inclusión, visto a partir de la tasa de replegamiento y de la condición de desnaturalización utilizada, donde dicha tasa podría estar asociada a que hay menor estructura amiloide en los cuerpos de inclusión formados a 200 rpm.

Asímismo, se encuentra el estudio realizado por Qoronfleh (Qoronfleh, 1999), donde se evalúa como afecta la concentración de oxígeno disuelto a la producción de tres proteínas recombinantes de VIH-1 (Env41, p24Gag y p55Gag) y una proteína del virus de la influenza (pGKc13), producidas en *E. coli* N99 con un sistema de inducción por temperatura bajo el promotor pL. El autor encontró que la imposición de una limitación de oxígeno tuvo un efecto estimulador en la producción de p24Gag y Env41. Los experimentos se llevaron a cabo, manteniendo los cultivos con una agitación de 500 rpm y bajando a 300 rpm al momento de la inducción, con lo que se registró una TOD de 0%. Para la proteína p24Gag se obtuvo un incremento del 100% en la expresión de la misma, respecto a los cultivos que mantuvieron la agitación a 500 rpm, mientras que para Env41, el incremento fue sólo del 15%. El autor sugiere, que la concentración de oxígeno disuelto debe tener un efecto sobre la actividad del promotor pL utilizado en sus estudios y aunque no responde la pregunta si dicho efecto es directo o indirecto, supone que el oxígeno ejerce su efecto a nivel de transcripcional y/o traduccional. Sin embargo, se propone que dicho efecto será dependiente del tipo celular, la edad y densidad del cultivo al momento de la inducción, así como de la proteína que se está expresando.

Otros estudios han reportado que bajo limitación de oxígeno, o bien, valores $\leq 15\%$ de TOD, se favorece la producción de proteínas recombinantes, tal es el caso del estudio realizado en 1992, por Li *et al.*, (1992), donde se prueba el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la expresión de una proteína recombinante en cuatro cepas diferentes. Sus resultados sugieren que la acumulación del plásmido es favorecida cuando la alimentación de oxígeno es suficiente durante la fase exponencial temprana, mientras que la expresión del gen es favorecida cuando el nivel de oxígeno disuelto cae en la etapa tardía del crecimiento. Sin embargo, también concluye que la producción es dependiente de la cepa que se utiliza para la sobreexpresión, así como el medio de cultivo y el grado de limitación de oxígeno disuelto (Li *et al.*, 1992, Qoronfleh *et al.*, 1999,).

Aunque otros estudios suponen, con o sin datos mostrados en los artículos un efecto de la TOD sobre la producción de proteínas recombinantes y/o cuerpos de inclusión (Fathi-Roudsari *et al.*, 2016; Konz *et al.*, 1998; Lindner *et al.*, 2008; Sandoval-Basurto *et al.*, 2005; Strandberg & Enfors, 1991), el efecto de una baja concentración de oxígeno disuelto en la producción de proteínas recombinantes y/o la arquitectura de los cuerpos de inclusión, no se encuentra bien documentado, de ahí la importancia de este proyecto.

Tabla 3-1. Antecedentes de estudios de oxígeno disuelto sobre producción de proteínas recombinantes

Cepa	Plásmido	Medio de cultivo y condiciones	Resultados	Referencia
<i>E. coli</i> Turner (DE3) pLacI/T Z56	pRSET-B-rARU, promotor T7	Medio TB modificado Cultivos en lote a 30% de TOD (No restringido) y sin control de TOD, manteniendo 2 vvm y 650 rpm (Restringido), pH 7.0, 37°C	Proteína expresada: rARU rARU se expresó eficientemente sólo a bajas condiciones de oxígeno disuelto. Después de 4 h de inducción, la transición de rARU fue 500% más alta que en la condición no restringida.	Sharma <i>et al.</i> , 2020
<i>E. coli</i> BL21 pLysS	pDEST™ 17- CFP10, promotor T7, inducible con IPTG	Medio LB. Cultivos a 15% y 30% TOD, 33.5°C, pH 7.0, 1.8 vvm La inducción se realizó al alcanzar 0.8 U.A. y 0.13 mM de IPTG	Proteína expresada: CFP10 A mayor concentración de oxígeno la producción de proteína insoluble fue 3 veces mayor (311 mg g-1 de biomasa contra 109 mg g-1 de biomasa). No obstante, a 15% de TOD, el 72% de la proteína insoluble, corresponde a la proteína recombinante, comparado con el 20% obtenido a 30% de TOD.	Dela Coletta <i>et al.</i> , 2019
<i>E. coli</i> BL21	pSE420 - Ves v 5, promotor <i>trc</i> inducible con IPTG	Medio LB. Cultivos a 800, 400 y 200 rpm, 37°C, 1 vvm y ningún otro parámetro controlado. La inducción se realizó al alcanzar 0.8 U.A. y 1 mM de IPTG	Proteína expresada: Ves v 5 A 200 rpm se observó limitación de oxígeno después de la primera hora de inducción. La proteína total disminuyó al disminuir la velocidad de agitación, sin embargo, la proporción de proteína recombinante incrementó. Los CI obtenidos a 200 rpm, se replegaron aproximadamente 77% mientras que los derivados de 800 y 400 rpm, lo hicieron a tasas de 38% y 60%, respectivamente.	Kischnick <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> N99	pGK41 y pGK24, ambos derivados del plásmido pSKF bajo el promotor pL, inducible por incremento de temperatura	Medio complejo: 24 g/L triptona; 48 g/L extracto de levadura; 26 g/L glicerol; 30.6 g/L K ₂ HPO ₄ ; 3.4 g/L KH ₂ PO ₄ . Cultivos a 32°C, pH 7.0, 0.5 vvm y mantenimiento de TOD >20% por cascada de agitación. Al alcanzar 5 U.A. se incrementó la temperatura a una razón de 0.66 °C/min y la agitación cambió a 500 y 300 rpm, respectivamente	Proteínas expresadas: Env41 y p24Gag de VIH-1 Para la proteína p24Gag, se obtuvo un incremento del 100% en la expresión de la misma, respecto a los cultivos que mantuvieron la agitación a 500 rpm, mientras que para Env41, el incremento fue sólo del 15% en la expresión.	Qoronfleh, 1999

3.2 ANTECEDENTES DE CARACTERIZACIÓN DE ARQUITECTURA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

En los últimos años, la descripción de la arquitectura de los CI, entendida como caracterización estructural (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Carrió & Villaverde, 2000; García-Fruitos *et al.*, 2007a), ha cobrado gran relevancia, no solo en la producción de proteínas recombinantes, sino también por el potencial de éstos como biomateriales en sectores como biorremediación, salud, alimentos, entre otros (de Marco *et al.*, 2019; Pesarrodonna *et al.*, 2019; Schleegeer *et al.*, 2013). Además, el hecho de que la estructura de los CI varía en función de la proteína que se está expresando y que para la misma proteína, la estructura cambia si las condiciones de proceso son diferentes durante su expresión, han hecho que, cada vez sean más los estudios sobre su caracterización (de Marco *et al.*, 2019; Slouka *et al.*, 2019).

Por lo anterior, diferentes técnicas se han usado ampliamente para la caracterización de la arquitectura, las cuales se retoman a continuación.

3.2.1.1 Resistencia a la degradación proteolítica

Debido a la estructura tipo amiloide que tienen los cuerpos de inclusión, es posible evaluar la resistencia que presentan a la degradación proteolítica. Carrió *et al.* (2000), evaluaron la resistencia proteolítica de CI de la proteína VP1LAC y LACVP1, un derivado de una β galactosidasa propensa a la agregación, que está fusionada con la proteína de cápside viral VP1. Encontraron que al tratar los CI con tripsina, las velocidades de degradación no eran constantes, sino eran mayores durante los primeros minutos e iban disminuyendo con el tiempo. Además, mediante SEM, observaron que los CI tratados con tripsina, exhibían una morfología con líneas de fragmentación profundas que sub-particulan los CI, aumentando su volumen. Posteriormente, se liberaban partículas pseudoesféricas resistentes a la proteasa, que iban desapareciendo aún más en tiempos de incubación más largos, lo que hizo pensar que el ataque proteolítico no está restringido a la superficie. En este estudio también se evaluó la resistencia proteolítica de CI obtenidos a diferentes tiempos de cultivo, donde la resistencia proteolítica incrementó con la edad de los CI. Los autores sugieren que este cambio en la resistencia proteolítica, podría deberse a reorganizaciones dinámicas de la estructura dentro de los CI con respecto al tiempo. Estudios posteriores demostraron que la degradación proteolítica ocurre por un mecanismo de cascada donde se da también la degradación de intermediarios (Carbonell & Villaverde, 2002; Cubarsí *et al.*, 2001)

Cano-Garrido *et al.* (2013) propusieron un modelo donde los CI están estructurados por fibras tipo amiloides, resistentes a la degradación proteolítica, que forman un andamio. Los espacios resultantes de este andamio están compuestos por especies sensibles a la degradación, que probablemente representan las especies con estructura similar a la nativa o con estructura secundaria nativa, y que dichas proporciones son dependientes de las condiciones a las cuales se obtuvieron. De tal manera, mientras menos estructura tipo amiloide tenga un núcleo de CI, su resistencia a la degradación proteolítica será menor.

Actualmente, debido a su amplia especificidad, la proteinasa K es la proteasa más utilizada para caracterización de CI (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Morell *et al.*, 2008; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Upadhyay *et al.*, 2012). La proteinasa K una proteasa de serina con capacidad para degradar proteínas nativas. No tiene especificidad por un aminoácido, pero se sabe que, corta en los enlaces peptídicos adyacentes a los extremos carboxilo de los aminoácidos alifáticos y aromáticos, dejando típicamente solo el enlace que une el dipéptido N-terminal de una proteína intacta (Ebeling *et al.*, 1974). El mecanismo de acción propuesto de la proteinasa K, sugiere que corta selectivamente en regiones expuestas y flexibles de la estructura de la proteína. Generalmente, el corte se da en regiones no estructuradas, como loops, y algunas veces, también lo hace en regiones cercanas α -hélices, pero aparentemente nunca en estructura β extendida (Fontana *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998; Kheterpal *et al.*, 2001). De esta forma, los enlaces peptídicos localizados dentro o cerca de las cadenas β son total o parcialmente resistentes a la proteólisis. Además, la proteinasa K tiene actividad en presencia de detergentes fuertes e hidrólisis de proteínas nativas y desnaturalizadas. A causa de esto, se ha convertido en una herramienta importante en el estudio de CI, ya que la cinética de degradación se puede seguir a 350 nm (Mach *et al.*, 1995, Cano-Garrido *et al.*, 2013; Kaur, 2017).

3.2.1.2 Ensayos de estabilidad ante solubilidad química

Otro ensayo utilizado para la caracterización de CI son los ensayos de estabilidad frente a la solubilidad química, utilizando agentes desnaturalizantes. Generalmente, se prefieren altas concentraciones de agentes como el $\text{Gn}\cdot\text{HCl}$ y Urea. Sin embargo, esto resulta también en la desnaturalización de las proteínas con estructuras secundarias nativas (Salvi *et al.*, 2005). Como se ha demostrado que los CI pueden contener estructuras secundarias de tipo nativo, se ha propuesto el uso de condiciones suaves que no desplieguen completamente estas estructuras (Sarker

et al., 2019; Singh & Panda, 2005; Upadhyay *et al.*, 2016). Así, el uso de procesos suaves y bajas concentraciones de agentes caotrópicos, podrían permitir la recuperación de proteínas del CI en forma activas o bien, de proteínas que no tuvieran una estructura de tipo amiloide.

Existen modelos de mecanismos mediante los cuales un desnaturalizante podría desestabilizar la estructura de una proteína: mediante interacción específica con grupos de la proteína, e indirectamente al alterar las propiedades solventes del agua. Este último mecanismo, cuando se utiliza Gn•HCl, es posible que no sea aplicable, pues la interacción entre las moléculas de agua y de Gn•HCl es muy débil. Gn•HCl parece afectar las interacciones agua-agua en la capa de hidratación promoviendo la solubilidad de grupos no polares en el interior de las proteínas a través de la interacción con cadenas laterales de los aminoácidos (Lim *et al.*, 2009; Mason *et al.*, 2003). Los aminoácidos presentes en regiones no estructuradas exhiben más unión para Gn•HCl en comparación con los aminoácidos presentes en regiones altamente estructuradas (Balamurugan *et al.*, 2019), como lo son las hojas β cruzadas, presentes en CI, por lo cual, la estabilidad de los CI puede relacionarse con una estructura más resistente, dada por el contenido amiloide de los CI (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; de Groot & Ventura, 2006; Upadhyay *et al.*, 2012)

Para la producción industrial, el despliegue completo es una desventaja, ya que favorece la agregación durante el replegamiento, lo que a su vez lleva a una baja recuperación de proteínas activas (Singh *et al.*, 2015; Tsumoto *et al.*, 2003). Por lo anterior, procesos de solubilización suaves como el uso de pH alcalino, alta presión, detergentes, solventes orgánicos y baja concentración de agentes caotrópicos han sido desarrollados, para permitir el replegamiento de las proteínas solubilizadas desde una forma parcialmente plegada y mejorar así, la recuperación de proteínas activas. (Singh *et al.*, 2015; Upadhyay *et al.*, 2016).

3.2.1.3 FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Debido al alto contenido de información que un espectro puede dar, la espectroscopía infrarroja es otra técnica que se ha utilizado ampliamente, pues se puede obtener información del estado de plegamiento de una proteína (Ami *et al.*, 2006; Kong & Yu, 2007; Moran & Zanni, 2014).

De manera particular, la estructura secundaria de una proteína y la agregación pueden ser estudiadas a través del análisis de la región amida I (1700-1600 cm^{-1}), donde se sabe que, los enlaces peptídicos C=O absorben cercano a 1650 cm^{-1} (Barraza-Garza *et al.*, 2013; Doglia *et al.*, 2008; Shivu *et al.*, 2013; Zandomeneghi *et al.*, 2009). La banda de componentes se observa mejor en la segunda derivada del espectro, pues permite la identificación de los picos de absorción pequeños y cercanos que no se resuelven en el espectro original (Rieppo *et al.*, 2012), resultando la adsorción de los componentes como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 1-2. Bandas de adsorción de IR en región amida I

Máximo en segunda derivada (cm^{-1})	Adsorción debida a:
~1654-1658	α - hélice
~1644-1651	random coil
~ 1634-1638	hoja β
~1611-1630 y un pico adicional 1691-1693	Interacciones intermoleculares β (fibras amiloides)

El principio básico de esta técnica se basa en la excitación de grupos moleculares por un haz de luz infrarrojo que ocasiona movimientos vibracionales en los enlaces de la molécula, generando un espectro de adsorción infrarrojo. Cada banda corresponde a un movimiento de un enlace específico dentro de la molécula, haciendo posible la asignación de picos de adsorción a grupos funcionales específicos. En ATR-FTIR, un haz de infrarrojo ingresa al elemento ATR, el cual es un cristal en un cierto ángulo, correspondiente al ángulo crítico entre el elemento ATR y la muestra. El haz se refleja varias veces dentro del cristal, creando una onda evanescente que se extiende más allá del elemento ATR hasta la muestra que se encuentra en contacto con éste. La onda evanescente pierde energía en frecuencias idénticas a la absorbancia de la muestra. Posteriormente, el haz atenuado regresa al cristal, sale por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector, para generar un espectro de absorción (Minnes *et al.*, 2017).

De acuerdo con Zandomeneghi *et al.* (2009), las fibras amiloides producen un espectro característico, con una banda independiente a las hojas β nativas. En este estudio se compararon los espectros IR obtenidos para la forma nativa y fibras amiloides de la proteína transtiretina y otras cadenas polipeptídicas en soluciones de agua deuterada. Los espectros revelaron que las proteínas nativas mostraban un máximo en 1630 cm^{-1} y las fibrillas amiloides, por el contrario, mostraban una banda más estrecha con un máximo en 1615 cm^{-1} y un pico adicional de baja

intensidad en 1684 cm^{-1} . Shivu *et al.*, (2013) examinaron varios agregados de proteínas diferentes, incluidas fibrillas amiloides de varios polipéptidos, cuerpos de inclusión, agregados y oligómeros solubles. Todos los agregados mostraron alguna estructura secundaria tipo nativa y, además, una nueva estructura β específica en frecuencias más bajas, cercanas a 1617 cm^{-1} .

Carrió *et al.*, (2005) caracterizaron mediante FTIR a la proteína VP1LAC. Al producirse en *E.coli*, VP1LAC se localizó en el citoplasma en fracción soluble e insoluble. El espectro infrarrojo para la fracción soluble mostró un máximo en 1634 cm^{-1} , que corresponde a la vibración intramolecular de las hojas β . Por su parte, el espectro de los CI de VP1LAC, fueron completamente diferentes. Se observó una banda predominante en 1621 cm^{-1} , acompañada de una banda menor en 1691 cm^{-1} . Para comprobar que estas nuevas bandas fueran consistentes con estructuras amiloides, se probaron dos modelos diferentes de CI. El primero de ellos, LACVP1, en donde la proteína de fusión se encontraba invertida, y CI de trombospondina, que no se encuentra relacionada ni secuencial ni estructuralmente con VP1LAC. Los espectros FTIR obtenidos fueron muy similares y a estos nuevos picos se les asignó, como indicadores de estructuras β cruzada tipo amiloide.

Por otro lado, Jiang *et al.* (1996), realizaron estudios sobre la estructura secundaria de rHuGM-CSF soluble en soluciones acuosas (H_2O y D_2O) utilizando FTIR. Adicionalmente, mediante la reducción de los enlaces disulfuro, que llevó al despliegue de la conformación nativa y la formación intermolecular de estructuras β agregadas, se analizaron las diferencias en los espectros infrarrojos obtenidos. Para la proteína soluble, se obtuvo un máximo de absorbancia a 1654 cm^{-1} en H_2O y 1650 cm^{-1} en D_2O , lo que representa la existencia considerable de estructuras α -hélices. A la banda en 1631 cm^{-1} en H_2O se le asignó la estructura de hojas β y cercano a 1645 cm^{-1} para estructuras irregulares. Con los resultados, se propuso que rHuGM-CSF se compone 46% de estructuras α -hélices, 7% de hojas β , 23% de giros y 24% de estructuras irregulares. Después, para evaluar la estructura tipo amiloide de la proteína, los enlaces disulfuro fueron destruidos, y en el espectro infrarrojo se observaron 2 nuevos picos, que no estaban presentes en los espectros de la proteína soluble, en 1622 cm^{-1} en H_2O y 1613 cm^{-1} en D_2O , que se atribuyeron a estructuras β cruzada de tipo amiloide.

3.2.1.4 Ensayos de unión a Tioflavina T (Th-T)

Otro método de caracterización de CI, debido a las propiedades similares con las fibrillas amiloides, es la unión a agentes de tinción específicos de estructura amiloide

como tioflavina T (Th-T), tioflavina S (Th-S), rojo Congo (CR) y crisamina G (CG) (Naiki *et al.*, 1989; Nilsson, 2009; Wang *et al.*, 2008).

La tioflavina T es una molécula pequeña, con una longitud $\sim 15\text{Å}$, conformada por un benzotiazol fusionado a un anillo de fenilamina (Figura 3-1). Esta molécula tras unirse a una fibra amiloide, produce una fuerte señal de fluorescencia a aproximadamente 482 nm cuando se excita a 450 nm (Naiki *et al.*, 1989; Xue *et al.*, 2017). Además, la Th-T no interactúa con proteínas monoméricas plegadas o parcialmente plegadas, oligómeros solubles o agregados amorfos, o bien, la interacción de Th-T con otras especies produce un incremento de fluorescencia insignificante (Lindgren *et al.*, 2005), razón por la cual, su uso se ha extendido para estudiar la estructura y el mecanismo de formación de fibrillas amiloides y CI.

Cuando la Th-T no se encuentra unida, la rotación de sus anillos se da libremente, lo que apaga rápidamente los estados excitados generados por la excitación con fotones. Por lo cual, la emisión de fluorescencia es baja, pero cuando se une, se bloquea la torsión de la molécula por impedimento estérico, preservando el estado excitado, lo que resulta en un incremento de la emisión de fluorescencia (Stsiapura *et al.*, 2007). Respecto al mecanismo de unión, se han propuesto varios modelos por los cuales la Th-T se une a las fibras amiloides. El principal y más aceptado, el “modelo de canal”, propone la unión de monómeros de forma paralela al eje largo de la fibrilla amiloide, es decir, a los surcos superficiales hidrófobos y aromáticos que surgen de la estructura β cruzada (Biancalana & Koide, 2010; Peccati *et al.*, 2017; Sulatskaya *et al.*, 2017) (Figura 3-4). También, se ha propuesto que se requiere un sitio mínimo de unión de cuatro residuos aromáticos hidrofóbicos en hojas β consecutivas (Murugan *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2009).

Algunos autores han sugerido que la compactación de los CI puede influir en la unión de Th-T. Tal es el caso de Morell *et al.* (2008), quienes propusieron la presencia de estructuras β cruzadas intermoleculares que se encuentran escondidas en el interior de los CI. Por otro lado, Castellanos-Mendoza *et al.* (2014) mostraron que los CI obtenidos bajo condiciones controladas de pH mostraban espectros de emisión de fluorescencia altos en tiempos iniciales, y que la afinidad de la Th-T disminuía al avanzar el tiempo de cultivo. Además, en este estudio, se observó que a mayor tiempo de cultivo, también el tamaño de los CI disminuía, por lo cual, ésta podría ser una de las razones de pérdida de afinidad, ya que, al ser más compactos, la accesibilidad de la Th-T se vería limitada.

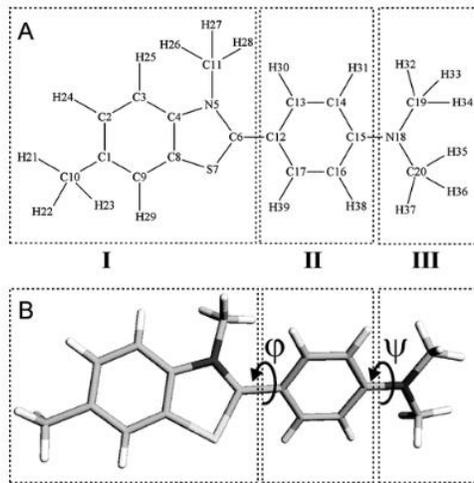


Figura 3-1. A) Estructura química de una molécula Th-T. I: Anillo benzotiazol, II. Benceno, III: Grupo dimetilamina. B). Modelo espacial de Th-T (Tomado de Stsiapura *et al.*, 2007).

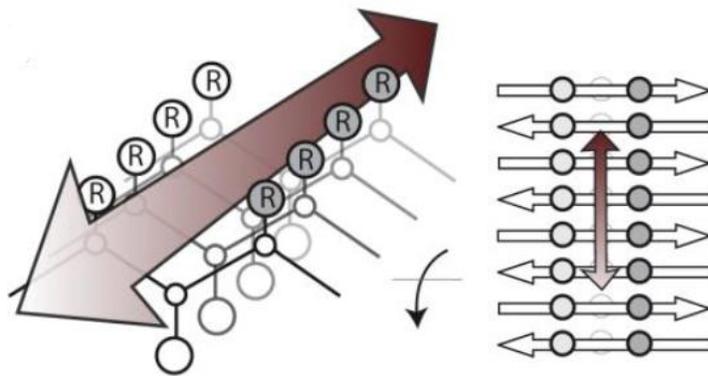


Figura 3-2. Modelo de "canal" de unión de Th-T a lámina β similar a fibrillas amiloides. (Tomado de Biancalana & Koide, 2010).

4 HIPÓTESIS:

La disminución del nivel de tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el momento de la inducción térmica incrementará la producción de la proteína recombinante rHuGM-CSF al expresarse en *Escherichia coli* en un sistema termoinducible con respecto a los cultivos controlados a 30% de TOD después de la inducción térmica. Además, se propone que estas condiciones generan cuerpos de inclusión con menor contenido de estructuras tipo amiloide con respecto a los obtenidos bajo condiciones controladas de 30% de TOD después de la inducción térmica.

5 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del control postinducción de la tensión de oxígeno disuelto sobre la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (rHuGM-CSF) y sobre la arquitectura de los cuerpos de inclusión en un sistema de inducción por temperatura λ pL-cl857 en *E. coli* W3110.

5.1 Objetivos particulares:

- Analizar el efecto del control postinducción de la TOD a 5%, 10%, 30%, 70% y sin control de TOD postinducción sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo de *E.coli* W3110, transformada con el plásmido pV3-uri200N, productora de rHuGM-CSF, bajo el control del sistema λ pL-cl857, inducible por temperatura.
- Caracterizar y analizar la composición y la arquitectura de cuerpos de inclusión de rHuGM-CSF, formados a diferentes % de control de TOD postinducción.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepa y banco de trabajo

Durante este proyecto, se utilizó la cepa *E.coli* W3110, proporcionada por la empresa PROBIOMED S.A. de C.V, que tiene una copia de la proteína represora termosensible, *ci857*, en cromosoma y la expresa de forma constitutiva. Esta cepa, derivada de *E.coli* K-12, está transformada con el plásmido pV3-uri200N (propiedad de PROBIOMED S.A de C.V.), que contiene el gen optimizado del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) humano, bajo el promotor pL del bacteriófago λ y el gen *kanR*, de resistencia a kanamicina.

Por debajo de los 37°C, la proteína *ci857* se une a los dominios de la región operadora del promotor. Esta unión impide la unión de la RNA polimerasa al promotor y, por ende, la transcripción. Al incrementar la temperatura por arriba de 37°C, la proteína represora *ci857* se libera, permitiendo así, que la RNA polimerasa se una al promotor, inicie la transcripción, y la acumulación de la proteína recombinante.

Para realizar el banco de trabajo, se partió de un vial de 1 mL del banco maestro de la cepa, que se encontraba guardado a -74°C. Tres matraces convencionales de 250 mL se inocularon con 200 μ L cada uno. La cepa se cultivó a 200 rpm, 30°C, en una incubadora de agitación orbital (Modelo C-25, New Brunswick Scientific, EE.UU), con 50 mL de medio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl), pH inicial de 7.4 (ajustado antes de esterilizar con NaOH 1 M), y suplementado con 100 mg/mL de kanamicina estéril.

Al alcanzar una densidad óptica de 1.6 U.A., a 600 nm, se mezclaron en tubos de 50 mL, con glicerol estéril al 40%. Se realizaron alícuotas de 1 mL que fueron almacenadas a -74°C.

6.2 Factor de conversión de equivalencia de DO (U.A. 600 nm) – Biomasa (g/L) de *E. coli* W3110.

Dado que las mediciones de biomasa se realizaron por turbidimetría (Espectrofotómetro Genesys 5, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), para el cálculo de concentración celular (gravimétricamente en g/L), se determinó la equivalencia de DO (U.A. 600 nm) y peso seco. La determinación se realizó por duplicado a partir

de cultivos de *E. coli* W3110 recombinante en matraces convencionales de 250 mL con 50 mL de medio mineral a 30°C y 200 rpm en una incubadora de agitación orbital (Modelo C-25, New Brunswick Scientific, EE.UU). Durante diferentes puntos de la fase exponencial, se tomó un matraz y se realizaron diluciones a 10 mL, registrando la absorbancia de cada una de ellas. Posteriormente, fueron filtradas al vacío a través de membranas 0.22 μm (Millipore, EE.UU.), previamente pesadas, y se colocaron a peso constante, registrado su peso cada 8 h por 72 h.

Cuando la luz pasa a través de una mezcla, la atenuación de la intensidad de luz se produce por la absorbancia y la dispersión de luz debido a la diferencia en el índice de refracción. La absorbancia se refiere específicamente a la luz que es absorbida por la muestra. La dispersión se produce cuando los dipolos inducidos por la absorción de energía reemiten la luz en una dirección diferente. La luz atenuada por la dispersión, también debe ser inicialmente absorbida por la célula. Dependiendo de la configuración del espectrofotómetro y del ángulo de la luz dispersa, esta redirección puede causar que el fotosensor detecte o no, la luz dispersada (Myers *et al.*, 2013)

Para saber si la producción de CI afectaba las mediciones por turbidimetría, se realizó el mismo procedimiento, pero en esta ocasión, se realizó la inducción subiendo la temperatura a 42°C. Los valores obtenidos, se graficaron (Figura 6-1) y las pendientes representan el factor de conversión, obteniéndose un valor de 0.45 ± 0.02 y 0.38 ± 0.02 , sin y con acumulación de cuerpos de inclusión, respectivamente, que son fueron estadísticamente significativas.

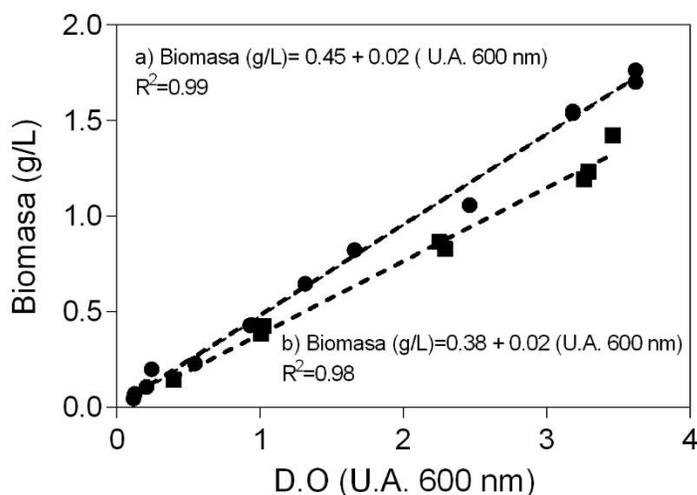


Figura 6-1. Factor de equivalencia DO (U.A. 600 nm) - Biomasa (g/L) para cultivos sin (●) y con inducción (■) de la expresión de la proteína recombinante rHuGM-CSF.

Por lo anterior, se consideró el factor de equivalencia de 0.45 para la conversión antes de la inducción, y el factor de equivalencia de 0.38 para los datos obtenidos después de a inducción.

Los CI se han descrito como agregados refráctiles. Fahnert *et al.* (2004), muestran que la producción de CI afecta la medición de densidad óptica después de graficar la relación de la densidad óptica a 500 nm y el peso seco para cultivos de *E. coli* RB791 pKK177gluC pUBS520 productora de α -glucosidasa sin y con inducción con 1 mmol de IPTG obtenidos en estudios anteriores (Schweder *et al.*, 2002; Teich *et al.*, 1998), donde el factor de conversión, es decir, la pendiente de la recta, fue 16% menor en los cultivos con acumulación de cuerpos de inclusión que en los cultivos sin inducción.

Por otro lado, valores de factores de conversión de 1.0 unidad de absorbancia para *E. coli* han sido reportados entre 0.31 y 0.50 g/L biomasa como peso seco (Lagunas-Muñoz *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2013; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016; Soni *et al.*, 2008).

6.3 Medio mineral

El medio de cultivo que se utilizó fue medio mineral reportado por Caspeta *et al.*, (2013) (), modificado por Restrepo-Pineda *et al.*, (2019), suplementando glucosa 17.5 g/L, casaminoácidos 3.0 g/L, y kanamicina 30 μ g/mL. Las soluciones concentradas de glucosa (500 g/L) y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (400 g/L) fueron esterilizadas una sola vez en autoclave y guardadas a 4°C y añadidas después de esterilizar. Soluciones concentradas de casaminoácidos (500 g/L), tiamina 1000X (100 mg/mL) y kanamicina 1000X (30 mg/mL), fueron esterilizadas por filtración a través de filtros de 0.22 μ m (membranas de ésteres mezclados de celulosa, Merck-Millipore, EE.UU.) y guardadas a -20 °C y añadidas al medio antes de inocular.

Tabla 6-1. Composición de medio mineral descrito por Caspeta *et al.*, 2013

Compuesto	(g L ⁻¹)	Compuesto	(g L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4.0	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.2
KH ₂ PO ₄	13.3	Tiamina	0.045
Ácido cítrico	1.7	Elementos traza*	2 mL

* Solución de elementos traza concentrada 500X: Para 200 mL, citrato Fe(III) 10.08 g, ZnSO₄ · 2H₂O 3.2 g, MnCl₂ · 4H₂O 1.5 g, H₃BO₃, 0.3 g, EDTA 1.41 g, CoCl₂ · 6H₂O 0.25 g, NaMoO₄ · 2H₂O 0.21 g, CaCl₂ 0.01g

6.4 Cultivo en matraces

La caracterización a nivel matraz se realizó en matraces convencionales de 250 mL con 50 mL medio mineral (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019). Se preparó un preinóculo que se dejó crecer por 12 h, y se inocularon los matraces para iniciar en 0.1 U.A. Para los cultivos control, se mantuvo la temperatura a 30°C durante todo el cultivo. En los cultivos con inducción, al llegar a 2.0 U.A., se subió la temperatura a 42°C durante el resto del cultivo. Tanto los preinóculos, como la caracterización se realizaron a 200 rpm en una incubadora de agitación orbital (Modelo C-25, New Brunswick Scientific, EE. UU).

Se prepararon 9 matraces, de los cuales, cada dos horas se tomaron muestras de tres de ellos, para determinación de biomasa por turbidimetría (Espectrofotómetro Genesys 5, Thermo Fisher Scientific, EE.UU), así como 1.0 mL en tubo Eppendorf para medición posterior de glucosa, ácidos orgánicos, y análisis de proteína. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm/10 min (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Alemania). Se separó el sobrenadante del paquete celular formado y ambos fueron guardados a -20°C. De uno de los matraces se tomó adicionalmente, 2.5 mL para registro de pH (Modelo 430, Corning, EE.UU). El volumen que se muestreo de cada matraz fue registrado para llevar un control de volumen final hasta ≤ 45 mL.

Para poder obtener las mediciones en línea de oxígeno disuelto, se utilizó el lector óptico Fibox 3 con el sensor PSt3, y el software de adquisición de datos OxyView PST3v602 (PreSens, Alemania). El sensor se colocó al fondo del matraz, a manera de que siempre estuviera en contacto con el líquido y el lector óptico. La calibración del sensor se realizó a 100% de saturación de aire, a 200 rpm y 30°C o 42°C, y a 0% de saturación de aire con una solución de Na₂SO₃ (0.3 M) y CoCl₂ ($<5 \times 10^{-7}$ M) (Reynoso-Cereceda *et al.*, 2016; Wittmann *et al.*, 2003).

6.5 Cultivo en reactores.

Para los biorreactores y sus inóculos se utilizó medio mínimo ajustado a pH 7.2 antes de esterilizar. El inóculo se cultivó por 12 h, a 30°C y 200 rpm en agitación orbital (Modelo C-25, New Brunswick Scientific, EE.UU), en matraces convencionales de 250 mL con 50 mL medio mineral (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019).

Todos los cultivos se realizaron por triplicado en biorreactores (Applikon Biotechnology, Países Bajos), equipados con 2 turbinas Rushton de 6 paletas planas, de un volumen nominal de 1.8 L y 1.0 L de volumen de operación. Los

biorreactores se equiparon con sensores para el control de pH (sensores AppliSens, Applikon Biotechnology, Países Bajos), temperatura (mantilla de calentamiento, Applikon Biotechnology, Países Bajos) y TOD (electrodos Mettler Toledo, EE.UU.) conectados a un controlador Biocontroller ADI 1010 (Applikon Biotechnology, Países Bajos) y se utilizó un sistema de control proporcional-integral-derivativo (PID). El control de la TOD se realizó con una cascada de agitación entre 400-1000 rpm ($P= 2-3$; $I= 2,500-3,000$; $D=100-200$, controlador Biocontroller ADI 1010). El seguimiento en línea se realizó mediante el software de adquisición de datos BioXpert (Applikon Biotechnology, Países Bajos).

Los biorreactores se inocularon con 100 mL de inóculo (10% del volumen de operación) para iniciar a 0.1 U.A. aproximadamente. El cultivo se mantuvo a 30°C, 500 rpm y 1 vvm, hasta alcanzar 3.0 U.A. Se indujo entonces, con un cambio de temperatura a 42°C, con una velocidad de calentamiento de 0.37 ± 0.03 °C/min, y un cambio en el control de la TOD por cascada de agitación a 70%, 30 %, 10% o 5%, según la condición a evaluar, manteniendo 1 vvm constante. Para la condición sin control, se mantuvieron 500 rpm y 1 vvm durante todo el cultivo. En la condición de 70% de TOD, en los periodos donde el límite de 1000 rpm de agitación no fue capaz de mantener esa TOD, se mezcló la entrada de aire con oxígeno puro a través de un controlador de válvulas solenoides. El control de pH se realizó a 7.2 ± 0.2 con una solución 2 M de NaOH y 2 M de HCl. Cada 2 h, se tomaron muestras para determinación de biomasa por turbidimetría, análisis de consumo de glucosa, producción de ácidos orgánicos y, posteriormente, concentración de la proteína recombinante y análisis de los cuerpos de inclusión en las horas postinducción. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm/10 min/4°C (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Alemania), separando el sobrenadante del paquete celular formado y ambos se guardaron a -20°C. Adicionalmente se tomaron 12 mL de muestra en el momento preinducción, así como a las 3 h y 15 h postinducción. Para el control de espuma, se adicionó un agente antiespumante (New Brunswick 2097-87) al 5% estéril cuando fue necesario.

6.6 Cuantificación de glucosa y ácidos orgánicos

Los análisis de concentración de glucosa residual, así como producción de ácidos orgánicos se realizaron del sobrenadante guardado a -20°C.

La determinación de glucosa residual se realizó mediante el analizador bioquímico YSI 2900 (YSI Life Sciences, EE.UU.) utilizando la membrana YSI 2365 (YSI Life Sciences, EE.UU.) y una solución calibradora de 2.5 g/L de glucosa. Para el análisis

de ácidos orgánicos, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se filtraron las muestras en filtros de jeringa de 0.22 μm (Sartorius, Alemania) y se inyectaron 100 μL en el equipo (unidad de bombas LC-20AT, detector UV a 210 nm SPD-20A, y regulador de temperatura CTO-104, Shimadzu, Japón), utilizando una columna Aminex HPX-87H (intercambio catiónico, BioRad, EE.UU). La fase móvil utilizada fue H_2SO_4 0.004 M, a un flujo de 0.6 mL/min y 50°C. Para la cuantificación se utilizó un estándar comercial (No. Catálogo 125-0586, BioRad, EE.UU.), con los metabolitos mostrados en la Tabla 6-2 y el software de análisis e integración, LC Solutions v1.25 (Shimadzu, Japón).

Tabla 6-2. Tiempos de retención para la cuantificación de ácidos orgánicos en una columna Aminex HPX-87H.

Metabolito	tiempo de retención (min)
Citrato	8.477
Malato	10.129
Succinato	12.167
Formiato	14.063
Acetato	14.984

6.7 Cálculo de parámetros cinéticos

Para la caracterización cinética y estequiométrica se calcularon los parámetros que se describen a continuación. La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó durante la fase exponencial pre y postinducción a partir de la pendiente en escala logarítmica de la biomasa generada antes de la inducción y después de la inducción y antes de entrar a fase estacionaria, respectivamente. Los rendimientos de biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), proteína total/biomasa ($Y_{p/x}$), proteína total/sustrato ($Y_{p/s}$) de manera global, y los rendimientos acetato/sustrato ($Y_{ac/s}$), proteína recombinante/sustrato ($Y_{rP/s}$), proteína recombinante/biomasa ($Y_{rP/x}$) y la velocidad específica de consumo de glucosa ($q_{s_{\text{Glu}}}$) después de la inducción.

En los casos que se aplicó regresión lineal, los mínimos cuadrados lineales se ajustaron a los datos r^2 mostrados con valores iguales o superiores a 0,97.

Los valores se encontraron utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Y_{x/s} = \frac{[Biomasa\ final - Biomasa\ inicial]}{[Sustrato\ inicial - Sustrato\ final]}$$

$$Y^p/s = \frac{[proteína\ total]}{[sustrato\ consumido]}$$

$$Y^p/x = \frac{[proteína\ total]}{[biomasa]}$$

$$Y^{rP}/x = \frac{[proteína\ recombinante]}{[biomasa]}$$

$$Y^{rP}/s = \frac{[proteína\ recombinante]}{[sustrato\ consumido]}$$

$$Y^{ac}/s = \frac{[acetato\ en\ el\ medio]}{[sustrato\ consumido]}$$

$$q_s = \frac{\mu}{Y_x^s}$$

La cuantificación y rendimientos de proteína recombinante se realizó obteniendo el % de rHuGM-CSF en geles, mediante densitometría en el software Image Lab (BioRad, EE.UU).

6.8 Recuperación de cuerpos de inclusión

El método de recuperación de cuerpos de inclusión que se utilizó fue el reportado por Calcines-Cruz *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se tomaron los paquetes celulares de biomasa guardados a -20°C y se les añadió solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF, Sigma, EE.UU.) como inhibidor de proteasas. Posteriormente, las muestras se sonicaron con 8 ciclos de 30 s y 8 micrones de amplitud en un sonicador SoniPrep 150 (Richmond Scientific, Reino Unido), manteniendo las muestras en hielo entre cada ciclo. Se tomó muestra del lisado para posterior análisis de proteína total y el resto fue centrifugado a 12,000 rpm/15 min/4°C (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Alemania). Se recuperaron ambas fracciones, para cuantificación de proteína soluble e insoluble. La fracción insoluble, se resuspendió en solución de lisis + 1% v/v IGEPAL CO-630 (Sigma, EE.UU.) y se incubó por 30 min/4°C. Las muestras se centrifugaron y se recuperó el paquete celular. Posteriormente, se resuspendió en buffer de lisis + 0.5% v/v Tritón X100 (Sigma, EE.UU.). Las muestras se centrifugaron sin incubación, descartando el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ y se centrifugó a 12000 rpm/15 min/4°C (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Alemania). Por último, se realizaron lavados repitiendo el último paso al menos 4 veces.

6.9 Determinación de proteína total, soluble y presente en cuerpos de inclusión por método de Bradford

La determinación de concentración de proteína se realizó a partir de las muestras recuperadas del apartado 6.8 mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el Kit de ensayo Bio-Rad Protein Assay (BioRad, EE.UU) en microplacas de fondo plano de 96 pozos. La absorbancia fue medida a 600 nm en el lector StatFax 4200 (Awareness Technology Inc., EE.UU).

Las muestras de lisado y cuerpos de inclusión fueron previamente solubilizadas con amortiguador de isoelectroenfoque (IEF) (7 M urea, 2M tiourea, 40 mM DTT), por 3 h a temperatura ambiente. Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración partiendo de una solución estándar de 2.0 mg/mL de albumina de suero bovino (BSA), y posteriores diluciones seriadas 1:2 en un intervalo de 0 – 0.75 mg/mL (Anexo 11-1).

6.10 Detección y análisis de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Steinberg, 2009) para el análisis de proteína total y cuerpos de inclusión. Con la finalidad de observar la acumulación de la proteína recombinante en diferentes tiempos de cultivo, se cargaron geles con muestras obtenidas a 1, 3, 9 y 15 h después de la inducción. Las muestras fueron previamente solubilizadas en amortiguador IEF (1:5) por al menos 3 h. El gel separador se preparó al 15% y se cargó cada pozo con 25 µg de proteína total y 20 µg de CI purificados, cuantificados por Bradford. También se realizaron geles de proteína total cargando 15 µL de 1.0 U.A. de biomasa de *E.coli* W3110 a 15 h postinducción de cada una de las condiciones utilizadas. 2 µg de rHuGM-CSF estándar se utilizó como control en cada gel (Molgramostim CRS, European Pharmacopoeia Reference Standards, Y0000251).

Se corrieron los geles a voltaje constante de 110 Volts durante aproximadamente 3 h. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad, EE.UU) y luego se pasaron a una solución de desteñido (10% ácido acético, 30% metanol y 60% agua). La obtención de las imágenes y el análisis densitométrico se realizó con el programa Image Lab (BioRad, EE.UU.).

6.11 Degradación proteolítica por Proteinasa K

Se resuspendieron 100 µg de CI purificados en amortiguador 50 mM de Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 8.0 para un volumen final de 1.0 mL. La digestión se inició añadiendo proteinasa K (Bioline, Reino Unido) a una concentración final de 50 µg/mL. Los cambios en la absorbancia a 350 nm fueron registrados durante 100 min en un espectrofotómetro UV/Vis DU 730 (Beckman Coulter, EE. UU). Los resultados se normalizaron al valor máximo alcanzado antes de mostrarse una disminución en la absorbancia (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Upadhyay *et al.*, 2012)

6.12 Ensayos de estabilidad ante solubilidad química con Gn•HCl

El efecto del control de la TOD sobre la estabilidad de CI frente a un agente caotrópico, se realizó evaluando la resistencia a la desnaturalización, utilizando diferentes concentraciones de cloruro de guanidinio (Gn•HCl), en CI obtenidos a 3 h y 15 h después de la inducción. Se resuspendieron CI purificados, para una concentración final de 125 µg/mL en un volumen final de 100 µL con amortiguador (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5) y diferentes concentraciones de Gn•HCl (0, 1, 2, 4, 6 M) (Sigma, EE.UU.). Las muestras se incubaron en agitación a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm/15 min (Centrífuga 5417R, Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se cuantificó por Bradford (Bradford, 1976), obteniéndose así, la fracción solubilizada a cada concentración (Castellanos-Mendoza, *et al.*, 2014). Para cada concentración de Gn•HCl utilizada, se obtuvieron curvas de calibración partiendo de una solución estándar de albumina de suero bovino (BSA) a 2.0 mg/mL, y posteriores diluciones seriadas 1:2 en un intervalo de 0 – 0.375 mg/mL. (Anexo 11.2)

6.13 ATR-FTIR (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada)

Para su análisis, se tomaron CI purificados, provenientes de 4 mL de cada cultivo a las 3 h y 15 h postinducción. Los CI se concentraron en una centrífuga por vacío (SpeedVac Concentrator Savant ISS110, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), a temperatura ambiente por 30 min. Una vez secos los CI, se obtuvieron los espectros de absorbancia, analizando la región entre 1500 cm⁻¹ – 1700 cm⁻¹ (región amida I).

Los espectros de absorción se adquirieron en modo de absorbancia con un espectrofotómetro infrarrojo IRAffinity-1S con el software IR Solutions (Shimadzu, Japón) y el dispositivo de reflexión atenuada Specac Quest ATR (Specac Limited, Reino Unido). Para obtener espectros de absorción con bajo nivel de ruido, se obtuvieron los espectros de fondo antes de cada medición. Se realizaron 40 escaneos de cada muestra a 2 cm^{-1} de resolución (Ami *et al.*, 2005). Después de un suavizado de 13 puntos por el método Savitzky-Golay con el software IR Solutions (Shimadzu, Japan) (Ami *et al.*, 2005), se obtuvieron las segundas derivadas de los espectros IR (Rieppo *et al.*, 2012) para una identificación más específica de los picos de absorción pequeños y cercanos que no se resuelven en el espectro original. Las segundas derivadas fueron normalizadas con el valor del pico de tirosina ($\sim 1510\text{ cm}^{-1}$) (Ami *et al.*, 2005, 2006; Calcines-Cruz *et al.*, 2018).

6.14 Ensayos de unión a Tioflavina T (Th-T)

Se utilizaron $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de CI purificados obtenidos a 3 h y 15 h postinducción, en una solución de reacción (10 mM de fosfatos, 150 mM de NaCl, pH 7.0 y $75\text{ }\mu\text{M}$ de Th-T) (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014). Tras realizar la mezcla, se dejaron incubar a temperatura ambiente por 30 min. Se registraron los espectros de fluorescencia de 450 a 560 nm (espectrofluorómetro Agilent Cary Eclipse, EE UU), utilizando una longitud de onda de excitación de 440 nm y 5 escaneos por muestra. El ancho de rendija se fijó en 5 nm, tanto para la emisión como excitación. Se obtuvo también el espectro de fluorescencia de Th-T libre como control (Upadhyay *et al.*, 2012).

6.15 Microscopía electrónica

El análisis microscópico de los CI se realizó en un microscopio electrónico (ZEISS Libra 120 plus) en la Unidad de Microscopía del IBt-UNAM en colaboración con la Dra. Guadalupe Zavala, para CI obtenidos después de 3 h de inducción. Las muestras fueron fijadas por 4 h con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% en solución de cacodolato de sodio (0.16 M pH 7.2). Para la post fijación se aplicó tetraóxido de osmio 1% durante 90 min/ 4°C . Posteriormente, los CI se lavaron dos veces en solución y seis veces en agua destilada fría. Luego las muestras se deshidrataron gradualmente en etanol y se embebieron en Epon. Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Para el análisis de tamaño de CI, se midieron los diámetros máximos de los CI en las micrografías utilizando el programa ImageJ y posteriormente se graficó la distribución de los tamaños encontrados.

6.16 Estadística

Todos los cultivos se realizaron por triplicado (3 réplicas biológicas) y cada análisis de las técnicas se realizó por triplicado (3 réplicas técnicas). Se utilizaron muestras independientes, pruebas *t* de Student, ANOVA de una y dos vías, con la prueba de Tukey para la comparación de medias múltiples. En las figuras se indican con letras minúsculas las diferencias de forma significativo para $p < 0.05$ y con mayúsculas para $p < 0.01$. Para diferencias de forma significativa, respecto al tiempo, se indican con un *.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización cinética

El control postinducción de TOD a valores $\geq 5\%$ afecta la μ , pero no la biomasa máxima alcanzada

Para este proyecto se plantearon 4 condiciones de control postinducción de TOD (70, 30, 10 y 5 %) y una condición adicional sin control postinducción de TOD. En todas las condiciones se controló el pH a 7.0 ± 0.2 , durante todo el cultivo. Hasta aproximadamente 1.35 g/L de biomasa (~ 3.0 U.A.), todos los cultivos se mantuvieron a 30°C , 500 rpm y 1 vvm constante. Al llegar a esa concentración celular, la inducción se realizó elevando la temperatura a 42°C a una velocidad de calentamiento de 0.37 ± 0.03 $^\circ\text{C}/\text{min}$ y manteniendo los 42°C durante todo el cultivo (Figura 7.-1 y Anexo 11.4). Se decidió realizar el cambio en el control de TOD en el momento de la inducción con la finalidad de que la acumulación de biomasa y condiciones metabólicas fueran similares antes de la inducción en todas las condiciones propuestas.

Bajo todas las condiciones de control de TOD postinducción, se tienen crecimientos similares, alcanzando una biomasa máxima similar (4.34 ± 0.4 g/L) (Figura 7-2 y Tabla 7-1). Sin embargo, cuando se realiza sin control de TOD, y el cultivo permanece por varias horas en 0% TOD (Figura 7-1 e), la biomasa se reduce en un 50% (2.30 ± 0.3 g/L). No obstante, la biomasa máxima es 37% mayor, a la obtenida a nivel matraz (Anexo 11.3). Esto debido a que en biorreactor se puede alcanzar valores más altos de transferencia de masa, que en los matraces de agitación orbital y se realiza control de pH (Büchs, 2001; Klöckner & Büchs, 2012).

Los cultivos crecieron exponencialmente con una velocidad específica de crecimiento (μ) preinducción de 0.56 ± 0.03 h^{-1} (Tabla 7-1). En comparación con la velocidad de crecimiento preinducción, el valor obtenido en postinducción para todas las condiciones, disminuyó (Tabla 7-1). La disminución de μ podría deberse a los desvíos de flujos metabólicos hacia la síntesis de proteínas recombinantes (Bentley *et al.*, 2009). Además, al usar un sistema de inducción por temperatura, puede deberse a la síntesis de proteínas de respuesta de choque térmico (Hoffmann *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2007, Restrepo-Pineda *et al.*, 2019). Por un lado, después del incremento de temperatura, la síntesis global de proteínas aumenta en un factor de tres, donde hasta el 25% corresponde a proteínas de choque térmico

(HSP) (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Por otro lado, la síntesis de proteínas recombinantes y HSP, incrementa los flujos catabólicos para la generación de energía, por lo que se disminuyen también los recursos para generación de biomasa (Hoffmann *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2007).

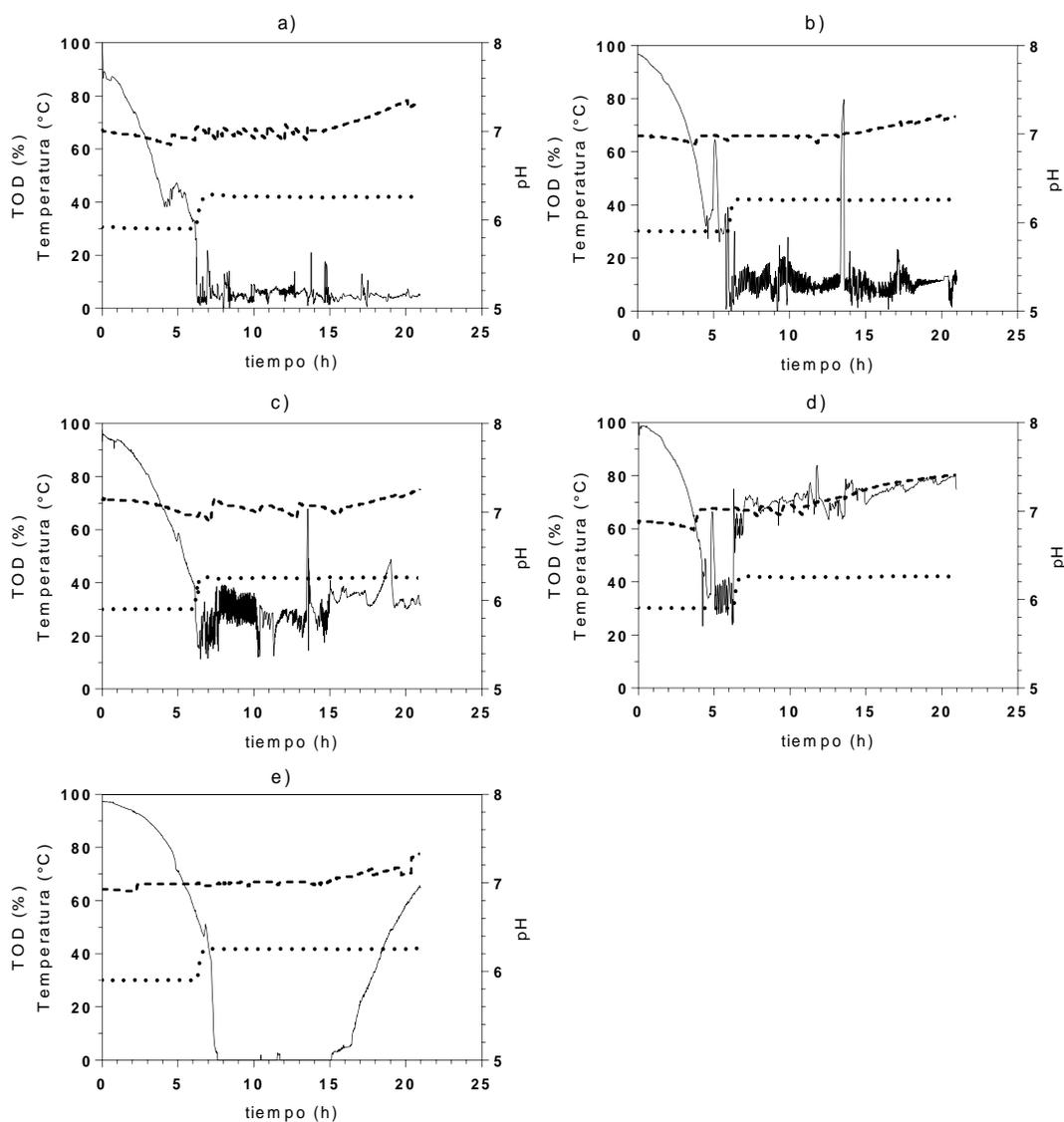


Figura 7-1. Ejemplo representativo de perfiles de control de TOD, pH y temperatura de las cinéticas de crecimiento de *E.coli* W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF. TOD: línea continua negra, temperatura: línea punteada, pH: línea intermitente. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD

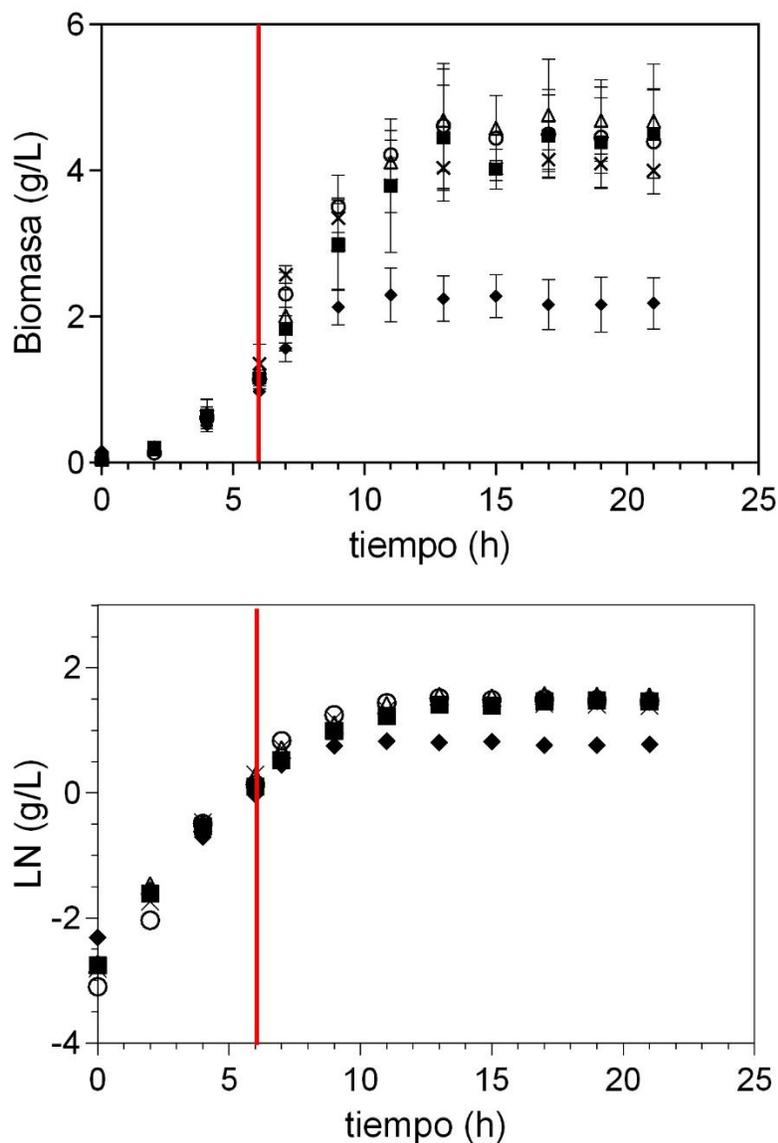


Figura 7-2. Comparación de cinéticas de crecimiento de *E. coli* W3110 recombinante como biomasa (g/L) y Ln (g/L) bajo diferentes condiciones de control de TOD postinducción. El cambio del cultivo a una temperatura de 42° C se muestra con una línea vertical. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (○) 30%, (△) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control.

Respecto al control postinducción de la TOD, los cultivos realizados a 70% de TOD no mostraron diferencias con respecto a los cultivos donde se mantuvo una TOD de 30% postinducción, siendo 0.28 ± 0.01 y 0.32 ± 0.04 h⁻¹, respectivamente. Por el contrario, los valores de μ postinducción son 35%, 44% y 15% menor a 10%, 5% y sin control de TOD postinducción, respectivamente.

Tabla 7-1. Parámetros cinéticos y estequiométricos a nivel biorreactor, para los diferentes % de control de TOD postinducción utilizados (70%, 30%, 10%, 5% de TOD y sin control de TOD)

Parámetro	TOD 70 %	TOD 30%	TOD 10 %	TOD 5%	Sin control
μ prel (h ⁻¹)			0.56 ± 0.03		
^A μ postI (h ⁻¹)	0.28 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.03 ^b	0.24 ± 0.02 ^b
Biomasa máxima (g/L)	4.15 ± 0.46 ^a	4.61 ± 0.85 ^a	4.69 ± 0.70 ^a	4.45 ± 0.71 ^a	2.30 ± 0.36 ^b
^B $Y_{x/s}$ (g _{células} /g _{glucosa})	0.25 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.002 ^a	0.26 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^b
^C Acetato (g/L)	2.47 ± 1.38 ^a	2.88 ± 0.11 ^a	2.50 ± 0.98 ^a	4.3 ± 3.66 ^a	10.18 ± 0.21 ^b
^D $Y_{ace/s}$ (g _{acetato} /g _{glucosa})	0.15 ± 0.08 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.05 ^a	0.22 ± 0.17 ^a	0.58 ± 0.02 ^b
^D Proteína total (mg/mL)	1.67 ± 0.09 ^a	1.39 ± 0.02 ^a	1.96 ± 0.11 ^b	1.92 ± 0.05 ^b	0.92 ± 0.10 ^c
^E $Y_{p/x}$ (g _{prot} /g _{biomasa})	0.40 ± 0.004 ^b	0.32 ± 0.05 ^a	0.41 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.005 ^b	0.41 ± 0.01 ^b
^F rHuGM-CSF (mg/mL)	0.34 ± 0.07 ^a	0.28 ± 0.06 ^a	0.53 ± 0.03 ^b	0.49 ± 0.10 ^b	0.22 ± 0.03 ^a
^G $Y_{rP/x}$ (mg _{rHuGM-CSF} /g _{célula})	84 ± 13 ^a	64 ± 8 ^a	110 ± 9 ^b	106 ± 3 ^b	94 ± 6 ^b
^H q_s (g _{glu} /g _{biomasa} *h)	1.40 ± 0.10 ^a	1.50 ± 0.20 ^a	0.84 ± 0.11 ^b	0.78 ± 0.08 ^b	0.90 ± 0.09 ^b

El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se muestra con letras minúsculas para $p < 0.05$ con respecto a los valores obtenidos en 30% TOD. Misma letra: el resultado es no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$).

A: La velocidad de crecimiento postinducción se obtuvo como la pendiente del crecimiento después de la inducción y antes de entrar en fase estacionaria.

B: El rendimiento de biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$) se obtuvo con la glucosa consumida hasta el punto donde se obtuvo la biomasa máxima para cada condición.

C, D, E y G: Concentración de acetato, proteína total y rendimientos $Y_{p/x}$, $Y_{rP/x}$ tras 15 h después de la inducción.

F: Concentración de rHuGM-CSF basado en análisis densitométrico de geles de SDS-PAGE de proteína total (Figura 7-7) a partir del porcentaje de banda correspondiente.

H: La velocidad específica de consumo de glucosa se obtuvo con valores posteriores a la inducción.

El oxígeno disuelto es un sustrato importante que puede ser limitante, si la velocidad de consumo de oxígeno excede la velocidad de transferencia (Liu, 2017). Cuando el nivel de oxígeno disuelto está por debajo de la concentración crítica de oxígeno, la μ se ve afectada. Al igual que otro caso limitado por sustrato, la μ varía con la concentración de oxígeno disuelto según la ecuación de Monod (Chen *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1992; Sandoval-Basurto *et al.*, 2005). Algunos autores consideran que la concentración crítica de oxígeno disuelto, es aproximadamente del 5 al 10% de la concentración de saturación de oxígeno disuelto (Liu, 2017), mientras otros, cuando se tienen μ por debajo del 95% de la μ máxima observada (Chen *et al.*, 1984; Galvanauskas *et al.*, 2018). Para los datos aquí presentados, bajo control postinducción de la TOD (Figura 7-3) se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.31 h^{-1} y una constante de saturación (K_{O_2}) de 3.8% de TOD ajustando los datos experimentales mediante una linealización Lineweaver-Burk (no mostrado).

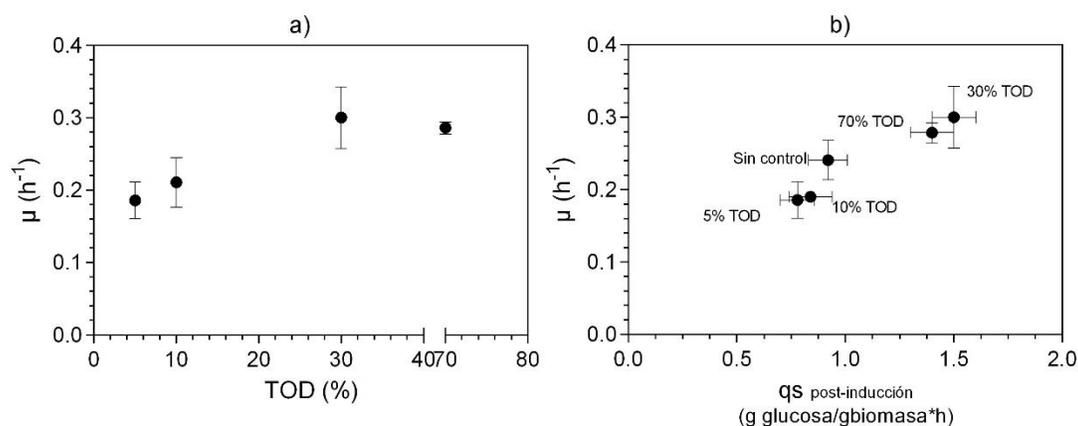


Figura 7-3. a) μ postinducción de *E.coli* W3110 a 70%, 30%, 10% y 5% de control de TOD a 42°C. b) μ postinducción como función de la velocidad específica de consumo de sustrato de *E. coli* W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF.

A partir de 10% de TOD postinducción, las μ determinadas son menores al 95% de la μ observada a 30% de control postinducción de TOD, pues disminuyeron para 10% y 5% de control de TOD postinducción, 0.35 y 0.43 veces, respectivamente. Sin embargo, como puede observarse en las curvas de crecimiento, en estas condiciones no se tuvo una limitación por oxígeno disuelto, mientras que en los cultivos sin control de TOD se observó limitación de oxígeno.

A menor TOD postinducción durante el cultivo, menor es la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{sGlu})

La glucosa fue consumida en su totalidad, medida como glucosa residual en el medio, en todos los cultivos realizados (Figura 7-4) y, la entrada a fase estacionaria está asociada con su agotamiento (Anexo 11.5). Durante la inducción por temperatura, se puede requerir un mayor consumo de sustrato, en este caso glucosa, para fines de generación de energía, para la síntesis de proteína recombinante, HSP y mantenimiento celular (Schmidt *et al.*, 1999). El valor de la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{sGlu}) preinducción, fue de 0.70 ± 0.15 $g_{glu}/g_{biomasa} \cdot h$. Después de la inducción, la q_{sGlu} incrementó para todos los cultivos, sin embargo, fue menor para los cultivos a 10%, 5% y sin control de TOD postinducción (Tabla 7-1). Los valores obtenidos fueron 0.46, 0.42 y 0.37 veces menor, respectivamente, a la obtenida para 30% y 70% de TOD postinducción (1.50 ± 0.20 y 1.40 ± 0.10 $g_{glu}/g_{biomasa} \cdot h$, respectivamente). El valor de q_{sGlu} obtenido para 30% y 70% de TOD postinducción, se encuentra en el rango reportado para *E. coli* W3110 a 37°C con valores entre alrededor 1.38 $g_{glu}/g_{biomasa} \cdot h$ (Fuentes *et al.*, 2013; Seong *et al.*, 2020).

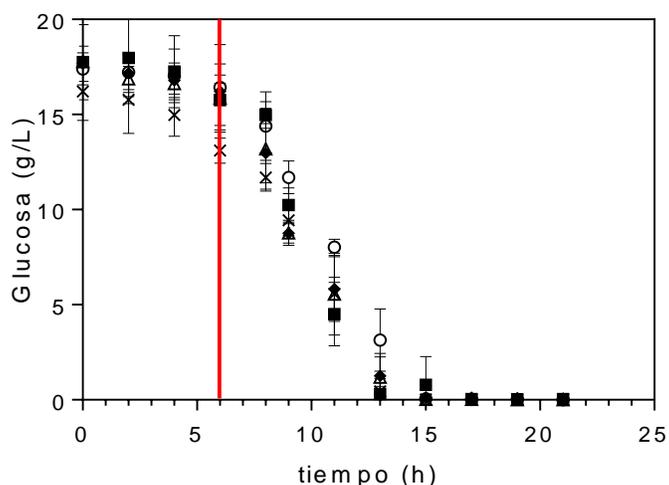


Figura 7-4. Comparación de cinéticas de consumo de glucosa en cultivos de *E. coli* W3110 recombinante como glucosa residual (g/L) bajo diferentes condiciones de control de TOD postinducción a nivel biorreactor. El cambio y periodo de tiempo del cultivo a una temperatura de 42° C se muestra una línea. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (o) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (♦) Sin control

La relación entre la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica de consumo de sustrato postinducción, fue lineal para todas las condiciones postinducción utilizadas (Figura 7-3 b). Algunos autores han propuesto que la

velocidad de crecimiento está inversamente relacionada con la síntesis de proteínas recombinantes. Así, considerando una relación lineal entre μ y q_s , menores valores de q_s , favorecen no sólo la síntesis de proteínas recombinantes, sino también, una menor acumulación de acetato (Fragoso-Jiménez *et al.*, 2019; Fuentes *et al.*, 2013; Picon *et al.*, 2005).

En términos de rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), para todos los esquemas con control de TOD postinducción, se obtuvieron $Y_{x/s}$ alrededor de 0.25 ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$), mientras que para los cultivos realizados sin control de TOD postinducción, el rendimiento es sólo del 0.12 ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$) (Tabla 7-1). Esta diferencia indica que en condiciones sin control de TOD postinducción el consumo de glucosa se desvió a otras rutas metabólicas para transformación de otros productos diferentes a biomasa, como ácidos orgánicos.

La TOD postinducción no tuvo efecto sobre la acumulación de acetato extracelular en las primeras 3 h después de la inducción

Para evaluar el efecto del control postinducción de la TOD sobre el metabolismo central de carbono en *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF, se realizó la cuantificación extracelular de acetato, citrato, formiato, malato y succinato al momento de la inducción, 1, 3, y 15 h después de la inducción. (Figura 7.5).

Primero, en un sistema de inducción por temperatura, la sobreexpresión de proteínas recombinantes y la sobreexpresión de HSP endógenas, incrementa los requisitos de ATP hasta 6 veces (Hoffman *et al.*, 2002). Tal requerimiento se ve reflejado en el aumento de la respiración, pero no es suficiente para compensar la demanda de ATP para la producción de proteínas, por lo que causa una caída transitoria de energía en la célula. Aunado a esto, se ha demostrado que la velocidad del incremento de la temperatura, tiene un papel importante en el requerimiento energético de la célula (Caspeta *et al.*, 2009). A velocidades de calentamiento más altas, las células requieren más energía para mantener la homeostasis celular y experimentan desequilibrios más grandes entre la glucólisis y ciclo TCA. Mientras que, velocidades de calentamiento más lentas, permiten una mejor adaptación de la célula obteniéndose una mejor producción de proteínas recombinantes y menor acumulación de ácidos orgánicos (Caspeta *et al.*, 2009). En este trabajo, la velocidad de calentamiento en todos los cultivos fue de 0.37 ± 0.03 °C/min, velocidades cercanas a la mejor condición encontrada por Caspeta *et al.*, (2009) (0.4°C/min).

Después, bajo condiciones aerobias, cuando la concentración de glucosa en el medio no es limitante, *E. coli* muestra altas velocidades de crecimiento y de consumo de sustrato. Sin embargo, en estas condiciones *E. coli* secreta acetato, como resultado de un desbordamiento metabólico, donde la velocidad de síntesis de acetil-CoA supera la capacidad de TCA para consumirlo por completo, provocando la ramificación hacia producción de acetato. Aunque esta vía no contribuye con la regeneración de NAD⁺, permite la producción de ATP a nivel de sustrato para satisfacer la demanda (Rinas *et al.* 1989; Wolfe, 2005).

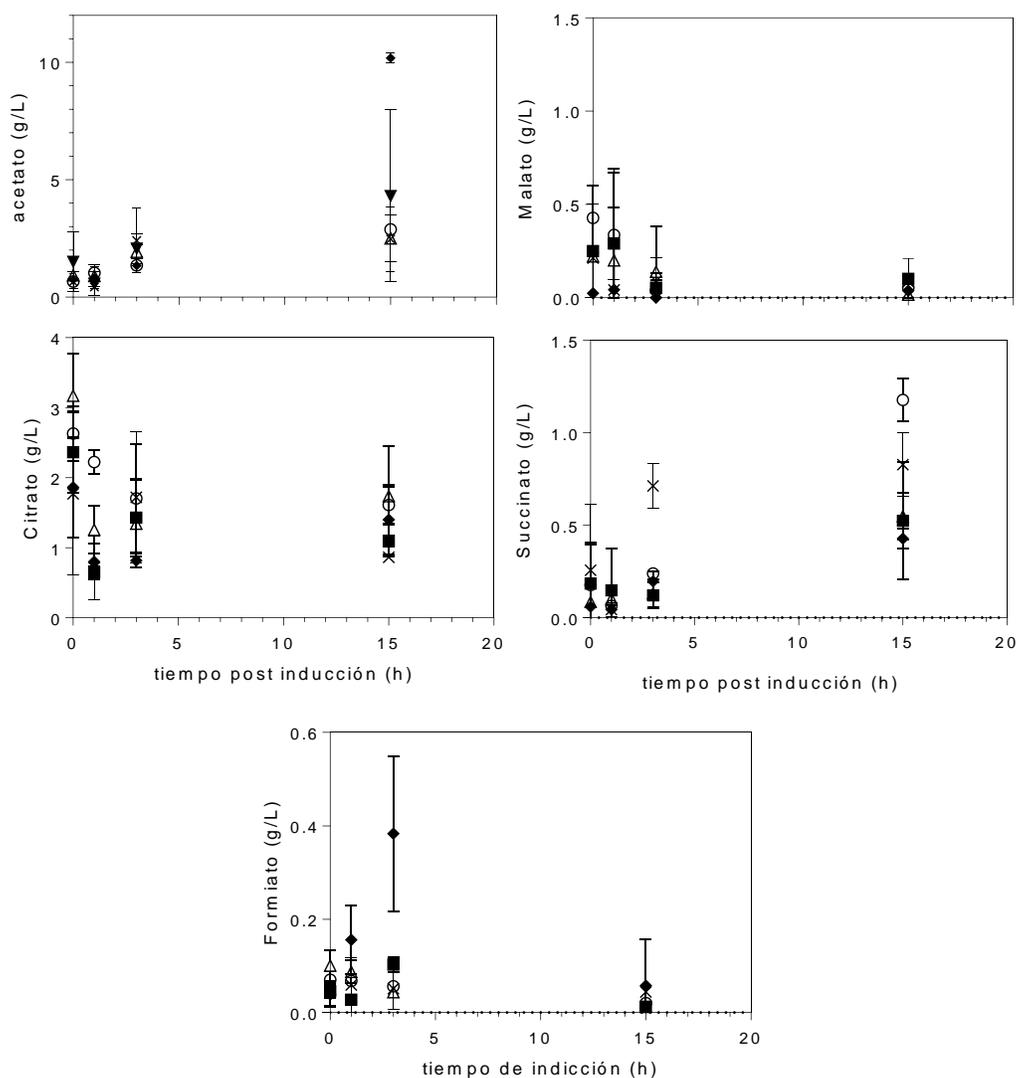


Figura 7-5. Acumulación extracelular de ácidos orgánicos al momento de la inducción, y 1, 3 y 15 h después de la inducción, a diferentes condiciones de control de TOD postinducción. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (o) 30%, (Δ) 10%, (■) 5%, (◆) Sin control.

Además, después de la inducción por temperatura, se ha observado la acumulación de acetato, debido a la reducción de flujo de carbono por la piruvato deshidrogenasa en el ciclo TCA, donde el flujo de carbono a través del nodo de piruvato se canaliza a través de la descarboxilación oxidativa del piruvato por la piruvato oxidasa (poxB) (Figura 2-8 a) (Caspeta *et al.*, 2009; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

En los cultivos realizados en este trabajo, el principal ácido orgánico acumulado fue acetato (Figura 7-5). La velocidad de formación de acetato es proporcional a la μ (Fragoso-Jiménez *et al.*, 2019; Fuentes *et al.*, 2013), y dado que todos crecieron bajo las mismas condiciones, en el momento de la inducción todos los cultivos presentaron una acumulación extracelular de acetato similar, cercana a 1 g/L. Después de 3 h de inducción, la acumulación de acetato incrementó, aproximadamente, a 2 g/L, sin diferencias significativas entre las condiciones utilizadas (Figura 7-5). Además, la entrada a fase estacionaria podría no sólo ser efecto del agotamiento de la fuente de carbono, sino también de la acumulación de acetato (Nakano *et al.*, 1997; Pinhal *et al.*, 2019).

La limitación de oxígeno es otro fenómeno que favorece la producción de ácidos orgánicos. Bajo limitación de oxígeno, se favorece la acumulación de NADH, por lo que la célula ramifica la vía de la glucólisis hacia la producción de ácidos orgánicos tras la oxidación de NADH a NAD⁺, siendo acetato el principalmente producido (De Mets *et al.*, 2019; Shalel-Levanon *et al.*, 2005; Shimizu, 2013).

En tanto, los cultivos con control de TOD no presentaron diferencias de forma significativa en la acumulación de acetato, en los cultivos sin control de TOD postinducción, donde se observó limitación de oxígeno, el acetato se acumuló de manera diferencial después de 15 h de inducción, alcanzando una concentración de 10 ± 0.3 g/L y un rendimiento $Y_{ace/s}$ de 0.58 ± 0.02 g_{acetato}/g_{glucosa}. Lo anterior podría indicar que por encima de 5% de TOD, no hay diferencias en la regulación de metabolismo central de carbono y el ciclo TCA (Sharma *et al.*, 2020).

Restrepo-Pineda *et al.*, (2019) demostraron que en cultivos en lote de *E.coli* ATCC® 53606 productora de rESAT-6, bajo un sistema de inducción por temperatura a 42°C y control de TOD a 30%, la acumulación de acetato alcanzaba un máximo de 7.37 ± 0.99 g/L después de 5 h de inducción y acumulaciones de, aproximadamente, 3 g/L a las 3 h de inducción. Además, el acetato acumulado era reasimilado durante la fase estacionaria, alcanzando 1.88 ± 0.54 g/L tras 14 h de inducción.

En el presente estudio no se observaron altas concentraciones de acetato extracelular, como otros estudios donde se han utilizado sistemas de inducción por temperatura (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019; Wittmann *et al.*, 2007), posiblemente

porque no se evaluó la acumulación de ácidos orgánicos entre las 3 h y 15 h postinducción. Por lo tanto, no se puede saber si los valores encontrados corresponden al máximo acumulado en los cultivos. *E. coli* es capaz de consumir glucosa y acetato aún bajo exceso de glucosa (Enjalbert *et al.*, 2017). *E. coli* puede tomar acetato, para la síntesis de acetil-CoA, usando la vía Pta-AckA a la inversa, cuando hay concentraciones de acetato extracelular cercanas a 8 mM y hay disponibles fuentes de carbono glicolítico. Cuando el carbono es limitante, como sucede en la fase estacionaria, y bajo bajas concentraciones de oxígeno, la acetil-CoA sintetasa (Acs), cataliza la conversión a acetil-CoA (Enjalbert *et al.*, 2017; Wolfe, 2005).

En condiciones microaerobias, o anaerobias, el piruvato puede metabolizarse a D-lactato, o transformarse en formiato o acetil-CoA, para formar etanol o acetato. Además, para satisfacer la demanda energética, las células toman vías alternas como la fosforilación a nivel de sustrato, que lleva a la formación de acetato y formiato (Förster & Gescher, 2014; Perrenoud & Sauer, 2005; Wolfe, 2005).

Como se puede observar en la Figura 7-5, los cultivos sin control de TOD postinducción, donde el cultivo permanece en 0% de TOD durante varias horas después de la inducción, hubo una acumulación extracelular de formiato (0.4 g/L) a 3 h postinducción, característica de una fermentación ácido mixta. Después de 15 h de inducción, los niveles de formiato son cercanos a cero y similares a los obtenidos en las otras condiciones de control de TOD postinducción. El formiato acumulado, pudo ser entonces reasimilado por las células (Bar-Even, 2016; Yishai *et al.*, 2017).

Por otro lado, en los cultivos con control postinducción a 70% de TOD, se observó una acumulación extracelular de succinato (Figura 7-5) desde las 3 h y en 15 h postinducción se observó también para los cultivos realizados a 30% de TOD postinducción. En estas condiciones, la producción de ROS podría estar favorecida (Lin *et al.*, 2020), sobre todo, en 70% de TOD postinducción, donde se adicionó oxígeno puro en la entrada de aire. En *E. coli* la acumulación de ROS es contenida por la superóxido dimutasa (SOD), peroxidasas y catalasas que degradan O_2^- y H_2O_2 . Además, el α -cetoglutarato tiene un papel importante en la desintoxicación de ROS, como H_2O_2 y O_2^- , ya que disminuye los niveles de ROS y la formación de NADH, acompañado de la acumulación de succinato (Mailoux *et al.*, 2007).

7.2 Evaluación de la producción de proteína total y rHuGM-CSF en *E.coli* W3110 bajo un sistema de inducción por temperatura

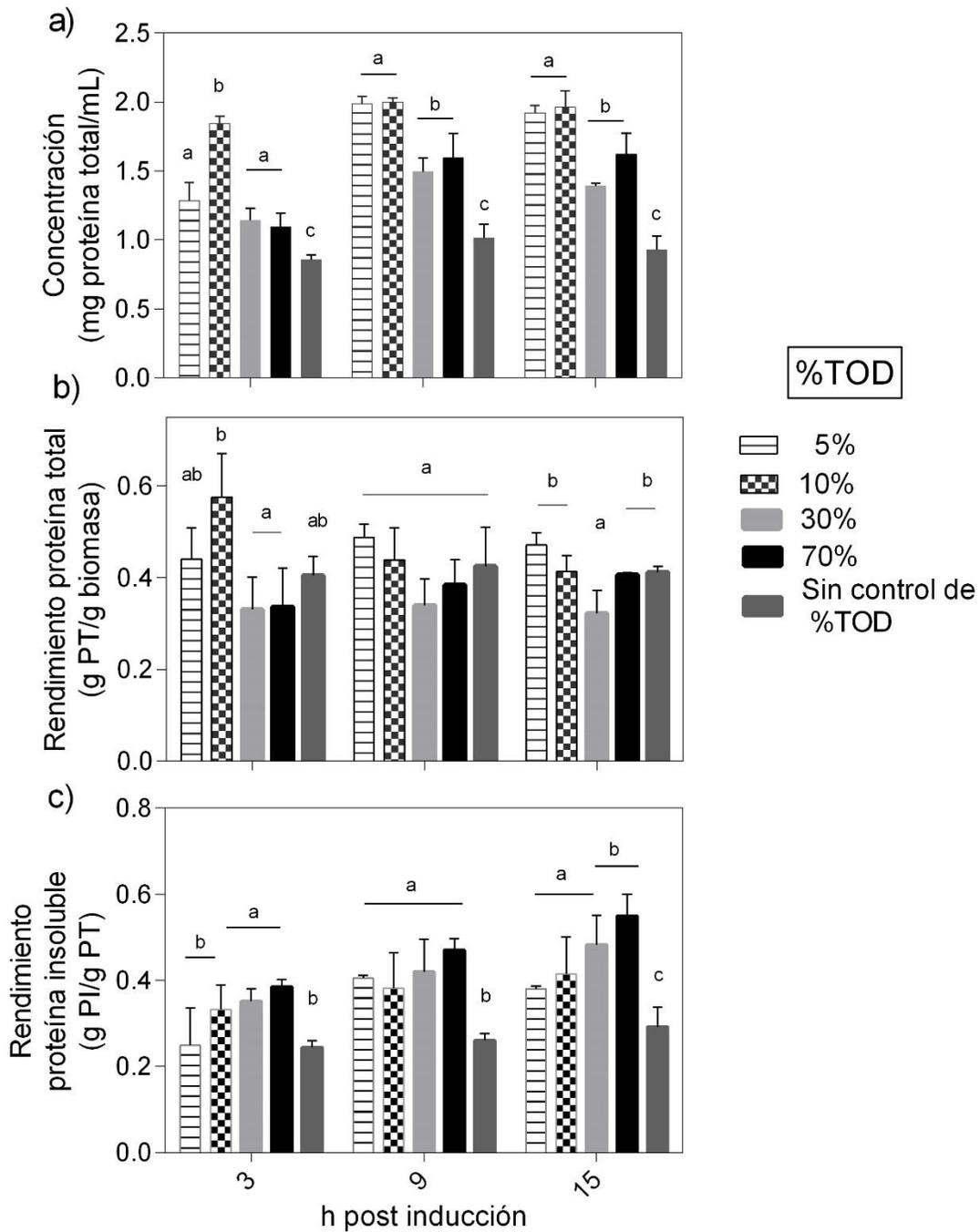
Valores \leq 10% de TOD favorecieron la producción de proteína total y proteína recombinante

La cuantificación de proteínas totales por método de Bradford (1976), se realizó en muestras de 3, 9 y 15 h después de la inducción.

Al evaluar la producción volumétrica de proteína total, después de 3 h de inducción, los cultivos con control postinducción de TOD a 10%, muestran una concentración 0.5 veces mayor, comparado con los cultivos que se mantuvieron a 30% de TOD postinducción. Después de 9 h y 15 h postinducción, la mayor producción volumétrica de proteína total se observó en los cultivos con control de TOD postinducción a 10% y 5% (Figura 7-6). Por el contrario, debido a la menor biomasa obtenida en los cultivos sin control de TOD postinducción, la producción de proteína total en los cultivos, fue 35% menor en todos los tiempos evaluados.

Los rendimientos proteína total/biomasa (YPT/x) mostraron diferencias de forma significativa a las 3 h después de la inducción, entre las condiciones de 10% de TOD y 30% y 70% de TOD, siendo 0.7 veces mayor para 10% de TOD después de la inducción. A las 15 h postinducción, los rendimientos YPT/x, a 30 % de TOD fueron menores que para todas las otras condiciones evaluadas.

Los rendimientos de proteína insoluble/proteína total (Ypl/PT) (Figura 7-6. c), en 3 h postinducción fueron, aproximadamente, 0.3 veces menor en los cultivos a 70% y 30% de TOD, comparado con los rendimientos a 5% de TOD y sin control de TOD postinducción. Respecto al tiempo, para todas las condiciones utilizadas se observa que, la fracción insoluble de proteína va aumentando al incrementar las horas de inducción, excepto en los cultivos sin control de TOD, donde los rendimientos se mantuvieron constantes alrededor de $0.25 \frac{\text{g}_{\text{protinsoluble}}}{\text{g}_{\text{proteínatotal}}}$ desde las 3 h.



En sistemas de inducción por temperatura, tras el incremento de temperatura, la síntesis global de proteínas aumenta en un factor de tres, por lo que, el requerimiento de energía aumenta (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Además, la síntesis de proteína se encuentra entre los procesos celulares más exigentes de energía. (Heyland *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2020). De hecho, la síntesis de proteína recombinante demanda, aproximadamente, dos tercios de la energía total producida en una célula en fase exponencial, requiriéndose una mayor generación de ATP (Hoffmann *et al.*, 2002; Mahalik *et al.*, 2014).

Lin *et al.*, (2020) evaluaron, en sistemas de síntesis de proteínas de *E. coli* libres de células, el efecto de diferentes gradientes de TOD, entre el 0-100% sobre la síntesis de proteína. Las corrientes fueron creadas por una corriente de oxígeno y nitrógeno por controladores de flujo másico. El efecto sobre la síntesis se determinó analizando la síntesis de proteínas fluorescentes “superfolder-GFP”. Se encontró que la concentración mínima para la síntesis de proteínas es de 2%, y entre 4% y 70% el rendimiento de síntesis de proteínas no dependía en gran medida del oxígeno, ya que se afectaba la velocidad de síntesis de proteínas, pero se alcanzaban rendimientos similares de proteínas. Además, el análisis proteómico mostró que cuando la síntesis se llevó a cabo a 0% de O₂ (100% de N₂), se tenía poca influencia a nivel transcripcional, pero con un efecto importante a nivel traducción. Por otro lado, a 100% de O₂, se tenía una regulación negativa de proteínas relacionadas con la traducción, y a partir de 21% de O₂ se favorecía la producción de ROS que sugieren se relaciona con la degradación de proteínas.

A nivel de traducción, la síntesis de proteínas puede verse limitada por el suministro de precursores de energía, aminoácidos y nucleótidos (Baez *et al.*, 2019; Elf & Ehrenberg, 2005; Kim *et al.*, 2012). *E. coli* puede sintetizar aminoácidos a partir de moléculas precursoras. De los precursores para la síntesis de aminoácidos, cinco se encuentran presentes en las rutas glucolíticas o ciclo TCA (α -cetoglutarato, oxalacetato, acetil-CoA, piruvato, fosfoenolpiruvato) (Konz *et al.* 1998), por lo que, si estas rutas se ven afectadas, la síntesis a nivel traducción podría afectarse. Sin embargo, en el análisis de ácidos orgánicos no hubo diferencias de forma significativa, en ninguna de las condiciones con control postinducción, utilizadas.

La mayor producción de proteína insoluble en 70% de control de TOD postinducción (Figura 7-6 c), podría asociarse a la inducción de respuestas a estrés oxidativo que causan la agregación de proteínas (Alam *et al.*, 2017; Sharma *et al.* 2020; Schramm *et al.*, 2020), al tener una mayor concentración de oxígeno e inyección de oxígeno puro. Aun cuando el mayor rendimiento Y_{pl}/PT se obtuvo a 70% de TOD postinducción, esta no es la condición donde se obtuvo la mayor producción de

rHuGM-CSF (Tabla 7-1). Es decir, aunque a mayor concentración de oxígeno se favorezca la producción de proteína en fracción insoluble, esta no corresponde a la proteína recombinante en forma de CI. Dela Coletta *et al.*, (2019) mostraron que al producir la proteína recombinante CFP10 en *E. coli*, a pesar de obtener menores concentraciones de proteína insoluble en 15% de control de TOD, el 72% de la proteína insoluble correspondía a la proteína recombinante CFP10, contrario al 20% de proteína recombinante obtenido a 30% de control de TOD.

Para analizar la producción de la proteína rHuGM-CSF por SDS-PAGE, se cargó en cada carril 25 µg de proteína total (Figura 7-7 a) de todas las condiciones con control de TOD postinducción, excepto para 1 h postinducción, donde se cargó un volumen de 35 µL por pozo y en el último carril, 2 µg de estándar de rHuGM-SCF. Al realizar el análisis densitométrico (Anexo 11-6) se encontró que no hay cambios de forma significativa en el porcentaje de la banda correspondiente a rHuGM-CSF, de 14.4 kDa, en cada hora y condición con control de TOD postinducción utilizada. rHuGM-CSF representó aproximadamente, el 25-30% de la proteína total desde las 3 h postinducción. En el perfil electroforético (Figura 7-7), también se observan bandas que se mantienen constantes incluso desde la primera hora postinducción. Al estar presentes desde la primera hora, podrían corresponder a proteínas de choque térmico, las cuales, tras el aumento de temperatura, son sintetizadas por *E. coli* para mantener la homeostasis celular y han sido descritas incluso, como parte de los CI (Carrió & Villaverde, 2003; Rinas *et al.*, 2007).

Debido a que no se encontraron cambios en el perfil electroforético de los geles cargados por concentración de proteína, se propuso realizar geles volumétricos. Se cargaron 15 µL de 1.0 U.A. de biomasa de *E. coli* W3110 a 15 h postinducción de cada una de las condiciones utilizadas, incluidos los cultivos sin control de TOD. En estos geles (Figura 7-7 b), las bandas correspondientes a rHuGM-CSF fueron, en promedio, 1.4 veces en las condiciones de 5% y 10% de control de TOD postinducción comparadas con las obtenidas a 30% de control de TOD. Asimismo, la mayor producción volumétrica de rHuGM-CSF (mg/mL) se obtuvo en los cultivos realizados con control postinducción a 10% y 5% de TOD (Tabla 7-1).

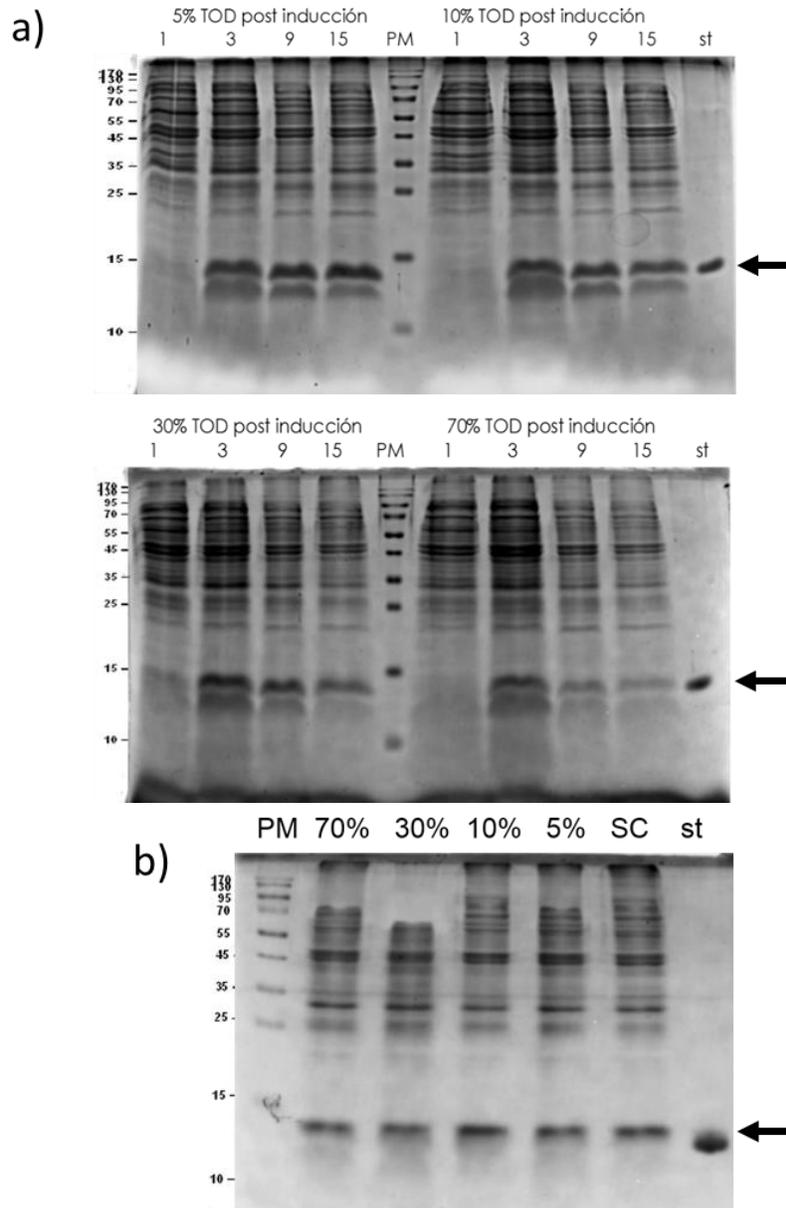


Figura 7-7. a) SDS-PAGE de lisado celular de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF a diferentes % de control de TOD postinducción. En cada carril se cargó, 25 μ g de lisado celular. b) SDS-PAGE de proteína total, cargado volumétricamente (15 μ L) partiendo de 1 U.A. a 15 h postinducción. Las condiciones de %TOD postinducción se indican en la parte superior y los números indican las horas postinducción. En los últimos carriles (st) de cada gel, 2 μ g de rHuGM-CSF estándar. La banda correspondiente a rHuGM-CSF se indica con una flecha. PM: Marcador de peso molecular (kDa), st: Estándar de rHuGM-CSF.

En producción de proteínas recombinantes utilizando sistemas de inducción por temperatura en *E. coli*, se han reportado rendimientos de hasta 30% de proteína recombinante con respecto a la proteína celular total (Valdez-Cruz *et al.* 2010). Rendimientos de proteínas recombinantes producidas en *E.coli* como CI en citoplasma, bajo un promotor pL/pR y realizados a nivel biorreactor, se encuentran en la Tabla 7-2, encontrando rendimientos YrP/PT alrededor de 0.2, es decir, 20% de la proteína total. En este trabajo, para todas las condiciones utilizadas, se obtuvieron YrHuGM-CSF/PT alrededor de 0.25.

Tabla 7-2. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas en citoplasma como CI, expresadas en *E.coli* utilizando un sistema de inducción por temperatura a nivel biorreactor.

Proteína	Cepa, plásmido y sistema	Condiciones de cultivo	Producción de proteína recombinante	Referencia
Insulina cadena A-Mut3sY	TG1; PMYW-A; λ pL/cl857	FB; HCD; 40% TOD, inducción 30°C a 42°C	13% de la proteína total	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
Insulina cadena B-Muy3sY	TG1; PMYW-A; λ pL/cl857	FB; HCD; 40% TOD, inducción 30°C a 42°C	18% de la proteína total	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
rHuBMP-2	TG1: pCYTEXP3-BMP-2; λ pL/cl857	FB; HCD; 25% de TOD; inducción 30°C a 42°C	20% de la proteína total	Vallejo <i>et al.</i> , 2002
rHuGH	DH5 α ; pET21-hgh; λ pL	FB; 40% de TOD, inducción de 30°C a 42°C (30 min) y reducción a 37°C (4 h)	20% de la proteína total	Tabandeh <i>et al.</i> , 2004
hPPI	BL21; λ -pL-cl857 pUC; λ pL/cl857	FB; 40% de TOD, inducción 30°C a 42°C	3.3 g/L	Caspeta <i>et al.</i> , 2009
ESAT-6	ATCC® 53606™; λ pL/cl857	BC, 30% de TOD; inducción 30°C a 42°C	18% de la proteína total de CI	Restrepo-Pineda <i>et al.</i> , 2019

FB: Lote alimentado (Fed-batch); BC: Lote (Batch culture), HCD: Cultivos de alta densidad (High Cell Density); Muy3sy: versión más corta del gen INF- γ ; rHuBMP-2: proteína morfogénica ósea 2 humana; rHuGH: Hormona del crecimiento humana; hPPI: preproinsulina humana; ESAT-6: antígeno de secreción temprana de 6 kDa.

La mayor producción de proteína recombinante en las condiciones de 5% y 10% de control de TOD postinducción (Figura 7-8), puede deberse a las menores q_{sGlu} en estos cultivos. Fragoso-Jimenez *et al.* (2019) evaluaron a nivel matraz y biorreactor, la producción de la proteína recombinante GFP en cepas de *E.coli* W3110, con deleciones simples o combinadas, de genes que codifican para PTS y otros transportadores de azúcares. Demostraron que, la reducción de q_{sGlu} , conduce a una mejora en la producción de proteína recombinante, en este estudio, de GFP, y una reducción en la producción de acetato. El máximo de producción se observó, aproximadamente, a valores de 50% de la q_s máxima encontrada en la cepa silvestre. En los datos mostrados en este estudio, las q_{sGlu} a 5% y 10% de control de TOD, corresponden aproximadamente al 50% de la q_s máxima observada a 30% de TOD postinducción. Otros autores también han reportado para algunas cepas de *E.coli* con mutaciones en el importe de glucosa, una disminución de q_s y un incremento en la producción de proteínas recombinantes (Bäcklund *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2013; Wurm *et al.*, 2006), donde se ha propuesto que una menor q_s favorece una menor velocidad de síntesis de proteínas y eso a su vez, favorece la acumulación de la proteína recombinante.

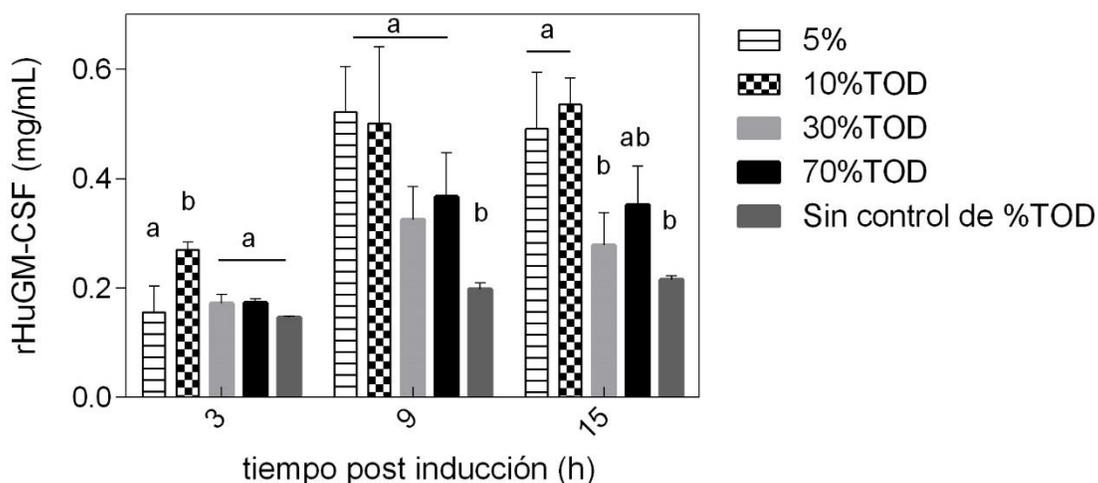


Figura 7-8. Producción de rHuGM-CSF en *E.coli* W3110. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción y se muestra con letras minúsculas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$).

Sharma *et al.*, (2020) evaluaron la producción de rARU en *E.coli* en condiciones restringidas (650 rpm y 2 vvm constantes durante todo el cultivo) y no restringidas de oxígeno (30% de TOD). El perfil de TOD para la condición restringida, mostró periodos con concentraciones de TOD cercanas a 0%. Encontraron que la expresión de rARU fue 27 mayor que en condiciones restringidas. En la condición restringida,

el regulador global *lrp* estaba regulado positivamente, lo que redujo la absorción de nutrientes y la μ . Además, las vías de traducción y generación de energía estaban regulados negativamente en la condición no restringida, mientras que los mismos procesos celulares estaban regulados en exceso en la condición restringida. También se observó un aumento de 4 veces en genes asociados con ciclo TCA que podría estar favoreciendo la generación de energía para síntesis de la proteína recombinante, como podría estar pasando en nuestros cultivos con control postinducción a 5% y 10% de TOD. Asimismo, observaron aumentos en la expresión de genes relacionados en procesos como la traducción, plegamiento y secreción de proteínas en la condición restringida. Por el contrario, en la condición no restringida, un mayor número de genes diferencialmente expresados se regularon negativamente, entre ellos, la formación de ribosomas, biosíntesis de aminoacil-tRNA sintasas, biosíntesis de aminoácidos y fosforilación oxidativa que podrían afectar la síntesis de proteínas

En el actual estudio, los cultivos sin control de TOD, tuvieron una metodología similar a la condición no restringida de Sharma *et al.*, (2020). Los cultivos se mantuvieron con una agitación y entrada de aire constante, pero a 500 rpm y 1 vvm para nuestro trabajo. Estas condiciones de cultivo llevaron a valores cercanos o igual a 0% de TOD, por una velocidad de consumo de oxígeno igual a la velocidad de transferencia de oxígeno del sistema en ambos trabajos. Sin embargo, en este caso, la condición sin control postinducción de TOD no fue donde se obtuvo la mayor producción de rHuGM-CSF. Seguramente, en la condición de oxígeno restringido utilizada por Sharma *et al.*, (2020) (650 rpm y 2 vvm), se alcanzó un kLa mayor, lo que incrementa la velocidad de transferencia de oxígeno, por lo cual, la mayor producción de rHuGM-CSF se obtiene al mantener el control de TOD en 5% y 10%. De hecho, en su estudio de Sharma *et al.*, (2019) no se menciona si se tuvieron valores de 0% de TOD o solo cercanos a ellos, ni se menciona limitación de oxígeno para sus cultivos.

Por otro lado, el hecho de no haber encontrado cambios de forma significativa en los perfiles electroforéticos para otras proteínas en ninguna de las condiciones utilizadas puede ser que, la respuesta a estrés por calor tras el incremento de temperatura a 42°C tuvo mayor influencia en la célula que el efecto por oxígeno disuelto.

7.3 Análisis de cuerpos de inclusión de rHuGM-CSF

7.3.1 Detección y análisis de proteína en CI por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción de azul de Coomassie

El valor de TOD postinducción no tiene un efecto en la composición de los cuerpos de inclusión de rHuGM-CSF obtenidos por termoinducción

La producción de proteínas en forma de CI ha tomado importancia a nivel industrial, debido al alto porcentaje de proteína recombinante que pueden contener (Baneyx & Mujacic, 2004; González-Montalbán *et al.*, 2007). Para el análisis de la composición de los CI, se cargaron geles de poliacrilamida con 20 µg de CI, excepto para 1 h postinducción, donde se cargaron 35 µL por pozo.

Todos los CI obtenidos bajo las condiciones de control de TOD postinducción probadas, incluyendo la condición sin control postinducción de TOD, estuvieron altamente enriquecidos con la proteína rHuGM-CSF (Figura 7-9). De acuerdo con el perfil electroforético (Figura 7-9), no se observaron cambios en la composición de los CI respecto al tiempo. Contrario a estos resultados, otros autores han reportado que la composición de los CI cambia con el tiempo de cultivo, donde la proteína recombinante llega a ser predominante en tiempos finales (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Rinas & Bailey, 1992). En el presente estudio, a las 3 h después de la inducción se encontró una acumulación de rHuGM-CSF de, aproximadamente, 20% más en los CI formados a 70% y 30% de TOD postinducción, así como en los CI formados sin control de TOD postinducción (Figura 7-10), pero al incrementar las horas postinducción, el % de rHuGM-CSF fue similar en todas las condiciones evaluadas, siendo aproximadamente, el 55% del contenido del CI. Para los carriles de 1 h postinducción, no se realizó análisis respecto a las otras condiciones, pues éstos no fueron cargados por cantidad de proteína.

En el perfil electroforético se encuentran otras bandas que permanecen constantes incluso desde la primera hora después de la inducción. En CI se han encontrado otros elementos no proteicos, como fosfolípidos y ácidos nucleicos, procedentes de una ruptura celular insuficiente o que fueron arrastrados durante la purificación. Sin embargo, proteínas citoplasmáticas, que pueden observarse mediante SDS-PAGE, como chaperonas y HSPs, han sido descritas como componentes reales de los CI (Carrio & Villaverde, 2003, 2005; Jürgen *et al.*, 2010; Restrepo-Pineda *et al.*, 2019), como se mencionó anteriormente.

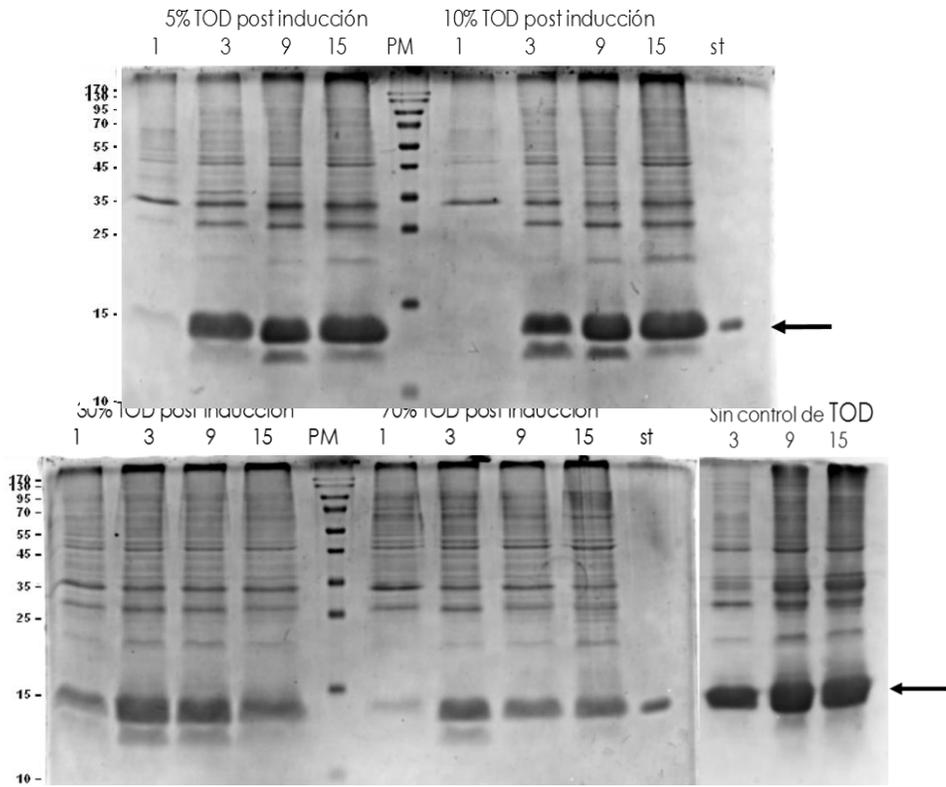


Figura 7-9. SDS-PAGE de cuerpos de inclusión purificados, cargando 20 μ g de CI cuantificados por Bradford. Los números indican las horas postinducción para cada uno de las condiciones de control de % de TOD postinducción utilizadas, indicadas en la parte superior. En los últimos carriles (st) de cada gel, se cargó 2 μ g de rHuGM-CSF estándar. La banda correspondiente a rHuGM-CSF se indica con una flecha. PM: Marcador de peso molecular (kDa), st: Estándar de rHuGM-CSF.

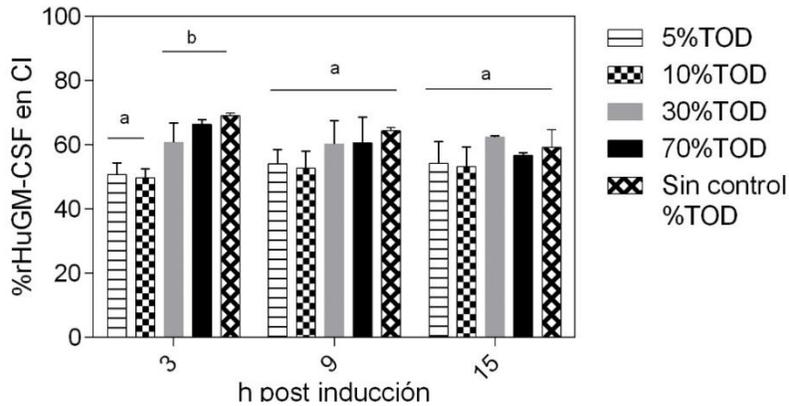


Figura 7-10 % rHuGM-CSF en CI por densitometría de geles en el programa Image Lab de BioRad, a diferentes tiempos postinducción y diferentes %TOD. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$).

De esta forma, las otras bandas que se observan, podrían ser proteínas de choque térmico, en respuesta al incremento de temperatura para la inducción y a la sobreexpresión de proteínas. Además, en nuestro grupo de investigación, en otro proyecto, se han identificado varias chaperonas en CI de rHuGM-CSF mediante Western-blot (datos no mostrados). Se ha propuesto que, la chaperona DnaK se encuentra en superficie y se cree se requiere para los procesos iniciales de despliegue de las proteínas en los CI (Carrió & Villaverde, 2005; Rinas *et al.*, 2007; Weibezahn *et al.*, 2005). IbpA e IbpB por su parte, parecen tener un papel importante en evitar la inactivación enzimática de las proteínas en CI y facilitar la presentación de las proteínas a DnaK para su posterior repliegamiento (García-Fruitós *et al.*, 2007b; Kuczynska-Wisnik *et al.*, 2004).

En nuestros resultados, el oxígeno disuelto parece no tener ningún efecto de forma significativa sobre la composición de los CI de rHuGM-CSF obtenidos en un sistema de inducción por temperatura a 42°C. Sin embargo, podría ser que la respuesta a estrés por calor, tras el incremento de temperatura a 42°C, tuvo mayor influencia en la célula que el efecto por oxígeno disuelto y no fue posible observar cambios de forma significativa en el perfil electroforético. Para identificar posibles cambios podría hacerse uso de metodologías como la electroforesis en gel bidimensional (DIGE 2D) o bien, probar temperaturas de inducción más bajas.

7.4 Arquitectura de cuerpos de inclusión

Se sabe que durante la agregación de proteínas recombinantes en forma de CI, las proteínas pierden su estructura nativa y se enriquecen de estructuras β que dan lugar a una estructura tipo amiloide. Este cambio es función de condiciones de cultivo como temperatura (de Groot & Ventura, 2006; Jevševar *et al.*, 2005; Peternel *et al.*, 2008; Strandberg & Enfors, 1991), pH (Calcines-Cruz *et al.*, 2018; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014;), tiempo de cultivo (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014.; Margreiter *et al.*, 2008a), entre otras. Debido al potencial de los CI no solo en producción de proteínas recombinantes, sino también en sectores como biorremediación, alimentos y biomateriales, la caracterización de su estructural, entendida como arquitectura, está tomando gran relevancia.

7.4.1 Degradación proteolítica por Proteinasa K

Los CI formados sin control de TOD y a 70% de TOD fueron menos resistentes a la degradación proteolítica.

La resistencia a la degradación por Proteinasa K (PK) se evaluó en CI obtenidos a 3 h y 15 después de la inducción. Los perfiles de degradación se muestran en la Figura 7-11. Al analizar los cambios de pendientes en el tiempo de reacción, se observa que la velocidad de degradación es mayor durante los primeros minutos de la reacción, mientras que se vuelve menor y constante al avanzar la reacción. Además, después de 100 min de reacción, ninguno de los CI se degrada por completo.

La Tabla 7-3 muestra las máximas velocidades de degradación en cada condición de control de TOD postinducción y sin control de TOD. En los CI obtenidos después de 3 h de inducción, formados a 5%, 10% y 30 % de control postinducción de TOD no se observaron diferencias. Por el contrario, la velocidad de degradación fue de 1.55 veces y 2.6 veces, en los CI obtenidos a 70% de TOD y sin control de TOD postinducción, respectivamente, comparada con las otras condiciones evaluadas. En los CI obtenidos después de 15 h de inducción, las diferencias se encontraron en las mismas condiciones, mostrando velocidades de degradación de 2 veces y 1.40 veces, respectivamente, con respecto a los CI obtenidos a 30% de TOD postinducción. Es decir, tanto los CI obtenidos a 70% de TOD como los obtenidos sin control de TOD postinducción fueron menos resistentes a la degradación proteolítica con proteínas K, mostrando velocidades de degradación más rápidas. Incluso, los formados sin control de TOD postinducción fueron más susceptibles, visto no solo en la mayor velocidad de degradación, sino también, en la DO 350 nm final de 0.63 ± 0.03 U.A., comparados con los CI formados a 70% TOD (0.75 ± 0.08 U.A.), y a los obtenidos a 5%, 10% y 30% de TOD postinducción, que tuvieron una DO 350 nm final similar (0.8 ± 0.1 U.A.).

Respecto al tiempo de formación, al aumentar el tiempo de inducción, los CI formados a 10% de control de TOD y sin control de TOD postinducción tuvieron una mayor resistencia a la degradación proteolítica, al compararse con las velocidades de degradación obtenidas en CI formados a las 3 h de inducción (Tabla 7-3).

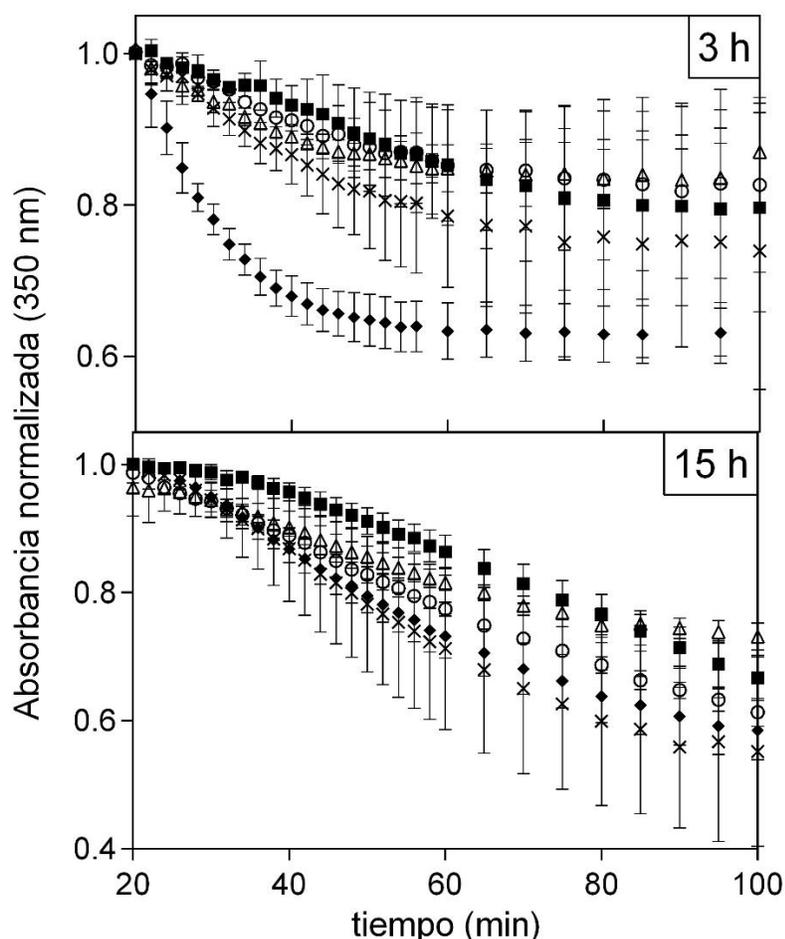


Figura 7-11. Perfiles de degradación con proteinasa K (50 $\mu\text{g/mL}$), de CI purificados, obtenidos a diferente control postinducción de %TOD post. 3 h (Superior) y 15 h (Inferior) después de la inducción. Se muestra el promedio del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (\circ) 30%, (Δ) 10%, (\blacksquare) 5%, (\blacklozenge) Sin control

Tabla 7-3. Velocidades de degradación ($\times 10^{-3}$) con proteinasa K.

TOD postinducción (%)	V (U.A./min)	V (U.A./min)
	3 h	15 h
5	6.01 \pm 0.6 ^a	4.3 \pm 0.7 ^a
10	6.1 \pm 1.3 ^{a*}	3.9 \pm 0.7 ^{a*}
30	6.6 \pm 0.9 ^a	5.3 \pm 0.5 ^a
70	9.7 \pm 0.8 ^b	10.1 \pm 1.7 ^b
Sin control	16.75 \pm 2.4 ^{c*}	7.6 \pm 0.6 ^{c*}

El análisis estadístico por ANOVA de una vía se muestra con una minúscula para comparación de condiciones y por comparaciones múltiples con * para diferencias en tiempo. Se muestra el promedio y desviación estándar de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$).

7.4.2 Ensayos de estabilidad ante solubilidad química con Gn•HCl

Los CI formados a 70% de TOD y sin control de TOD fueron menos estables frente a la solubilización química a las 3 h postinducción.

La estabilidad de los CI obtenidos a diferentes % de control de TOD se evaluó con la solubilización de CI obtenidos a 3 h y 15 h después de la inducción, utilizando diferentes concentraciones de Gn•HCl. La Figura 7-12 muestra la proteína que se solubilizó después del tratamiento con Gn•HCl., mientras que la Figura 7-13 muestra el análisis por horas a cada condición de control postinducción de TOD.

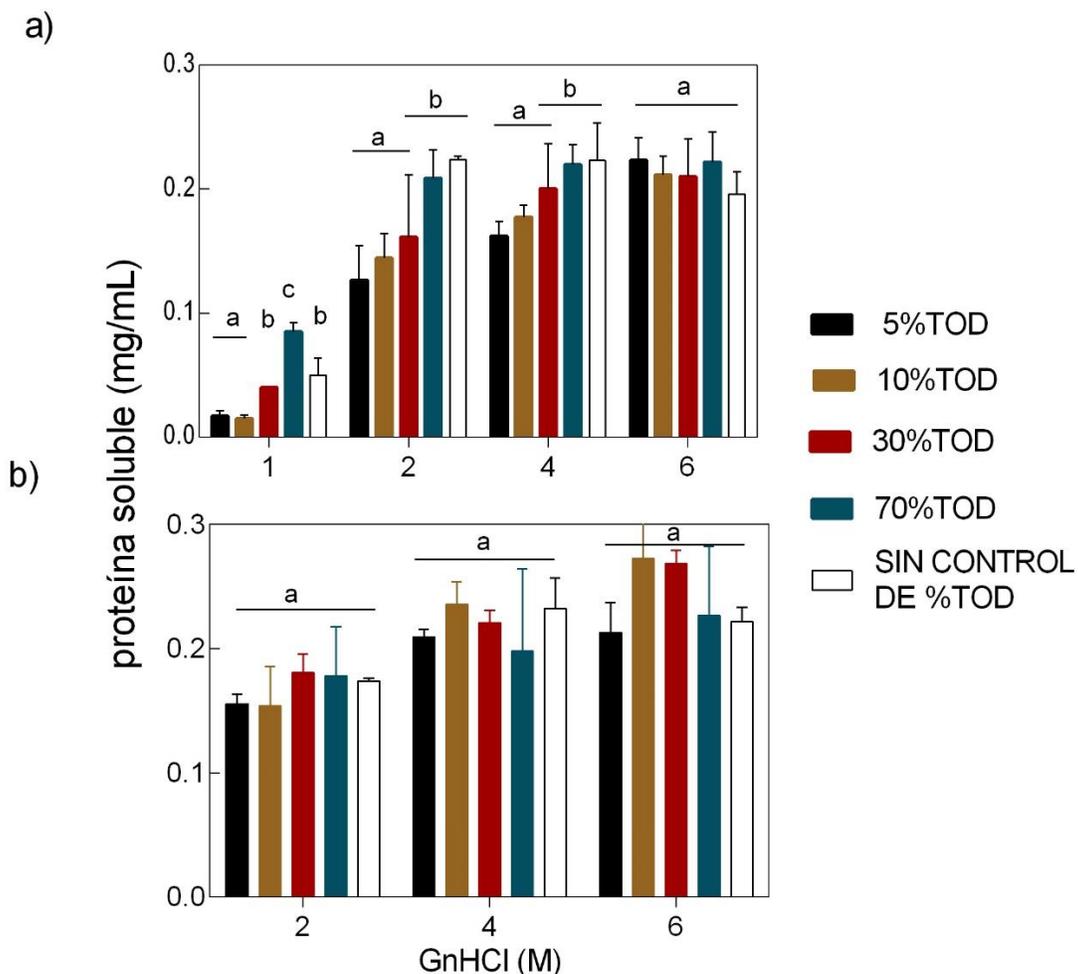


Figura 7-12. Proteína solubilizada de CI purificados, formados a diferente % de control de TOD postinducción a 3h (a) y 15 h (b) posterior a la inducción después de 24 h de incubación a diferentes concentraciones de Gn•HCl. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas.

Se observó un incremento de proteína solubilizada de los CI al incrementar la concentración de Gn•HCl en todas las condiciones evaluadas. Después de 3 h de inducción, los CI formados a 70% de control postinducción de TOD y sin control de TOD, presentaron menor estabilidad. Con Gn•HCl 1M, la proteína solubilizada de los CI formados a 70% de control de TOD postinducción fue 4.5 veces mayor, a la solubilizada de CI a 5% y 10% de control de TOD postinducción y 1 vez mayor que los formados a 30% de control de TOD y sin control de TOD postinducción. Con Gn•HCl 2M, se encontraron diferencias (Figura 7-12) en la proteína solubilizada de CI formados en las condiciones de 70% de control de TOD y sin control de TOD, donde fue en promedio, 0.6 veces mayor a la proteína solubilizada de CI a 5% y 10% de control de TOD. Además, estos CI alcanzaron la máxima proteína solubilizada de CI a 2M, mientras que el máximo de proteína solubilizada para las otras condiciones se observó entre 4M y 6M. Por otro lado, después de 15 h de inducción, aunque también se observó el incremento de proteína solubilizada de CI al incrementar la concentración de Gn•HCl en todas las condiciones, no existen diferencias de forma significativa entre las condiciones evaluadas (Figura 7-12).

Por otra parte, al comparar el efecto del tiempo de cultivo (3 h y 15 h después de la inducción) en la estabilidad de CI (Figura 7-13), se encontró que mientras a 2 M, los CI formados sin control postinducción de TOD, eran más estables al incrementar el tiempo de formación, a 4M los CI formados a 5% y 10% de control postinducción de TOD tuvieron una menor estabilidad. Al tratar los CI con Gn•HCl 6M, no se observó diferencias en la proteína solubilizada en ninguna de las condiciones de control postinducción de TOD.

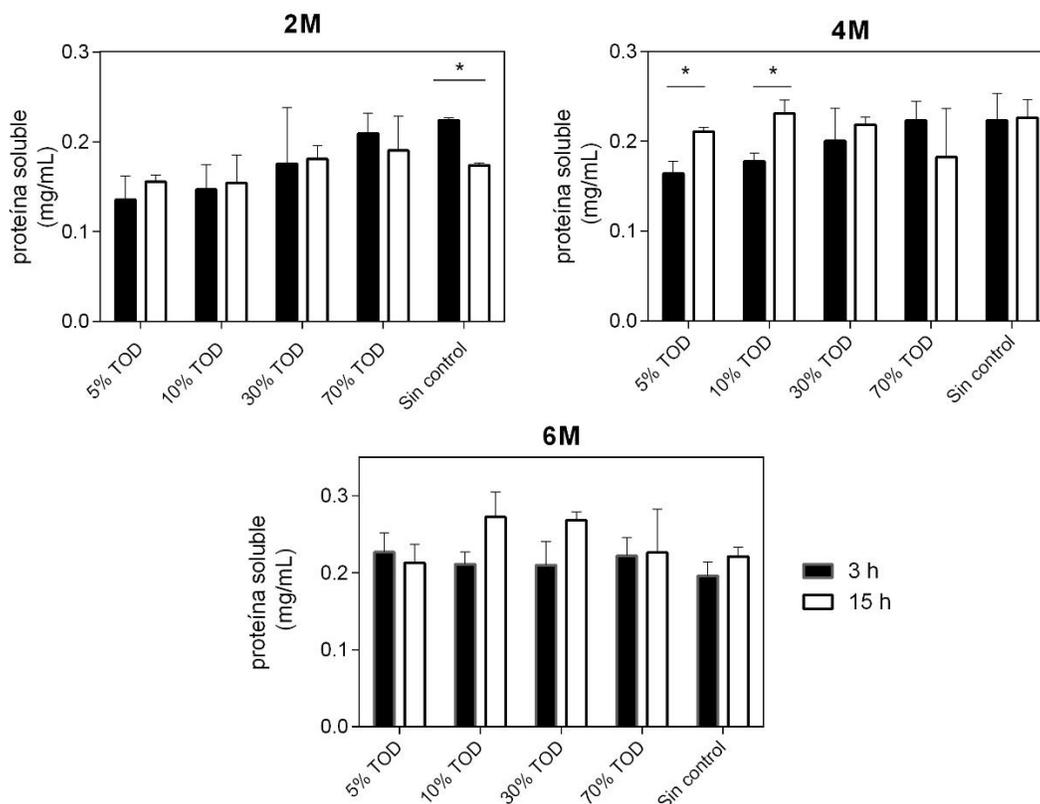


Figura 7-13. Comparación de proteína solubilizada de CI obtenidos a diferente control de %TOD postinducción después de 24 h de incubación en diferentes concentraciones de Gn·HCl de CI. 3 h después de la inducción: barra rellena y 15 h después de la inducción: barra sin rellena. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Se muestra con (*) para diferencias de forma significativa ($p < 0.05$).

7.4.3 FTIR-ATR (Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Los CI formados a 5% y 10% de TOD postinducción obtenidos después de 3 h de inducción tienen menor proporción de estructuras tipo amiloide.

Para el análisis de la región amida I ($1700-1600 \text{ cm}^{-1}$) a través de FTIR-ATR, se analizaron los espectros infrarrojos de CI obtenidos a 3 h y 15 h después de la inducción para cada condición de control de TOD utilizada. Para una identificación más específica de los picos de absorción pequeños y cercanos que no se resuelven en el espectro original, se obtuvieron las segundas derivadas de los espectros IR (Figura 7-14), donde los picos en $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$

corresponden a estructuras α -hélice, hojas β y estructuras tipo amiloide, respectivamente.

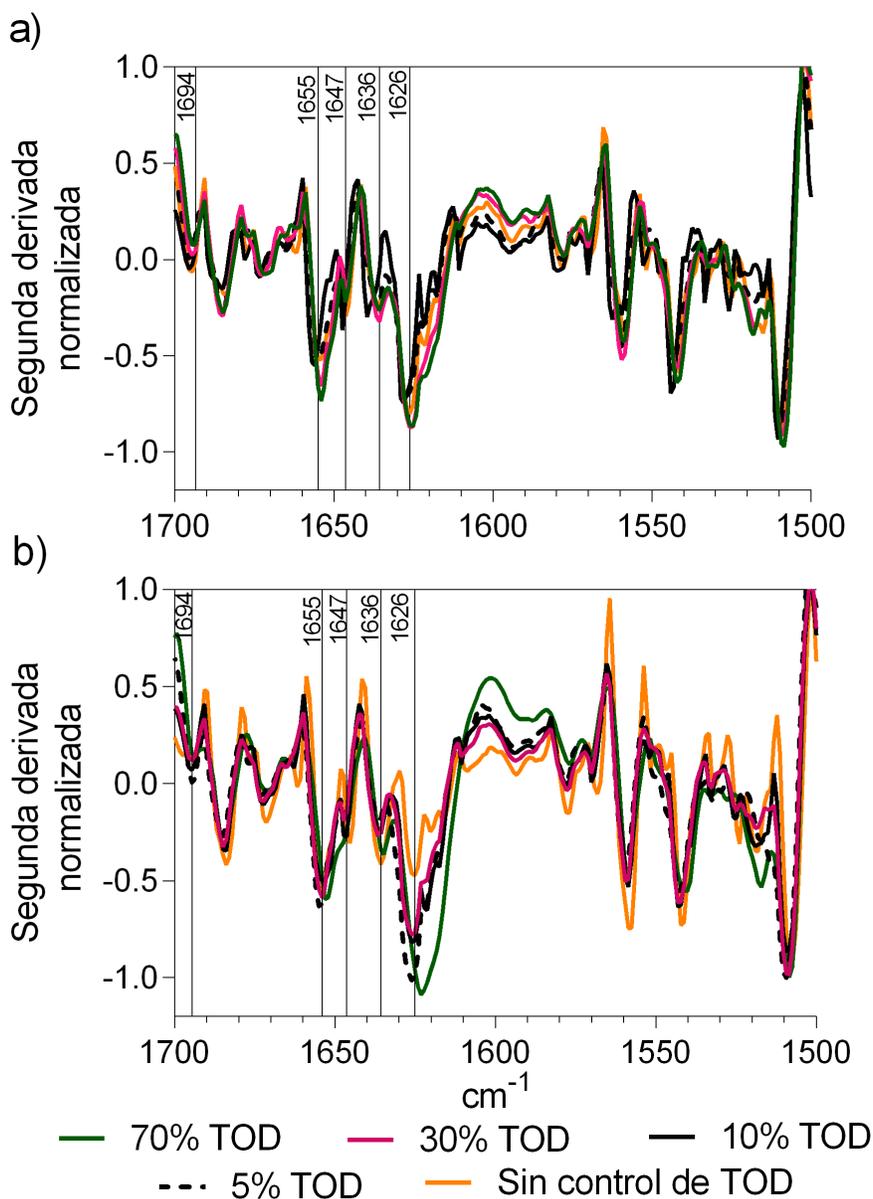


Figura 7-14. Segundas derivadas de los espectros IR por ATR-FTIR después de un suavizado de 13 puntos por el método Savitzky-Golay con el software IR Solutions (Shimadzu, Japón) para CI purificados obtenidos a 3 h (a) y 15 h (b) después de la inducción en 5 condiciones diferentes de control de TOD postinducción. Los valores se encuentran normalizados al pico de tirosina ($\sim 1508\text{ cm}^{-1}$). Se señala la posición de las bandas correspondientes a las estructuras α -hélice ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$), random coil ($\sim 1647\text{ cm}^{-1}$), hojas β ($\sim 1636\text{ cm}^{-1}$) y estructuras tipo amiloide ($\sim 1626\text{ cm}^{-1}$). Se muestran los promedios de los perfiles de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas.

Además, de la segunda derivada de los componentes se puede realizar una cuantificación relativa, pues los mínimos son proporcionales al pico de absorbancia original.

En la Figura 7-14, se comparan las segundas derivadas de los espectros IR de CI formados a 3 h y 15 h después de la inducción en diferentes condiciones de control de TOD. Los espectros de todos los CI, muestran un mínimo en $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$, indicativo de un alto contenido de estructuras tipo amiloide, excepto para los CI formados sin control de TOD a las 15 h después de la inducción. También, se muestran picos bien definidos en ~ 1653 , 1647 y 1636 cm^{-1} , lo que sugiere que los CI formados en todas las condiciones evaluadas, contienen otras proteínas, correcta o parcialmente plegadas. En la misma figura se observa que, el mínimo en $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$ después 15 h de inducción para CI formados a 70% de TOD, es superior a las demás condiciones y el pico se encuentra ligeramente desplazado.

Para conocer si el control postinducción a diferentes % de TOD tuvo efecto en la proporción de estructuras α -hélice, hojas β y tipo amiloide en los CI, se analizaron los mínimos de la segunda derivada para ambos tiempos (Figura 7-15). Primero, comparando por condiciones, en $\sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ a las 3 h postinducción, aunque pareciera haber una tendencia, de mayor proporción de α -hélices a manera que incrementa el % de control de TOD, la diferencia solo resultó diferente de forma significativa ($p < 0.05$) entre los CI formados a 5% de TOD y los formados a 30% y 70% de TOD. Al incrementar el tiempo de cultivo, los CI formados sin control de TOD, tienen una menor proporción de α -hélices, comparados con todas las condiciones de control de TOD utilizadas. Después, en $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 7-15 b), pico correspondiente a estructuras de hojas β , no hay una tendencia en función de la TOD. En los CI obtenidos a 3 h después de la inducción, se observa que los CI formados a 70% de TOD postinducción tienen menor proporción de hojas β ($p < 0.01$) que los formados a 5% y 30% de TOD y los formados sin control de TOD. Aun así, no son diferentes a los obtenidos a 10% de control de TOD postinducción. Después de 15 h de inducción, solo se muestran diferencias ($p < 0.01$) entre los CI formados a 5% de control de TOD y sin control de TOD, y los formados a 10% y 70% de TOD postinducción.

Por último, en los mínimos del pico correspondiente a las estructuras tipo amiloide, que aparece en $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$ (Figura 7-15 c), se encontró que después de 3 h de inducción, los CI formados a bajos % de TOD, e incluso en 0% de TOD, que es el caso de los formados sin control de TOD a esta hora de inducción, parecen tener un menor enriquecimiento de estructuras tipo amiloide, en comparación con los CI formados por arriba de 30% de TOD postinducción ($p < 0.01$). Por otro lado, en los CI obtenidos después de 15 h de inducción, la proporción de estructuras tipo amiloide es mayor para los CI formados en esquemas con control de postinducción.

El mínimo en $\sim 1626 \text{ cm}^{-1}$, para CI formados sin control de TOD es de -0.5 ± 0.18 , comparado con los mínimos de los CI formados con control de TOD postinducción (-1.07 ± 0.03 para 5% de TOD; -1.02 ± 0.08 para 10% de TOD y -1.04 ± 0.15 para 70% de TOD).

Para poder visualizar de mejor manera si al incrementar el tiempo de inducción se tiene cambios en las estructuras de las proteínas que forman los CI, la Figura 7-16 presenta la comparación de los mínimos respecto al tiempo para cada condición. Se encontró que al incrementar el tiempo de cultivo, los CI formados a 5% de control postinducción de TOD tienen un enriquecimiento en estructuras α -hélice y tipo amiloide, mientras que hay pérdida de estructuras hoja β . Por su parte, los CI formados a 70% de TOD y sin control de TOD postinducción muestran una disminución en estructuras α -hélice al incrementar el tiempo de cultivo, pero no tienen cambios en estructuras tipo amiloide. Respecto a estructuras de hoja β , mientras que en los CI formados a 70% de control de TOD hay ganancia de hoja β , en los formados sin control de TOD postinducción hay pérdida de ella. Por otro lado, en los espectros de los CI formados a 10% de control de TOD se encontró una ganancia de estructuras tipo amiloide al incrementar el tiempo de cultivo, similar a los formados a 5% de TOD.

En resumen, después de 3 h de inducción los CI formados con un control postinducción de TOD $\leq 10\%$ mostraron una menor proporción de estructuras tipo amiloide, al igual que los obtenidos sin control de TOD. Sin embargo, al incrementar el tiempo de inducción a 15 h, en los CI formados a 5% y 10% de TOD hubo ganancia de estructuras tipo amiloide. Por otro lado, los espectros de los CI formados a 70% de control de TOD, y obtenidos después de 15 h de inducción, mostraron mínimos superiores a todas las demás condiciones y un desplazamiento hacia el rojo, que es indicativo de una estructura altamente ordenada β cruzada de tipo amiloide.

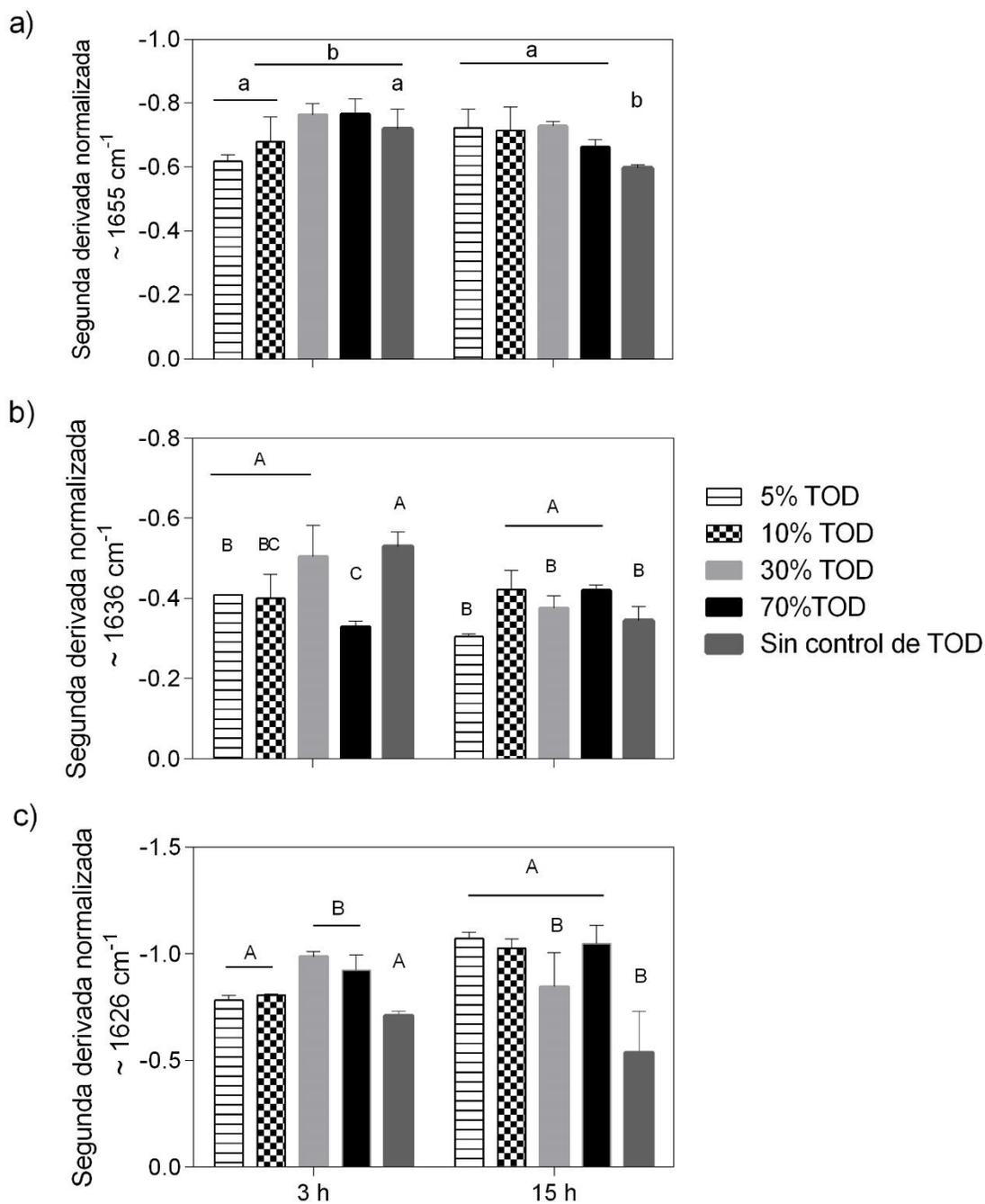


Figura 7-15. Mínimos de la segunda derivada normalizada de los espectros IR correspondientes a las bandas de α - hélice (a), hojas β (b) y agregados (c) para CI purificados a 3 h y 15 h postinducción. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa. Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa. Se muestra con letras minúsculas para $p < 0.05$ y con mayúsculas para $p < 0.01$.

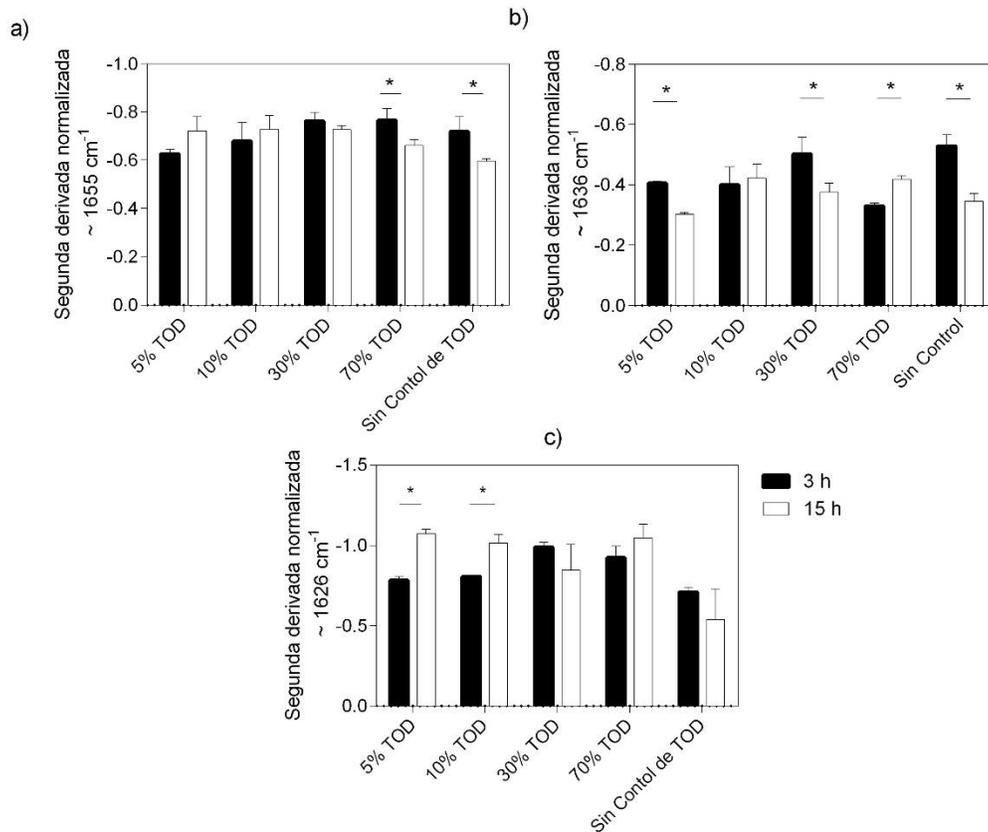


Figura 7-16. Comparación de los mínimos de la segunda derivada normalizada de los espectros IR correspondientes a las bandas de α - hélice (a), hojas β (b) y agregados (c) para CI purificados respecto al tiempo de inducción. 3h: barra rellena y 15 h: barra sin relleno. Se muestra el promedio y desviación estándar del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Se muestra con (*) para diferencias con $p < 0.05$.

7.4.4 Ensayos de unión a Thioflavina T (Th-T)

Después de 3 h de inducción, los CI formados a 30% de TOD mostraron menor emisión de fluorescencia, mientras que a 15 h la emisión fue superior en comparación con los CI formados en las otras condiciones de TOD.

Otro método que se decidió utilizar para evaluar el efecto sobre la formación de estructuras fibrilares en CI al utilizar diferentes % de TOD, fue realizar ensayos de unión a Th-T, un cromóforo que incrementa su fluorescencia al unirse específicamente a estructuras amiloides (Naiki *et al.*, 1989; Lindgren *et al.*, 2005).

En 3 h después de la inducción, la intensidad máxima de fluorescencia de los CI formados a 30% de control de TOD postinducción fue alrededor de 25% menor al

máximo mostrado por los CI formados a 10%, 70% de TOD y sin control de TOD (Figura 7-17). De manera contraria, después de 15 h de inducción, los CI formados a 30% de TOD mostraron una intensidad máxima de fluorescencia 1.5 veces mayor que los CI formados a 70% de TOD y en promedio, 0.6 veces mayor que los obtenidos a 5%, 10% y sin control de TOD postinducción.

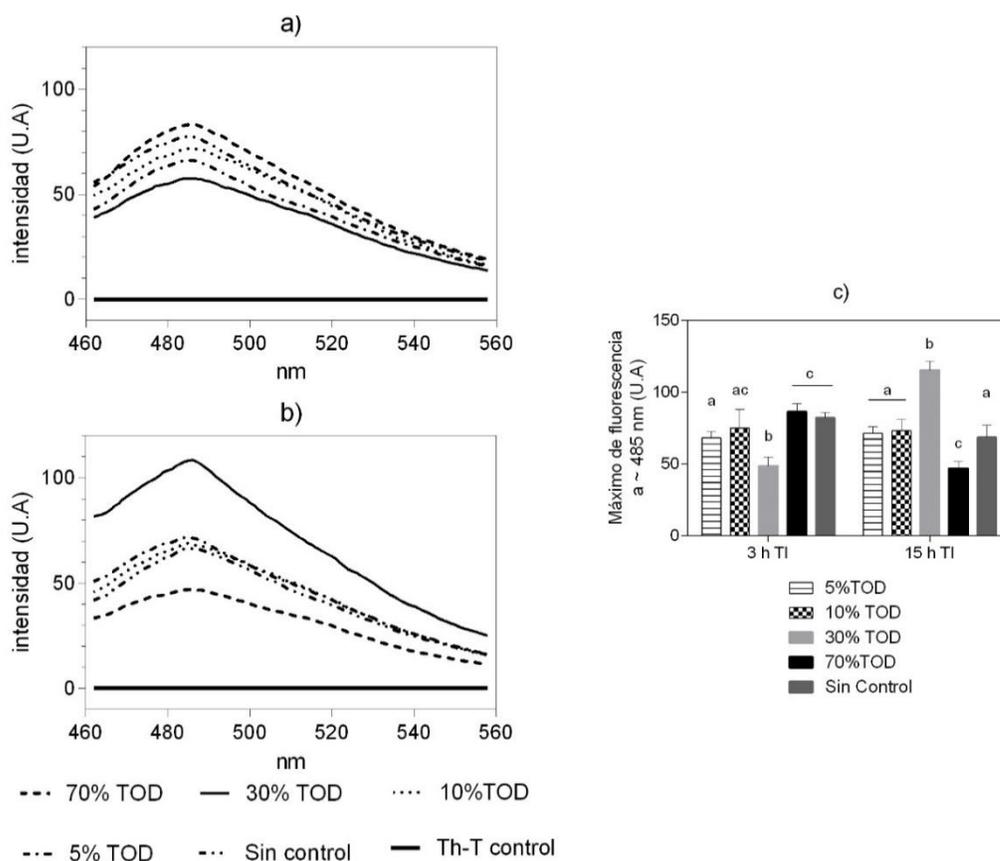


Figura 7-17. Comparativo de espectros de fluorescencia de Th-T incubada con CI formados a diferentes valores de control de TOD postinducción, obtenidos después de 3 h (a) y 15 h (b) de inducción. c) Análisis estadístico de los máximos de fluorescencia de Th-T Se muestra el espectro de Th-T libre como control, y el promedio y desviación estándar de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas.

Para observar los cambios respecto al tiempo en cada condición de TOD utilizada, se realizaron las comparaciones de los máximos obtenidos por condición (Figura 7-18). Solo se observaron diferencias en la máxima fluorescencia en los CI formados a 30% y 70% de control de TOD. Los CI formados a 30% de control de TOD, mostraron un aumento de la emisión de fluorescencia, 0.85 veces mayor. Mientras que, los CI formados a 70% de control de TOD mostraron la mitad de emisión de fluorescencia (0.54 veces) que la mostrada a 3 h después de la inducción.

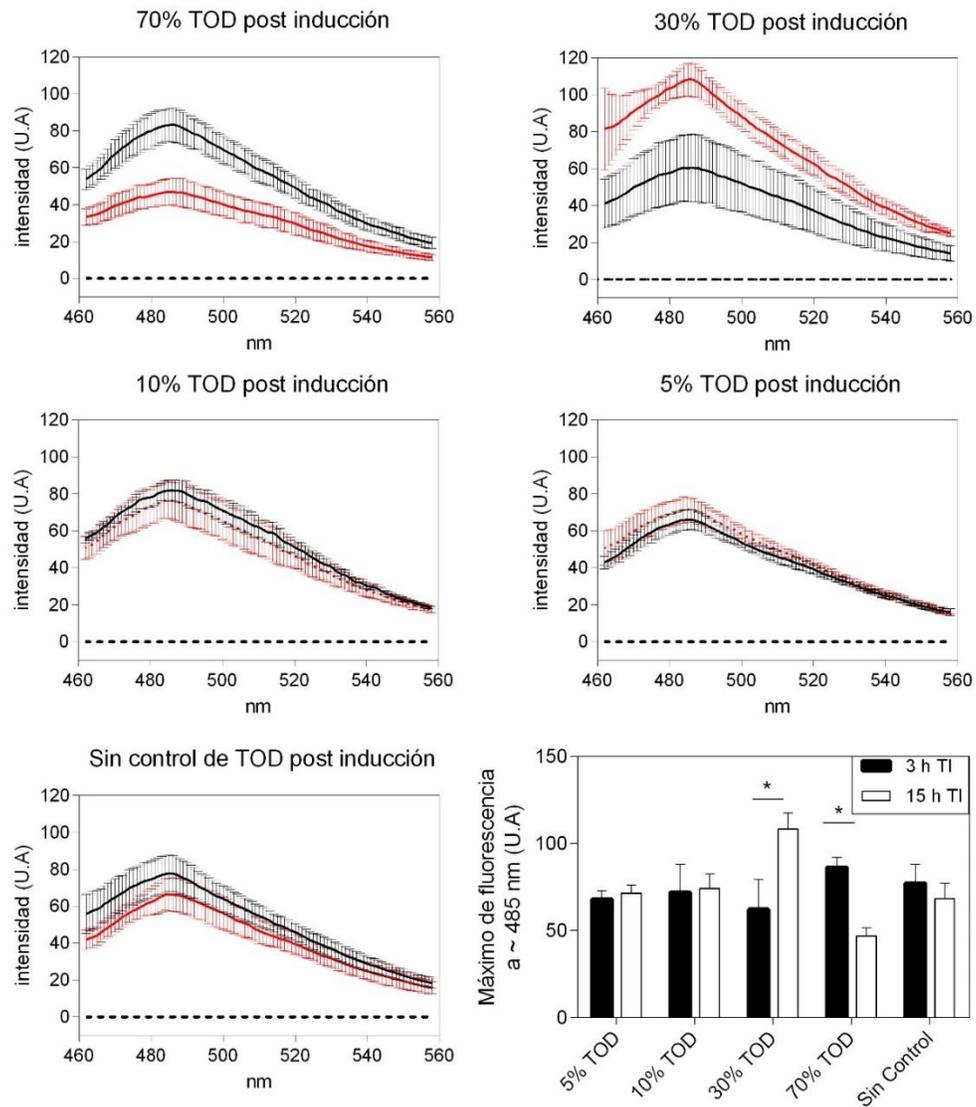


Figura 7-18. Espectros de fluorescencia de Th-T incubada con CI formados a 5 condiciones diferentes de control de TOD postinducción (70%, 30%, 10%, 5%, sin control) después de 3 h (línea negra) y 15 h de inducción (línea roja). En la gráfica final se observa la comparación de los máximos de fluorescencia a diferentes tiempos de inducción: 3h: barra rellena; 15 h: barra sin relleno. Se muestra el espectro de Th-T libre como control (línea punteada negra), y el promedio y desviación estándar de 3 réplicas técnicas provenientes de 3 réplicas biológicas. Las diferencias de forma significativa $p < 0.05$ se muestran con (*).

7.4.5 Microscopía electrónica de cuerpos de inclusión

Los CI formados a 5% y 10% de TOD postinducción, presentaron rangos más amplios de diámetros y fueron en promedio más grandes que los formados a 30% y 70% de TOD.

A fin de observar cambios en la morfología de los CI formados en diferentes valores de control de TOD, se tomaron micrografías electrónicas a CI obtenidos después de 3 h de inducción (Figura 7-19).

Para el análisis del tamaño de los CI obtenidos a 3 h después de la inducción, se analizaron las micrografías electrónicas con el programa ImageJ (Figura 7-20).

Se observa que la superficie de los CI formados fue mayormente esférica, sin embargo, en 5% y 10% de control de TOD, se observaron un mayor número de CI con formas elipsoidales y otros más alargados (Figura 7-19).

Los CI formados a 5% de control de TOD postinducción, tuvieron diámetros entre 0.2 y 1 μm , mientras que en 10% de TOD, aunque se encontraron entre 0.2 y 0.9 μm , la mayor frecuencia se encontró entre 0.5-0.6 μm . Por el contrario, en las condiciones con 30% y 70% de control de TOD post-inducción, no se encontraron CI con diámetros mayores a 0.8 μm y 0.7 μm , respectivamente, y la mayor frecuencia de CI con este diámetro fue menor al 4%. En tanto, la mayor frecuencia se encontró entre diámetros de 0.4-0.6 μm y 0.3-0.5 μm , respetivamente. Por último, aunque en CI formados sin control de TOD se encontraron tamaños entre 0.2-1 μm , la frecuencia de CI con tamaños mayores a 0.7 μm fue menor a 10%, encontrándose la mayor frecuencia entre 0.4-0.6 μm .

Como resumen, la frecuencia acumulada de los diámetros máximos medidos se presenta en la Figura 7-20 f), donde las curvas son similares entre ellas para todas las condiciones de control de TOD utilizadas, excepto para 5% de control de TOD. Se muestra que los CI formados a 5% de TOD, tienen un amplio rango de tamaño, mientras que los formados a 70% de CI tienen diámetros menores.

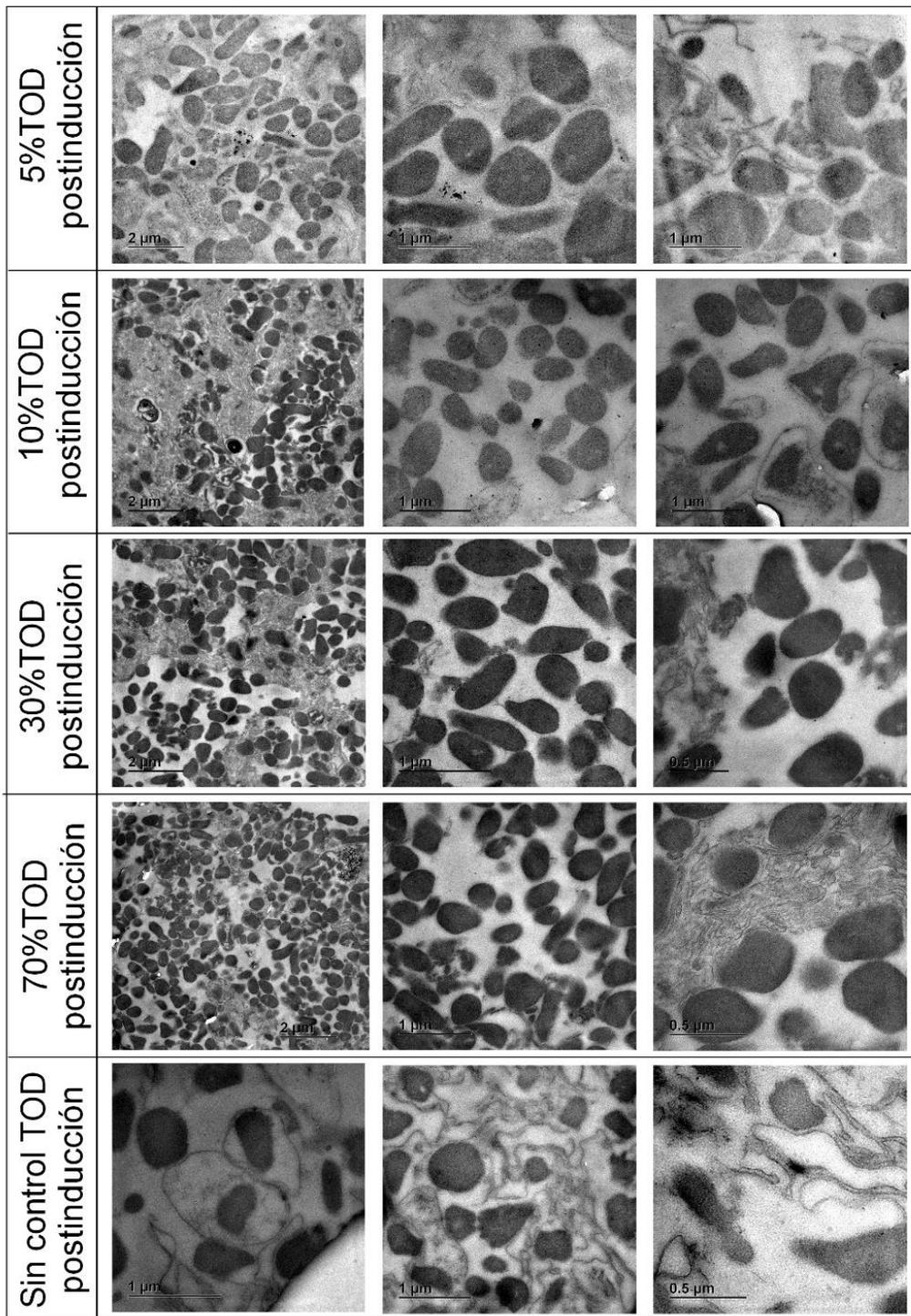


Figura 7-19. Micrografías de CI purificados obtenidos 3 h después de la inducción, formados a diferentes % de control de TOD postinducción. Las barras representan la escala. Izquierda: barra representa 2 μm , centro: barra representa: 1 μm , derecha: barra representa 0.5 μm o 1 μm .

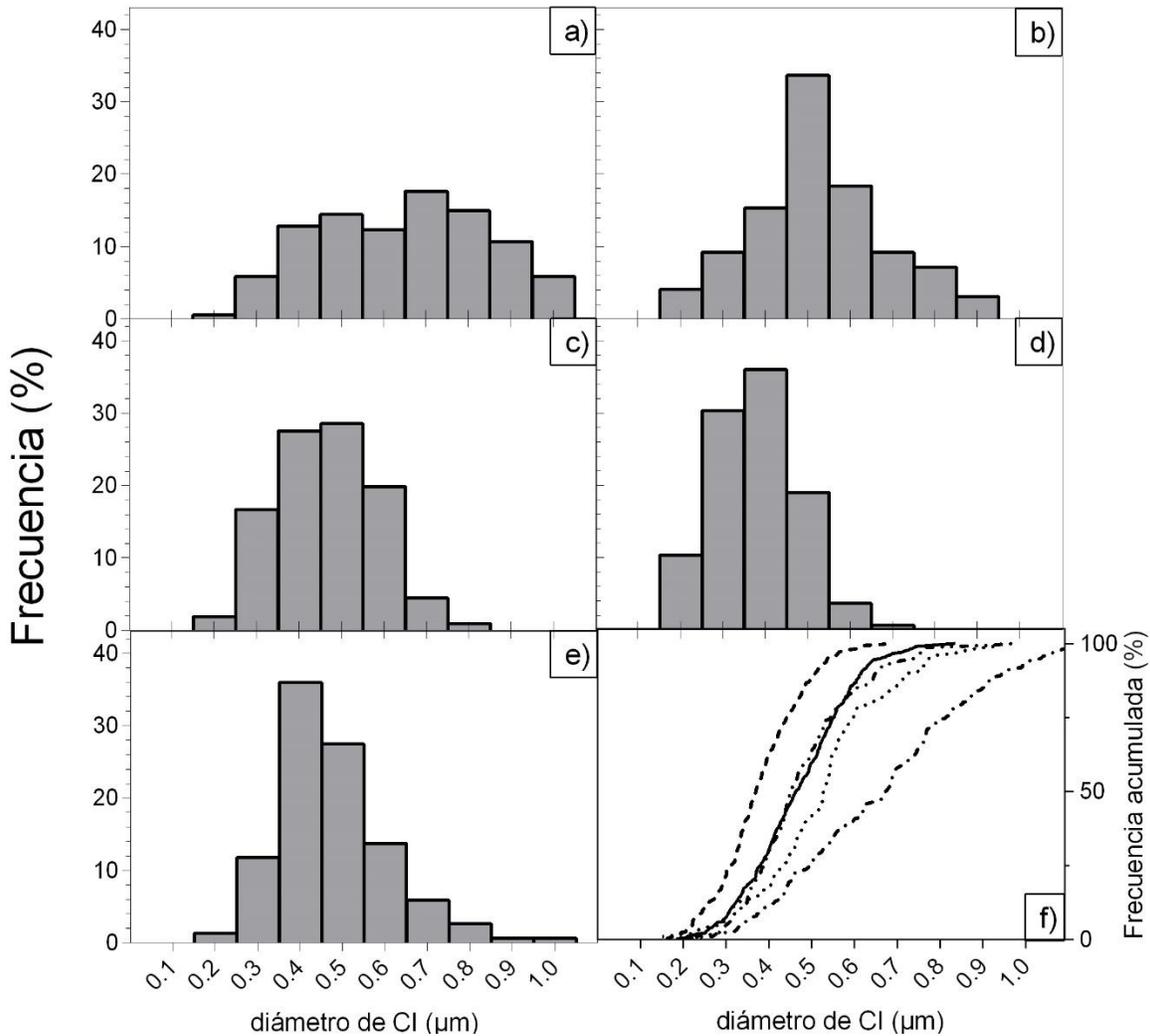


Figura 7-20. Histograma de los diámetros máximos de CI purificados formados a diferentes % de control de TOD obtenidos a 3 h después de la inducción medidos mediante el programa ImageJ. a) 5% de TOD (N=193), b) 10% de TOD (N=98), c) 30% de TOD (N=312), d) 70% de TOD (N=300), e) Sin control de TOD (N=153). f) Frecuencia acumulada de los diámetros máximos de CI obtenidos después de 3 h de inducción. 5% de TOD (línea-punto-línea), 10% de TOD (línea punteada), 30% de TOD (línea continua), 70% de TOD (línea discontinua), sin control de TOD (línea-punto-punto)

7.4.6 DISCUSIÓN DE ARQUITECTURA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

El resumen de los resultados para caracterización de arquitectura de CI se muestra en la Tabla 7-4.

Tabla 7-4. Resumen de los resultados de caracterización de arquitectura de CI obtenidos para CI formados a diferentes % de control de TOD postinducción.

% Control de TOD postinducción	Vel. de degradación con PK (U.A./min)	Proteína solubilizada a 2M de Gn•HCl (mg/mL)	Mínimo de la segunda derivada (1626 cm ⁻¹) ATR-FTIR	Máximo de fluorescencia de Th-T (U.A.)	Tamaño promedio de CI (µm)
3 h					
5%	6.01 ± 0.6 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	-0.78 ± 0.02 ^a	68.1 ± 4.6 ^a	0.680 ± 0.23
10%	6.1 ± 1.3 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	-0.80 ± 0.01 ^a	71.9 ± 15.8 ^{ac}	0.520 ± 0.15
30%	6.6 ± 0.9 ^a	0.17 ± 0.06 ^{ab}	-0.98 ± 0.03 ^b	62.2 ± 17.1 ^b	0.434 ± 0.12
70%	9.7 ± 0.8 ^b	0.20 ± 0.02 ^b	-0.92 ± 0.07 ^b	86.3 ± 5.6 ^c	0.377 ± 0.09
Sin Control	16.75 ± 2.4 ^c	0.22 ± 0.01 ^b	-0.70 ± 0.02 ^a	77.3 ± 10.5 ^c	0.477 +/- 0.12
15 h					
5%	4.3 ± 0.7 ^a	0.15 ± 0.01 ^a	-1.07 ± 0.03 ^a	71.4 ± 4.5 ^a	-
10%	3.9 ± 0.7 ^{a*}	0.14 ± 0.03 ^a	-1.02 ± 0.08 ^a	74.2 ± 8.4 ^a	-
30%	5.3 ± 0.5 ^a	0.17 ± 0.001 ^a	-0.84 ± 0.16 ^{ab}	115.3 ± 9.2 ^b	-
70%	10.1 ± 1.7 ^b	0.18 ± 0.03 ^a	-1.04 ± 0.15 ^a	46.9 ± 4.5 ^c	-
Sin Control	7.6 ± 0.6 ^c	0.17 ± 0.002 ^a	-0.5 ± 0.18 ^b	68.4 ± 8.5 ^a	-

La proteinasa K, es una serín proteasa que corta selectivamente en el enlace peptídico adyacente al grupo carboxilo de aminoácidos localizados en regiones no estructuradas, como loops, y en regiones cercanas α -hélices, pero aparentemente nunca lo hace en estructura β cruzada (Fontana *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 1998; Kheterpal *et al.*, 2001). De esta forma, las estructuras amiloides, que son altamente estructuradas en láminas β cruzada, son total o parcialmente resistentes a la proteólisis por proteinasa K.

Los perfiles de degradación obtenidos muestran diferentes velocidades de degradación para los CI formados a diferentes % de control de TOD postinducción (Tabla 7-4). Sin embargo, ninguno de los CI se degradó completamente. Se ha propuesto que los CI están estructurados por fibras tipo amiloide, resistentes a proteinasa K, que forman un andamio con espacios compuestos por especies sensibles a proteinasa K, que probablemente representan las especies con estructura similar a la nativa o estructura secundaria nativa (Cano-Garrido *et al.* 2013). Después de 100 min de reacción, la DO a 350 nm muestra la estructura que no fue degradada, es decir, resistente a la proteólisis. Aunque ninguno de los CI se degradó completamente, los CI formados sin control de TOD después de 3 h de inducción mostraron una resistencia aún menor a la degradación y una DO 350 nm final menor a las otras condiciones evaluadas. Asimismo, los CI formados a 70% de TOD fueron menos resistentes a la degradación por PK. Posiblemente, estos CI tengan menor estructura tipo amiloide.

Las velocidades de degradación para todos los CI fueron mayores al inicio de la reacción, llegando a ser constantes hacia el final de la reacción. Carrió *et al.* (2000), evaluaron la resistencia proteolítica de CI de la proteína VP1LAC y LACVP1, un derivado de β galactosidasa propensa a la agregación, que contiene fusionada la proteína de la cápsida VP1. Observaron que las velocidades de degradación no eran constantes, sino, eran mayores durante los primeros minutos e iban disminuyendo con el tiempo, como se observa en nuestros resultados. También, se evaluaron CI obtenidos a diferentes tiempos de cultivo, encontrando que la resistencia proteolítica incrementaba con la edad de los CI, lo que puede sugerir que dentro de los mismos, se dan transiciones y reorganizaciones dinámicas de la estructura del cuerpo. En nuestros resultados, los CI formados a 10% de control de TOD y sin control de TOD postinducción, mostraron menores velocidades de degradación al incrementar el tiempo de inducción a 15 h, comparados con los obtenidos a 3 h después de la inducción.

Durante la proteólisis, se observó un aumento de la DO 350 nm antes de la degradación, en los primeros 20 minutos (Anexo 11-7). Carrió *et al.*, (2000)

observaron, mediante SEM, que al tratar los CI con tripsina, los CI aumentaban su volumen al fragmentarse por el tratamiento. Las subpartículas formadas iban desapareciendo en tiempos de incubación más largos. Se ha sugerido que la degradación proteolítica ocurre por un mecanismo de cascada donde se da también la degradación de intermediarios (Carbonell & Villaverde, 2002; Cubarsí *et al.*, 2001).

Los ensayos de estabilidad frente a la solubilidad química con Gn•HCl, mostraron que también los CI formados a 70% de control de TOD y sin control de TOD postinducción, obtenidos después de 3 h de inducción, fueron menos estables, pues la proteína solubilizada de los CI fue mayor, comparada con las otras condiciones después de 24 de incubación con 2 M de Gn•HCl (Tabla 7-4).

Se cree que Gn•HCl puede desestabilizar la estructura de una proteína al afectar las interacciones agua-agua en la capa de hidratación, promoviendo la solubilidad de grupos no polares en el interior de las proteínas (Lim *et al.*, 2009; Mason *et al.*, 2003) e implica la interacción con cadenas laterales de aminoácidos presentes en regiones no estructuradas. De forma que, los aminoácidos que se encuentran en regiones altamente estructuradas, como hojas β cruzada, presentes en estructuras tipo amiloide, no podrían interactuar con Gn•HCl y por ende, no podrían solubilizarse, dando mayor estabilidad a los CI con mayor contenido de láminas β cruzada.

Aunque los resultados obtenidos por estabilidad ante la solubilización con Gn•HCl, parecen confirmar que los CI a 70% de TOD y sin control de TOD postinducción podrían tener una composición menos amiloide, permitiendo así una degradación más rápida y una solubilización a menor concentración de Gn•HCl, los resultados por FTIR sugieren lo contrario para los CI formados a 70% de TOD. Los CI obtenidos a las 3 h y 15 h después de la inducción, formados a 70% de TOD están mayormente enriquecidos en estructuras tipo amiloides comparados con las demás condiciones, mientras que, los formados a valores $\leq 10\%$ de control de TOD, obtenidos a las 3 h tienen un pico mínimo menor (Tabla 7-4).

El análisis de las segundas derivadas de la región amida I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) de los espectros IR de los CI ha sido utilizado para su caracterización (Ami *et al.*, 2006; Kong & Yu, 2007; Moran & Zanni, 2014). Puesto que las fibras amiloides producen un espectro característico, con una banda independiente a las hojas β nativas con un máximo en 1615 cm^{-1} y un pico adicional de baja intensidad en 1684 cm^{-1} , contrario al máximo en 1630 cm^{-1} para hojas β , es posible observar la existencia de esta estructura (Carrió *et al.*, 2005; Doglia *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 1996; Zandomenighi *et al.*, 2009). Además, con la segunda derivada se puede

realizar una cuantificación relativa, pues los mínimos son proporcionales al pico de absorbancia original (Ami *et al.*, 2006).

El hecho de no haberse degradado completamente con PK, muestra la existencia de un núcleo resistente a la proteólisis, que resulta de la degradación de las partes más expuestas y sensibles a proteólisis dejando dicho núcleo sin degradar (Bocharova *et al.*, 2006; Carrió *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2013; Fontana *et al.*, 1997; Vindigni *et al.*, 1994). Los estudios por ATR-FTIR reafirman la existencia de estructuras α -hélice y hojas β , que son, seguramente, sensibles a la proteólisis, y estructuras tipo amiloide.

Dado que la Th-T no interactúa con proteínas monoméricas plegadas o parcialmente plegadas, oligómeros solubles o agregados amorfos, o bien, su interacción produce un incremento de fluorescencia insignificante (Lindgren *et al.*, 2005), se ha usado para estudiar la composición amiloide de CI. Así, una mayor fluorescencia puede sugerir una mayor proporción de contenido amiloide. No obstante, nuestros resultados de unión a Th-T no se relacionan con los obtenidos mediante degradación con PK, solubilización con Gn•HCl y FTIR-ATR (Tabla 7-4).

Morell *et al.* (2008) sugirieron la presencia de estructuras β cruzadas intermoleculares. En sus estudios, incubaron CI purificados de A β 42-GFP con Th-T y PK. En los CI con PK se incrementó dos veces la emisión de fluorescencia comparados con los CI sin tratamiento con PK. Este aumento se le atribuyó a que la proteólisis favorece la accesibilidad de las moléculas de Th-T a estructuras tipo amiloide que se encontraban previamente escondidas al interior. En el mecanismo de unión propuesto, el “modelo de canal”, la unión de la molécula de Th-T es paralela, por complementariedad geométrica, al eje largo de la fibrilla amiloide, formado por la estructura β cruzada (Biancalana & Koide, 2010; Sulatskaya *et al.*, 2017). Para la unión, se requiere un sitio mínimo de unión de cuatro residuos aromáticos hidrofóbicos en hojas β consecutivas (Murugan *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2009) y cuatro sitios de unión para Th-T: uno en la hendidura de entrada, dos sitios centrales en los canales, y un sitio superficial (Murugan *et al.*, 2016). Por lo cual, si los CI fueran más compactos, podrían bloquearse los accesos a alguno de estos sitios, resultando en una menor intensidad de fluorescencia.

Respecto al efecto del tiempo de inducción, los resultados obtenidos por FTIR y PK podrían indicar que al aumentar el tiempo de cultivo, en los CI obtenidos a 10% de control de TOD, hay ganancia de estructuras altamente estructuradas, en este caso, de estructuras β cruzada, resistentes a proteólisis, tal como ha sido reportado por otros autores al incrementar el tiempo de cultivo (Carrió *et al.*, 2000; Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Upadhyay *et al.*, 2012). La disminución de la velocidad de

degradación por PK y la menor proteína solubiliza a 2 M al incrementar el tiempo de inducción en los CI formados sin control de TOD, también sugieren que hay ganancia de estructuras tipo amiloide, sin embargo, no se observó la misma tendencia en FTIR y Th-T.

La ganancia de estructuras tipo amiloide, no es la única respuesta a una menor velocidad de degradación o menor solubilización con Gn•HCl. Ambos fenómenos podrían deberse a diferencias en la composición de los CI. Sin embargo, no se encontraron diferencias en ella ni en las condiciones de TOD ni al incrementar el tiempo de cultivo. Las diferencias entonces, podrían deberse a la compactación de CI, que limitaría la unión de proteasas o agentes caotrópicos al sustrato dentro de los CI, lo cual, también ha sido propuesto por otros autores (Castellanos-Mendoza *et al.*, 2014; Upadhyay *et al.*, 2012).

Castellanos-Mendoza *et al.* (2014) mostraron que los CI obtenidos bajo condiciones controladas de pH mostraban espectros de emisión de fluorescencia altos en tiempos iniciales, y que la fluorescencia de Th-T disminuía al avanzar el tiempo de cultivo. Sin embargo, en este estudio, además se observó que a mayor tiempo de cultivo, también el tamaño de los CI disminuía. Los autores sugieren que la disminución de tamaño podría estar asociado a compactación de las estructuras del CI, por lo cual, la accesibilidad de Th-T se veía limitada.

Por el contrario, Upadhyay *et al.* (2012), realizó experimentos con CI de dos proteínas recombinantes, L-asparaginasa II y la hormona de crecimiento humano (rHuGH), expresados en *E.coli*. Encontraron que, los CI de rHuGH, incrementaban su tamaño y su resistencia proteolítica, al incrementar el tiempo de cultivo, mientras que los cuerpos de inclusión de asparaginasa, que eran cuerpos más pequeños y que no incrementaron su tamaño con el tiempo de cultivo, fueron más susceptibles. Además, los CI de rHuGH fueron progresivamente más solubles al incrementar la concentración de urea y solubilizaron completamente a una concentración 7 M, mientras que, los de asparaginasa lo hicieron entre 2-3 M. Lo anterior debía ser resultado de que los CI más grande, de rHuGH, tenían una naturaleza más compacta que los CI de asparaginasa que eran más pequeños.

La formación de agregados compactos no implica necesariamente la participación de láminas β cruzadas, puede formarse por una fuerte interacción entre hélices anfipáticas o hidrófobas (Upadhyay *et al.*, 2012). Los espectros de ATR-FTIR, mostraron que los CI en todas las condiciones tenían una proporción significativamente grande de α -hélices que podrían interactuar y formar CI muy compactos.

Los CI formados a 70% de control de TOD y sin control de TOD postinducción, resultaron ser de menor tamaño, comparados con los obtenidos a 5 y 10% de TOD (Tabla 7-4), y además, podrían ser menos compactos, pues fueron menos resistentes a la degradación con PK, y menos estables a la solubilidad, resultado de una mejor interacción de PK y Gn•HCl con la estructura. Por otro lado, no mostraron diferencias de forma significativa en los resultados por ATR-FTIR, pues esta prueba no depende de la compactación de los CI.

Por el contrario, los CI formados a 5% y 10% de TOD, son agregados de mayor tamaño, pero podrían tener mayor compactación. Por esta razón, aunque los espectros por FTIR muestran que la proporción de estructuras tipo amiloide es menor en comparación con los formados con un control postinducción de TOD \geq 30%, resultaron ser más resistentes y estables a la degradación con PK y solubilización con Gn•HCl, respectivamente.

Los resultados de Th-T también podrían explicarse por el tamaño y compactación de los CI. Los ensayos de unión a Th-T no mostraron diferencias de forma significativa en los CI formados a 70% de control de TOD y sin control de TOD postinducción y los formados a 10% de TOD obtenidos después de 3 h. Podría ser que en los primeros, al ser más pequeños pero menos compactos, la interacción de Th-T con estructuras tipo amiloide puede ser tanto interna como superficial, mientras que los obtenidos a 5 y 10% de TOD, a pesar de ser más compactos y no permitir la unión de Th-T con estructuras que se encuentra al interior de CI, al tener mayor tamaño, la interacción de Th-T puede darse con las estructuras tipo amiloide localizadas en el área superficial.

Los resultados para CI obtenidos a 15 h después de la inducción a 70% de TOD por FTIR muestran el pico correspondiente a estructuras tipo amiloide ligeramente barrido. Este barrido de banda, es indicativo de una estructura β cruzada de tipo amiloide más condensada, debido al alto ordenamiento de las láminas β en las fibras amiloides, que ocasionan un mayor desplazamiento hacia el rojo (García-Fruitós *et al.*, 2007b; Moran & Zanni, 2014), indicando que estos CI son los que tienen una mayor estructuración tipo amiloide o bien, un mayor grado de compactación, que podría explicar la disminución en la fluorescencia de Th-T al incrementar el tiempo de cultivo en estos cuerpos.

Los resultados a 15 h después de la inducción no mostraron en general diferencias de forma significativa entre las condiciones de control de TOD. Esto puede ser resultado del tiempo prolongado que permanecieron a 42°C, pues se ha demostrado que al incrementar la temperatura de inducción, los CI formados muestran velocidades de degradación y solubilización más lentas (de Groot & Ventura, 2006;

Restrepo-Pineda *et al.*, 2019), lo que podría estar interviniendo con la visualización de efectos por oxígeno disuelto.

Para finalizar, de manera específica, en la producción de proteínas recombinantes, se prefieren CI con características que faciliten los procesos de recuperación, solubilización y replegamiento de la proteína. De esta forma, CI con menor proporción de estructuras tipo amiloide o bien, menos compactos podrían facilitar tales procesos, haciendo atractivo el uso de proteínas en forma de CI para la producción.

De modo que, para la obtención de rHuGM-CSF en forma de CI, *E.coli* W3110 con un sistema de inducción por temperatura, un proceso podría tener TOD $\geq 5\%$ de control de TOD postinducción, donde la concentración de biomasa no se ve afectada e incluso se favorece la producción de rHuGM-CSF a valores de 5% y 10% de TOD. Sin embargo los CI con menor resistencia a la degradación proteolítica por PK y menor estabilidad ante $Gn \cdot HCl$, fueron los formados a 70% de control de TOD y los formados sin control de TOD. Estas características podrían favorecer procesos de solubilización y posterior replegamiento de la proteína. Por lo cual, realizar los cultivos sin control de TOD, podría resultar más práctico y representar menores costos en un proceso para la recuperación de proteínas producidas como CI.

8 CONCLUSIONES:

- El cultivo de *E. coli*/W3110 recombinante, productora de rHuGM-CSF a 5% y 10% de control de TOD postinducción, favoreció la producción de proteína total, siendo 0.41 y 0.38 veces mayor comparados con los cultivos a 30% de TOD postinducción.
- La producción de la proteína recombinante, rHuGM-CSF, fue 0.89 y 0.71 veces mayor en los cultivos con 5% y 10% de control de TOD postinducción, respectivamente, que con 30% de TOD postinducción.
- No se observaron cambios en la concentración máxima de biomasa alcanzada en todas las condiciones de control de TOD postinducción utilizadas, mientras que, los cultivos sin control de TOD postinducción, mostraron una disminución del 50% de biomasa, comparada con todas las condiciones con control de TOD postinducción.
- A menores valores de control de TOD, se observó una disminución de la velocidad específica de crecimiento, así como de la velocidad específica de consumo de glucosa post-inducción.
- El control de la TOD postinducción ni el tiempo de cultivo ocasionan cambios observables en el perfil electroforético de la composición de los CI, donde para todas las condiciones evaluadas, la proporción de rHuGM-CSF fue \geq al 55% del contenido de los CI.
- Los CI formados a 70% de TOD y sin control de TOD fueron menos resistentes a la degradación proteolítica y menos estables frente a la solubilización química a las 3 h postinducción.
- Los resultados mediante FTIR sugieren que los CI formados a 5% y 10% de TOD postinducción tienen menor proporción de estructuras tipo amiloide.
- Los CI formados a 5% y 10% de control de TOD postinducción, presentaron diámetros más grandes comparados con los obtenidos a 30% y 70% de control de TOD postinducción.
- Los datos obtenidos en este proyecto sugieren que los CI formado a 70% de control de TOD y sin control de TOD, pueden ser menos compactos comparados con los obtenidos a 5% y 10% de control de TOD postinducción.

9 Perspectivas

1. Realizar cultivos de *E.coli* W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF con una temperatura de inducción menor (39°C), con la finalidad de observar si el control de TOD tiene un efecto mayor en la arquitectura de los CI donde se ha observado, que al obtenerse a menor temperatura, éstos presentan características menos amiloides.
2. Llevar a cabo la identificación de chaperonas en CI y sobrenadantes por Western Blot.
3. Realizar electroforesis en gel bidimensional (DIGE 2D) para evaluar cambios en la producción de proteínas
4. Evaluar cambios en la expresión de genes involucrados en metabolismo central en las diferentes condiciones.

10 Bibliografía.

Alam, P., Siddiqi, K., Chturvedi, S. K., & Khan, R. H. (2017). Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules* 103: 208-219 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048>

Alexeeva, S., De Kort, B., Sawers, G., Hellingwerf, K. J., & De Mattos, M. J. T. (2000). Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182(17): 4934-4940 <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4934-4940.2000>

Ami, D., Natalello, A., Schultz, T., Gatti-Lafranconi, P., Lotti, M., Doglia, S. M., & de Marco, A. (2009). Effects of recombinant protein misfolding and aggregation on bacterial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 179(2): 263-269 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.015>

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): 3433-3436 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.085>

Ami, D., Natalello, A., Taylor, G., Tonon, G., & Doglia, S. M. (2006). Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764(4): 793-799 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.12.005>

Arellano, M., & Lonial, S. (2008). Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. *Biologics: Targets and Therapy* 2(1): 13-27 <https://doi.org/10.2147/btt.s1355>

Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., & Siegele, D. A. (2001). Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *Journal of Bacteriology* 183(7): 2178-2186 <https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2178-2186.2001>

Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 55(1-3): 3-9 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00206-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00206-3)

Bäcklund, E., Ignatushchenko, M., & Larsson, G. (2011). Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 10: 35 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-35>

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., Redwan, E. M. (2015) Production of biopharmaceuticals

in *E. coli*: Current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(7):953-962 <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>

Baez, A., Kumar, A., Sharma, A. K., Anderson, E. D., & Shiloach, J. (2019). Effect of amino acids on transcription and translation of key genes in *E. coli* K and B grown at a steady state in minimal medium. *New Biotechnology* 49: 120-128 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.004>

Baez, A., & Shiloach, J. (2013). *Escherichia coli* avoids high dissolved oxygen stress by activation of SoxRS and manganese-superoxide dismutase. *Microbial Cell Factories* 12:23 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>

Balamurugan, K., Prakash, M., & Subramanian, V. (2019). Theoretical insights into the role of water molecules in the Guanidinium-Based protein denaturation process in specific to aromatic amino acids. *Journal of Physical Chemistry B* 123(10): 2191-2202 <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.8b08968>

Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22(11):1399-1408 <https://doi.org/10.1038/nbt1029>

Bar-Even, A. (2016). Formate assimilation: The metabolic architecture of natural and synthetic pathways. *Biochemistry* 55(28): 3851-3863 <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00495>

Barnard, A. M. L., Green, J., & Busby, S. J. W. (2003). Transcription regulation by tandem-bound FNR at *Escherichia coli* promoters. *Journal of Bacteriology* 185(20):5993-6004 <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.5993-6004.2003>

Barraza-Garza, G., De La Rosa, L. A., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel, H., Cotte, M., & Alvarez-Parrilla, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista Latinoamericana de Química* 41(3): 125-148 ISSN 0370-5943

Bednarska, N. G., Schymkowitz, J., Rousseau, F., & Van Eldere, J. (2013). Protein aggregation in bacteria: The thin boundary between functionality and toxicity. *Microbiology (United Kingdom)* 159(Pt9): 1795-1806 <https://doi.org/10.1099/mic.0.069575-0>

Becher, B., Tugues, S., & Greter, M. (2016). GM-CSF: From growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity* 45(5):963-973 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>

Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., Kompala, D. S. (2009). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated

with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 35(7): 668-681
<https://doi.org/10.1002/bit.22292>

Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1804(7): 1405-1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>

Bocharova, O. V., Makarava, N., Breydo, L., Anderson, M., Salnikov, V. V., & Baskakov, I. V. (2006). Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. *Journal of Biological Chemistry* 281(4): 2373-2379 <https://doi.org/10.1074/jbc.M510840200>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Briseño, C. G., Haldar, M., Kretzer, N. M., Wu, X., Theisen, D. J., Wumesh, K. C., Durai, V., Grajales-Reyes, G. E., Iwata, A., Bagadia, P., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2016). Distinct transcriptional programs control cross-priming in classical and monocyte-derived dendritic cells. *Cell Reports* 15(11): 2462-2474 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.025>

Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. In *Biochemical Engineering Journal* 7(2): 91-98 [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00106-6)

Burgess, A. W., Begley, C. G., Johnson, G. R., Lopez, A. F., Williamson, D. J., Mermod, J. J., Simpson, R. J., Szchmitz, A., DeLamarter, J. F. (1987). Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 69(1):43-51

Calcines-Cruz, C., Olvera, A., Castro-Acosta, R. M., Zavala, G., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2018). Recombinant-phospholipase A2 production and architecture of inclusion bodies are affected by pH in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules* 108:826-836 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.178>

Cano-Garrido, O., Rodríguez-Carmona, E., Díez-Gil, C., Vázquez, E., Elizondo, E., Cubarsi, R., Seras-Franzoso, J., Rinas, U., Ventosa, N., Veciana, J., Villaverde, A., García-Fruitós, E. (2013). Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies. *Acta Biomaterialia* 9(4): 6134-6142 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.033>

Carbonell, X., & Villaverde, A. (2002). Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. *Biotechnology Letters* 24: 1939-1944 <https://doi.org/10.1023/A:1021173114193>

- Carrió, M., González-Montalbán, N., Vera, A., Villaverde, A., & Ventura, S. (2005). Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *Journal of Molecular Biology* 347(5): 1025-1037 <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.030>
- Carrió, M. M., Cubarsi, R., & Villaverde, A. (2000). Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters* 471(1): 7-11 [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01357-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01357-0)
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2003). Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters* 537(1-3): 215-221 [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00126-1)
- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2005). Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *Journal of Bacteriology* 187(10): 3599-3601 <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3599-3601.2005>
- Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolívar, 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. *Biotechnology and Bioengineering* 102(2): 468-482 <https://doi.org/10.1002/bit.22084>
- Caspeta, L., Lara, A. R., Pérez, N. O., Flores, N., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2013). Enhancing thermo-induced recombinant protein production in *Escherichia coli* by temperature oscillations and post-induction nutrient feeding strategies. *Journal of Biotechnology* 167(1): 47-55 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.001>
- Castan, A., Näsman, A., & Enfors, S. O. (2002). Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: Production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology* 30(7): 847-854 [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00490-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00490-2)
- Castellanos-Mendoza, A., Castro-Acosta, R. M., Olvera, A., Zavala, G., Mendoza-Vera, M., García-Hernández, E., Alagón, A., Trujillo-Roldán, M. A. Valdez-Cruz, N. A. (2014). Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 13:137 <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0137-9>
- Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Gardner, I., Dempsey, P., Layton, J., Dührsen, U., Burgess, A. W., Nice, E., Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *Journal of Biological Chemistry* 265(8): 4483-4491
- Chatterjee, B., Lee, C. Y., Lin, C., Chen, E. H. L., Huang, C. L., Yang, C. C., & Chen, R. P. Y. (2013). Amyloid core formed of full-length recombinant mouse prion protein

involves sequence 127-143 but not sequence 107-126. *PLoS ONE* 8(7): e67967 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067967>

Crack, J., Green, J., & Thomson, A. J. (2004). Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *Journal of Biological Chemistry* 279: 9278-9286 <https://doi.org/10.1074/jbc.M309878200>

Cubarsí, R., Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2001). In situ proteolytic digestion of inclusion body polypeptides occurs as a cascade process. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282(2): 436-441 <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4583>

de Groot, N. S., & Ventura, S. (2006). Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters* 580(27): 6471-6476 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.071>

de Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitós, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U., Trujillo-Roldán M. A., Valdez-Cruz, N.A., Vázquez, E., Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiology Reviews* 43(1): 53-72 <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>

De Mets, F., Van Melderen, L., & Gottesman, S. (2019). Regulation of acetate metabolism and coordination with the TCA cycle via a processed small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(3): 1043-1052 <https://doi.org/10.1073/pnas.1815288116>

Dela Coletta Troiano Araújo, L., Wibrantz, M., Rodríguez-Fernández, D. E., Karp, S. G., Talevi, A. C., Maltempo de Souza, E., Soccol, C. R., Thomaz-Soccol, V. (2019). Process parameters optimization to produce the recombinant protein CFP10 for the diagnosis of tuberculosis. *Protein Expression and Purification* 154: 118-125 <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.016>

Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein folding and mechanisms of proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 16(8): 17193-17230 <https://doi.org/10.3390/ijms160817193>

Ding, H., Hidalgo, E., & Dimple, B. (1996). The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *Journal of Biological Chemistry* 271(52): 33173-33175 <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33173>

Dodd, I. B., Perkins, A. J., Tsemitsidis, D., & Egan, J. B. (2001). Octamerization of λ CI repressor is needed for effective repression of PRM and efficient switching from lysogeny. *Genes and Development* 15(22): 3013-3022. <https://doi.org/10.1101/gad.937301>

- Dodd, Ian B., Shearwin, K. E., Perkins, A. J., Burr, T., Hochschild, A., & Egan, J. B. (2004). Cooperativity in long-range gene regulation by the λ CI repressor. *Genes and Development* 18(3): 344-354 <https://doi.org/10.1101/gad.1167904>
- Doglia, S. M., Ami, D., Natalello, A., Gatti-Lafranconi, P., & Lotti, M. (2008). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the conformational quality of recombinant proteins within inclusion bodies. *Biotechnology Journal* 3(2): 193-201 <https://doi.org/10.1002/biot.200700238>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., Lorenzo, V., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories* 14: 201 <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry* 47(1): 91-97 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x>
- Elf, J., & Ehrenberg, M. (2005). Near-critical behavior of aminoacyl-tRNA pools in *E. coli* at rate-limiting supply of amino acids. *Biophysical Journal* 88(1): 132-146 <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.051383>
- Elia, F., Cantini, F., Chiti, F., Dobson, C. M., & Bemporad, F. (2017). Direct conversion of an enzyme from native-like to amyloid-like aggregates within inclusion bodies. *Biophysical Journal* 112(12): 2540-2551 <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.011>
- Enjalbert, B., Millard, P., Dinclaux, M., Portais, J. C., & Létisse, F. (2017). Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. *Scientific Reports* 7:42135 <https://doi.org/10.1038/srep42135>
- Fahnert, B., Lilie, H., & Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 89: 93-142 <https://doi.org/10.1007/b93995>
- Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of three *Escherichia coli* strains in recombinant production of reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 8(1): 16-22
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8(17):1-8 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-17>
- Figge, J., Wright, C., Collins, C. J., Roberts, T. M., & Livingston, D. M. (1988). Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes

by *E. coli* lac repressor in monkey cells. *Cell* 52(5):713-722
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90409-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90409-6)

Fontana, A., De Laureto, P. P., De Filippis, V., Scaramella, E., & Zambonin, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Folding and Design* 2(2):R17-26 [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(97\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00010-2)

Forno, G., Bollati Fogolin, M., Oggero, M., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., Conradt, H. S., & Nimtz, M. (2004). N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *European Journal of Biochemistry* 271(5): 907-919 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03993.x>

Förster, A. H., & Gescher, J. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2: 1-12 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>

Fragoso-Jiménez, J. C., Baert, J., Nguyen, T. M., Liu, W., Sassi, H., Goormaghtigh, F., Van Melderen, F., Gaytán, P., Hernández-Chávez, G., Martínez A., Delvigne, F., & Gosset, G. (2019). Growth-dependent recombinant product formation kinetics can be reproduced through engineering of glucose transport and is prone to phenotypic heterogeneity. *Microbial Cell Factories* 18: 1-16 <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1073-5>

Fu, H., Yuan, J., & Gao, H. (2015). Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 584:28-35 <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.012>

Fuentes, L. G., Lara, A. R., Martínez, L. M., Ramírez, O. T., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2013). Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: Physiologic consequences and utility for improving DNA vaccine production. *Microbial Cell Factories* 12: 1-11 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-42>

Galvanauskas, V., Simutis, R., Levišauskas, D., Butkus, M., & Urniežius, R. (2018). Development and investigation of efficient substrate feeding and dissolved oxygen control algorithms for design of recombinant *E. coli* cultivation process. *IEEE International Conference on Automation Science and Engineering* 20-24 <https://doi.org/10.1109/COASE.2018.8560495>

García-Fruitós, E., Arís, A., & Villaverde, A. (2007a). Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1): 289-294 <https://doi.org/10.1128/AEM.01952-06>

García-Fruitós, E., Martínez-Alonso, M., González-Montalbán, N., Valli, M., Mattanovich, D., & Villaverde, A. (2007b). Divergent Genetic Control of Protein

Solubility and Conformational Quality in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 374(1): 195-205 <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.004>

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 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.09.003>

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. *FEBS Journal* 278(14): 2408-2418 <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08163.x>

Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. C. (1999). Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *Journal of Biological Chemistry* 274(50):35950-35954 <https://doi.org/10.1074/jbc.274.50.35950>

González-Montalbán, N., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2007). Recombinant protein solubility - Does more mean better? *Nature Biotechnology* 25: 718-720 <https://doi.org/10.1038/nbt0707-718>

Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D., & Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(16): 6181-6185 <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6181>

Guisbert, E., Herman, C., Lu, C. Z., & Gross, C. A. (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes and Development* 18(22): 2812-2821 <https://doi.org/10.1101/gad.1219204>

Gunsalus, R. P., & Park, S. J. (1994). Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Research in Microbiology* 145(5-6): 437-450 [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90092-2)

Gupta, S. K., & Shukla, P. (2017). Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 43(1): 31-42 <https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1150959>

Heyland, J., Blank, L. M., & Schmid, A. (2011). Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 155(2): 178- 184 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.016>

Hidalgo, E., & Demple, B. (1994). An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *The EMBO Journal* 13(1):138-146 <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06243.x>

Hoffmann, F., Weber, J., & Rinas, U. (2002). Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 80:313-319 <https://doi.org/10.1002/bit.10379>

Holms, W. H. (1986). The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *In Current Topics in Cellular Regulation* 28: 69-105 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152828-7.50004-4>

Hubbard, S. J., Beynon, R. J., & Thornton, J. M. (1998). Assessment of conformational parameters as predictors of limited proteolytic sites in native protein structures. *Protein Engineering* 11(5): 349-359 <https://doi.org/10.1093/protein/11.5.349>

Iafolla, M. A. J., Mazumder, M., Sardana, V., Velauthapillai, T., Pannu, K., & McMillen, D. R. (2008). Dark proteins: Effect of inclusion body formation on quantification of protein expression. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 72(4): 1233-1242 <https://doi.org/10.1002/prot.22024>

Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 11(7): 443-454 <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>

Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental Microbiology* 21(2):521-530 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14445>

Jervis, A. J., & Green, J. (2007). In vivo demonstration of FNR dimers in response to lower O₂ availability. *Journal of Bacteriology* 189(7): 2930-2932 <https://doi.org/10.1128/JB.01921-06>

Jevševar, 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(2):632-639 <https://doi.org/10.1021/bp0497839>

Jiang, H., Song, Z., Ling, M., Yang, S., & Du, Z. (1996). FTIR studies of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in aqueous solutions: Secondary structure, disulfide reduction and thermal behavior. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1294(2):121-128 [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(96\)00002-7](https://doi.org/10.1016/0167-4838(96)00002-7)

- Jürgen, B., Breitenstein, A., Urlacher, V., Büttner, K., Lin, H., Hecker, M., Schweder, T., Neubauer, P. (2010). Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 9: 2-13 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-41>
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J., & Blattner, F. R. (2005). Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *Journal of Bacteriology* 187(3): 1135-1160 <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1135-1160.2005>
- Kaur, J. (2017). Application of UV Light Scattering to Detect Reversible Self-association and Aggregation of Proteins in Solution. *University of Connecticut-Doctoral Dissertations*. 1386. Disponible en: <https://opencommons.uconn.edu/dissertations/1386>
- Kelley, R. K., Mitchell, E., Behr, S., Hwang, J., Keenan, B., Cheung, A., Gordan, J. D., Ko, A. H., Cinar, P., Atreya, C. E., Van Loon, K., Weber, T., Ngo, Z., Quandt, Z. E., Liu, C., Venook, A. P., & Fong, L. (2018). Phase II trial of pembrolizumab (PEM) plus granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in advanced biliary cancers (ABC). *Journal of Clinical Oncology* 36(4): 386 https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.4_suppl.386
- Kheterpal, I., Williams, A., Murphy, C., Bledsoe, B., & Wetzel, R. (2001). Structural features of the A β amyloid fibril elucidated by limited proteolysis. *Biochemistry* 40(39): 11757-11767 <https://doi.org/10.1021/bi010805z>
- Kim, H. J., Kwon, Y. D., Lee, S. Y., & Kim, P. (2012). An engineered *Escherichia coli* having a high intracellular level of ATP and enhanced recombinant protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94: 1079-1086 <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3779-0>
- Kim, J., Park, H., Park, B. T., Hwang, H. S., Kim, J. II, Kim, D. K., & Kim, H. H. (2016). O-glycans and O-glycosylation sites of recombinant human GM-CSF derived from suspension-cultured rice cells, and their structural role. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479: 266-271 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.057>
- Kirkpatrick, C., Maurer, L. M., Oyelakin, N. E., Yoncheva, Y. N., Maurer, R., & Slonczewski, J. L. (2001). Acetate and formate stress: Opposite responses in the proteome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183(21): 6466-6477 <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6466-6477.2001>
- Kischnick, S., Weber, B., Verdino, P., Keller, W., Sanders, E. A., Anspach, F. B., Fiebig, H., Cromwell, O., Suck, R. (2006). Bacterial fermentation of recombinant major wasp allergen Antigen 5 using oxygen limiting growth conditions improves yield and quality of inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 47(2):621-628 <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.01.009>

- Klößner, W., & Büchs, J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology* 30(6):307-314 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.03.001>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(8): 549-559 <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Konz, J. O., King, J., & Cooney, C. L. (1998). Effects of oxygen on recombinant protein expression. *Biotechnology Progress* 14(3): 393-409 <https://doi.org/10.1021/bp980021l>
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 16(6):589-597 <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>
- Kuczynska-Wisnik, D., Zurawa-Janick, D., Narkiewicz, J., Kwiatkowska, J., Lipinska, B., Laskowska, E. (2004). *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA/B enhance activity of enzymes sequestered in inclusion bodies. *Acta Biochim Pol* 51(4): 925-931.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685 <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagunas-Muñoz, V. H., Cabrera-Valladares, N., Bolívar, F., Gosset, G., & Martínez, A. (2006). Optimum melanin production using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 101(5): 1002-1008 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03013.x>
- Lara, A. R., Knabben, I., Regestein, L., Sassi, J., Caspeta, L., Ramírez, O. T., & Büchs, J. (2011). Comparison of oxygen enriched air vs. pressure cultivations to increase oxygen transfer and to scale-up plasmid DNA production fermentations. *Engineering in Life Sciences* 11: 382-386 <https://doi.org/10.1002/elsc.201000104>
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W. S., Yu, M. H., Storz, G., Ryu, S. E. (2004). Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path. *Nature Structural and Molecular Biology* 11(12): 1179-1785 <https://doi.org/10.1038/nsmb856>
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K., Rennick, D. (1985). Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(13):4360-4364 <https://doi.org/10.1073/pnas.82.13.4360>

Li, X., Robbins, J. W., & Taylor, K. B. (1992). Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *Journal of Industrial Microbiology* 9(1):1-9 <https://doi.org/10.1007/BF01576362>

Lieb, M. (1981). A fine structure map of spontaneous and induced mutations in the lambda repressor gene, including insertions of IS elements. *MGG Molecular & General Genetics* 184(3): 364-371 <https://doi.org/10.1007/BF00352506>

Lim, W. A., & Sauer, R. T. (1989). Alternative packing arrangements in the hydrophobic core of λ repressor. *Nature* 339(6219):31-36 <https://doi.org/10.1038/339031a0>

Lim, W. K., Rösgen, J., & Englander, S. W. (2009). Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(8): 2595-2600 <https://doi.org/10.1073/pnas.0812588106>

Lin, H. Y., Mathiszik, B., Xu, B., Enfors, S. O., & Neubauer, P. (2001). Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 73: 347-357 <https://doi.org/10.1002/bit.1068>

Lin, X., Zhou, C., Zhu, S., Deng, H., Zhang, J., & Lu, Y. (2020). O₂-Tuned protein synthesis machinery in *Escherichia coli*-based cell-free system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 312. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00312>

Lindgren, M., Sörgjerd, K., & Hammarström, P. (2005). Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal* 88(6): 4200-4212 <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.049700>

Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J., & Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(8): 3076-3081 <https://doi.org/10.1073/pnas.0708931105>

Liu, S. (2017). How cells grow. *Bioprocess Engineering (Second Edition)* Chapter 11: 629–697. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00011-3>

Liutkute, M., Samatova, E., Rodnina, M. (2020). Cotranslational folding of proteins on the ribosome. *Biomolecules* 10(1): E97 <https://doi.org/10.3390/biom10010097>

Lotfi, N., Thome, R., Rezaei, N., Zhang, G. X., Rezaei, A., Rostami, A., & Esmaeil, N. (2019). Roles of GM-CSF in the pathogenesis of autoimmune diseases: An update. *Frontiers in Immunology* 10:1265 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01265>

Lu, J., & Deutsch, C. (2005). Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature Structural and Molecular Biology* 12(12): 1123-1129 <https://doi.org/10.1038/nsmb1021>

Mach, H., Middaugh, C. R., & Denslow, N. (1995). Determining the identity and purity of recombinant proteins by UV absorption spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science* Chapter 7: Untit 7.2 <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0702s01>

Mahalik, S., Sharma, A. K., & Mukherjee, K. J. (2014). Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 13: 177 <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0177-1>

Mailloux, R. J., Bériault, R., Lemire, J., Singh, R., Chénier, D. R., Hamel, R. D., & Appanna, V. D. (2007). The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS ONE* 2(8): e690 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000690>

Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D., & Bayer, K. (2008a). Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *Journal of Biotechnology* 138(3-4): 67-73 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1995>

Margreiter, G., Schwanninger, M., Bayer, K., & Obinger, C. (2008b). Impact of different cultivation and induction regimes on the structure of cytosolic inclusion bodies of TEM1- β -lactamase. *Biotechnology Journal* 3(9-10): 1245-1255. <https://doi.org/10.1002/biot.200800072>

Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenka, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60(4): 368-384 <https://doi.org/10.1002/em.22267>

Mason, P. E., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., Barnes, A. C., & Cruickshank, J. M. (2003). The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8): 4557-4561 <https://doi.org/10.1073/pnas.0735920100>

Mejía, R., Gómez-Eichelmann, M. C., & Fernández, M. S. (1999). Fatty acid profile of *Escherichia coli* during the heat-shock response. *Biochemistry and Molecular Biology International* 47(5): 835-844 <https://doi.org/10.1080/15216549900201923>

Metcalf, D. (2013). The colony-stimulating factors and cancer. *Cancer Immunology Research* 1(6): 351-356 <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0151>

Mettert, E. L., & Kiley, P. J. (2018). Reassessing the Structure and Function Relationship of the O₂ Sensing Transcription Factor FNR. *Antioxidants and Redox Signaling* 29(18): 1830-1840 <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7365>

- Minnes, R., Nissinmann, M., Maizels, Y., Gerlitz, G., Katzir, A., & Raichlin, Y. (2017). Using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infra-Red (ATR-FTIR) spectroscopy to distinguish between melanoma cells with a different metastatic potential. *Scientific Reports* 7:4381 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04678-6>
- Moonen, P., Mermod, J. J., Ernst, J. F., Hirschi, M., & DeLamarter, J. F. (1987). Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(13): 4428-4431 <https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4428>
- Moran, S. D., & Zanni, M. T. (2014). How to get insight into amyloid structure and formation from infrared spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters* 5(11): 1984-1993 <https://doi.org/10.1021/jz500794d>
- 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 - Molecular Cell Research* 1783(10): 1815-1825 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.007>
- Morrison, C. (2019). Fresh from the biotech pipeline-2018. In *Nature Biotechnology* 37: 118-123 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0021-6>
- Morrison, C. (2020). Fresh from the biotech pipeline-2019. In *Nature Biotechnology* 38: 126-131 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0405-7>
- Murugan, N. A., Halldin, C., Nordberg, A., Långström, B., & Ågren, H. (2016). The culprit is in the cave: The core sites explain the binding profiles of amyloid-specific tracers. *Journal of Physical Chemistry Letters* 7(17): 3313-3321 <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01586>
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysic* 6:4 <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>
- Myers, K. S., Yan, H., Ong, I. M., Chung, D., Liang, K., Tran, F., Keles, S., Landick, R., Kiley, P. J. (2013). Genome-scale analysis of *Escherichia coli* FNR reveals complex features of transcription Factor Binding. *PLoS Genetics* 9(6):e1003565 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003565>
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analytical Biochemistry* 177(2): 244-249 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8)

Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., & Märkl, H. (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 597-601 <https://doi.org/10.1007/s002530051101>

Nelson, R., & Eisenberg, D. (2006a). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Current Opinion in Structural Biology* 16(2):260-265 <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.007>

Nelson, R., & Eisenberg, D. (2006b). Structural models of amyloid-like fibrils. *Advances in Protein Chemistry* 73: 235-282 [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(06\)73008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73008-X)

Nilsson, K. P. R. (2009). Small organic probes as amyloid specific ligands - Past and recent molecular scaffolds. *FEBS Letters* 583(16): 2593-2599 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.016>

Parrilli, E., Giuliani, M., Marino, G., & Tutino, M. L. (2010). Influence of production process design on inclusion bodies protein: The case of an Antarctic flavohemoglobin. *Microbial Cell Factories* 9: 1-10 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-19>

Peccati, F., Pantaleone, S., Riffet, V., Solans-Monfort, X., Contreras-García, J., Guallar, V., & Sodupe, M. (2017). Binding of thioflavin T and related probes to polymorphic models of amyloid- β fibrils. *Journal of Physical Chemistry B* 121(38): 8926-8934 <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.7b06675>

Perrenoud, A., & Sauer, U. (2005). Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187(9):3171-3179 <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3171-3179.2005>

Pesarrodona, M., Jauset, T., Díaz-Riascos, Z. V., Sánchez-Chardi, A., Beaulieu, M. E., Seras-Franzoso, J., Sánchez-García, L., Balta-Foix, R., Mancilla, S., Fernández, F., Rinas, U., Schwartz, S. Jr., Soucek, L., Villaverde, A., Abasolo, I., Vázquez, E. (2019). Targeting antitumoral proteins to breast cancer by local administration of functional inclusion bodies. *Advanced Science* 6(18): 1900849 <https://doi.org/10.1002/advs.201900849>

Peternel, Š., Jevševar, S., Bele, M., Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2008). New properties of inclusion bodies with implications for biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 49(4): 239-246 <https://doi.org/10.1042/ba20070140>

Picon, A., Teixeira De Mattos, M. J., & Postma, P. W. (2005). Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production. *Biotechnology and Bioengineering* 90(2): 191-200 <https://doi.org/10.1002/bit.20387>

Pinhal, S., Ropers, D., Geiselman, J., & De Jong, H. (2019). Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *Journal of Bacteriology* <https://doi.org/10.1128/JB.00147-19>

Reynoso-Cereceda, G. I., Garcia-Cabrera, R. I., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2016). Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_{La} characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochemical Engineering Journal* 105(15): 379-390 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.015>

Qoronfleh, M. W. (1999). Dissolved oxygen concentration affects the accumulation of HIV-1 recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 80(2):107-120 <https://doi.org/10.1385/ABAB:80:2:107>

Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: Not that bad... *In Frontiers in Microbiology* 5:56 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00056>

Restrepo-Pineda, S., Bando-Campos, C. G., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2019). Recombinant production of ESAT-6 antigen in thermoinducible *Escherichia coli*: the role of culture scale and temperature on metabolic response, expression of chaperones, and architecture of inclusion bodies. *Cell Stress and Chaperones* 24(4):777-792 <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01006-x>

Rieppo, L., Saarakkala, S., Närhi, T., Helminen, H. J., Jurvelin, J. S., & Rieppo, J. (2012). Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 20(5): 451-459 <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.010>

Rinas, U., & Bailey, J. E. (1992). Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37(5): 609-614 <https://doi.org/10.1007/BF00240735>

Rinas, U., Hoffmann, F., Betiku, E., Estapé, D., & Marten, S. (2007). Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated *in vivo* inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 127(2): 244-257 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.004>

Rinas, U., Kracke-Helm, H.-A., & Schügerl, K. (1989). Glucose as a substrate in recombinant strain fermentation technology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31(2): 163-167 <https://doi.org/10.1007/bf00262456>

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: 1-9 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-71>

- Rodriguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Effect of D-Lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 186(7): 2085-2090 <https://doi.org/10.1128/JB.186.7.2085-2090.2004>
- Rodriguez, F., Arsène-Ploetze, F., Rist, W., Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2008). Molecular basis for regulation of the heat shock transcription factor σ_{32} by the DnaK and DnaJ chaperones. *Molecular Cell* 32(3): 347-358 <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.016>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5: 1-17 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science* 28(8): 1412-1422 <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rossmann, R., Sawers, G., & Böck, A. (1991). Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Molecular Microbiology* 5(11): 2807-2814 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01989.x>
- Saarikangas, J., & Barral, Y. (2015). Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *ELife* e06197 <https://doi.org/10.7554/eLife.06197>
- Salvi, G., De Los Rios, P., & Vendruscolo, M. (2005). Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 61(3): 492-499 <https://doi.org/10.1002/prot.20626>
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangués, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microbial Cell Factories* 15(33): 1-7 <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>
- Sandoval-Basurto, E. A., Gosset, G., Bolivar, F., & Ramírez, O. T. (2005). Culture of *Escherichia coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnology and Bioengineering* 89(4): 453-463 <https://doi.org/10.1002/bit.20383>
- Sarkar-Banerjee, S., Goyal, S., Gao, N., Mack, J., Thompson, B., Dunlap, D., Chattopadhyay, K., Finzi, L. (2018). Specifically bound lambda repressor dimers promote adjacent non-specific binding. *PLoS ONE* 13(4): e0194930 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194930>

- Sarker, A., Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2019). Evaluation of scFv protein recovery from *E. coli* by *in vitro* refolding and mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* 18(5): 1-12 <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1053-9>
- Sawers, R. G., & Clark, D. P. (2004). Fermentative pyruvate and acetyl-coenzyme A metabolism. *EcoSal Plus* 1(1): 1-37 <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.5.3>
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nature Biotechnology* 6: 291-294 <https://doi.org/10.1038/nbt0388-291>
- Schleeger, M., Vandenakker, C. C., Deckert-Gaudig, T., Deckert, V., Velikov, K. P., Koenderink, G., & Bonn, M. (2013). Amyloids: From molecular structure to mechanical properties. *Polymer* 54(10):2473-2488 <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2013.02.029>
- Schmidt, M., Babu, K. R., Khanna, N., Marten, S., & Rinas, U. (1999). Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 68(1): 71-83 [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00189-8)
- Schramm, F. D., Schroeder, K., & Jonas, K. (2020). Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 44(1): 54-72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
- Schweder, T., Lin, H., Jürgen, B., Breitenstein, A., Riemschneider, S., Khalameyzer, V., Gupta, A., Büttner, K., & Neubauer, P. (2002). Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 330-337 <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0904-5>
- Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R., & Palsson, B. O. (2015). Genome-wide reconstruction of OxyR and SoxRS transcriptional regulatory networks under oxidative stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Reports* 12(8): 1289-1299 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.043>
- Seong, H. J., Woo, J. E. & Jang, Y. (2020). Control of the galactose-to-glucose consumption ratio in co-fermentation using engineered *Escherichia coli* strains. *Sci Rep* 10: 12132. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69143-3>
- Shalel-Levanon, S., San, K. Y., & Bennett, G. N. (2005). Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 92(2): 147-159 <https://doi.org/10.1002/bit.20583>
- Shanafelt, A. B., & Kastelein, R. A. (1989). Identification of critical regions in mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by scanning-deletion analysis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86(13): 4872-4876 <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.4872>

Shang, L., Tian, P. Y., Kim, N. J., Chang, H. N., & Hahm, M. S. (2009). Effects of oxygen supply modes on the production of human growth hormone in different scale bioreactors. *Chemical Engineering and Technology* 32(4): 600-605 <https://doi.org/10.1002/ceat.200800481>

Sharma, A. K., Phue, J., Khatipov, E., Dalal, N., Anderson, E. D., & Shiloach, J. (2020). Effect of restricted dissolved oxygen on expression of *Clostridium difficile* toxin A subunit from *E. coli*. *Scientific Reports* 10: 3059 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59978-1>

Shimizu, K. (2013). Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism. *ISRN Biochemistry* 645983 <https://doi.org/10.1155/2013/645983>

Shivu, B., Seshadri, S., Li, J., Oberg, K. A., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2013). Distinct β -sheet structure in protein aggregates determined by ATR-FTIR spectroscopy. *Biochemistry* 52(31): 5176-5183 <https://doi.org/10.1021/bi400625v>

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories* 14:41 <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>

Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A & Panda, A. K. (2020) Structure-function relationship of Inclusion Bodies of a multimeric protein. *Frontiers in Microbiology*. 11:876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00876>

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(4):303-310 <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>

Singh, S. P., Purohit, M. K., Aoyagi, C., Kitaoka, M., & Hayashi, K. (2010). Effect of growth temperature, induction, and molecular chaperones on the solubilization of over-expressed cellobiose phosphorylase from *cellvibrio gilvus* under *in vivo* conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(2): 273-276 <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0023-1>

Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial inclusion bodies: A treasure trove of bioactive proteins. *Trends in Biotechnology* 38(5): 474-476 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>

Slouka, C., Kopp, J., Hutwimmer, S., Strahammer, M., Strohmer, D., Eitenberger, E., Schwaighofer, A., Herwig, C. (2018). Custom made inclusion bodies: Impact of

classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. *Microbial Cell Factories* 17(1):148 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0997-5>

Slouka, C., Kopp, J., Spadiut, O., & Herwig, C. (2019). Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? *Applied Microbiology and Biotechnology* 103: 1143-1153 <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9569-1>

Soini, J., Ukkonen, K., & Neubauer, P. (2008). High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations - Consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. *Microbial Cell Factories* 7:26 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-26>

Speed, M. A., Wang, D. I. C., & King, J. (1996). Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: The molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology* 14(10):1283-1287 <https://doi.org/10.1038/nbt1096-1283>

Steinberg, T. H. (2009). Chapter 31 Protein Gel Staining Methods. An Introduction and Overview. *In Methods in Enzymology* 463: 541-563 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63031-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63031-7)

Strandberg, L., & Enfors, S. O. (1991). Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 13: 609-614 <https://doi.org/10.1007/BF01033419>

Stsiapura, V. I., Maskevich, A. A., Kuzmitsky, V. A., Turoverov, K. K., & Kuznetsova, I. M. (2007). Computational study of thioflavin T torsional relaxation in the excited state. *Journal of Physical Chemistry A* 111(22): 4829-4835 <https://doi.org/10.1021/jp070590o>

Sulatskaya, A. I., Lavysh, A. V., Maskevich, A. A., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2017). Thioflavin T fluoresces as excimer in highly concentrated aqueous solutions and as monomer being incorporated in amyloid fibrils. *Scientific Reports* 7(1): 2146 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02237-7>

Tabandeh, F., Shojaosadati, S. A., Zomorodipour, A., Khodabandeh, M., Sanati, M. H., & Yakhchali, B. (2004). Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 26: 245-250 <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000013714.88796.5f>

Taylor, G., Hoare, M., Gray, D. R., & Marston, F. A. O. (1986). Size and density of protein inclusion bodies. *Bio/Technology* 4:553-557 <https://doi.org/10.1038/nbt0686-553>

Teich, A., Lin, H. Y., Andersson, L., Meyer, S., & Neubauer, P. (1998). Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG

induction. *Journal of Biotechnology* 64(2-3): 197-210 [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00108-4)

Teran-Melo, J. L., Peña-Sandoval, G. R., Silva-Jimenez, H., Rodriguez, C., Alvarez, A. F., & Georgellis, D. (2018). Routes of phosphoryl group transfer during signal transmission and signal decay in the dimeric sensor histidine kinase ArcB. *Journal of Biological Chemistry* 293(34): 13214-13223 <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003910>

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 [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00641-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00641-1)

Tyler, J. S., Mills, M. J., & Friedman, D. I. (2004). The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *Journal of Bacteriology* 186(22): 7670-7679 <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7670-7679.2004>

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 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033951>

Upadhyay, V., Singh, A., Jha, D., Singh, A., & Panda, A. K. (2016). Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial Cell Factories* 15:100 <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0504-9>

Valax, P., & Georgiou, G. (1993). Molecular characterization of β -Lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. 1. Composition. *Biotechnology Progress* 9(5): 539-547 <https://doi.org/10.1021/bp00023a014>

Valdez-Cruz, N. A., Caspeta, L., Pérez, N. O., Ramírez, O. T., & Trujillo-Roldán, M. A. (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories* 9:18 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-18>

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 <https://doi.org/10.4161/bbug.2.2.14316>

Valdez-Cruz, N. A., Reynoso-Cereceda, G. I., Pérez-Rodríguez, S., Restrepo-Pineda, S., González-Santana, J., Olvera, A., Zavala, G., Alagón, A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2017). Production of a recombinant phospholipase A2 in *Escherichia*

coli using resonant acoustic mixing that improves oxygen transfer in shake flasks. *Microbial Cell Factories* 16(1): 129 <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0746-1>

Vallejo, L. F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, H. A., Rinas, U. (2002). Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 94(2): 185-194 [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00425-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00425-4)

Vázquez, E., Corchero, J. L., Burgueño, J. F., Seras-Franzoso, J., Kosoy, A., Bosser, R., Mendoza, R., Martínez-Láinez, J. M., Rinas, U., Fernández, E., Ruiz-Avila, L., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2012). Functional inclusion bodies produced in bacteria as naturally occurring nanopills for advanced cell therapies. *Advanced Materials* 24: 1742-1747 <https://doi.org/10.1002/adma.201104330>

Venema, G., Kok, J., & Van Sinderen, D. (1999). From DNA sequence to application: Possibilities and complications. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 76:3-23 <https://doi.org/10.1023/A:1002061808489>

Ventura, S. (2005). Sequence determinants of protein aggregation: Tools to increase protein solubility. *Microbial Cell Factories* 4:11 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-11>

Ventura, S., & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biotechnology* 24(4): 179-185 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>

Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E., & Cubarsi, R. (1993). Fine regulation of cl857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 59(10): 3486-3487.

Vindigni, A., De Filippis, V., Zanotti, G., Visco, C., Orsini, G., & Fontana, A. (1994). Probing the structure of hirudin from *Hirudinaria manillensis* by limited proteolysis: isolation, characterization and trombin-Inhibitory Properties of N-terminal fragments. *European Journal of Biochemistry* 226(2): 323:233 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb20056.x>

Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology* 36: 1136-1145 <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>

Walter, M. R., Cook, W. J., Ealick, S. E., Nagabhushan, T. L., Trotta, P. P., & Bugg, C. E. (1992). Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Molecular Biology* 224(4): 1075-1085 [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90470-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90470-5)

- Wang, L. (2009). Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. *Prion* 3(3): 139-145 <https://doi.org/10.4161/pri.3.3.9922>
- Wang, L., Maji, S. K., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., & Riek, R. (2008). Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biology* <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060195>
- Weibezahn, J., Schlieker, C., Tessarz, P., Mogk, A., & Bukau, B. (2005). Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biological Chemistry* 386: 739-744 <https://doi.org/10.1515/BC.2005.086>
- Wingfield, P., Graber, P., Moonen, P., Craig, S., & Pain, R. H. (1988). The conformation and stability of recombinant-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *European Journal of Biochemistry* 173(1): 65-72 <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13967.x>
- Wittmann, C., Kim, H. M., John, G., & Heinzle, E. (2003). Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnology Letters* 25(5): 377-380 <https://doi.org/10.1023/A:1022402212537>
- Wittmann, C., Weber, J., Betiku, E., Krömer, J., Böhm, D., & Rinas, U. (2007). Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 132(4):375-384 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.495>
- Wolfe, A. J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(1): 12-50 <https://doi.org/10.1128/mnbr.69.1.12-50.2005>
- Wood, A. J. J., Lieschke, G. J., & Burgess, A. W. (1992). Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *New England Journal of Medicine* 327:28-35 <https://doi.org/10.1056/NEJM199207023270106>
- Wu, C., Biancalana, M., Koide, S., & Shea, J. E. (2009). Binding modes of Thioflavin-T to the single-layer β -sheet of the peptide self-assembly mimics. *Journal of Molecular Biology* 394(4): 627-633 <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.056>
- Wurm, D. J., Veiter, L., Ulonska, S., Eggenreich, B., Herwig, C., & Spadiut, O. (2016). The *E. coli* pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(20): 8721-8729 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7620-7>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science* 4(1): 160696 <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>

- 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 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>
- Yishai, O., Goldbach, L., Tenenboim, H., Lindner, S. N., & Bar-Even, A. (2017). Engineered assimilation of exogenous and endogenous formate in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology* 6(9): 1722-1731 <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00086>
- Zandomenoghi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G., & Fändrich, M. (2009). FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science* 13(12): 3314-3321 <https://doi.org/10.1110/ps.041024904>
- Zhan, Y., Lew, A. M., & Chopin, M. (2019). The pleiotropic effects of the GM-CSF rheostat on myeloid cell differentiation and function: more than a numbers game. *Frontiers in Immunology* 10: 2679. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02679>
- Zhang, S., Yang, W., Chen, H., Liu, B., Lin, B., & Tao, Y. (2019). Metabolic engineering for efficient supply of acetyl-CoA from different carbon sources in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 18:130 <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1177-y>
- Zhao, W., Zhou, X., Zhao, G., Lin, Q., Wang, X., Yu, X., & Wang, B. (2017). Enrichment of Ly6C^{hi} monocytes by multiple GM-CSF injections with HBV vaccine contributes to viral clearance in a HBV mouse model. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 13(12):2872-2882 <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1344797>
- Zheng, M., Åslund, F., & Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279(5357): 1718-1721 <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1718>
- Zhu, J., Shalel-Levanon, S., Bennett, G., & San, K. Y. (2006). Effect of the global redox sensing/regulation networks on *Escherichia coli* and metabolic flux distribution based on C-13 labeling experiments. *Metabolic Engineering* 8(6): 619-627 <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.07.002>

11 Anexos

11.1 Curva estándar para proteína total y proteína en cuerpos de inclusión y proteína soluble

Las curvas estándar se realizaron tal y como se describió en la sección 0 de Materiales y métodos, obteniéndose los siguientes datos.

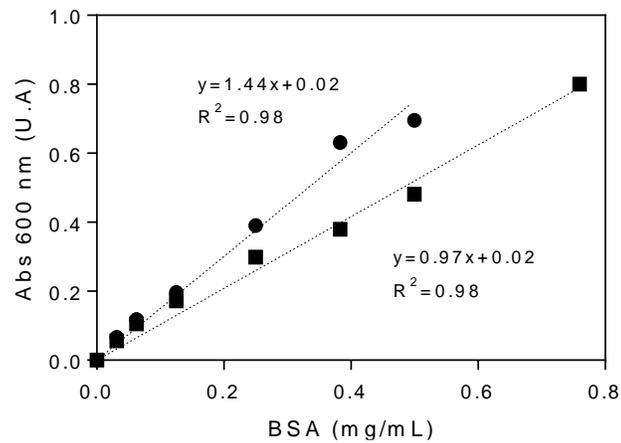
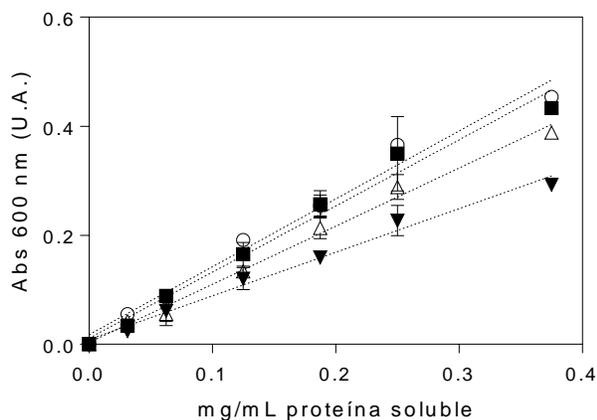


Figura 11-1. Curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) + IEF (1:5) (●) en un rango de 0 - 0.5 mg/mL y de BSA (■) en un rango de 0 - 0.75 mg/mL

11.2 Curvas estándar para proteína soluble en diferentes concentraciones de Gn•HCl



0 M	2 M	4 M	6 M
$Y = 1.25 \cdot X + 0.0175$	$Y = 1.21 \cdot X + 0.0109$	$Y = 1.07 \cdot X + 0.00315$	$Y = 0.801 \cdot X + 0.00850$

Figura 11-2. Curvas estándar de albumina de suero bovino (BSA) + 0 M (○), 2 M (■), 4 M (Δ), 6 M (▼) en un rango de 0-0.375 mg/mL

11.3 Caracterización a nivel matraz

La caracterización inicial a nivel matraz se realizó en matraces convencionales de 250 mL con 50 mL medio mineral descrito por Restrepo-Pineda *et al.* (2019), suplementado con glucosa, casaminoácidos y kanamicina, como se describió en Materiales y Métodos. En la Tabla 7-1 se encuentran los parámetros encontrados para la cinética de crecimiento a nivel matraz sin inducción y con inducción por temperatura al alcanzar aproximadamente 2.0 U.A.

En las primeras horas, antes de la inducción (6 h), la μ preinducción es de $0.43 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ para todos los cultivos realizados. Después de la inducción por temperatura, el cultivo entra en fase estacionaria (Figura 11.3. a). Los cultivos con inducción, alcanzan una biomasa máxima menor comparada con la que permanece a 30°C , de 1.66 ± 0.05 y $1.99 \pm 0.04 \text{ g/L}$, respectivamente (Tabla 11-1). Asimismo, en los perfiles de consumo de glucosa, se alcanzan concentraciones residuales finales de $9.06 \pm 0.4 \text{ g/L}$ y $8.84 \pm 0.31 \text{ g/L}$, respectivamente (Figura 11.3. b), pero el rendimiento $Y_{x/s}$, en el cultivo con inducción es 26% menor (0.17 ± 0.01 contra 0.23 ± 0.2 sin inducción). En ambos casos, hay limitación de oxígeno, reflejado en la Figura 11.3. c. Los cultivos con inducción muestran una reducción en densidad óptica en los últimos tiempos, que concuerda con el perfil de TOD, donde se muestra que la demanda de oxígeno para estos cultivos, fue menor en las últimas horas del cultivo. Además, en ambas condiciones, la limitación de oxígeno ocurre desde antes de la inducción. Restrepo-Pineda *et al.* (2019) realizaron estudios a nivel matraz y biorreactor para la producción del antígeno ESAT-6 en un sistema termoinducible de *E. coli* y encontraron que la glucosa no se consumía por completo a nivel matraz, a diferencia del nivel biorreactor, y que la glucosa podría no ser un factor limitante de crecimiento en los matraces, pero sí podría serlo, la limitación de oxígeno y/o la acumulación de acetato. Fragoso-Jiménez *et al.* (2019), menciona que la mayor producción de acetato en los matraces de agitación podría ser el resultado de la limitación de oxígeno y la falta de control del pH. Además, las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , no presentaron diferencias significativas entre la no inducida ($0.75 \pm 0.19 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$) y las termoinducidas ($0.89 \pm 0.13 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h}$) (Tabla 7-1). Este mismo comportamiento, fue reportado para matraces con y sin inducción por temperatura por Restrepo-Pineda *et al.* (2019).

La menor biomasa máxima alcanzada, el menor rendimiento $Y_{x/s}$, así como la disminución de la velocidad de crecimiento, podría deberse al desvío de flujos metabólicos para la síntesis de proteínas recombinantes (Bentley *et al.*, 2009). Además en sistemas de inducción por temperatura, a la síntesis de proteínas de

respuesta de choque térmico (Hoffmann *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2007, Restrepo-Pineda *et al.*, 2019).

Respecto al pH, en los cultivos con inducción, parece que se presenta una acidificación más rápida del medio y se alcanza un pH final de 4.96, comparado con 5.48 del cultivo sin inducción térmica (Figura 11.3 d), lo cual concuerda con la mayor acumulación de acetato en cultivos con inducción térmica (Restrepo-Pineda *et al.*, 2019). No obstante, estas mediciones no se realizaron por duplicado, por lo cual, podría no existir una diferencia significativa.

Tabla 11-1. Parámetros cinéticos estimados para cultivos de *E.coli* W3110 recombinante productora de rHuGM-CSF en matraces en agitación orbital, a 200 rpm con y sin inducción a 42°C

Parámetro	No inducido (30°C)	Inducido (42°C)
μ preinducción (h^{-1})	0.46 ± 0.01^a	0.42 ± 0.03^a
μ postinducción (h^{-1})	-	0.29 ± 0.02
biomasa máxima (g/L)	1.96 ± 0.04^a	1.66 ± 0.05^b
Glucosa residual (g/L)	9.06 ± 0.4^a	8.84 ± 0.31^a
qs ($(g_{glu}/g_{biomasa} \cdot h)$ pre estacionaria)	0.75 ± 0.19^a	0.89 ± 0.13^a
Acetato final	4.49 ± 0.7^a	3.85 ± 1.76^a
$Y_{x/s}$ ($g_{células}/g_{glucosa}$)	0.23 ± 0.02^a	0.17 ± 0.01^b
$Y_{ac/s}$ ($g_{acetato}/g_{glucosa}$)	0.50 ± 0.008^a	0.42 ± 0.18^a
pH final	5.48	4.96
$T_{DOT \rightarrow 0\%}$ (h)	10.1	8.4
Proteína total (g/L)	0.52 ± 0.05^a	0.42 ± 0.04^a
$Y_{p/x}$ ($g_{proteína}/g_{célula}$)	0.26 ± 0.05^a	0.42 ± 0.05^b

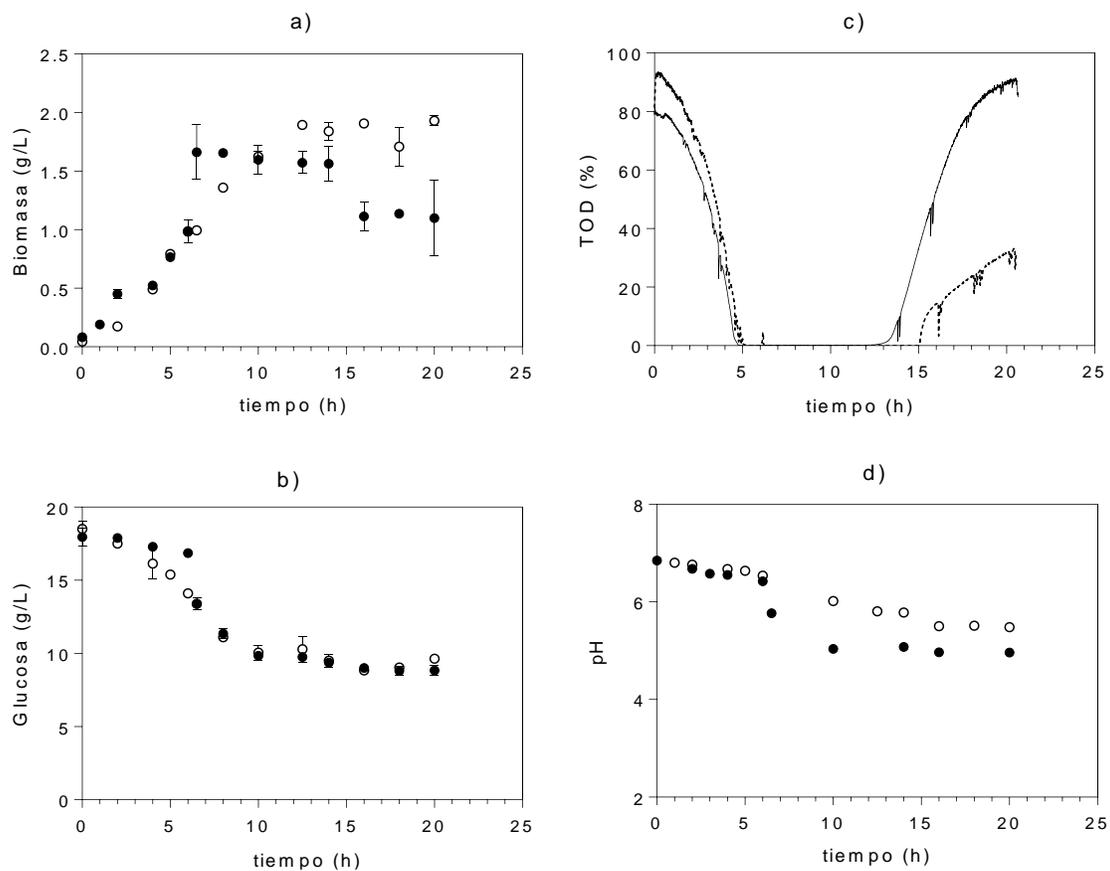
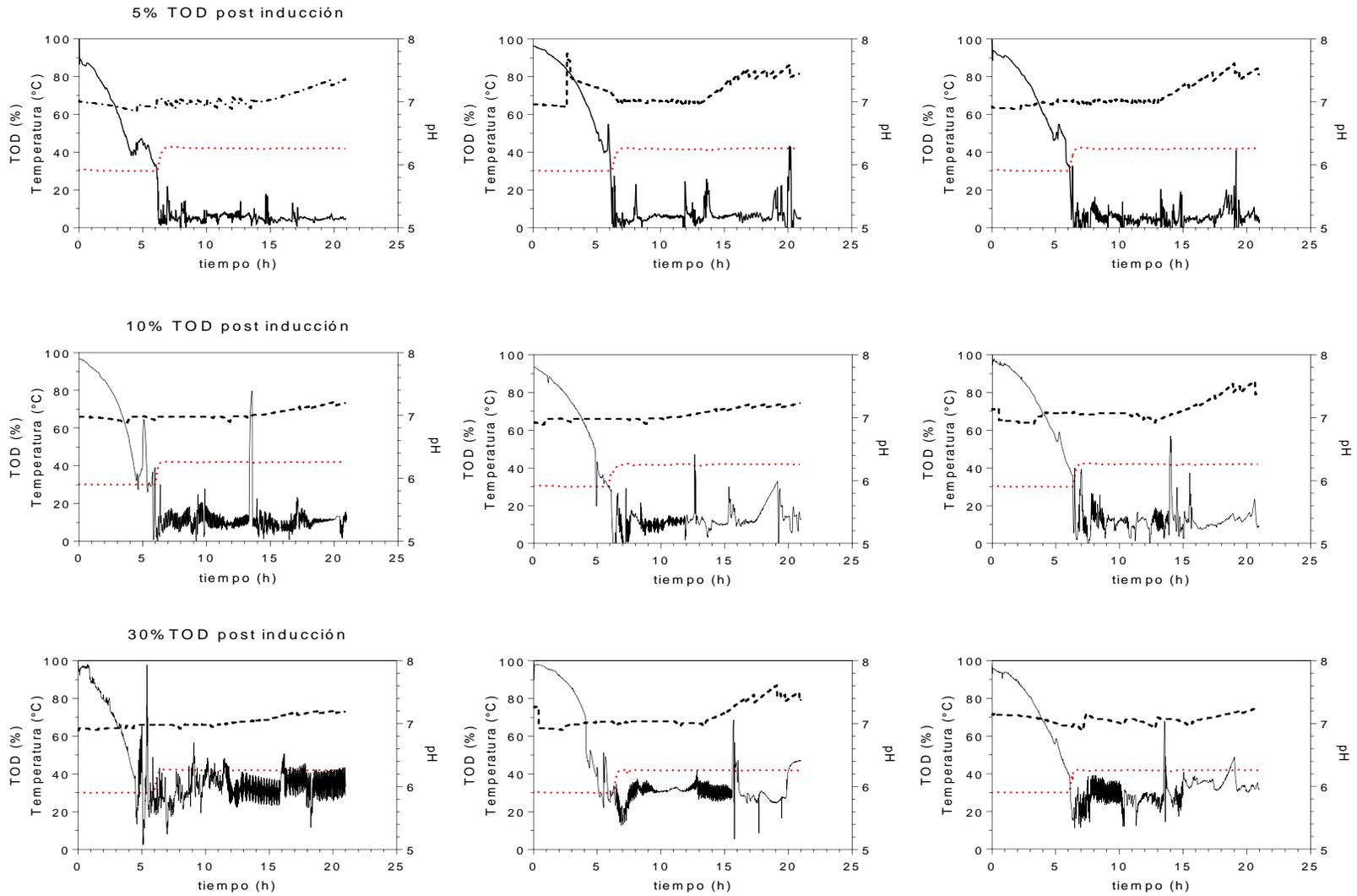


Figura 11-3. Cinéticas de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF a) Cinética de crecimiento (g/L), b) Glucosa residual en el medio (g/L), c) Perfiles de TOD (%), d) Perfiles de pH. Los cultivos a 30°C sin inducción, se muestran con (○) y TOD con línea punteada, y los inducidos a 42°C, se muestran con (●) y TOD con línea continua.

11.4 Perfiles de control



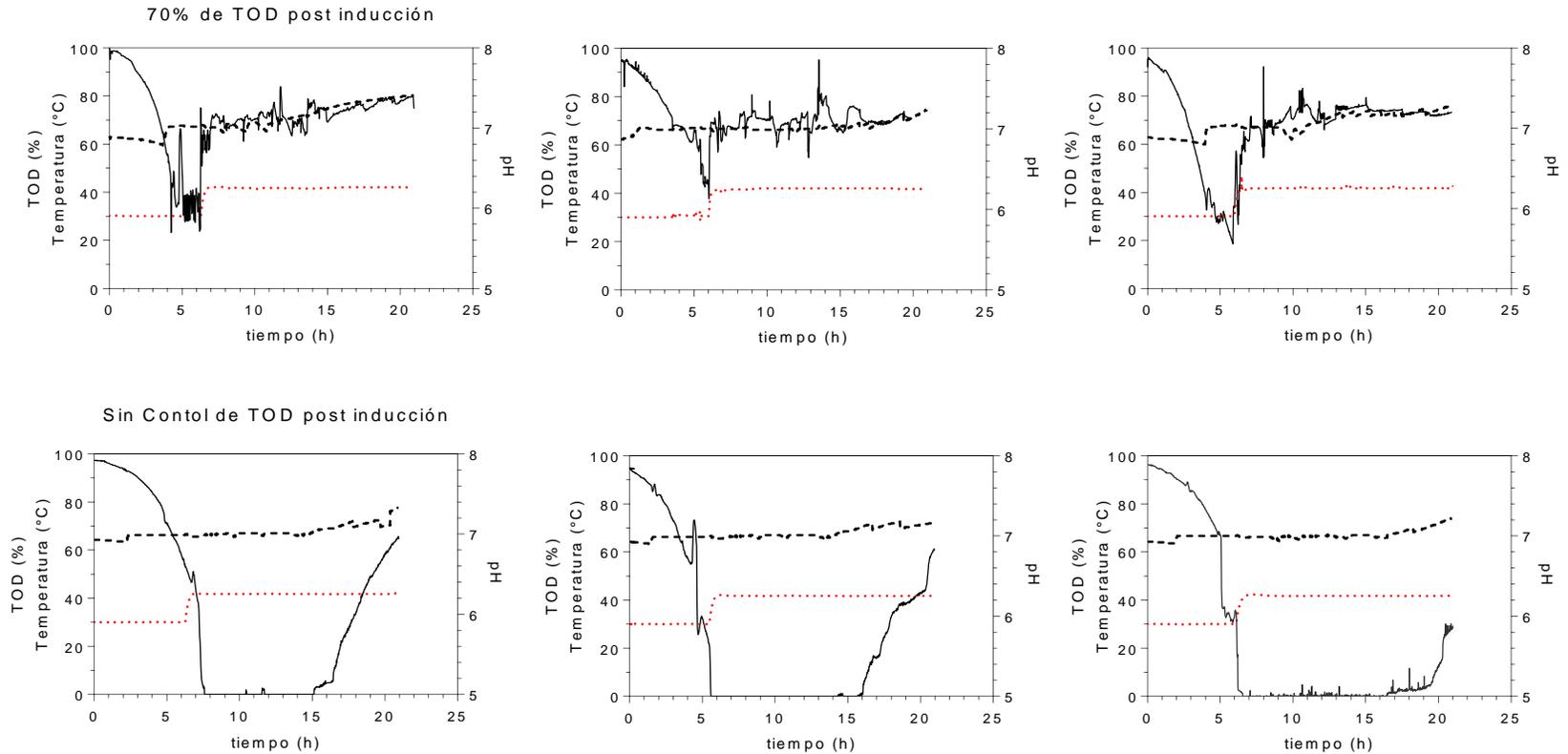


Figura 11-4. Perfiles de control de las cinéticas de crecimiento de *E.coli* recombinante productora de rHuGM-CSF. TOD: línea continua, temperatura: línea punteada, pH: línea intermitente. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD. Se muestran 3 réplicas biológicas por condición

11.5 Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa

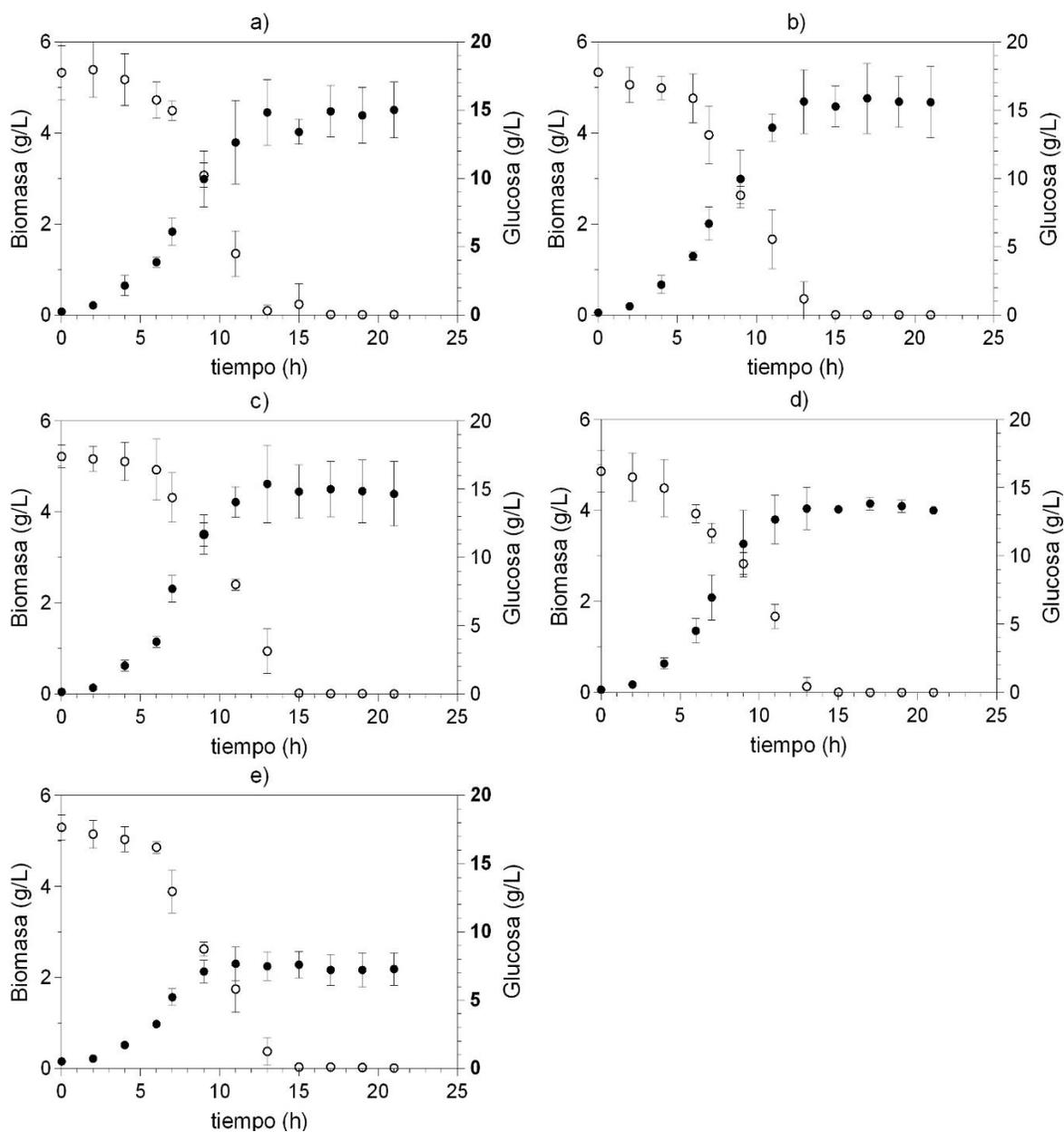


Figura 11-5. Cinéticas de crecimiento de *E. coli* W3110 recombinante como biomasa (g/L) (●) y consumo de glucosa (g/L) (○) en los diferentes esquemas de control de TOD postinducción. a) 5 % TOD, b) 10 %TOD c) 30% TOD, d) 70% TOD, e) Sin control de TOD.

11.6. Densitometría de geles de proteína total para condiciones con control de TOD postinducción

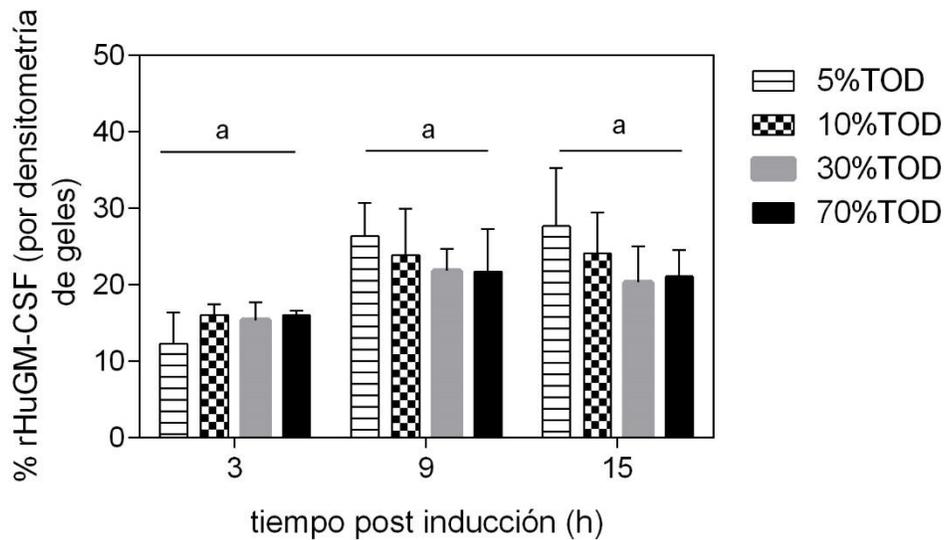


Figura 11-6. % rHuGM-CSF en proteína total por densitometría de geles en el programa Image Lab de BioRad, a diferentes tiempos postinducción y diferentes %TOD. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres réplicas técnicas provenientes de tres réplicas biológicas. El análisis estadístico por ANOVA de una sola vía se realizó por horas postinducción y se muestra con letras minúsculas. Misma letra: el resultado no es diferente de forma significativa ($p > 0.05$). Diferente letra: El resultado es diferente de forma significativa ($p < 0.05$).

11.7 Perfiles de degradación de CI con Proteinasa K

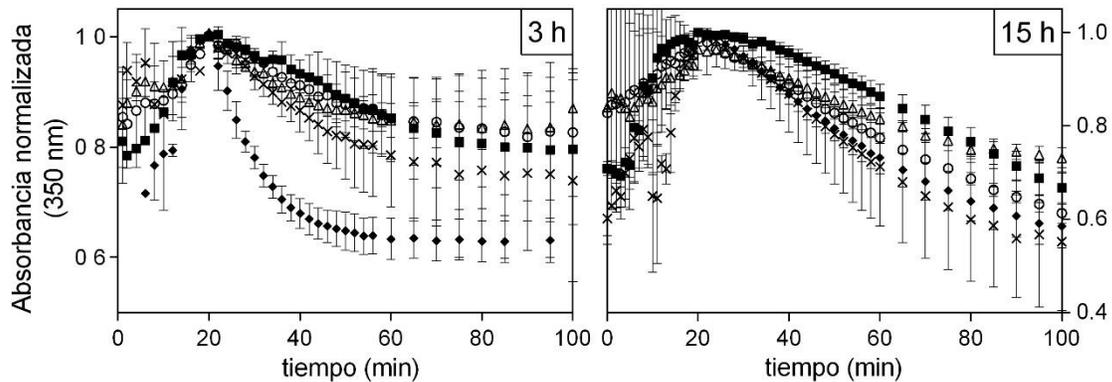


Figura 11-7. Perfiles de degradación con proteinasa K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de CI purificados, obtenidos a diferente control postinducción de %TOD post a 3 h y 15 h después de la inducción. Se muestra el promedio del triplicado de 3 réplicas técnicas, provenientes de 3 réplicas biológicas. Condiciones de control de TOD postinducción: (X) 70%, (o) 30%, (Δ) 10%, (\blacksquare) 5%, (\blacklozenge) Sin control.

Tabla 11-1. Análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías y comparaciones múltiples, para mínimos en 1626 cm^{-1} de los espectros IR de CI purificados obtenidos por diferentes condiciones de control de TOD postinducción.

3 h TI	¿Significativo?	valor P
70%TOD vs. 30% TOD	No	-
70%TOD vs. 10% TOD	No	-
70%TOD vs. 5%TOD	No	-
70%TOD vs. Sin control de TOD	No	-
30% TOD vs. 10% TOD	No	-
30% TOD vs. 5%TOD	No	-
30% TOD vs. Sin control de TOD	Si	P < 0.05
10% TOD vs. 5%TOD	No	-
10% TOD vs. Sin control de TOD	No	-
5%TOD vs. Sin control de TOD	No	-
15 h TI		
70%TOD vs. 30% TOD	No	-
70%TOD vs. 10% TOD	No	-
70%TOD vs. 5%TOD	No	-
70%TOD vs. Sin control de TOD	Si	P < 0.01
30% TOD vs. 10% TOD	No	-
30% TOD vs. 5%TOD	No	-
30% TOD vs. Sin control de TOD	Si	P < 0.5
10% TOD vs. 5%TOD	No	-
10% TOD vs. Sin control de TOD	Si	P < 0.01
5%TOD vs. Sin control de TOD	Si	P < 0.01

Tabla 11-11-2. Análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías y comparaciones múltiples, para resultados de fluorescencia de Th-T tras la unión a CI obtenidos por diferentes condiciones de control de TOD postinducción.

	¿Significativo?	Valor P
3 h de inducción con temperatura		
5% TOD vs. 10% TOD	No	-
5% TOD vs. 30% TOD	Si	P < 0.01-
5% TOD vs. 70% TOD	Si	P < 0.05
5% TOD vs. Sin Control	Si	P < 0.05
10% TOD vs. 30% TOD	Si	P < 0.01
10% TOD vs. 70% TOD	No	-
10% TOD vs. Sin Control	No	-
30% TOD vs. 70% TOD	Si	P < 0.01
30% TOD vs. Sin Control	Si	P < 0.01
70% TOD vs. Sin Control	No	-
15 h de inducción con temperatura		
5%TOD vs. 10% TOD	No	-
5%TOD vs. 30% TOD	Si	P < 0.01
5%TOD vs. 70%TOD	Si	P < 0.01
5%TOD vs. Sin Control	No	-
10% TOD vs. 30% TOD	Si	P < 0.01
10% TOD vs. 70%TOD	Si	P < 0.01
10% TOD vs. Sin Control	No	-
30% TOD vs. 70%TOD	Si	P < 0.01
30% TOD vs. Sin Control	Si	P < 0.01
70%TOD vs. Sin Control	Si	P < 0.01