



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA
ESCOLA D'ENGINYERIA

**Millora de soques i estudi d'estratègies de
procés per a la producció de Fuculosa-1-
fosfat aldolasa recombinant activa en**

Escherichia coli

Memòria que per optar al grau de doctor per la

Universitat Autònoma de Barcelona presenta

Cristina Sans i Duran

sota la direcció i supervisió de

Dr. Josep López Santín

Dr. Pau Ferrer Alegre

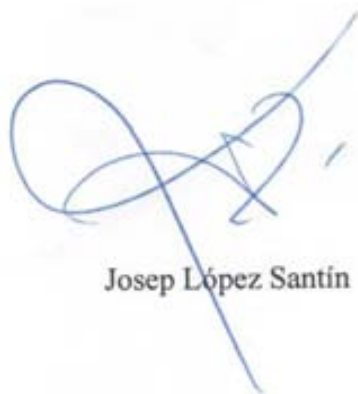
Dr. Gregorio Álvaro Campos

23 de Setembre de 2011


Josep López Santín, com a catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, Gregorio Álvaro Campos i Pau Ferrer Alegre, com a professors agregats del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFIQUEM: Que la llicenciada Cristina Sans Duran ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball que amb el títol “Millora de soques i estudi d'estratègies de procés per a la producció de Fuculosa-1-fosfat aldolasa activa en *Escherichia coli*” presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva tesi per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem i apadrinem davant de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentat treball, signant aquesta certificació a Cerdanyola del Vallès el dia 23 de Setembre de 2011.



Josep López Santín



Gregorio Álvaro Campos



Pau Ferrer Alegre

A l'Alex i als meus pares

AGRAÏMENTS

Es diu que quan tens un somni, l'univers sencer conspira perquè el puguis realitzar. En el cas de la tesi que tens entre les mans, per tal que es convertís en una realitat, l'univers va col·locar en el camí una sèrie de persones clau que voldria recordar.

En primer lloc, m'agradaria agrair la oportunitat que em van donar el Goyo i el Josep de formar part del grup d'aldolases del departament d'Enginyeria Química. D'altra banda, us dono les gràcies pel vostre suport com a directors en aquest llarg camí, juntament amb el Pau, tres punts de vista diferents i enriquidors a la tesi. La participació del David en una part de la tesi va ser vital, des d'aquí a tots: moltíssimes gràcies!

Tot seguit, m'agradaria destacar a la resta "d'aldolaseros" que m'han acompanyat activament en aquest llarg viatge : Carmen, Inés, Juanmi, Jordi, Alfred, Milja, Max, Natasa, Marcel·la, Daniel, Rosmery, Dolors, Glòries i Carles. Quantes hores treballant plegats!

Com a suport moral, no m'agradaria oblidar la gent amb qui he compartit dinars i més d'alguna vetllada: Beléns, Roger, Joan, Sergio, Jero, Torà, Marcel, Engràcia, Carlota, Carol, Lorena, Ernest, Laura, Martí, Enric, Marta C, Kristin, Marc, Edu, Marcos, Marc C, Margot, Núria A, Núria M, Cynthia, Natalia, Marina, Xavi, Joel, Anna, Elena... i a tots els que formeu part d'aquesta gran família: el Departament d'Enginyeria Química. I als veterans que van deixar-nos tot el seu llegat, a més d'algun savi consell: Jaume, Trinitat, Anna S, Anna M, Anna U...i sobretot, a la Rosi, la més veterana, però que viu la seva professió com el primer dia i ens fa a tots la rutina més agradable.

En segon lloc, m'agradaria donar les gràcies al grup del Dr. Villaverde de l'IBB, especialment a l'Elena, sempre disposada a assessorar-me científicament i a contagiar les seves bones vibracions, tal com ella diu. Per cert, gràcies pel plasmidi pTVP1GFP. I

evidentment al Toni, aportant sempre una visió positiva dels resultats. De l'IBB, voldria destacar també l'ajut del Dr.Piñol, no tan sols per cedir-nos el plasmidi pET21a, sinó pels seus savis consells a nivell de transposons.

En tercer lloc, voldria recordar la beca DAAD que va fer possible l'estada a Hannover (Alemanya) en col·laboració amb la Dra.Rinas, àlies Uschi, al Institut für Technische Chemie (Leibniz Universität). "Ich möchte TCI danken: Ana, Carola, Daniel, Maria, Mariana, Olga und Víctor".

I ja en el tram final de la tesi, agraeixo la possibilitat que em va donar l'empresa Sysmex de formar-ne part. L'entusiasme que em va transmetre em va donar la força necessària per superar els últims esculls.

Pel que fa al suport emocional i incondicional, els que es mereixerien tota una tesi dedicada a ells: els meus pares sempre al meu costat dient-me que no fos tan "agonia"... i a l'Alex: sobren les paraules, ja ho saps, ets el meu motor.

Per acabar, m'agradaria recordar als meus avis, que durant el temps que han estat aquí, m'han transmès el seu esperit de lluita (Quim, Teresa, Miquel i Anna), així com també els meus familiars, que malgrat no entendre què feia realment l'estranya de la seva neboda i cosina, m'han anat acompanyat al llarg del procés: Josep, Sara, Mariona, Adrià, Laura, Irene, Tura, Agustí, Mònica, Lluís, Clàudia, Bernat, Teresa, Joan, Anna, Marc, Júlia, Janina, Àngel, Maria Àngels, Josep i Judit.

I finalment, ara sí, a tots aquells que m'heu recordat en moments crítics que, a banda de la feina existeixen altres coses a la vida: Elisabet, David, Mireia, Roger, Pep, Salut, Marta, Glòria, Núria G, Miquel, Elisenda, David T, Assun, Leo, Àngels, Edu, Míriam, David G, Sus, Siscu, Anna, Sergi, M^a Àngels, Antonio, Toni, Larisa, Daniela, Francesc, Rosa, Sara, Paula, Agustí, Anna M^a, Quim, Alberto, Ana, Mari, Carlos, Jose, Encarni, David C i Cecília. A TOTS VOSALTRES, US DEDICO AQUESTA TESI.

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	pàg. vi
SINOPSI.....	pàg. 1
NOMENCLATURA.....	pàg. 3
PRÒLEG.....	pàg. 6
CAPÍTOL 1.INTRODUCCIÓ GENERAL	pàg. 7
1.1. Biotecnologia industrial i economia	pàg. 7
1.2. Expressió de proteïnes recombinants en <i>Escherichia coli</i>	pàg. 9
1.3. Disseny del bioprocés.	pàg. 12
1.3.1. Sistema d'expressió: tàndem hoste-vector	pàg. 13
1.3.2. Estratègia de producció.....	pàg. 18
1.3.3. Estratègia de purificació	pàg. 21
1.3.4. Obtenció de la proteïna Fuculosa-1-fosfat aldolasa.....	pàg. 22
1.4. Aldolases i reaccions aldòliques	pàg. 24
1.5. Antecedents: visió general.	pàg. 31
1.6. Context i objectius de la tesi.....	pàg. 35
1.7. Referències	pàg. 37
CAPÍTOL 2. MATERIALS I MÈTODES	pàg. 46
2.1. Soques bacterianes i plasmidis	pàg. 46
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> M15.....	pàg. 46
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> M15 Δ glyA.....	pàg. 46
2.1.3. <i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF'	pàg. 47
2.1.4. <i>Escherichia coli</i> Origami	pàg. 47
2.1.5. <i>Escherichia coli</i> JGT20 (DnaK ⁻)	pàg. 48
2.1.6. Plasmidi pREP-4	pàg. 49
2.1.7. Plasmidi basats en pQE-40: pQEfucA i pQE α Brham	pàg. 50
2.1.8. Plasmidi pET21a	pàg. 53
2.1.9. Plasmidi pTrcHis.....	pàg. 54
2.1.10. Plasmidi pTVP1GFP	pàg. 55
2.2. Tècniques de DNA recombinant	pàg. 57
2.2.1. Extracció i aïllament de DNA plasmídic	pàg. 57
2.2.2. Visualització i quantificació de DNA.....	pàg. 57
2.2.3. Amplificació de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa.....	pàg. 58
2.2.4. Modificacions enzimàtiques de DNA.....	pàg. 60
2.2.5. Transformació d' <i>E. coli</i> per electroporació.....	pàg. 61
2.3. Medis i condicions de cultiu.....	pàg. 63
2.3.1. Procediment productiu segons la fracció	pàg. 63
2.3.2. Creixement en matrassos d'Erlenmeyer	pàg. 65
2.3.3. Creixement en fermentador.....	pàg. 66
2.4. Mètodes analítics per al seguiment del cultiu.....	pàg. 68
2.4.1. Mesures de densitat òptica (DO)	pàg. 68
2.4.2. Determinació de la concentració de glucosa	pàg. 69
2.5. Mètodes d'anàlisi i quantificació de proteïnes	pàg. 70
2.5.1. Aïllament de la FucA expressada en forma soluble	pàg. 70
2.5.2. Purificació de la FucA en forma de cossos d'inclusió	pàg. 70
2.5.3. Quantificació proteica.....	pàg. 72
2.5.4. Determinació de l'activitat enzimàtica de fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA).....	pàg. 73
2.5.5. Reacció d'addició aldòlica entre dihidroxiacetona fosfat (DHAP)	

i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA	pàg. 76
2.6. Tècniques d'immobilització	pàg. 80
2.6.1. Immobilització en forma de CLEA (Cross-linked Enzyme Aggregates)	pàg. 80
2.6.2. Immobilització per encapsulament a partir de tecnologia Lentikat® (Genialab)	pàg. 82
2.7. Referències	pàg. 85

CAPÍTOL 3. PRODUCCIÓ DE L'ALDOLASA FUCULOSA-1-FOSFAT RECOMBINANT EN *ESCHERICHIA COLI* MITJANÇANT UNA SOCA AUXOTRÒFICA PER A LA GLICINA

3.1. Introducció	pàg. 87
3.2. Materials i mètodes	pàg. 89
3.2.1. Soques, plasmidis i estratègia emprades	pàg. 89
3.2.2. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en Erlenmeyer	pàg. 90
3.2.3. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius fermentador operant en discontinu alimentat	pàg. 91
3.3. Resultats i discussió	pàg. 92
3.3.1. Desenvolupament de la construcció M15 Δ glyA/pQE α fucA	pàg. 92
3.3.2. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en matrassos d'Erlenmeyer	pàg. 95
3.3.3. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en fermentador	pàg. 102
3.4. Conclusions	pàg. 106
3.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits	pàg. 106
3.4.2. Motivacions	pàg. 107
3.5. Referències	pàg. 108

CAPÍTOL 4. MILLORA DEL SISTEMA D'EXPRESSIONIÓ BASAT EN UN MARCADOR D'AUXOTROFIA PER A LA GLICINA

4.1. Introducció	pàg. 110
4.2. Materials i mètodes: Soques i estratègies emprades	pàg. 118
4.2.1. Primera estratègia	pàg. 119
4.2.2. Segona estratègia	pàg. 120
4.3. Resultats i discussió	pàg. 122
4.3.1. Estudi de l'origen dels elevats nivells de SHMT	pàg. 123
4.3.2. Eliminació del pREP-4 de la soca hoste	pàg. 123
4.3.3. Reconstrucció del plasmidi i fusió del gen <i>glyA</i> amb <i>rrn T1B</i>	pàg. 126
4.3.4. Producció de FucA en matrassos d'Erlenmeyer	pàg. 127
4.3.5. Producció de FucA en fermentador en cultiu discontinu alimentat de la soca M15 Δ glyApQE α fucAT1	pàg. 130
4.4. Conclusions	pàg. 138
4.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits	pàg. 138
4.4.2. Motivacions	pàg. 139
4.5. Referències	pàg. 140

CAPÍTOL 5. REINCORPORACIÓ DEL REPRESSOR *LAC I* PER A L'OBTENCIÓ D'UN SISTEMA D'EXPRESSIONIÓ BASAT EN UN MARCADOR AUXOTRÒFIC PER A LA GLICINA AMB UN ÚNIC GEN DE RESISTÈNCIA A ANTIBIÒTIC

5.1. Introducció	pàg. 143
5.2. Materials i mètodes: Soques, plasmidis i estratègia emprades	pàg. 146
5.3. Resultats i discussió	pàg. 147

5.3.1. Desenvolupament de la construcció	pàg. 147
5.3.2. Producció de FucA en cultius d'Erlenmeyer.....	pàg. 150
5.3.3. Producció de FucA en fermentador en discontinu alimentat de la soca M15 Δ glyA/ pQE α fucAT1Lacl	pàg. 154
5.4. Conclusions	pàg. 158
5.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectis assolits	pàg. 158
5.4.2. Perspectives de futur.....	pàg. 160
5.5. Referències	pàg. 161
CAPÍTOL 6. PRODUCCIÓ DE LA FUC A EN FORMA DE COSSOS D'INCLUSIÓ ACTIUS I APLICACIÓ D'AQUESTS EN REACCIONS DE SÍNTESI ESTEREOSELECTIVES.....	
6.1. Introducció	pàg. 163
6.2. Materials i Mètodes	pàg. 167
6.2.1. Expressió de FucA en JGT20, XL1 Blue i Origami	pàg. 167
6.2.2. Cultius en matrassos d'Erlenmeyer	pàg. 168
6.2.3. Desenvolupament dels primers assaigs de la reacció d'addició aldòlica	pàg. 168
6.3. Resultats i Discussió	pàg. 169
6.3.1. Avalució de l'activitat biològica i quantitat de FucA obtingudes en forma d'IBs mitjançant les soques utilitzades.....	pàg. 169
6.3.2. Estudis dels IBs a com a biocatalitzadors en una reacció d'addició aldòlica	pàg. 169
6.4. Conclusions	pàg. 175
6.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.....	pàg. 178
6.4.2. Motivacions.....	pàg. 179
6.5. Referències	pàg. 181
CAPÍTOL 7. OBTENCIÓ DE COSSOS D'INCLUSIÓ EN FERMENTADOR I PURIFICACIÓ MITJANÇANT MÈTODES ALTERNATIUS.....	
7.1. Introducció	pàg. 186
7.2. Materials i Mètodes	pàg. 190
7.3. Resultats i Discussió	pàg. 192
7.3.1. Estudis previs en Erlenmeyer	pàg. 192
7.3.2. Fermentació en discontinu per a l'obtenció de cossos d'inclusió.....	pàg. 193
7.3.3. Purificació dels cossos d'inclusió mitjançant diversos mètodes de disrupció	pàg. 195
7.4. Conclusions	pàg. 203
7.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius assolits	pàg. 203
7.4.2. Motivacions.....	pàg. 204
7.5. Referències	pàg. 205
CAPÍTOL 8. RE-DIRECCIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE FUC A CAP A COSSOS D'INCLUSIÓ	
8.1. Introducció	pàg. 207
8.2. Materials i Mètodes	pàg. 210
8.2.1. Soques, plasmidis i estratègia emprades	pàg. 210
8.2.2. Particularitats en les condicions de cultiu	pàg. 211
8.2.3. Purificació estandaritzada dels cossos d'inclusió	pàg. 211
8.3. Resultats i Discussió	pàg. 212
8.3.1. Producció de FucA amb la construcció M15 Δ glyApQE α fucAT1VP1	pàg. 212
8.3.2. Estudis dels cultius en Erlenmeyer en els medis DNB i S-DAB.....	pàg. 212

8.3.3. Fermentació en discontinu amb el medi DNB per a la producció d'IB.....	pàg. 216
8.4. Conclusions	pàg. 221
8.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.....	pàg. 221
8.4.2. Motivacions.....	pàg. 221
8.5. Referències	pàg. 223
CAPÍTOL 9. PREPARACIÓ DE BIOCATALITZADORS IMMOBILITZATS BASATS EN COSSOS D'INCLUSIÓ PER A LA SEVA APLICACIÓ EN REACCIONS DE SÍNTESI ESTEREOSELECTIVES	
9.1. Introducció	pàg. 229
9.2. Materials i Mètodes	pàg. 230
9.3. Resultats i Discussió	pàg. 230
9.3.1. Immobilització per entrecreuament amb glutaraldehid	pàg. 230
9.3.2. Mètode d'encapsulament per tecnologia Lentikat®	pàg. 233
9.3.3. Ús dels IB com a biocatalitzadors en síntesi	pàg. 234
9.4. Conclusions	pàg. 237
9.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.....	pàg. 238
9.5. Referències	pàg. 239
CAPÍTOL 10. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR.....	
ANNEXES	
A1. Calibracions dels mètodes analítics	pàg. 244
A2. Identificació del transposó a la seqüència dels plasmidis pQE α rham, pQE α fucA i pREP4	pàg. 245
A2.1. Plasmidi pQE α rham (2568 pb-5401 pb)	pàg. 246
A2.2. Plasmidi pQE α fucA (1526 pb-4695 pb)	pàg. 248
A2.3. pREP4 (2565 pb- 3740 pb)	pàg. 250
A3. Càlcul dels mg de FucA en cada fracció	
A3.1. Concentració de proteïna (mg de proteïna /mL).....	pàg. 251
A3.2. Quantitat de pes sec (g/L)	pàg. 252
A3.3. Càlcul de l'error estàndard	pàg. 252

SINOPSI

Aquest treball de tesi doctoral s'engloba dins la coneguda Biotecnologia Blanca, concretament en el camp de la Producció de Proteïnes Recombinants. Les aplicacions d'aquesta àrea de coneixement en processos industrials es basa en el disseny de microorganismes per obtenir productes d'alt valor afegit. En aquest cas, el microorganisme productor és *Escherichia coli* i la proteïna d'interès es tracta de Fuculosa-1-fosfat aldolasa, enzim que catalitza estereoselectivament reaccions d'addició aldòlica.

Per una banda, s'han dut a terme diverses modificacions a nivell de plasmidi per tecnologia de DNA recombinant a fi de millorar un sistema d'expressió auxotròfic per la glicina. Aquestes millores no tan sols han anat enfocades a l'increment dels nivells de producció de la proteïna d'interès, sinó també a la obtenció d'un sistema d'expressió segur, simplificat i estable. El creixement i producció de la Fuculosa-1-fosfat aldolasa mitjançant les soques modificades han estat efectuats en matrassos d'Erlenmeyer i en fermentadors operant en discontinu alimentat quan s'ha requerit.

Per altra banda, l'expressió de la proteïna d'interès en forma de cossos d'inclusió, a banda de soluble, ha permès obtenir alts nivells de Fuculosa-1-fosfat pura i activa. L'aplicació d'aquests cossos d'inclusió prèviament immobilitzats per encapsulament mitjançant la tecnologia Lentikat® en una reacció estereoselectiva d'addició aldòlica ha donat com a resultat un biocatalitzador actiu, robust i estable a llarg termini.

Per tant, es tracta d'una petita aportació en la biotecnologia industrial que intenta conceptualitzar el bioprocés de manera hol·lística tot fusionant diverses àrees de coneixement. Tot i que no s'ha realitzat una avaluació econòmica del procés, consideracions tals com la possibilitat de reutilització del biocatalitzador han estat contemplades, per tal que el resultat fos atractiu industrialment parlant.

NOMENCLATURA

ARG: Gens de resistència a antibiòtic

CAP: Proteïna repressora per catabòlit.

CLE: Cross-linked Enzyme (Enzim Immobilitzat per Entrecreuament).

CLEC: Cross-linked Enzyme Crystals (Cristalls Immobilitzats per Entrecreuament).

CLEA: Cross-linked Enzyme Aggregates (Agregats Immobilitzats per Entrecreuament).

DHAP: dihidroxiacetonafosfat.

DMF: N,N-Dimetilformamida.

DNB: Brou no inductiu (de l'anglès "Defined Non Inducing Broth").

dsDNA: DNA de doble cadena (de l'anglès double strand).

DO: densitat òptica.

EDTA: àcid etilendiaminotetracètic.

EFSA: European Food Safety Authority.

FLP: recombinasa.

FRT: lloc d'unió a la recombinassa (FLP).

FSC: dispersió *forward* (paràmetre de citometria de fluxe)

FT-IR: Espectrometria d'infraroig per transformada de Fourier.

FucA o Fuc-1-PA: fuculosa-1-fosfat aldolasa.

***fucA*:** gen que codifica per la fuculosa-1-fosfat aldolasa.

α -GDH: α -glicerofosfat deshidrogenasa.

G3P: D-gliceraldehid-3-fosfat.

GFP: (de l'anglès Green fluorescence protein). Proteïna de fluorescència verda.

GlyA: glicina hidroximetiltransferasa.

glyA: gen que codifica per GlyA/SHMT.

IB o IBs: cos o cossos d'inclusió

IPTG: isopropil- β -tiogalactopiranosid.

Ks: constant de saturació (g/L).

Ksi: constant d'inhibició per substrat (g/L).

LB: medi complex Luria Bertoni.

m: coeficient de manteniment

MCS: Multiple cloning site (lloc de clonatge múltiple).

MD: medi definit.

p/v: pes/ volum.

NP-40: nonil-fenoxipolietioxiletanol.

PMSF: fluorur de fenilmetilsulfonil.

Rham-1-PA o RhuA: rhamnulosa-1-fosfat aldolasa.

RNA_m: RNA missatger.

S: concentració de substrat (g/L)

S₀: concentració de substrat al temps d'inoculació (g/L).

S-DAB: (de l'anglès "Smart"-Defined Autoinduction Broth): Brou definit autoinductiu.

SDS: (de l'anglès sodium dodecil sulfat) lauril sulfat sòdic.

SDS-PAGE: electroforesi discontinua desnaturalitzant en gel de poliacrilamida-SDS.

SHMT: serina hidroximetil transferasa.

SOE-PCR: (de l'anglès Splicing by Overlap Extension PCR)

Tris: hidroximetilaminometà.

UA: unitat d'activitat.

UV: ultraviolat.

ufc: unitats formadores de colònies.

$Y_{x/\text{glucosa}}$: rendiment de glucosa a biomassa (g biomassa seca per g glucosa).

μ : velocitat específica de creixement (h^{-1}).

$\mu_{\text{màx}}$: velocitat específica màxima de creixement (h^{-1}).

PRÒLEG

Aquesta tesi ha estat emmarcada dins un projecte de recerca del grup d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada. Es tracta de la producció de proteïnes recombinants, concretament, Fuculosa-1-fosfat aldolasa, mitjançant dues línies de recerca centrals: el disseny de soques productores que permeten produir la proteïna d'interès de manera soluble, i l'avaluació del cossos d'inclusió com a alternativa productiva. Tot i que ésser dos eixos independents, s'entrellacen entre sí, de manera que es donen interrelacions constants entre els diversos capítols. Conseqüentment, algunes de les informacions poden resultar redundants pel lector.

El treball consta de deu capítols que inclouen una introducció general (capítol I), uns materials i mètodes generals (capítol II) i unes conclusions generals (capítol X).

En el capítol III, es construeix una primera soca auxotròfica per glicina que permet produir FucA recombinant utilitzant el gen *glyA* d'*E. coli* com a marcador de manteniment del vector d'expressió. En el capítol IV, aquesta soca és millorada des d'un punt de vista quantitatiu pel que fa a la quantitat de proteïna d'interès obtinguda. Les millores qualitatives relacionades amb la millora del sistema d'expressió són desenvolupades al llarg del capítol V.

En el capítol VI, s'avalua l'activitat biològica dels cossos d'inclusió i aquests són aplicats en biocatàlisi. La seva obtenció i purificació s'estudia en el capítol VII i posteriorment, es decideix redirigir l'expressió de la proteïna d'interès cap a cossos d'inclusió (capítol VIII). En el capítol IX, els cossos d'inclusió són immobilitzats i avaluats com a biocatalitzador.

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ GENERAL.

1.1. Biotecnologia industrial i economia.

La biotecnologia industrial, altrament coneguda com a biotecnologia blanca, consisteix en l'ús modern i aplicació de la biotecnologia a la producció sostenible de compostos biològics, biomaterials i biocombustibles a partir de fonts renovables, usant cèl·lules vives i/o els seus enzims, amb un mínim de generació de residus i energia (EuropaBioReport 2006).

Les oportunitats en aquest camp creixen a gran velocitat degut a la incorporació de la genòmica, la genètica molecular, l'enginyeria metabòlica i la catàlisi. Amb l'aplicació d'aquests coneixements, les cèl·lules poden ser usades com a micro-fàbriques, les quals poden ser optimitzades en termes de productivitat, seguretat i càrrega mediambiental.

Tot i que entre 2008 i 2009, les inversions europees van experimentar una pèrdua econòmica important de 913 milions de dòlars a 288 milions de dòlars a causa de la retallada de costos i l'eliminació de companyies no rendibles com a conseqüència de la crisi, els informes econòmics reflecteixen una recuperació de les inversions que s'estimen en 540 milions de dòlars durant el 2011 (www.ey.com). Les previsions per al 2015 destaquen un creixement global que, en el cas del mercat dels enzims podria arribar al 6.5 % anual (Reiss, 2007).

Les bases de la biotecnologia industrial es troben en la tecnologia de la fermentació i la biocatàlisi.

La biocatàlisi és una eina poderosa per a la síntesi de fàrmacs òpticament purs, als quals seria complicat accedir mitjançant la via química convencional.

El procés biocatalític pot generar beneficis tot millorant la sostenibilitat i reduint l'impacte ambiental. Tot i que *a priori* sembla complicat que un procés biocatalític pugui competir econòmicament amb un procés químic convencional, la reducció de costos de procés es pot aconseguir a partir de millores en la productivitat i la optimització del procés. El fet de millorar, per exemple, l'activitat específica i la productivitat del biocatalitzador pot donar lloc a un efecte positiu significatiu en la productivitat volumètrica (g producte/ L/hora).

1.2. Expressió de proteïnes recombinants en *Escherichia coli*.

Les proteïnes recombinants han guanyat importància en aplicacions durant els últims anys. Els primers productes recombinants en *E. coli* van ser produïts fa uns vint anys, concretament la somatostatina i la insulina van entrar al mercat als anys 80.

Fins el dia d'avui, un gran nombre de productes ha estat desenvolupat i produït al mercat usant diferents sistemes d'expressió microbians i alguns d'ells estan encara en desenvolupament. Segons alguns autors, els beneficis que representen les cèl·lules microbianes, com ara un creixement ràpid, una manipulació senzilla i una expressió eficient dels gens diana, hostes generats per enginyeria genètica i noves classes de productes, incrementaran el valor dels sistemes microbians a la indústria biotecnològica del futur (Baneyx et al., 1999; Walsh et al., 2003; Graumann i Premstaller, 2006).

En concret, *E. coli* representa un dels hostes més competitius per a una producció ràpida i econòmica de proteïnes recombinants simples, aminoàcids i metabòlits (Noronha et al., 2000). D'altra banda, el seu elevat coneixement tant pel que fa a la seva genètica com al seu metabolisme, el converteixen en un hoste útil per tal de produir compostos complexes i d'alt valor afegit. Com a exemples il·lustratius, tenim el cas de la insulina recombinant o l'activador plasminògen de teixit mutant (r-tPA mutant), entre d'altres.

E. coli compta amb diverses estratègies d'expressió, concretament tres: citoplasmàtica, periplasmàtica i de secreció.

Pel que fa a l'estratègia citoplasmàtica, el producte s'expressa en forma soluble o bé en forma d'agregats (Graumann i Premstaller, 2006), depenent de les propietats intrínseques de la seqüència proteica o peptídica, però també de la força del promotor (dèbil o fort) i dels paràmetres de la fermentació (temperatura i velocitat de creixement).

Les estratègies d'expressió soluble en el citoplasma bacterià són àmpliament emprades (Ponniah et al., 2010, Tomala et al., 2010, Bals et al., 2011), però tenen com a inconvenients l'increment de degradació proteolítica, la metilació a N-terminal i els procediments tediosos d'aïllament i purificació del producte, el qual forma part d'una mescla complexa de components cel·lulars (Graumann i Premstaller, 2006).

Les estratègies d'expressió en forma d'agregats insolubles o cossos d'inclusió es deu principalment a la solubilitat limitada i a la manca de sistemes de xaperona a l'hoste procariota (Baneyx et al., 2004; Carrió et al., 2001; Fahnert et al., 2004). Els cossos d'inclusió han estat descrits com a agregats proteics densos, refràctils, altament hidratats, resistent a la proteòlisi, constituïts majoritàriament per la proteïna recombinant (formant part d'aquests, però, també podem trobar altres proteïnes, components ribosomals i una petita proporció de fosfolípids i àcids nucleics). Poden presentar una morfologia molt variable (Fig. 1.1) i poden ésser tant citoplasmàtics com periplasmàtics (García-Fruitós et al., 2007). D'altra banda, cal esmentar que els cossos d'inclusió bacterians presenten propietats estructurals semblants a les fibres amiloides (estructura ordenada, majoritàriament en forma de fulla β i orientació antiparal·lela de les cadenes). També s'ha vist que l'agregació proteica *in vitro* de cossos d'inclusió és un fenomen selectiu i específic, similar a la formació d'estructures amiloides (García-Fruitós et al., 2005).

Aquest mode de producció es tracta amb més profunditat en bona part d'aquest treball i s'analitza com a alternativa a la obtenció de proteïna recombinant de manera soluble.

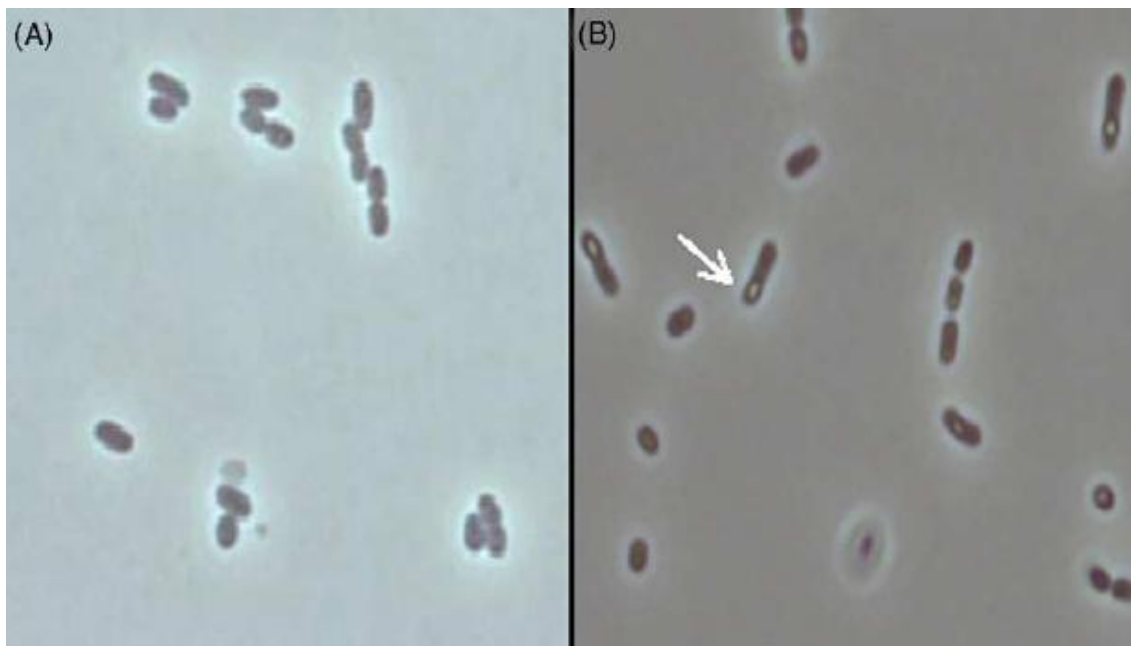


Fig. 1.1. Imatges obtingudes mitjançant un microscopi òptic a partir de l'observació de cèl·lules MC1061/PJCO46 (A) i MC1061/pJTVPI1LAC (B) preses 5 h després de la inducció de l'expressió del gen recombinant. Com a referència, la fletxa del panell B indica un cos d'inclusió, mentre aquesta mena d'agregats no s'observen al panell A (Corchero et al., 1996).

Dins l'estratègia periplasmàtica, destaquen com a avantatges la formació de ponts disulfur i la secreció de senyals naturals. Tanmateix, es tracta d'una ruta d'expressió empírica i de vegades ineficient a nivell de translocació.

Per últim, l'estratègia secretora permet una separació senzilla del producte, una elevada puresa del producte al sobrenedant i resulta molt eficient per a pèptids. Com a limitació, destaca el fet que la maquinària de secreció no és de tot coneguda, així com també la ineficiència per a les proteïnes grans (Graumann i Premstaller, 2006).

1.3. Disseny del bioprocés.

El desenvolupament d'un bioprocés per assolir la manufacturació i la comercialització d'un producte ha de tenir en compte un seguit d'etapes. Cal considerar que les decisions que es prenen en cada etapa, influiran a les característiques i definició d'altres àrees del procés, les qual estan doncs interrelacionades.

Abans de definir el procés, cal tenir en compte quin és el producte a obtenir, quina és la quantitat que es desitja produir i finalment, la puresa que es requereix en funció de l'aplicació. Un cop definits aquests tres paràmetres, caldrà procedir de la següent manera:

- Disseny del sistema d'expressió: hoste i vector (1.3.1).
- Estratègia de producció: mode d'operació i d'inducció (1.3.2).
- Estratègia de purificació del producte (1.3.3).
- Obtenció del producte d'interès (1.3.4).

Els passos esmentats s'analitzen al llarg de la tesi i requereixen la fusió de diverses àrees de coneixement: enginyeria genètica o de DNA recombinant, enginyeria de bioprocessos i enzimologia, atès que el producte posseeix activitat enzimàtica.

Tot i que qualsevol procés necessita ésser sotmès a una anàlisi econòmica per valorar la seva rendibilitat, en aquest cas només s'ha arribat a la realització d'un anàlisi tècnic de les alternatives proposades.

1.3.1. Sistema d'expressió: tàndem hoste-vector.

Un sistema d'expressió consisteix en un conjunt d'elements genètics configurats de manera òptima per al control de la transcripció i traducció de les seqüències a expressar (Makrides et al., 1996, Sorensen et al., 2005).

El sistema d'expressió en *E. coli* està constituït per dos components: un bacteri hoste i un vector d'expressió.

El vector d'expressió ha de constar d'un origen de replicació, el qual influeix en el nombre màxim de còpies del vector d'expressió per a cada cèl·lula, els promotors, terminadors i senyals (d'inici i final de la transcripció i la traducció, de llocs d'unió al ribosoma i de localització subcel·lular de la proteïna a expressar), així com també d'un marcador de manteniment plasmídic (o de selecció). Aquest darrer factor clau és de gran importància pel mecanisme de retenció del vector a la cèl·lula.

Els sistemes d'expressió comercials més emprats per a l'expressió de proteïnes recombinants en *E. coli* s'exposen a la Taula 1.1. Els promotors que figuren són generalment forts i regulables, regulats per repressors que controlen els nivells basals d'expressió.

Taula 1.1. Resum dels sistemes d'expressió comercials més emprats.

Vector d'expressió	Casa comercial	Promotor transcripció	Origen replicació	Soca (<i>E. coli</i>)
pET	Novagen	T7	pBR322	BL21 (DE3)
pRSET	Invitrogen	T7	Col E1	BL21 (DE3)
pGEX	GE Healthcare	Tac	pBR322	BL21
pBAD	Invitrogen	AraBAD	pUC	TOP 10
pTrc	Invitrogen	trc/lac	pUC	BL21
pQE	Qiagen	T5/lac	ColEI	M15 /pREP4

Tot i que la retenció del vector a la cèl·lula es duu terme tot exercint pressió selectiva a partir de l'addició d'antibiòtics al medi, existeixen un seguit de mecanismes per tal d'evitar la pèrdua plasmídica, els qual es descriuen a continuació.

- **Complementació auxotròfica.**

Un plasmidi incorpora un gen essencial es manté en el plasmidi, el qual complementa una delecció cromosòmica o mutació suprimible. Aquest sistema elimina la necessitat de marcadors de resistència a antibiòtic. Convé destacar com a exemples, el vector pCOR que conté un marcador tRNA seleccionat per suprimir la mutació cromosòmica del gen *arg* (Soubrier, 1999) i la soca auxotròfica per glicina (M15 Δ glyA) amb un plasmidi de complementació gènica (Vidal et al., 2008), ambdós capaços de créixer en medis mínims o definits (MD). Cal esmentar també un sistema similar basat en el gen essencial *infA* (Hägg et al., 2004). Aquest tipus de mecanisme és àmpliament tractat al llarg d'aquesta tesi.

- **Valoració o ajust del repressor.**

En aquest cas, una seqüència d'operador situada en un plasmidi multicòpia, desreprimeix un gen cromosòmic, el qual és expressat conjuntament amb la resistència a antibiòtic. S'han construït molts plasmidis terapèutics amb aquest disseny, per exemple, pGM50 (Eastman et al., 2003). Un sistema alternatiu (Cranenburgh et al., 2001) consisteix en un gen cromosòmic essencial, *dap*, sota el control de l'operador/promotor lac. Tres còpies de l'operador en el plasmidi ajusten el repressor lac, permetent l'expressió del gen essencial cromosòmic. En absència del plasmidi multicòpia, l'expressió de *dap* es reprimeix i la cèl·lula mor. L'avantatge d'aquests sistemes és la seva mida petita i l'eliminació de la resistència a antibiòtic (en el cas de *dap D*) (Durany et al., 2005a).

- **Selecció tipus antídoto/verí.**

Un sistema d'estabilitat plasmídica en què el plasmidi F-ccd (conté l'opció antídoto/verí) va ser modificat pel plasmidi de selecció (Szpirer, 2005). El gen proteïna antídoto *ccdA* es va incorporar al plasmidi. El gen verí *ccd* va ser expressat al cromosoma i així es permeté l'estabilitat plasmídica. Aquest sistema conté un marcador de selecció proteic (*ccdA*), però no ha estat avaluat a nivell fermentatiu.

- **Marcadors basats en RNA seleccionable.**

S'han desenvolupat sistemes de selecció basats en RNA que empren RNA I i RNA II antisentit, reguladors de l'origen de replicació pMB1 (Cranenburgh, 2006; Luke et al., 2009; Mairhofer et al., 2008).

Ambdós gens cromosòmics foren enginyats per contenir una seqüència RNA II amb la regió no traduïda del RNAm. En presència del plasmidi tipus ColEI, el plasmidi

codificat pel repressor RNA I s'uneix a la seqüència RNA II i reprimeix la traducció del gen cromosòmic. Aquest pot ser un marcador de resistència a antibiòtic, un repressor transcripcional (controlant l'expressió d'un segon gen) o un gen letal. Aquest mètode permet estalviar la selecció plasmídica, manteniment i producció d'alta densitat. Luke et al (2009) demostren que aquest tipus de vectors combinen alt rendiment fermentatiu, qualitat plasmídica amb expressió i immunogenicitat millorades *in vivo*.

Tots ells responen a la tendència general actual de prescindir de l'ús d'antibiòtics en el medi de cultiu per exercir pressió selectiva, degut a que la proliferació de patògens resistents a antibiòtics és un problema ja conegut però creixent al món sencer. De fet, el grau d'acceptació d'aquests marcadors depèn del tipus d'antibiòtic i dels requeriments del producte final. Per exemple, mentre la Kanamicina i la Tetraciclina encara són acceptades per les autoritats, les β -lactamases sovint s'associen a respostes al·lèrgiques i estan estrictament prohibides en teràpia gènica, però són encara acceptades en vectors que expressen biofàrmacs recombinants (Peubez, 2010). En aquest últim camp, s'han descrit riscos de bioseguretat potencials al llarg del temps. Concretament, la European Food Safety Authority (EFSA), afirma que "l'ús de certs marcadors de selecció com ara els de resistència a antibiòtics, poden impactar adversament en teràpies clíniques en una població diana i per tant, haurien de ser eliminats" (Statement of EFSA, 2009). La raó d'aquesta decisió recau bàsicament en el cost econòmic que aquests productes d'alt valor afegit representen, ja que acceleren la seva degradació un cop alliberats al medi (Baneyx, 1999). En aquest sentit, els bioprocessos destinats a la producció de proteïnes recombinants han d'assegurar la qualitat del producte mitjançant les anomenades GMP

(de l'anglès "Good Manufacturing Practices"). Es tracta de totes aquelles especificacions, matèries primeres, caracterització del sistema d'expressió, validació del procés (sistemes analítics i materials de referència) i estudis d'estabilitat.

En aquest context, els medis d'última generació són químicament definits, lliures de suplementes d'origen animal (aquests s'han substituït per peptones d'extracte de llevat) i lliures d'antibiòtics.

Així doncs, la idea d'eliminar la presència d'antibiòtics en el bioprocés comporta l'eliminació dels gens de resistència corresponents als vectors i al genoma de les soques (Pruden et.al, 2006).

A banda de simplificar els requisits regulatoris (en el cas dels productes d'ús terapèutic on es requereix la no-presència de traces de l'àcid nucleic de l'hoste i d'antibiòtics en la formulació final), el fet d'eliminar gens de resistència a antibiòtic permet reduir la mida del plasmidi, la qual cosa facilita la seva manipulació (per exemple, l'eficiència de transformació) i pot millorar la seva estabilitat estructural.

D'altra banda, l'ús de sistemes lliures d'antibiòtics (i gens de resistència corresponents) en processos industrials per a la producció de productes d'ús no terapèutic (com és el cas del present estudi) pot suposar un abaratiment dels costos de tractament de residus generats en el procés de fermentació.

Tanmateix, els vectors comercials que s'usen en clonatge (Fig.1.1), posseeixen almenys un gen de resistència a antibiòtic com a possible marcador de selecció. Encara que en etapes posteriors d'aquest estudi es decideixi prescindir d'aquest, es tracta d'una eina addicional útil en clonatges complexos. Així doncs, la rigorositat en aquest aspecte dependrà de l'aplicació i finalitat que se li vulgui donar al sistema d'expressió.

1.3.2. Estratègia de producció.

Els modes d'operació més emprats per a cultivar *E. coli* han estat al llarg del temps fins el dia d'avui, el discontinu i el discontinu-alimentat.

El creixement en discontinu és el més simple de tots i permet obtenir valors entre uns 5 i uns 10 g/L de pes sec (Lee, 1996). Per tal d'assolir uns millors resultats i incrementar la productivitat volumètrica del cultiu, s'empren els anomenats sistemes en discontinu alimentat.

El creixement en discontinu alimentat permet assolir altes densitats cel·lulars i obtenir valors de 80 g/L de pes sec (Lee, 1996).

L'addició limitada d'un nutrient essencial per al creixement durant l'etapa alimentada permet controlar el creixement del cultiu i això es tradueix en una solució per als principals problemes per assolir cultius d'alta densitat cel·lular en *E. coli*, els quals són bàsicament dos i s'expliquen tot seguit.

- *La limitació en la transferència d'oxigen.*

En bioreactors convencionals, la transferència d'oxigen per mantenir el creixement queda limitada als 10-20 g/L de pes sec (Neubauer i Winter, 2001) emprant aire com a aport d'oxigen. Si es treballa a velocitats de creixement inferiors a la màxima per al microorganisme, s'allarga el temps de creixement en condicions aeròbies (Durany et al., 2005b).

- *L'acumulació d'àcid acètic.*

L'àcid acètic és el principal subproducte produït per *E. coli*, el qual li és tòxic. El fet de controlar la font de carboni i energia per al creixement permet evitar la seva acumulació

al medi i mantenir les velocitats de creixement inferiors a la crítica per a la producció d'acètic (Korz et al., 1995; Durany et al., 2005b; Vidal, 2006; Pinsach, 2009). Aproximacions més recents es basen en la manipulació del metabolisme central del carboni mitjançant estratègies d'enginyeria metabòlica que condueixin a una menor formació d'acetat (Eiteman et al., 2006).

Un altre aspecte important per assolir cultius d'alta densitat cel·lular, així com també maximitzar les productivitats específiques és la composició del medi (Neubauer i Winter, 2001). En els processos discontinus alimentats, l'alimentació pot dur-se a terme de diferents maneres: constant, en augment lineal o exponencial. Aquesta darrera proposa millorar el rendiment volumètric de producte recombinant mantenint constant la velocitat específica de creixement i gairebé zero la concentració de substrat limitant (Riesenberget al., 1991; Yee i Blanch, 1992).

L'estratègia d'inducció és un factor clau que convé ésser analitzat en detall en combinació amb les estratègies anteriorment citades, ja que hi està molt relacionat. Algunes publicacions parlen d'una relació de dependència entre la velocitat específica de creixement abans de la inducció i el nivell d'expressió de la proteïna recombinant (Curless et al., 1990; Riesenberget al., 1991), mentre que d'altres parlen de factors independents (Jensen et al., 1990; Zabriskie et al., 1987).

Els paràmetres importants pel que fa a inducció són bàsicament, el tipus i concentració d'inductor emprat, el moment d'inducció, la disponibilitat de la font de carboni i la concentració cel·lular durant la inducció.

Per als sistemes d'expressió derivats de l'operò lac, els dos tipus d'inductor més emprats a la indústria són l' isopropil- β -tiogalactopirànòsid (IPTG) i la lactosa. Tot i

que s'han efectuat alguns estudis preliminars amb galactosa (Rotman et al., 1968), han estat poc rellevants des d'un punt de vista productiu.

L'inductor per excel·lència per a la producció de proteïnes recombinants és, sens dubte, l'IPTG, ja que permet dur a terme una estratègia d'inducció controlada. No obstant, la comparació a nivell productiu entre IPTG i lactosa ha estat objecte d'alguns estudis (Donovan et al., 1996; Gombert et al., 1997; Kilikian et al., 2000), en els quals es planteja l'ús de l'esmentada lactosa com a substitució del sistemàticament emprat IPTG, atès que ambdós permeten obtenir unes quantitats de proteïna equivalents (expressades en mg proteïna per g de pes sec). Des de fa un temps (Donovan et al., 1996) es coneix la toxicitat de l'IPTG cap als humans, així com també l'elevat cost econòmic que implica la utilització d'aquest en processos a escala, per la qual cosa s'han plantejat inductors alternatius.

Els cultius induïts amb lactosa són altrament anomenats cultius d'autoinducció. Aquests cultius són objecte de nombroses patents, ja que resulten especialment convenients per testar diferents proteïnes diana en termes d'expressió i solubilitat (Studier et al., 2005). En aquest sentit, s'ha postulat l'autoinducció com a convenient, eficient i econòmica per produir proteïnes a gairebé qualsevol escala, des de l'anàlisi de proteïnes individuals en petits laboratoris fins a la producció de proteïnes a escala comercial (Studier et al., 2005).

Tot i el gran nombre de publicacions que estableixen estratègies d'inducció diverses i sovint contradictòries, la determinació del millor inductor (IPTG o lactosa) s'efectua de manera empírica.

1.3.3. Estratègia de purificació.

Els processos fermentatius descrits al punt 1.3.2 a escala industrial han permès obtenir grans quantitats de proteïnes recombinants. Tanmateix, el procés de purificació representa aproximadament el 50 % dels costos procés de producció (Walsh et al., 2003; Graumann i Premstaller, 2006), per la qual cosa es diu que l'aïllament i la purificació de la proteïna són el coll d'ampolla del procés. Per aquest motiu, moltes proteïnes biològicament rellevants són excloses del mercat perquè no poden ser separades de la seva forma nativa amb rendiments econòmics interessants (Ventura i Villaverde, 2006). L'expressió de la proteïna d'interès en la seva forma soluble requereix un aïllament del producte i una seqüència de purificació complexa d'una mescla heterogènia de components, la qual cosa requereix invertir en equips i materials, els quals són efectius a nivell tècnic però impliquen disposar de molt espai dins la planta. En aquest sentit, les mesures que s'apliquen per reduir costos i espai consisteixen en eliminar tècniques altament costoses i en reduir el nombre de passos en el procés de purificació (Frey et al., 2005). Com a primer exemple, les separacions per afinitat tenen un gran potencial en la reducció del nombre de passos requerits per eliminar les impureses a nivells per sota el límit de detecció. En segon terme, les extraccions en dues fases aquïoses han anat guanyant terreny com a eina eficient en processos a gran escala (Hart et al., 1995; Cunha et al., 2002; Andrews et al., 2005). Per últim, la possibilitat que tenen alguns vectors, com ara pTrcHis, pRSET i derivats de pQE-40 de contenir una cua d'histidines, representa també un factor afegit que permet purificar les proteïnes d'interès en un sol pas a partir d'una cromatografia d'afinitat per quelació (García-Junceda et al., 1995).

El procés de recuperació i purificació consisteix en quatre etapes fonamentals: separació sòlid/líquid, concentració, purificació i acabat. Les tècniques aplicades en cada cas dependran bàsicament de la puresa del producte a obtenir, en funció de si és d'alt o baix valor afegit; però també de la manera que s'expressi la proteïna.

La proteïna d'interès en aquest treball és intracel·lular, de manera que requereix un pas de disruptió mecànica, amb la conseqüent centrifugació. Aquest fet significa l'addició d'etapes al procés, cosa que es veu reflectida en el cost final. Per aquesta raó, la possibilitat d'expressar les proteïnes de manera intracel·lular en les partícules denses ja esmentades (cossos d'inclusió) representa un avantatge, ja que els agregats poden contenir altes concentracions de proteïna (Fanhert et al., 2004).

1.3.4. Obtenció de la proteïna Fuculosa-1-fosfat aldolasa.

La proteïna que es vol produir en aquesta tesi forma part del gran grup de proteïnes anomenades aldolases, les qual seran analitzades en el punt 1.4 conjuntament amb les reaccions que poden catalitzar.

La Fuculosa-1-fosfat aldolasa (EC.4.1.2.17) és una proteïna de 26 kDa per monòmer i d'estructura quarternària, definida com a homotetràmer que posseeix quatre subunitats. Cada subunitat consta de 215 aminoàcids i un lloc d'unió al Zn^{2+} . Té un marge d'actuació ampli entre 6 i 9, essent l'òptim de 7.2 (Durany, 2003). La temperatura màxima d'activitat a pH 7.2 és de 37 °C per al seu substrat natural fuculosa-1-fosfat. El seu punt isoelèctric és de 6.12.

No es coneixen ponts disulfur a l'estructura, la qual fou determinada per cristal·lografia de raigs X (Dreyer i Shutz, 1993) i es mostra a la Fig.1.2.



Fig. 1.2. Estructura cristal·logràfica d'un monòmer de Fuculosa-1-fosfat aldolasa (Dreyer i Schutz, 1993).

1.4. Aldolases i reaccions aldòliques.

Les aldolases són un grup específic de liases que catalitzen la formació d'enllaços carboni-carboni mitjançant reaccions d'addició aldòlica en les que un carboni α desprotonat d'una aldehyd o cetona donador ataca al grup carbonil d'un altre aldehyd o cetona acceptor/a, generant un β -hidroxialdehyd o una β -hidroxicetona (Machajewski i Wong, 2000).

S'han descrit més de 30 tipus d'aldolases (Henderson i Toone, 1999) de diferents fonts biològiques (en eucariotes i en procariotes) que es poden classificar en funció de dos criteris: el seu mecanisme d'actuació i l'estructura del grup donador.

Sovint les aldolases es classifiquen segons el seu mecanisme d'actuació en dos grans grups.

Aldolases de Classe I: El mecanisme d'actuació d'aquest tipus d'aldolases consisteix en la formació d'una base de Schiff com a intermediària entre el substrat donador i un residu de lisina del centre actiu de l'enzim, afegint-se tot seguit del receptor (Fig.1.3a) Aquest tipus d'aldolases predominen en animals superiors i plantes.

Aldolases de Classe II: Aquest enzims usen un metall divalent com a cofactor (generalment Zn^{2+}), actuant com un àcid de Lewis en la catàlisi per facilitar la desprotonació del substrat (Fig. 1.3b). La catàlisi procedeix cap a la via de formació de l'intermediari enediolat. Aquests enzims són més estables que les aldolases de classe I i es troben principalment en procariotes, llevats, algues i fongs.

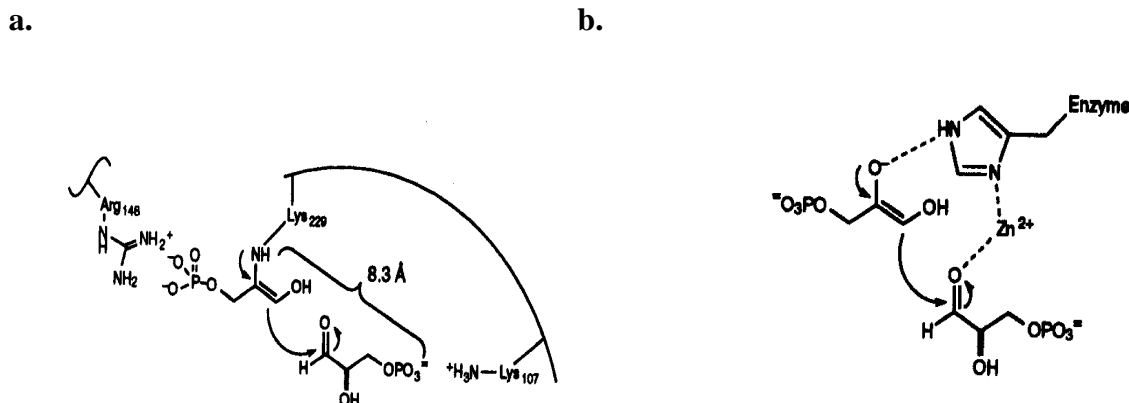


Fig. 1.3. Esquema que mostra el mecanisme catalític de les aldolases, les quals es classifiquen en tipus I (a) i tipus II (b) (extret de Takayama et al., 1997).

Per una altra banda, les aldolases poden ésser classificades segons l'estructura del substrat donador en quatre grups diferents.

- **Aldolases depenents de DHAP.**

Els quatre enzims de la família d'aldolases depenents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) inclouen l'aldolasa fructosa-1,6-bifosfat (FruA, EC 4.1.2.13), l'aldolasa fuculosa-1-fosfat (FucA, EC 4.1.2.17), l'aldolasa ramnulosa-1-fosfat (RhuA, EC 4.1.2.19) i l'aldolasa tagatosa 1,6-bifosfat (TagA, EC 4.1.2.40).

Les aldolases depenents de DHAP creen dos nous centres estereogènics amb una enantioselectivitat i diastereoselectivitat excel·lents. Aquests enzims són específics pel substrat donador, DHAP, però accepten un ampli ventall d'aldehids. Tan sols han estat descrits dos enzims capaços d'emprar dihidroxiacetona (DHA) com substrat donador (Schürmann i Sprenger, 2001).

- **Aldolases depenents de piruvat i fosfoenolpiruvat.**

Aquestes aldolases utilitzen piruvat o PEP com a substrat donador i diversos aldehids com a acceptors per formar 3-desoxi-2-cetoàcids. Dins aquest grup es troba la N-acetilneuraminat aldolasa, també coneguda com a àcid siàlic aldolasa, que depèn del piruvat com a substrat donador.

- **Aldolases dependents d'acetaldehid.**

Aquest grup inclou només la 2-desoxiribosa-5-fosfat aldolasa (DERA) que emprava l'acetaldehid com a substrat donador i altres aldehids com a acceptors per a la producció de 2-desoxialdehids. Es tracta de l'única aldolasa coneguda capaç de catalitzar l'addició aldòlica reversible de dos aldehids sense requerir substrats fosforil·lats. Per aquesta raó, es diu que l'especificitat del substrat donador d'aquest enzim no és tan estricta com en les altres aldolases.

- **Aldolases depenents de glicina.**

Aquest grup d'aldolases catalitzen la reacció aldòlica reversible de glicina, com a substrat donador, amb diversos grups d'aldehids per formar β -hidroxi- α -aminoàcids. Les més estudiades d'aquest grup són les treonina aldolases (TA), que catalitzen *in vivo* la reacció entre la treonina i la glicina, i els serina-hidroximetiltransferases (SHMT), que catalitzen *in vivo* la reacció entre la serina i la glicina.

Aquest treball es centra en la producció de Fuculosa-1-fosfat aldolasa, classificable dins el grup de les aldolases dependents de DHAP. Les quatre aldolases esmentades catalitzen *in vivo* l'addició reversible de DHAP amb D-gliceraldehid-2-fosfat o L-

lactaldehid per formar cetoses-1-fosfat, l'estereoisomeria dels quals resulta complementaria en els carbonis C3 i C4 (Fig.1.4).

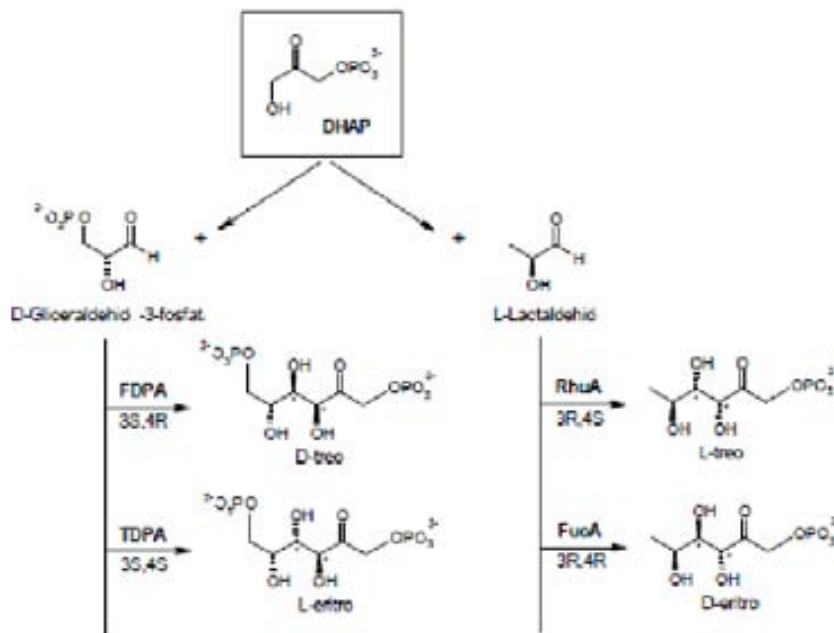


Fig. 1.4. Esteroquímica de les reaccions catalitzades per aldolases dependents de dihidroxiacetona fosfat (DHAP).

El potencial sintètic de les aldolases dependents de DHAP ha estat investigada de manera exhaustiva en els últims anys. La limitació fonamental per a ser aplicades a gran escala rau en el preu elevat del DHAP, així com també en la seva inestabilitat química. No obstant això, la primera limitació pot ser solventada mitjançant processos de síntesi enzimàtica per a la generació de DHAP *in situ* (Schoevaart et al., 2000; van Herk et al., 2006) o bé eliminant la dependència del DHAP tot modificant l'especificitat per substrat de l'enzim, a fi que pugui acceptar dihidroxiacetona (DHA) enlloc de DHAP (Sugiyama et al., 2007). Pel que fa a la segona limitació, la degradació del DHAP pot ser reduïda si es treballa a una temperatura de 4 °C (Suau et al., 2006).

El creixent interès de les aldolases per a la síntesi orgànica de compostos, especialment per a la indústria de la química fina, farmacèutica o agroquímica, es deu a que catalitzen la formació d'enllaços carboni-carboni en condicions suaus de temperatura i pH i són estereoselectives.

S'han descrit diverses aplicacions associades a les reaccions catalitzades per aldolases durant els últims anys. Un primer exemple il·lustratiu és el cas de les treonina aldolases, les quals poden ser usades en la síntesi d'aminoàcids β -hidroxiquirals multifuncionals, que són precursors importants de fàrmacs com ara el tiamfenicol, un derivat de L-treo-3,4-dihidroxifenilserina (L-treo-DOP) o agroquímics (Kimura et al, 1997; Liu et al, 1991; Alonso i Riera, 2005).

Un segon exemple es basa en la N-acetilneuraminat aldolasa (NAL, prèviament anomenada Neu5Ac liasa, EC 4.1.3.3), enzim emprat per a la producció de N-acetilneuraminat o Neu5Ac. Neu 5Ac i els seus derivats són un grup molt important de biomolècules ja que ocupen les posicions terminals de gran nombre de macromolècules com ara els glicans de les glicoproteïnes, involucrats en diversos fenòmens biològics i patològics amb moltes aplicacions industrials com ara la síntesi del fàrmac antigrip anomenat zanavir.

Per últim i pel que fa al grup d'aldolases dependents de DHAP, la ja descrita formació d'enllaços C-C genera una reacció en cascada que allibera anàlegs aminociclitols (Ogawa et al., 2007), entre els quals destaca la valiolamina (Baker et al., 2009), un inhibidor específic de la glicosidases intestinals.

La formació d'enllaços carboni-carboni és una de les reaccions més importants en química orgànica de síntesi (Wasserman et al 1999). És una reacció estratègica en la

qual es sintetitzen molècules enantiomèriques pures com ara carbohidrats complexes, derivats de sucres i anàlegs, així com també productes polihidroxilats. Concretament, una de les més atractives des d'un punt de vista industrial és la síntesi estereoselectiva d'aminopoliols a partir d'aminoaldehids N-protectes i DHAP (Espelt et al., 2003; Espelt et al., 2005). Els aminopoliols són precursors dels iminociclitols, els quals són compostos mimètics que poden actuar com a inhibidors de glicosidases i glicotransferases, per la qual cosa representen una potencial aplicació com a antibiòtics, fàrmacs antimetastàsics, antihiperoglucèmics o immunoestimuladors, així com també com a intermediaris de gran versatilitat en síntesi quiral de molècules d'interès (Liang et al., 2006; Caines et al., 2007).

Em el present treball, es tracta la reacció aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal, catalitzada per l'enzim fuculosa-1-fosfat aldolasa (Fig.1.5). El producte sintetitzat, l'aminopoliol, té propietats terapèutiques prometedores i la reacció posseeix una elevada diastereoselectivitat propera al 100 % (Espelt et al., 2003; Espelt et al., 2005).

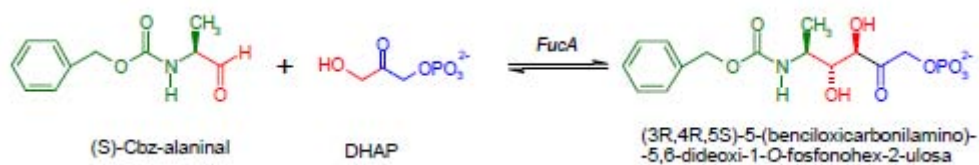


Fig. 1.5. Reacció aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per una aldolasa.

Durant la reacció d'addició aldòlica entre dihidroxiacetona fosfat i (S)-Cbz-alaninal poden tenir lloc dues reaccions secundàries degut a la degradació química i enzimàtica de la DHAP. Per una banda, la DHAP es degrada químicament mitjançant un intermediari enediolat que dona lloc a metilgloxal i fosfat inorgànic de manera irreversible (Fig.1.6)

(Fessner i Walter, 1996). Per altra banda, es va postular que les aldolases tipus II també podien catalitzar aquesta reacció de degradació a partir de la formació del mateix intermediari enediolat en unir-se la DHAP al Zn^{2+} del centre actiu i ésser desprotonat pel residu de l'àcid glutàmic propi (Fig.1.7). Aquest fet va ser posat en evidència per treball anteriors del grup de recerca (Suau et al., 2006).

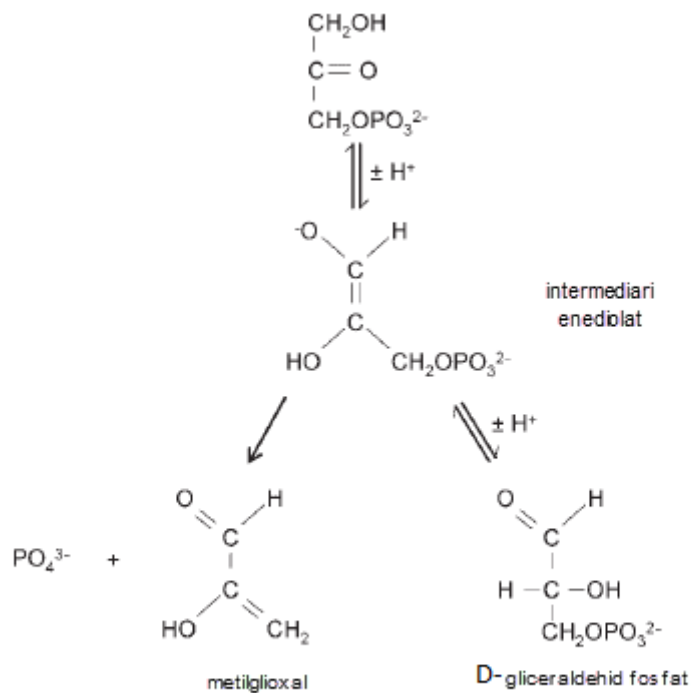


Fig. 1.6. Mecanisme d'isomerització i descomposició de la DHAP (Fessner i Walter, 1996).

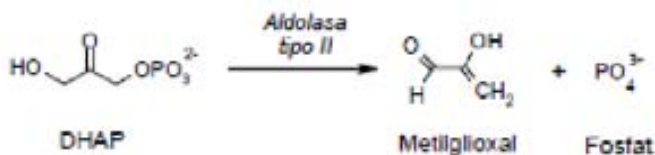


Fig. 1.7. Reacció de degradació enzimàtica de DHAP catalitzada per aldolases tipus II.

1.5. Antecedents: visió general.

Una de les limitacions principals pel desenvolupament industrial de processos de síntesi utilitzant aldolases és la disponibilitat d'aquestes a nivell comercial. De totes les aldolases descrites anteriorment, les que més s'han emprat en reaccions sintètiques són les aldolases dependents de DHAP (Henderson et al., 1999; Machajewsky et al., 2000). Aquestes es van obtenir de diferents fonts microbianes, així com d'animals superiors, per a ésser posteriorment expressades en *E. coli*. Totes elles presentaven una gran especificitat per la DHAP, mentre que acceptaven una àmplia gama d'aldehids amb substrats acceptors. No obstant, la seva producció no superava en general la desena de mil·ligrams (Henderson et al., 1999; García-Junceda, 1995), amb la única excepció de la FDPA de múscul de conill (RAMA) que és comercial. La DERA procedent de microorganismes i animal, va ser clonada i sobreexpressada en *E. coli* (Chen et al., 1992). Finalment, dins del grup de les treonina-aldolases, hi ha definides sis subclasses, entre les quals varia l'estereoquímica dels carbonis quirals formats (α i β) en la reacció de condensació. Es van identificar diferents aldolases que pertanyien a quatre d'aquestes subclasses, seqüenciant-ne els gens corresponents, però només alguna d'elles va ser clonada i sobreexpressada en *E. coli*. Les altres dues subclasses encara no han estat trobades a la natura (Liu et al., 1999).

En aquest context científic, el grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada va contribuir tot desenvolupant processos factibles per a la producció d'aldolases recombinants. En un primer moment, es va dur a terme la producció de FucA en medi definit, expressant-la en una soca d'*E. coli* XL1 Blue (Stratagene) sota el control del promotor suau Trc induïble per IPTG (Durany, 2005a). El clonatge i expressió de RhuA va ser dut a terme en una soca d'*E. coli* M15 emprant

el vector pQE-40 sota el control del promotor T5 induïble per IPTG (Vidal, 2006). Ambdós sistemes d'expressió són comercials. Atès que el sistema pQE-40 va proporcionar millors resultats en termes de nivells d'expressió i regulació de la mateixa, es van construir soques productores de les quatre aldolases depenents de DHAP, DERA i dues aldolases depenents de glicina (TA de *E. coli* i serina hidroximetil transferasa de *Streptococcus thermophilus*).

D'altra banda, es va desenvolupar un procés per a la producció de FucA en cultius discontinus alimentats de *E. coli* XL1 Blue (pTrcfuc) i un sistema automatitzat que determinava la velocitat d'addició de l'aliment per operar a velocitat específica de creixement constant (Pinsach, 2009). Més tard, es va dur a terme la modelització i posada a punt d'un sistema de control per retro-alimentació, mitjançant l'estimació de la biomassa a partir de la velocitat de producció de CO₂ (CER). La metodologia desenvolupada per la producció de FucA es va estendre al sistema *E. coli* M15/pQE-40, emprant RhuA com a model. Es van assolir altes densitats cel·lulars (100 g/L) i elevades productivitats, mitjançant la inducció a la fase final del cultiu, degut a la dràstica influència de la producció de proteïna recombinant sobre la velocitat de creixement. La producció de DERA i les altres aldolases depenents de DHAP en el mateix sistema d'expressió es comportava de manera similar a la RhuA, en cultius discontinus.

En tots els casos, la proteïna sobreexpressada intracel·lularment era soluble i s'havia desenvolupat un procés d'aïllament i purificació. Per últim, convenia destacar la recerca de sistemes d'expressió alternatius que permetessin l'estabilitat genètica (estabilitat de plasmidi-vector d'expressió), sense l'ús d'antibiòtics. En una primera instància, es va explorar l'ús d'un sistema desenvolupat per l'empresa Cobra Therapeutics (UK) usant FucA com a proteïna model. Malgrat haver obtingut resultats molt positius (inclús en

produccions de 50 L), el seu ús en el futur estava restringit per raons de propietat intel·lectual. Per aquest motiu, el grup va desenvolupar un mecanisme d'estabilitat plasmídica basat en un marcador auxotròfic (gen *glyA*, indispensable per la síntesi de glicina) a partir del sistema *E. coli*/pQE-40 (Qiagen). Per desenvolupar aquesta construcció, es va dur a terme en *E. coli* M15 la delecció del gen *glyA* que codifica per hidroximetil serina transferassa (SHMT), un enzim clau de la ruta metabòlica per la síntesi de glicina (Vidal, 2006). Conseqüentment, es va obtenir una soca amb una auxotrofia per la glicina (M15 Δ *glyA*), de manera que el creixement estaria subordinat al plasmidi que expressa *glyA*. Aquest sistema va resultar efectiu per la producció de RhuA (Vidal, 2006).

A nivell de procés enzimàtic, els primers passos desenvolupats pel grup van consistir en seleccionar el medi de reacció amb el qual s'obtenien majors rendiments i productivitats. Les reaccions de condensació aldòlica requerien medis que permetien la solubilització dels reactius i productes implicats, tant substrats hidrofílics com hidrofòbics, de manera que van ser provats medis monofàsics aquòs-orgànic, medis bifàsics o medis líquids iònics, els quals presentaven un comportament diferent envers els medis més convencionals (van Rantwijk et al., 2003). Un cop escollit el medi òptim, es van establir les condicions òptimes de temperatura i pH per poder dur a terme els estudis cinètics destinats a desenvolupar un model cinètic de paràmetres determinats.

La immobilització de les aldolases RhuA i FucA en suports sòlids porosos prèviament activats amb grups aldehid (glioxil-suport) va ser també estudiada i es va valorar tan en termes d'activitat com d'estabilitat. Ambdòs termes depenien del nombre d'enllaços covalents establerts entre el suport i l'enzim (Guisán et al., 1990). Al seu torn, el nombre d'enllaços covalents era controlat pel grau d'activació del suport, el pH, la temperatura i el temps de contacte entre substrat i enzim durant el procés

d'immobilització (Álvaro et al., 1990). Per tant, l'estudi de totes aquestes variables va permetre modular l'activitat i estabilitat de l'enzim immobilitzat (Suau et al., 2005).

Finalment, es va valorar l'activitat enzimàtica del derivat immobilitzat en els seu substrat natural i es va estudiar la seva estabilitat d'emmagatzematge i d'operació en el medi de reacció escollit (Suau et al., 2005; Ardao, 2009).

1.6. Context i objectius de la tesi.

Aquesta tesi va ser desenvolupada al grup de recerca de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada, de manera que es treballava en el camp de la biologia molecular, l'enginyeria de bioprocessos i la biocatàlisi de manera sinèrgica.

En aquest sentit, es va intentar participar en totes les etapes del procés; des de la millora genètica de les soques d'*E. coli* fins a la seva comprovació a nivell fermentatiu, a fi d'obtenir alts nivells de fuculosa-1-fosfat aldolasa per a poder ser aplicada en reaccions de síntesi estereoselectiva com a biocatalitzador.

Els objectius que es pretenien abordar en aquesta tesi s'analitzen tot seguit en dos eixos fonamentals: la millora genètica del sistema d'expressió per expressar fuculosa-1-fosfat aldolasa a nivell soluble i la producció de l'esmentada aldolasa a partir de cossos d'inclusió actius.

El punt de partida de la **millora genètica del sistema d'expressió** fou el sistema desenvolupat per Vidal que permetia produir ramnulosa-1-fosfat aldolasa sense afegir antibiòtics al medi de cultiu (Vidal, 2006), de manera que els objectius específics que es van plantejar en aquest sentit van ser els següents.

- 1) Extrapolació del sistema auxotròfic per la glicina (Vidal, 2006) a la producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa i comprovació d'aquest a nivell de cultiu discontinu alimentat.
- 2) Millora de la regulació de l'expressió de serina hidroximetil transferasa, codificada pel gen *glyA* (marcador auxotròfic), a fi de reduir la càrrega metabòlica associada a la producció de la proteïna d'interès.

- 3) Estudi de la factibilitat d'eliminar els gens de resistència a antibiòtics per obtenir un sistema d'expressió més estable i segur.

Pel que fa a la producció de l'aldolasa a nivell de **cossos d'inclusió actius**, es partia del coneixement que certs sistemes d'expressió d'*E. coli* sotmesos a certes condicions (García-Fruitós et al., 2005) permetien la formació uns agregats que manifestaven certa activitat biològica. L'interès del grup del Dr. Villaverde de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona en aplicar aquest coneixement a la producció d'un enzim d'interès industrial, va permetre estudiar aquesta alternativa de producció en cooperació entre ambdós grups.

- 4) Avaluació d'una sèrie de construccions d'antecedents coneguts com a sistema alternatiu per expressar la proteïna d'interès en forma de cossos d'inclusió d'acord amb els nivells d'activitat biològica i puresa.
- 5) Estudi del comportament dels cossos d'inclusió com a biocatalitzadors en reaccions de síntesi estereoselectives.
- 6) Desenvolupament d'un procés productiu-purificatiu que permeti maximitzar la quantitat de fuculosa-1-fosfat aldolasa produïda en forma de cossos per tal d'aconseguir un biocatalitzador actiu, estable i robust.

1.7. Referències.

Alonso M, Riera A. 2005. **Improved preparation of β -hydroxy- α -amino acids: direct formation of sulfates by sulfuryl chloride.** Tetrahedron-asymmetr. 16 (23): 3767-3920.

Álvaro G, Fernandez-Lafuente R, Blanco RM, Guisán JM. 1990. **Immobilisation-stabilization of penicillin G acylase from *Escherichia coli*.** Appl Biochem Biotech. 26 (2): 181-195.

Andrews, BA, Schmidt AS, Asenjo JA. 2005. **Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge.** Biotechnol Bioeng. 90 (3): 380-390.

Ardao I. 2009. **Avances en el desarrollo de bioprocesos: adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Baker P, Pan P, Carere J, Rossi A, Wang W, Seats SYK. 2009. **Characterization of an aldolase-dehydrogenase complex that exhibits substrate channeling in the polychlorinated biphenyls degradation pathway.** Biochemistry. 48 (27):6551-6558.

Bals C, Schambach A, Meyer J, Scheper T, Rinas U. 2011. **Expression and purification of bioactive soluble murine stem cell factor from recombinant *E. coli* using thioredoxin as fusion partner.** J Biotechnol. 152 (1-2): 1-8.

Baneyx F. 1999. **Recombinant protein expressions in *Escherichia coli*.** Curr Opin Biotech. 10 (5): 411-421.

Baneyx F, Mujacic M. 2004. **Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*.** Nat Biotechnol. 22.1399-1408.

Caines MEC, Vaughan MD, Tarling CA, Hancock SM, Warren RAJ, Withers SG, Strynadna NCJ. 2007. **Structural and Mechanistic Analyses of endo-glycoceramidase II, a Membrane-associated Family T Glycosidase in the Apo and GM3 ganglioside-bound Forms.** J Biol Chem. 282: 14300-14308.

Carrió MM, Villaverde A. 2001. **Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible.** FEBS Lett. 489 (1): 29-33.

Chen L, Dumas DP, Wong CH. 1992. **Deoxyribose-5-phosphate aldolase as a catalyst in asymmetric aldol condensation.** J Am Chem Soc. 114 (2): 741-748.

Corchero JL, Viaplana E, Benito A, Villaverde A. 1996. **The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in Escherichia coli.** J Biotechnol. 48 (3): 191-200.

Cranenburgh RM, Hanak JAJ, Williams SG, Sheratt DJ. 2001. **Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration.** Nucleic Acid Res. 29 (5): 26-31.

Cranenburgh R. 2006. **Antibiotic free systems for production.** Genet Eng News. 26 (1): 66-71.

Cunha T, Aires-Barros R. 2002. **Large-scale extraction of proteins.** Mol Biotechnol. 20 (1): 29-40.

Curless C, Pope J, Tsai L. 1990. **Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in Escherichia coli.** Biotechnol Progr. 6 (2): 149-152.

Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. **Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter.** J Ind Microbiol. 16 (3): 145-154.

Dreyer MK, Schultz GE. 1993. **The spatial structure of the class II L-fuculose-1-phosphate aldolase from *Escherichia coli*.** Acta Crystallogr. 231 (3): 549-553.

Durany O, 2003. **Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli*.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Durany O, Bassett P, Weiss A, Cranenburgh RM, Ferrer P, López-Santín J, de Mas C, Hanak J. 2005a. **Production of fuculose-1-phosphate aldolase using operator-repressor titration for plasmid maintenance in high cell density *Escherichia coli* fermentations.** Biotechnol Bioeng. 91(4): 460-467.

Durany O, de Mas C, López-Santín. 2005b. **Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*.** Process Biochem. 40 (2): 707-716.

Eastman EM, Durland RH. 2003. **Plasmid for delivery of nucleic acid to cells and method of use.** US Patent 6103470.

Eiteman MA, Altman E. 2006. **Overcoming in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations.** Trends Biotechnol. 24 (11): 530-536.

Espelt L, Parella Bujons J, Solans C, Joglar J, Delgado A, Clapés O. 2003. **Stereoselective Aldol Additions catalyzed by Dihydroxyacetone Phosphate. Dependent Aldolases in Emulsion Systems. Preparation and Structural Characterization of Linear and Cyclic Iminopoliols from Aminoaldehydes.** Chem-Eur J. 9 (20): 4887-4890.

Espelt L, Bujons J, Parella T, Calveras J, Joglar J, Delgado A, Clapés P. 2005. **Aldol Additions of Dihydroxyacetone Phosphate to N-Cbz-Amino-Aldehyde Catalyzed by L-Fuculose-1-Phosphate Aldolase in Emulsion Systems: Inversion of Stereoselectivity as a Function of the Acceptor Aldehyde.** Chem-Eur J. 11 (5): 1392-1401.

EFSA-Q-2009-00589. **Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinion on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants.** 2009. The EFSA Journal 1108: 1-8.

EuropaBioReport. 2006. **Biotechnology in Europe: 2006 Comparative Study.**

Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. 2004. **Inclusion Bodies: Formation and Utilisation.** Adv Biochem Eng Biot. 89: 93-142.

Fessner WD, Walter C. 1996. **Enzymatic C-C bond formation in asymmetric synthesis.** Top Curr Chem. 184: 97-194.

Frey DD, Kang X. 2005. **New concepts in the chromatography of peptides and proteins.** Curr Opin Biotech. 16 (5): 552-560.

García-Fruitòs E, González-Montalban, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Arís A. 2005. **Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins.** Microb Cell Fact.4:27

García-Fruitòs E, Aris A, Villaverde A. 2007. **Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies.** Appl Environ Microb.73:289-294.

García-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. **A new strategy for the cloning, overexpressions and one step purification of three DHAP-Dependent Aldolases: Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase.** Bioorg Med Chem. 2(8): 837-843.

Gombert AK, Kilikian BV. 1997. **Recombinant gene expression in Escherichia coli cultivation using lactose as inducer.** J Biotechnol. 60:47-54.

Graumann K, Premstaller A. 2006. **Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems.** J Biotechnol. 1 (2): 164-186.

Guisán JM, Álvaro G, Fernandez-Lafuente R. 1990. **Immobilisation of penicillin acylase. An integrated approach.** Ann NY Acad Sci. 613 (10): 553-559.

Hägg P, Wa de Pohl, Abdulkarim F, Isakkson LA. 2004. **A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance.** J Biotechnol. 111 (1): 17-30.

Hart RA, Ogez JR, Builder SE. 1995. **Use of multifactorial analysis to develop aqueous two-phase systems for isolation of non-native IGF-I.** Bioseparation. 5: 113-121.

Henderson DP, Toone EJ. 1999. **Initiating a structural study of keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Escherichia coli*.** Acta Crystallogr. D55: 1946-1948.

Jensen PR, Westerhoff HV, Michelsen O. 1990. **The Use of Lac-Type Promoters in Control Analysis.** Eur J Biochem. 211: 181-191.

Kilikian BV, Suárez ID, Liria CW, Gombert AK. 2000. **Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction.** Process Biochem.35:1019-1025.

Kimura KD, Tissebaum HA, Liu Y, Ruvkun G. 1997. **Daf-2, an insulin Receptor-Like Gene that Regulates Longevity and Dispause in *Caenorhabditis elegans*.** Science. 277(5328): 942-946.

Korz, DJ, Rinas U, Hellmuth, K, Sanders EA, Deckwer WD. 1995. **Simple fedbatch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*.** J Biotechnol. 39:59-65.

Lee SY. 1996. **High cell-density culture of *Escherichia coli*.** Trends Biotechnol. 14(3): 98-105.

Liang PH, Cheng WC, Lee YC, Yu HP, Wu Y, Lin, Wong CH. 2006. **Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors new structures for antivirals and osteoarthritis.** Chem Biochem Eng Q. 7(1): 165-173.

Liu KKC, Kajimoto T, Chen LR, Zhong ZY, Ichikawa Y, Wong CH. 1991. **Use of Dihydroxyacetone Phosphate Dependant Aldolases in the Synthesis Deoxyazasugars.** J Org Chem. 56 (22): 6280-6289.

Luke J, Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. 2009. **Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA based plasmid selections system.** Vaccine. 27: 6454- 6459.

Machajewsky TD, Wong CH. 2000. **Die Katalysierte assymetrische Aldol reaction.** Angew Chem Int Edit. 112 (8): 1406-1430.

Mairhofer J, Pfaffenzeller I, Menz D, Grabherr, R. 2008. **A novel antibiotic-free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy.** J Biotechnol. 3: 83-89.

Mairhofer J, Cserjan-Puschmann M, Striedner G, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Grabherr R. 2010. **Marker-free plasmid for gene therapeutic applications-Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process.** J Biotechnol. 146: 130-137.

Markrides SC. 1996. **Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli.** Microbiol Rev. 60 (3): 512-538.

Neubauer P, Winter J. 2001. **Expression and fermentation strategies for recombinant protein production in Escherichia coli. 2001.** In Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. Edited by: Merten O-W, Mattanovich D, Lang C, Larsson G, Neubauer P, Porro D, et al., Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers:195-258.

Noronha SB, Yeh HJ, Spande TF, Shiloach L. 2000. **Investigation of the TCA cycle and the glyoxilate Shunt in E. coli BL21 and JM19 using (B) C-NMR/MS/MS.** Biotechnol Bioeng. 68. 316-327.

Ogawa S, Shibata N, Inagaki J, Nakamura S, Toru T, Shiro M. 2007. **Chinchona-Alkaloid-Catalyzed Enantioselective Direct Aldol-Type Reaction of Oxindoles with Ethyl Trifluoropyruvate.** Angew Chem Int Edit. 46 (45): 8666-8669.

Pinsach J. 2009. **Development of recombinant aldolase production process in Escherichia coli.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ponniah K, Loo TS, Edwards PJB, Pascal SM, Jameson GB, Norris G. 2010. **The production of soluble and correctly folded recombinant bovine β -lactoglobulin variants A and B in E. coli for NMR studies.** Protein Expres Purif. 70 (2): 283-289.

Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson H. 2006. **Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants.** Envir Sci Tech Lib. 20 (23): 7445-7450.

Rantwijk F, Madeira R, Sheldon RA. 2003. **Biocatalytic transformations in ionic liquids.** Trends Biotechnol. 21 (3): 131-138.

Reiss T. 2007. **Consequences, opportunities and challenges of Modern Biotechnology for Europe.** Task 2 Main Report. Join Research Center Reference Reports. IPTS. Sevilla.

Riesemberg D. 1991. **High level Density Cultivation of Escherichia coli.** Curr Opin Biotech. 2: 380-384.

Rotman B, Ganesan AK, Guzman R. 1968. **Transport Systems for galactose and galactosides in Escherichia coli: II Substrate and inducer Specificities.** J Mol Biol. 36 (2): 247-260.

Schoevaart R, van Rantwijk F, Sheldon RA. 2000. **A four-step enzymatic cascade for the hydrates from glycerol.** J Organic Chem. 65(2): 6940-6943.

Schürmann M, Sprenger GA. 2001. **Fructose-6-Phosphate Aldolase is a Novel Class I Aldolase from Escherichia coli and is related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases.** J Biol Chem. 276 (6): 11055-11061.

Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. **Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli.** Microb Cell Fact. 4:1.

Soubrier F, Cameron B, Manse B, Somarriba S, Dubertret C, Jaslin G, Jung C, Caer CL, Dang D, Mouvault JM, Sherman D, Mayaux JF, Crouzet J. 1999. **pCOR: a new design of plasmid vector for nonviral gene therapy.** Gene Ther. 6 (8): 1482-1488.

Studier FW. 2005. **Protein production by autoinduction in high density shaking cultures.** Protein Expres Purif. 41 (1): 207-234.

Suau T, Calveras J, Clapés P, Benaiges MD, Álvaro G. 2005. **Immobilisation of fuculosa-1-phosphate aldolase from E. coli to glyoxal-agarose gels by multipoint covalent attachment.** Biocatal Biotransfor. 23 (3-4): 241-250.

Suau T, Álvaro G, Benaiges MD, López-Santín J. 2006. **Influence of Secondary Reactions on the Synthetic Efficiency of DHAP-aldolases.** Biotechnol Bioeng. 93: 48-55.

Sugiyama M, Hong Z, Greenberg WA, Wong CH. 2007. **In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD).** Bioorg Med Chem. 15 (17): 5905-5911

Szpirer CY, Milinkovitch MC. 2005. **Separate-component-stabilisation system for protein and DNA production without the use of antibiotics.** Biotechniques. 38: 775-81.

Takayama S, Mc Garvey GJ, Wong CH. 1997. **Microbial Aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars.** Annu Rev Microbiol. 51: 285-310.

Tomala M, Lavrentieva A, Moretti P, Rinas U, Kasper C, Stahl F, Schambach A, Warlich E, Martin U, Cantz T, Scheper T. 2010. **Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *E. coli* using thioredoxin as fusion partner.** Protein Expres Purif. 73 (1): 51-57.

van Herck T, Hartog AF, Shoenaker HE, Wever R. 2006. **Simple enzymatic *in situ* generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: increased efficiency by phosphate cycling.** J Organic Chem. 71 (6): 6241-6247.

Ventura S, Villaverde A. 2006. **Protein quality in bacterial inclusion bodies.** Trends Biotechnol. 24: 179-185.

Vidal L. 2006. **Producció de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal L, Pinsach J, Striedner G, Caminal G, Ferrer P. 2008. **Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*.** J Biotechnol. 134 (1-2): 127-136.

Walsh G. 2003. **Biopharmaceutical benchmarks.** Nature. 21(8): 865-870.

Wassermann HH, Chen JH, Xia M. 1999. **Total Syntheses of Depsipeptide Elastase Inhibitors YM-47141 and YM-47142 with use of Ylide Protections and Coupling Methods.** J Am Chem Soc. 121 (6): 1401-1402.

Zabriskie DW, Wareheim DA, Polansky MJ. 1987. **Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*.** J Ind Microbiol Biot. 2 (2): 87-95.

CAPÍTOL 2. MATERIALS I MÈTODES.

2.1. Soques bacterianes i plasmidis.

Les soques d'*Escherichia coli* utilitzades en aquest treball han estat les següents.

2.1.1. *Escherichia coli* M15.

La soca M15, també denominada DZ 291, va ser construïda per PJ.Zamenhof (Villarejo i Zebin, 1974; Zamenoff i Villarejo, 1972; Fowler i Zebin, 1968). És derivada de K12, conté la deleció M15 en el gen lac Z (Beckwith, 1964) i el seu fenotip és Nal^s, Str^s, Rif^s, Thi⁻, Lac⁻, ara⁻, gal⁺, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺. És una soca comercialitzada per Qiagen (Hilden, Alemanya), la literatura provinent de la qual afirma que aquesta soca no pot ser infectada per fags lambda i el promotor P_L introduït no és actiu. Per defecte, aquesta casa comercial proporciona la soca amb el plasmidi pREP-4, el qual conté una resistència a Kanamicina. En aquest estudi, aquest plasmidi s'ha curat, obtenint una soca M15 lliure de vectors plasmídics episomals.

2.1.2. *Escherichia coli* M15 ΔglyA.

M15 ΔglyA és una soca auxotròfica per la glicina que resulta d'una delecció cromosomal del gen *glyA* (el qual codifica per la serina-hidroximetil-transferasa o SHMT), donant lloc a M15 ΔglyA (Vidal et.al., 2008). Es tracta d'una soca derivada de la M15 comercial de Qiagen i per tant, caldria ésser designada com a soca auxotròfica M15 ΔglyA/pREP-4.

2.1.3. *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'.

La soca XL1 Blue MRF' (Stratagene Co: San Diego, CA), es caracteritza per a ser deficient en els gens que codifiquen per als enzims involucrats en la síntesi de tiamina (Vitamina B1) i també per contenir un episoma F'. L'episoma F' és un plasmidi que conté el factor F que codifica pel pili sexual a través del qual el bacteriòfag M13 pot infectar la cèl·lula i pels gens que codifiquen els enzims involucrats en la síntesi de prolina. Un sistema de complementació per l'operó lactosa (lac) entre l'episoma F' i el plasmidi emprat com a vector de clonatge facilita la selecció dels clons transformats amb èxit que contenen el plasmidi amb l'insert que codifica per l'expressió de l'enzim d'interès.

El genotip d'*E. coli* XL1 Blue MRF és: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcr CB-hsd SMR-mcr) 173 endA1supE44 thi-1recA1gyr \Delta 96 rel A1 lac [F' proAB lacIq Z\Delta M15Tn10 (Tet^r)]$.

2.1.4. *Escherichia coli* Origami.

Origami és una soca derivada de K-12, comercialitzada per Novagen (EMB Chemicals, USA), mutant en la tioredoxina reductasa (trx B) i la glutatona-reductasa que posseeix el següent genotip: $\Delta(ara-leu)7697 araD139, \Delta lacX74aphCgalEgalKtpsL\Delta phoAPvuII phoR F'[lac (lacIq)pro] gor522::Tn10 (TcR) trxB::Kan$. Aquesta soca és àmpliament usada en la producció de proteïnes amb ponts disulfur i requereix els antibiòtics Kanamicina i tetraciclina per al seu creixement.

2.1.5. *Escherichia coli* JGT20 (DnaK⁻).

La JGT20, Dna K defectiva, és una soca derivada de la soca salvatge MC4100 de genotip *dnaK756 thr::Tn10* (Thomas i Baneyx, 1998). És deficient en la xaperona Dna K, cosa que la fa interessant per a la producció i caracterització de cossos d'inclusió degut a la seva tendència a generar agregats. Conté dos gens de resistència a antibiòtic: Tetraciclina i estreptomocina, així com també dues auxotrofies: treonina i arginina.

Totes les soques descrites van ser conservades en criovials (AES Laboratoire, França) i preservades a -80 °C. La preparació d'aquests criovials, que contenien una sèrie de boles resuspeses en una solució isotònica, consistia en la prèvia incubació d'un falcon que contenia 10 mL de medi Luria Bertani (LB) amb 10 µL d'Ampicil·lina, als quals s'afegia 0.5 mL de cultiu. Després d'unes 10-12 hores d'incubació en agitació (150 rpm a 37 °C), se'n prenia 1 mL el qual era introduït en el criovial després d'extreure'n la solució isotònica prèvia. El cultiu introduït es deixava reposar durant 20-30 minuts, a fi que les boles s'impregnessin de líquid i finalment, s'extreia tot el contingut que sobreixia del límit assenyalat en el criovial.

Els plasmidis inicials usats en aquest estudi foren els següents. Els diagrames d'aquests foren visualitzats i modificats mitjançant el programa Vector NTi Versió 4.0 (Intelligent Computer System for Molecular Biology, USA).

2.1.6. Plasmidi pREP-4.

El plasmidi pREP-4 (Qiagen) de 3740 pb (Fig.2.1) és un vector de baix nombre de còpies, unes 10 per plasmidi segons Pinsach (Pinsach, 2009). Conté un gen repressor LacI, el qual permet produir un alt nivell de repressor *lac*. És comercialitzat a partir de la soca M15 (pREP-4), mitjançant un kit anomenat QIAexpress system (Qiagen) que combina l'expressió (pQE) i la repressió (pREP-4). El marcador de selecció per mantenir el pREP-4 dins M15 és un gen de resistència a Kanamicina. Tanmateix, en un punt determinat d'aquest treball es decideix eliminar l'esmentat plasmidi degut a certes circumstàncies negatives no previstes.

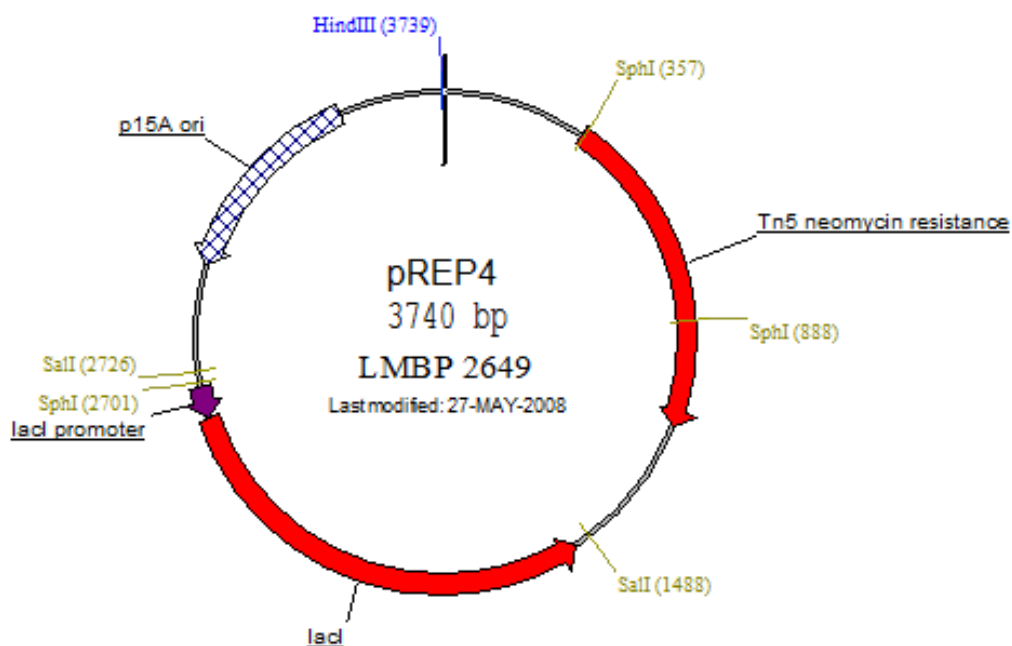


Fig. 2.1. Plasmidi pREP-4 (Qiagen) que conté un gen de resistència a Neomicina i Kanamicina, un gen repressor LacI i un origen de replicació p15A. Diagrama extret de la col·lecció de plasmidis BCCM/LMBP.

2.1.7. Plasmidi basats en pQE-40: pQEfucA i pQE α Brham.

Els plasmidis pQE α Brham i pQEfucA són derivats del pQE-40 i són d'alt nombre de còpies: 30-40 còpies segons Pinsach (Pinsach, 2009). Aquest tipus de plasmidis compten amb un promotor del fag T5, un lloc d'unió al ribosoma RBSII (alta taxa de traducció), una cua d'histidines a l'extrem 5' del lloc de clonatge múltiple (MCS segons les sigles en anglès), dos terminadors forts: t_0 del fag λ i el T1 de l'operó *rrnB* d' *E. coli*, un gen β -lactamasa (resistència a Ampicil·lina) i un origen de replicació Col EI. Dins aquest grup genèric es troben pQEfucA i pQE α Brham, que es descriuen tot seguit.

El pQEfucA, formant part del sistema d'expressió *E.coli* M15/pREP-4, és un plasmidi basat en pQE-40 (adquirit comercialment a Qiagen) que conté el gen que expressa Fuculosa-1-fosfat aldolasa en *E. coli* (Vidal, 2006). Tal com s'ha comentat en el paràgraf anterior, conté un gen *bla* de resistència a Ampicil·lina, l'esmentat gen que codifica per Fuculosa-1-fosfat aldolasa, Col EI com a origen de replicació i T5 com a promotor fort. Convé destacar la presència d'un gen *cat* (gen *cloramfenicol acetiltransferassa*), el qual no té promotor i juntament amb l'esmentat T1, incrementa l'estabilitat plasmídica. En presència d'IPTG, la transcripció de l'operador *lac* induït per T5 és reprimida pel terminador t_0 . L'efecte de sobrelectura de la unitat de transcripció no és suficient per permetre l'ús de *cat* com a informador o gen de resistència a cloramfenicol, raó per la qual sovint és anomenat *cat* inactiu.

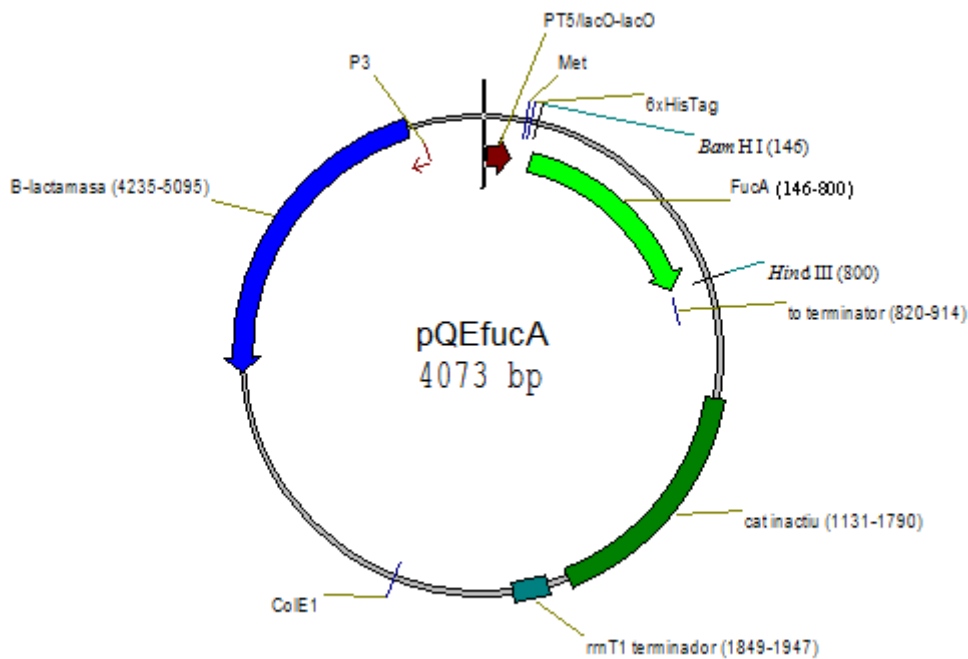


Fig. 2.2. Plasmidi pQEfucA que conté els gens *fucA* i *bla*, els terminadors t_0 i *rrnBT1* corrent avall dels gens *fucA* i *cat*, respectivament, l'origen de replicació *ColE1* i el promotor T5 (Vidal, 2006).

El plasmidi pQE $\alpha\beta$ rham, basat en el vector pQE-40 (Qiagen), incorpora un marcador auxotròfic, a partir de la fusió entre dues subunitats: α i β , a l'esmentat plasmidi estàndard (Vidal, 2006).

La subunitat β conté el gen *glyA* d'*E. coli*. Tenint en compte que al gen *glyA* li manca el seu propi promotor i regions reguladores, es va plantejar fusionar un promotor constitutiu dèbil al gen *glyA*. La raó d'aquesta elecció és que en estudis preliminars, l'expressió del "cassette" de *glyA* donava uns nivells d'expressió molt elevats. Per tal de reduir la càrrega metabòlica, es va plantejar la introducció d'un promotor més dèbil que el nadiu.

La subunitat α conté el promotor constitutiu dèbil P3, provinent del gen *bla*_{TEM} (de resistència beta-lactasàmica). Aquest promotor, present en el pQE-40 original, permet

l'expressió constitutiva del gen *bla*. Es tracta d'un sistema no regulable, però que permet subministrar quantitats suficients de SHMT a la cèl·lula per al seu creixement.

La introducció de l'esmentat cassette va implicar com a conseqüència associada l'eliminació de *cat* inactiu i per tant, del terminador T1, el qual serà estudiat més exhaustivament en capítols posteriors. Addicionalment, el promotor P3 compta amb un terminador de tipus dèbil anomenat t_0 constitutiu (Lartigue, 2002).

El gen *bla* (β lactamasa) és el responsable de la resistència a Ampicil·lina i l'origen de replicació és Col E1. Els fragments α i β contenen el promotor P3 i el gen *glyA*, el qual codifica per SHMT (serina-hidroximetil transferasa).

Posseeix una mida de 5300 pb i conté el gen *rhaD* (ramnulosa-1-fosfat aldolasa) d'*E. coli* sota el control del promotor T5 i dues seqüències reguladores lac O.

Finalment, destaca la presència d'una seqüència 6xHis-tag situada a l'extrem 5' del gen *rhaD*, així com també un terminador fort de la transcripció: t_0 del bacteriòfag lambda.

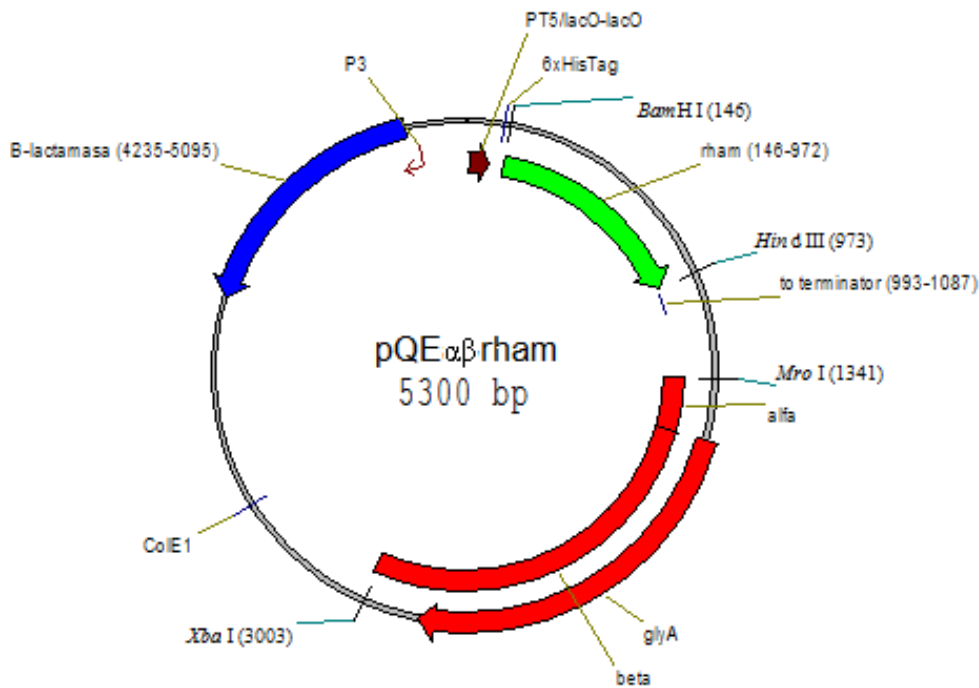


Fig. 2.3. Plasmidi pQE $\alpha\beta$ rham que conté els gens *bla*, *glyA* i *rhaD*, el terminador t_0 , l'origen de replicació ColE1 i el promotor T5 (Vidal, 2006).

2.1.8. Plasmidi pET21a.

El plasmidi pET21a (Novagen) posseeix el gen repressor LacI i es tracta d'un plasmidi àmpliament emprat en construccions gèniques (Fig.2.4). Conté un promotor fort, T7, a més d'un gen de resistència a Ampicil·lina i origen de replicació pBR322.

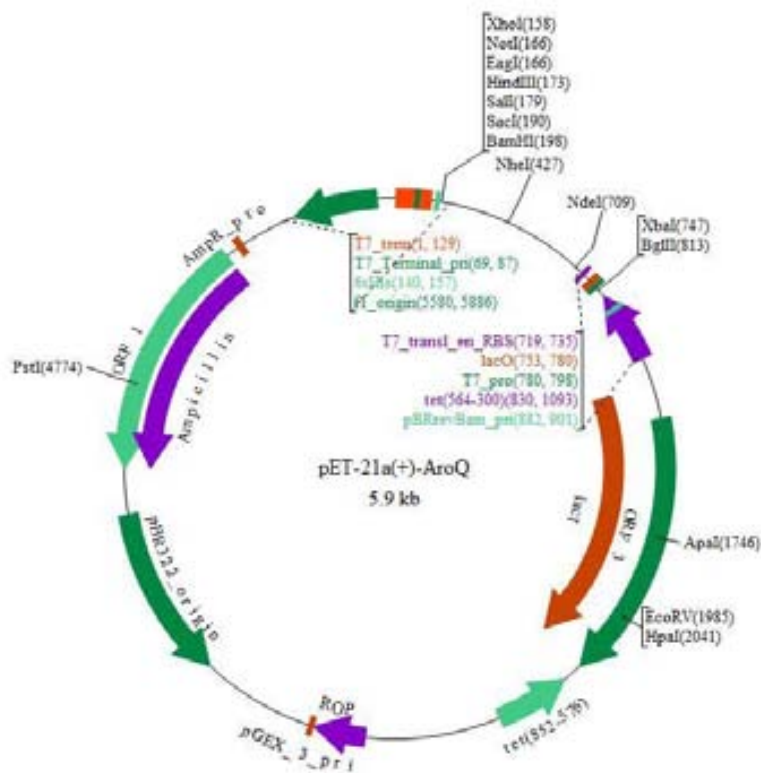


Fig. 2.4. Plasmidi pET21a que conté un repressor LacI, un gen de resistència a ampicil·lina, un promotor T7 i un origen de transcripció pBR322 (Novagen).

2.1.9. Plasmidi pTrcHis.

El sistema d'expressió basat en el vector pTrcHis (Invitrogen, San Diego, CA) és un sistema dissenyat per l'expressió regulada d'alts nivells de proteïnes no tòxiques en *E. coli* sota el control del promotor d'expressió *trc* (Fig.2.5). Aquest promotor *trc* és un híbrid derivat dels promotors *trp* i *lac* regulat per l'operador *lacO* i el producte d'expressió del gen *lacIq*. La presència de lactosa i el seu anàleg estructural isopropil- β -tiogalactopirànòsid (IPTG) activen la transcripció del gen *lacIq* i el producte d'expressió obtingut actua sobre l'operador *lacO* i permet l'expressió dels gens dependents d'aquest promotor fort.

Aquest plasmidi consta d'un origen de replicació (Col E1), el gen *bla*, sota el control del promotor *trc*, la seqüència codificant per la cua d'histidines junt al polímer, de forma que la proteïna clonada s'expressa com a proteïna de fusió a sis histidines en el seu extrem N-terminal.

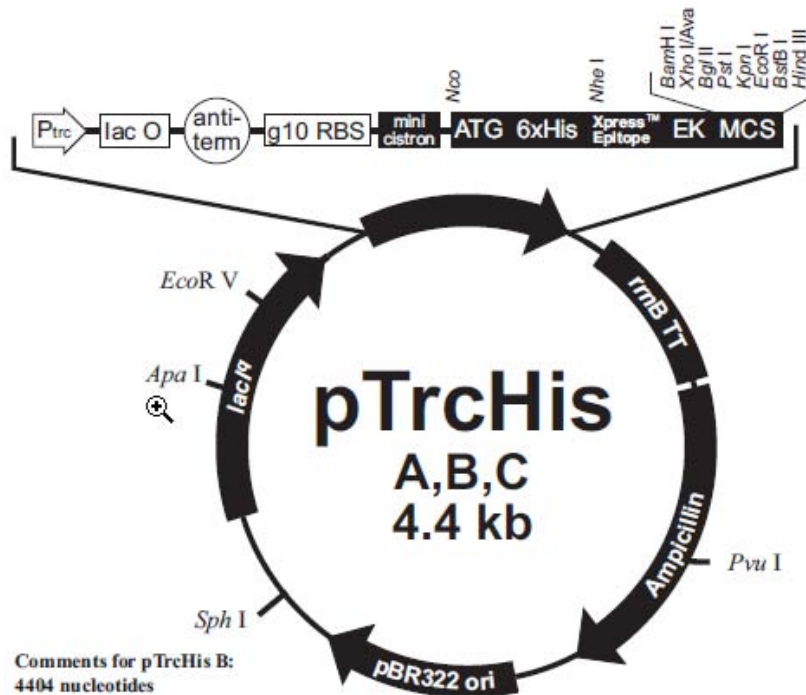


Fig. 2.5. Plasmidi pTrcHis que conté un repressor LacI, un gen de resistència a Ampicil·lina, un terminador *rrnB* T1 , un promotor *trc* i un origen de replicació pBR322 (Invitrogen).

2.1.10. Plasmidi pTVP1GFP.

El plasmidi pTVP1GFP (Garcia-Fruitòs et al., 2005) conté els gens que codifiquen per una fusió derivada entre la proteïna GFP (Green Fluorescence Protein) i una proteïna anomenada VP1 de la càpside del virus de la febre aftosa. L'expressió del gen *vp1gfp* està sota el control del promotor *trc* (Fig.2.6).

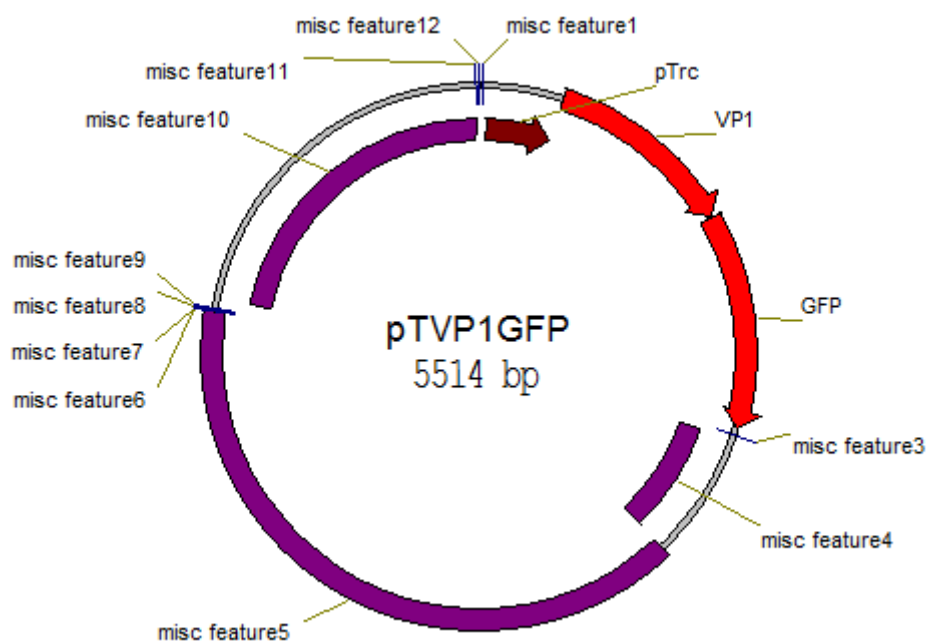


Fig. 2.6. Plasmidi pTVP1GFP que conté els gens *vp1* i *gfp* i un promotor *trc* (Garcia-Fruitòs et al, 2005).

2.2. Tècniques de DNA recombinant.

2.2.1. Extracció i aïllament de DNA plasmídic.

L'extracció de DNA plasmídic va ser duta a terme mitjançant el kit de Miniprep QIAprep spin (Qiagen, Minnesota, USA) o bé amb "Pure Yield Plasmid Miniprep system" de Promega (Madison, USA).

La purificació dels gels preparatius fou realitzada a partir del kit d'extracció de Qiagen (QIAquick Gel Extraction kit) i les etapes de rentat mitjançant un kit de purificació anomenat PCR Purification kit (Qiagen) o Wizard SV gel and "PCR clean-up system" de Promega.

2.2.2. Visualització i quantificació de DNA.

La visualització de DNA va ser realitzada a partir de gels d'agarosa tenyits amb bromur d'etidi (Bioprobe, Califòrnia, USA) a raó de 10 mg/mL. La preparació dels esmentats gels va ser possible mitjançant tampó d'electroforesi anomenat TAE que consistia en Tris 40 mM, Àcid acètic 20 mM i EDTA 1 mM ajustat a pH=8.1 i agarosa (Gibco, Michigan, USA) al 0.8 % (p/v).

Les condicions d'operació van consistir en 90 V durant 60 minuts aproximadament.

Per tal de conèixer la concentració de DNA, després d'aplicar cadascun dels passos de clonatge, especialment a l'etapa de lligació, es va emprar un espectrofotòmetre Thermoscientific Nanodrop™ 1000 tot seguint les indicacions del fabricant dins l'aplicació "Nucleic Acid" (Manual de l'usuari v.3.7, Thermoscientific Nanodrop™ 1000).

2.2.3. Amplificació de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa.

Els oligonucleòtids emprats, proporcionats per l'empresa Biomers (Alemanya) a partir de la seqüència de disseny, responen a dues finalitats ben diferenciades. En un primer lloc, destaquen aquells oligonucleòtids destinats a l'amplificació de certs elements per tal de modificar una construcció, les seqüències dels quals s'especifiquen capítol a capítol. En segon lloc, es necessiten oligonucleòtids per tal de seqüenciar els constructes resultants, les seqüències dels quals es descriuen tot seguit a la Taula 2.1.

Taula 2.1. Oligonucleòtids usats en la seqüenciació dels plasmidis que s'indiquen.

(*) S'empren també per clonatge i per a la seqüenciació del plasmidi pQE α fucAT1LacI sense β -lactamasa. Les Tm que figuren a la taula són les calculades per la mateixa casa comercial Biomers.

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	DNA motlle	Zona d'homologia	Tm (°C)
pQE_for1	accaacaaccgcgtatatc	pQE α fucA	Gen <i>fucA</i>	57
pQE_rev1	agctggacgttacgaagaa	pQE α fucA	Gen <i>fucA</i>	54
pQE_for2	cttgatcctgcggttaactt	pQE α fucA	Gen <i>fucA</i>	55
pQE_rev2	acagttcggcatcataatcg	pQE α fucA	Gen <i>fucA</i>	53
pQE_for3	cgaactgtggcaggtatgg	pQE α fucA	Gen <i>glyA</i>	58
pQE_rev3	tcgccggagtacctacctacacga	pQE α fucA	Gen <i>glyA</i>	63
pQE_for4	aggactccggcgattacc	pQE α fucA	Gen <i>bla</i>	58
pQE_rev4	gctaccagcgggtgtttgtt	pQE α fucA	Gen <i>bla</i>	58
pQE_for5	tttggatatcgcgtctgctgct	pQE α fucA	Gen <i>bla</i>	62
pQE_rev5	aagacgaaagggcctcgtga	pQE α fucA	Gen <i>bla</i>	58
pREP4_1a	agtaaactggatggctttct	pREP4	Gen Kan	51
pREP4_1b	atcagccatgatggatactt	pREP4	Gen Kan	51
pREP4_2a	ggaagggactggctgctatt	pREP4	Gen Kan	56
pREP4_2b	tggttgccaacgatcagatg	pREP4	Gen Kan	56
pREP4_3	tcgacaattcgcgctaact	pREP4	Gen <i>lacI</i>	55
pQEfucA_1	aacttaatgggccgctaac	pQEfucA	Gen <i>fucA</i>	55
pQEfucA_2	ctgtccctcctgttcagcta	pQEfucA	Gen <i>fucA</i>	55
pQEfucA_3	gacactcagttccggtagg	pQEfucA	Gen <i>bla</i>	57
pQEabrham_7	tgagcggataacaatttcac	pQE α rham	Gen <i>rham</i>	51
pQEabrham_8	ccgacgctggatgaaacctt	pQE α rham	Gen <i>rham</i>	58
pQEabrham_9	atccgggcaaacgctactac	pQE α rham	Gen <i>glyA</i>	57
pQE_T1for	cttcgggaagcctttctacg	pQE α fucAT1	Terminador T1	55
pQE_T1rev	accaccctgaattgactc	pQE α fucAT1	Terminador T1	52
LacI_NdeI*	atgcatcgagacactgtctcactgccc gctttccagtc	pQE α fucAT1LacI	Gen <i>lacI</i>	71
LacI_Asp*	atggactcacatatgatgatagcggcc	pQE α fucAT1LacI	Gen <i>lacI</i>	66
VP1_for	ggaagaga atcgatcacgaattcctacgaccactg gtgaatct	pQE α fucAT1VP1	Gen VP1	65

Les reaccions en cadena de la polimerasa (PCR) amb finalitats de clonatge es van realitzar amb KOD DNA polimerasa (Novagen) tot adaptant les indicacions del fabricant a la Tm (°C) dels primers i longitud del fragment a amplificar. Quan es tractava d'una PCR de comprovació, s'emprava la Taq polimerasa (Promega), seguint

també les especificacions del producte. La quantitat de DNA motlle oscil·lava entre 1 i 6 ng ja que provenia es tractava de DNA plasmídic.

2.2.4. Modificacions enzimàtiques de DNA.

Per tal de realitzar les modificacions plasmídiques pertinents, es va fer ús de diversos enzims de restricció, els quals es detallen a continuació, així com també la casa comercial i la diana de restricció. Pel que fa al procediment d'ús, es van seguir les instruccions del fabricant. (Taula 2.2).

Taula 2.2. Enzims de restricció rellevants emprats per modificar el DNA plasmídic al llarg de la tesi.

<i>Enzim</i>	<i>Diana (5'-3')</i>	<i>Casa comercial</i>
BamHI	GGATCC	Roche
HindIII	AAGCTT	Roche
MroI	TCCGGA	Roche
XbaI	TCTAGA	Roche
NdeI	CATATG	Fermentas
AspI	GACACTGT	Fermentas
EcoRI	GAATTC	Fermentas
Bgl I	GCCNNNNNGGC	Fermentas

Les lligacions es van realitzar mitjançant lligasa T4 DNA (Fermentas, Alemanya) a 16 °C durant tota una nit, tal com es recomana a les instruccions del fabricant si es desitgen lligar fragments d'extrem roms. Generalment, es va usar una relació insert-vector de 5:1, excepte en casos puntuals que va ser de 10:1. La quantitat de DNA total acostumava a ser de 200-300 ng i el volum màxim de reacció era de 20 µL.

2.2.5. Transformació d'*E. coli* per electroporació.

2.2.5.1. Preparació de cèl·lules competents.

Un cultiu de 10 mL en medi Luria-Bertani (LB) va ser incubat tota la nit a 37 °C. Aleshores, 5 mL d'aquests es van emprar per inocular 500 mL de medi LB fresc fins arribar a una OD₆₀₀ de 0.5-1.0. Les cèl·lules es van mantenir en gel durant 15-20 minuts i van ser centrifugades a 4000 rpm. Posteriorment, el sobrenedant va ser descartat i el sediment va ser resuspès en 500 mL de glicerol fred al 10 % (v/v), i tot seguit, es va realitzar el mateix procediment amb 250 mL. Després de dos rentats addicionals amb glicerol fred al 10 %, el sediment fou resuspès amb 50 mL i 500 µL.

Les cèl·lules resultants van ser guardades a -80 °C en alíquotes de 80 µL.

2.2.5.2. Procediment de transformació.

Les transformacions van ser dutes a terme emprant 50 µL de cèl·lules competents i 1 µL de la reacció de lligació, utilitzant cubetes (0.2 cm de llum) a 2500 V, 25 µF i 200 Ω en un electroporador Gene Pulser (Biorad Laboratories Inc, Califòrnia).

2.2.5.3. Verificació dels clons obtinguts.

Els clons obtinguts van ser comprovats mitjançant un anàlisi de restricció amb algunes endonucleases (descrites al punt 2.2.4), com a prova complementària a una PCR de comprovació. Aquesta es realitzà amb la intenció de verificar la presència de certs elements introduïts, per la qual cosa es va realitzar amb els mateixos oligonucleòtids amplificadors (descrits al punt 2.2.3). Addicionalment, es va dur a terme un creixement en medi mínim (vegeu 2.3.2), per tal de verificar directament la complementació per l'auxotrofia per glicina i per tant, del gen *glyA*.

Finalment, els clons obtinguts que responen favorablement a aquestes proves van ser analitzats al Servei de Seqüenciació de la UAB.

2.3. Medis i condicions de cultiu.

En el transcurs de la tesi s'han emprat diversos medis, bàsicament en funció de si es desitjava produir FucA en forma soluble o en forma de cossos d'inclusió, així com també segons el tipus de soca. No obstant, en ambdós casos el procediment consisteix en una etapa de preinòcul, seguida d'un creixement en un matràs d'Erlenmeyer. En alguns casos, es passarà al cultiu en fermentador agitat i airejat, operant en discontinu o en discontinu-alimentat.

2.3.1. Procediment productiu segons la fracció.

2.3.1.1. Producció de FucA en forma de fracció soluble.

En el preinòcul, s'ha usat el medi LB (Luria Bertoni) complementat amb un antibiòtic per tal de generar pressió selectiva. El medi LB conté NaCl (10 g/L), extracte de llevat (5 g/L) i peptona (5 g/L). L'antibiòtic ha estat Ampicil·lina en tots els casos, ja que el plasmidi d'interès amb finalitats de clonatge era pQE α fucA, el qual contenia un gen de resistència a l'esmentat antibiòtic. En un volum de 15 mL de LB, s'han introduït 15 μ L d'Ampicil·lina i una bola d'un criovial de glicerinat.

Pels creixements principals, destaca un medi definit basat en glucosa com a font de carboni (MD).

El medi definit o MD usat per l'obtenció de FucA en la fracció soluble en cultius en matràs d'Erlenmeyer conté els següents components la concentració dels quals s'expressa en g/L: glucosa (5), K₂HPO₄ (11.9), KH₂PO₄ (2.4), (NH₄)₂SO₄ (3) i NaCl (1.8), MgSO₂·7H₂O (0.45), aigua destil·lada estèril, FeCl₃ (0.02), tiamina (0.1) i 2.86 mL/L de solució d'elements traça o microelements.

El medi de cultiu del fermentador en operació discontinua conté els següents components la concentració dels quals s'expressa en g/L: glucosa (20), K_2HPO_4 (11.9), KH_2PO_4 (2.4), NaCl (1.8), $(NH_4)_2SO_4$ (3), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.45), $FeCl_3$ (0.02), tiamina (0.1) i 2.86 mL/L de solució d'elements traça o microelements.

El medi d'alimentació de cultius d'alta densitat cel·lular (operació discontinua alimentada) consisteix en els següents components la concentració dels quals s'expressa en g/L: glucosa (487), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (9.7), $FeCl_3$ (0.5), tiamina (0.34) i 64 mL/L d'elements traça o microelements.

La solució d'elements traça contenia en g/L: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1.44), $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.042), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.87), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.16), $CuSO_4$ (1.6), H_3BO_3 (0.01), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1.42), $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.01) i $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.02).

Els fosfats no s'inclouen al medi a la solució d'alimentació en els cultius discontinus alimentats per tal d'evitar la precipitació de les sals de magnesi. Enlloc d'això, una solució concentrada de fosfat que conté 500 g/L de K_2HPO_4 i 100 g/L de KH_2PO_4 s'incorpora en certs moments del creixement : $DO_{600}=40, 70$ i 100.

2.3.1.2. Producció de FucA en forma de cossos d'inclusió.

Quan la FucA es produeix en forma de cossos d'inclusió s'usen dos medis diferents: el brou "smart" definit d'autoinducció (S-DAB) i el brou definit d'inducció amb IPTG o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosid (DNB).

La composició del medi DNB es descriu en un article en fase de publicació (Li et.al., 2011) en g/L: glucosa (10.9), $(NH_4)_2HPO_4$ (4), KH_2PO_4 (13.3), Àcid cítric (1.55), $MgSO_4$ (0.59), citrat de ferro III (0.1), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.0021), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.0025), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.015), $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.0015), H_3BO_3 (0.003), $Zn(CH_3COOH)_2 \cdot 2H_2O$ (0.034), Titriplex III (0.014). El pH s'ajustava a 6.8 amb NaOH ~2.7 g/L.

En el medi S-DAB, la glucosa va ser substituïda per una barreja de glucosa, glicerol i lactosa (Rinas, Leibniz Universität, Hannover, comunicació personal).

Per al creixement de la soca JGT20 (Dna K⁻), en ser deficient en una xaperona, s'ha requerit una font de carboni suplementària al medi MD descrit al punt 2.3.1.1, extracte de llevat a concentració de 2-4 g/L.

2.3.2. Creixement en matrassos d'Erlenmeyer.

2.3.2.1. Producció de FuCA en forma de fracció soluble.

El preinòcul descrit al punt 2.3.1.1, s'incubà a 37 °C en un agitador rotatori (INFORS AG, Alemanya) a 250 rpm durant tota una nit. El dia següent, es preparà un matràs d'Erlenmeyer amb 50 mL de medi definit (MD) i se li afegiren 3.5 mL de l'esmentat preinòcul.

Es va seguir el cultiu fins a una DO_{600nm} de 1-1.5, moment en el qual es va induir mitjançant IPTG (50 µM). Es continuà seguint el cultiu fins que la DO es mantingué constant (entre 4 i 5 hores després de la inducció).

2.3.2.2. Producció de FuCA en forma de cossos d'inclusió.

En aquest cas, el mètode descrit compta amb algunes variacions ja que una part del treball va ser dut a terme durant una estada al TCI (Leibniz Universität, Hannover, Alemanya), per la qual cosa hi ha canvis en la metodologia habitual.

En primer lloc, es van preparar 2 mL de DNB amb una bola de criovial glicerinat, deixant-los en agitació a 37 °C durant 4 hores. A continuació, es preparà un matràs d'Erlenmeyer amb 100 mL de medi DNB i 100 µL del preinòcul, el qual es deixà incubar durant tota una nit (condicions similars a les esmentades). Aquest va ser l'inòcul que

s'emprà per inocular els matrassos d'Erlenmeyer productors, essent l'un amb medi DNB i l'altre S-DAB. Amb aquest objectiu, el dia següent es prepararen 2 matrassos d'Erlenmeyer amb 100 mL de medi definit i es prengué el volum de cultiu necessari per obtenir una densitat òptica de 0.12 unitats en DNB i 0.04 en el S-DAB. Aquests matrassos d'Erlenmeyer es van fer créixer a 37 °C per anar seguint la seva evolució al llarg del temps.

Quan la densitat òptica a 600 nm fou de 1-1.5 en el DNB, es va induir amb IPTG (1 mM) i no s'aturà el creixement fins a les 5 h en el cas d'estar treballant a 37 °C (a 30 °C serien 6-7 hores i a 42 °C, 4 hores).

En el cas del medi S-DAB, com que es tractava d'un medi d'autoinducció, no calia realitzar cap acció sobre el cultiu fins a les 24 hores després d'inocular. En aquest moment, s'aturà el cultiu després de mesurar la densitat òptica a 600 nm.

2.3.3. Creixement en fermentador.

Tots els experiments es realitzaren en un bioreactor Biostat B ® (Braun Biotech, Alemanya) equipat amb un tanc de fermentació de 2 L. La unitat de control digital (DCU) monitoritzava el pH, agitació, temperatura i oxigen dissolt en el reactor. Els paràmetres operacionals a mantenir van ser els següents.

El pH del medi de cultiu al fermentador es manté a un valor de 7 unitats, mitjançant l'addició d'una solució d'hidròxid amònic al 20 % (v/v). En segon lloc, l'airejament estava fixat a 1.5 L/minut, variant-ne la proporció entre aire i oxigen pur segons convingui. I finalment, el percentatge de saturació d'oxigen dissolt al medi es mantingué al 50 %, mitjançant un llaç de control en cascada amb l'agitació mantenint en tot moment un cabal de 1.5 L/minut.

Cal destacar la presència de dos mesuradors de flux per tal de controlar i mesurar l'entrada de fluxos massics de gas (MFM, Bronkhost, EL-FLOW, Holanda).

En el cas de cultius discontinus alimentats s'ha operat amb un perfil exponencial d'addició per tal de mantenir la velocitat específica de creixement (μ) al valor desitjat emprant una microbureta amb una xeringa Hamilton de 2.5 mL (MB Crison, Instruments MICRO BU 2030, España). S'ha utilitzat un software específic prèviament desenvolupat tot usant Microsoft Visual Basic 6.0 (Pinsach, 2009) per a l'addició automatizada per tal de d'adquirir dades i monitoritzar les variables al llarg del procés.

L'estratègia d'inducció és sempre en pols, sigui quina sigui la forma de produir la proteïna d'interès. L'única variació és la concentració d'IPTG, essent aquesta de 150 μ M en el cas de produir la FucA en forma de fracció soluble i de 1 mM si es desitja produir-la en forma de cossos d'inclusió.

2.4. Mètodes analítics per al seguiment del cultiu.

El seguiment del cultiu va ser analitzat bàsicament mitjançant la mesura de la densitat òptica a 600 nm, per a la determinació de biomassa i de la concentració de glucosa (g/L), per a la determinació de la concentració de substrat.

2.4.1. Mesures de densitat òptica (DO).

La densitat òptica a 600 nm es mesura usant un espectrofotòmetre (Philipps PV 8620 UV, Pye Unicam Ltd, Anglaterra).

L'estimació de la concentració de la biomassa per mesura de la densitat òptica es basa en la capacitat de les cèl·lules per produir turbidesa i alhora, absorbir llum amb una determinada longitud d'ona. L'increment en l'absorbància del cultiu és proporcional a la concentració cel·lular i per tant, és un bon indicador de creixement. Per aquesta raó, es realitzen dilucions del cultiu en aigua destil·lada, de manera que les lectures es trobin dins de l'interval lineal de 0.2-0.9 i es mesuren a 600 nm, havent realitzat prèviament un blanc amb aigua destil·lada. Els resultats s'expressen en unitats d'absorbància.

La densitat òptica es converteix en g biomassa/L a partir de calibratges realitzats prèviament. 1 unitat de DO₆₀₀ equival a 0.266 g de pes sec/L (Durany, 2003).

2.4.2. Determinació de la concentració de glucosa.

La concentració de glucosa va ser mesurada al llarg del temps, per la qual cosa es requeria un sistema ràpid i eficaç que permetés tenir el valor al moment. Per aquest motiu, es va emprar un mètode enzimàtic a partir del mesurador YSI 2070 (Yellow

Spring Instruments, Yellow Springs, USA). Prèviament a l'anàlisi, les mostres van ser centrifugades a 12000 rpm durant 5 minuts, filtrades i diluïdes per respectar el rang de treball de l'YSI, el qual té un valor límit de 20 g/L de glucosa.

2.5. Mètodes d'anàlisi i quantificació de proteïnes.

Un cop obtingut i seguit el cultiu, calia tractar les mostres per tal de purificar-ne la proteïna d'interès, la qual es va quantificar en termes d'activitat total, específica i concentració.

2.5.1. Aïllament de la FucA expressada en forma soluble.

Les mostres procedents de brous de cultiu van ser recollides i centrifugades a 12000 rpm durant 5 minuts. El sediment va ser resuspès en 100 mM Tris-HCl (pH=7.5) fins a una densitat òptica final (OD₆₀₀) de 3 unitats. Les suspensions cel·lulars van ser mantingudes en gel i sotmeses a ultrasonicació en un sonicador Vibracell™ Sonicator Model VC50 (Sonics and Materials, Inc., Danbury, USA) a 50 watts, durant 4 cicles (30 segons/cicle).

Les restes cel·lulars van ser descartades per centrifugació a 12000 rpm durant 10 minuts i els sobrenedants van ser recuperats per a ésser quantificats a partir d'un assaig enzimàtic específic per a la fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA).

2.5.2. Purificació de la FucA en forma de cossos d'inclusió.

Existeixen diverses opcions per purificar cossos d'inclusió, les quals han estat avaluades al llarg de la tesi.

Una de les més estudiades ha estat el tractament amb lisozim.

Partint d'un cultiu induït d'*E. coli*, el qual es va centrifugar 15 minuts a 15000xg, la fracció sòlida es sotmetia a congelació a -80 °C durant tota una nit (el pas de congelació-

descongelació afavoreix la lisi). Tot seguit, es va resuspendre amb tampó de lisi (100 mM Tris-HCl, pH=7.5) a raó de 3 mL/g de pes sec de *E. coli* i s'afegiren una sèrie de reactius.

En primer lloc, s'addicionà l'inhibidor de proteases fluorur de fenilmetilsulfonil (PMSF) a raó de 15 µL/g d'*E. coli* i liozím a raó de 80 µL/g de pes sec de *E. coli*. Tot plegat s'incubà a 37 °C durant 45 minuts en agitació.

En segon lloc, es va afegir nonil-fenoxipolietioxiletanol (NP-40) essent aquest un 1 % del volum final i s'incubà la barreja a 4 °C durant 30-45 minuts.

En tercer lloc, s'afegí DNAsI (25 µL d'un estoc de 1 mg/mL) i sulfat de magnesi (volum necessari per obtenir una concentració final de 10 mM) i la barreja es va mantenir durant 30-45 minuts a 37 °C.

Finalment, es centrifugà la solució resultant a 15000xg durant 15 minuts. Es separà el sediment del sobrenedant, guardant aquest a -80 °C. El sediment en la seva totalitat es va resuspendre en 1 mL de tampó de lisi i tritó (2 % v/v). Aquest últim pas de rentat es va anar repetint tantes vegades com va ser possible fins a no tenir activitat a la fracció soluble.

Una alternativa de purificació consistia en l'ús d'un kit de purificació anomenat 10XBugbuster®10XProtein Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI), el qual es basava en l'ús de liozím i DNAsI com a reactius.

Finalment, les proves de sonicació es varen realitzar a petita escala mitjançant les condicions ja esmentades anteriorment per fracció soluble (50 watts, 4 cicles, 30 segons/cicle).

Per la disrupció mecànica dels brous de cultiu, es va fer ús del disruptor model TS-5 4 kW (Constant Systems Ltd, Northants, UK), operant a dues condicions diferents: un sol cicle a pressió elevada (40 kPsi) i tres cicles a pressió més baixa (21 kPsi), sempre tenint en compte el rang de pressió òptim per treballar amb *E. coli*. En ambdòs casos, el volum de cultiu a processar era de 250 mL.

2.5.3. Quantificació proteica.

Els gels SDS-PAGE van ser preparats al 12 % (p/v) de policrilamida seguint el procediment descrit per Laemmli (Laemmli et al. 1970) usant l'equip MiniProtean II (Biorad Laboratories Inc, CA, USA). En el cas dels cossos d'inclusió, les mostres es van preparar seguint aquest mateix procediment, però amb la particularitat que el tampó de càrrega contenia urea 8 M i van ser incubades a 95 °C durant 15 minuts enlloc dels 10 minuts habituals.

La tinció dels gels va ser efectuada mitjançant Coomassie blue o col·loidal, segons va convenir.

En el cas del Coomassie Blue es va efectuar una etapa de fixació, seguida d'una etapa de tinció i posteriorment, una destinció, per eliminar l'excés de colorant. La primera i la darrera es van dur a terme mitjançant l'agitació del gel en una solució al 40 % de metanol, mentre que la tinció es va realitzar en una solució prèviament filtrada que consistia en Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.25 g), metanol (90 mL) i àcid acètic glacial (10 mL).

Pel que fa al Coomassie Col·loidal també es duia a terme en les tres etapes descrites anteriorment, però de composicions diferents. La solució fixadora consistia en sulfat d'amoni (85 g), àcid fosfòric (15 mL) i aigua destil·lada (330 mL), metanol (170 mL) i Coomassie Blue G-250 (0.1% del volum total).

Els patrons de pes molecular, adquirits a Bio-Rad Laboratories Inc (CA, EUA), van ser els següents: Miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116.2 kDa), Fosforil·lase B (97.4 kDa), Sèrum d'albumina (66.2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbònica (31 kDa), Inhibidor de tripsina (21.5 kDa), Lisozim (14.4 kDa) i Aprotinina (6.5 kDa).

Les condicions de treball van ser 40 mA a 120 V durant 90 minuts. Es van dur a terme anàlisis densitomètriques dels gels SDS-PAGE per determinar la proporció entre FucA i la

resta de proteïnes amb l'ajut de dos programaris: el Quantity one v.4.8 (Biorad Laboratories Inc, CA, USA) de manera habitual i el Kodak Z370290® 1D (Sigma-Aldrich, USA), emprat puntualment a tall comparatiu.

La concentració de proteïna en mg/mL va ser determinada mitjançant un kit d'assaig proteic de Bradford (Pierce, Rockford, Ill, USA), usant BSA (albúmina de sèrum boví) com a proteïna patró.

2.5.4. Determinació de l'activitat enzimàtica de fuculosa-1-fosfat aldolasa (FucA).

2.5.4.1. Fonament.

L'activitat de FucA va ser determinada d'acord amb el procediment proposat per Durany, (2003), els principis del qual es descriuen breument.

La FucA catalitza la transformació de L-fuculosa-1-fosfat en L-lactaldehid i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) (Figura 2.7). Per tal de seguir el curs de la reacció, s'acobla una segona reacció enzimàtica. La DHAP produïda reacciona amb NADH gràcies a la presència de α -glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (α -GDH). Sota les condicions d'assaig, la reacció acoblada és gairebé instantània (Figura 2.7).

Per aquesta raó, la reacció es mesura a partir de la disminució de l'absorbància de NADH a 340 nm.

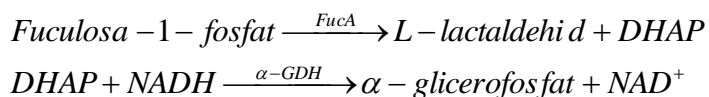


Fig. 2.7. Assaig enzimàtic per a la determinació de l'activitat enzimàtica de FucA (Durany, 2003).

2.5.4.2. Condicions de l'assaig.

L'assaig es va realitzar a una temperatura de 25 °C i pH=7.5 pas de llum=1cm, per un volum total d'assaig de 1 mL.

Reactius

Els reactius necessaris per l'assaig són els següents.

- 1) Tampó d'activitat: 100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl pH=7.5 a 25 °C.
- 2) Solució aquosa de Fuculosa-1-fosfat 58 mM sintetitzada com la sal de dicitclohexilamoni (PM=442.49). Aquesta sal no és comercial, i es disposa d'un protocol per la seva síntesi enzimàtica desenvolupada en treballs anteriors al grup (Durany, 2003).
- 3) GDH 50 UA/mL. Preparació d'una solució 500 UA/mL a partir del liofilitzat comercial α -GDH de múscul de conill (205 U/mL) (Fluka, Alemanya) que es conserva aliquidada a -20 °C. Es realitza la dilució pertinent amb Tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5.
- 4) β -NADH 4.0 mM (Fluka, Alemanya).
- 5) Solució aldolàsica a quantificar. L'assaig s'ha posat a punt per a mostres que continguin entre 0.26 i 0.60 UA/mL, la qual cosa correspon a una oxidació del β -NADH (considerant la velocitat inicial de consum per l'assaig) en el marge de 6.5 i 15.5 min.

Si la concentració de l'activitat Fuc-1-P-A de la mostra a quantificar excedia els marges definits per l'assaig es treballa amb dilucions de la mostra en el tampó d'activitat (100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, pH 7.5).

Procediment

S'introduïa en una cubeta la quantitat de reactius que s'indica a continuació.

864 µL de Tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5.

34 µL de Fuc-1-P 58 mM dissolts en 500 µL de Tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5.

34 µL de GDH dissolts en Tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5 per obtenir una concentració de GDH de 50 UA/mL.

34 µL de NADH dissolts en 1 mL d'aigua tipus MiliQ 18.2 MΩcm desgasificada i freda.

Tot seguit, s'homogeneïtzava tot per inversió i s'introduïa a l'espectrofotòmetre UV-VIS Cary (Varian, Agilent Technologies, USA) i es monitoritzava l'absorbància durant 2 minuts, per tal que els reactius s'atemperessin a 25 °C. S'esperava a tenir una lectura constant d' Ab_{340nm} entre 0.8 i 0.9 i en aquest moment s'afegien 34 µL de mostra a quantificar. S'homogenitzava la mescla de nou i es monitoritzava el descens durant 5 minuts.

Una unitat d'activitat enzimàtica (UA) es defineix com la quantitat d'enzim que catalitzava el trencament d'1 µmol de substrat natural per minut a 25 °C i pH=7.5. Per tant, l'activitat enzimàtica de la mostra es podia calcular a partir de la disminució de l'absorbància observada per minut mentre la caiguda és lineal segons l'equació següent:

$$UA/ml = \frac{(\Delta A_{340nm} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot V_t}{\epsilon \cdot V_e} \cdot D_f \cdot L_p$$

on: $\Delta A_{340nm} \cdot \text{min}^{-1}$ és la variació de l'absorbància a 340 nm, ϵ és el coeficient d'extinció molar de NADH ($6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), V_t : volum total d'assaig (mL), V_e : solució enzimàtica d'assaig (mL), D_f : factor de dilució de mostra enzimàtica i L_p : pas de llum (1 cm).

En mostres heterogènies, com és el cas dels cossos d'inclusió o de les mostres contenint enzim immobilitzat, l'activitat enzimàtica es mesurava en un cubeta de quars de 2 mL amb agitació magnètica, essent aquest el volum final, però mantenint la mateixa concentració de reactius, és a dir: 1728 μ L de Tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5, 68 μ L de Fuc-1-P 58 mM, 68 μ L de GDH i 68 μ L de NADH. Tots els reactius esmentats es dissolen de la mateixa manera que en el cas de les mostres homogènies.

2.5.5. Reacció d'addició aldòlica entre dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i (S)-Cbz-alaninal catalitzada per FucA.

2.5.5.1. Fonament.

FucA catalitza la reacció d'addició aldòlica entre la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i (S)-Cbz-alaninal, d'acord amb la reacció següent.

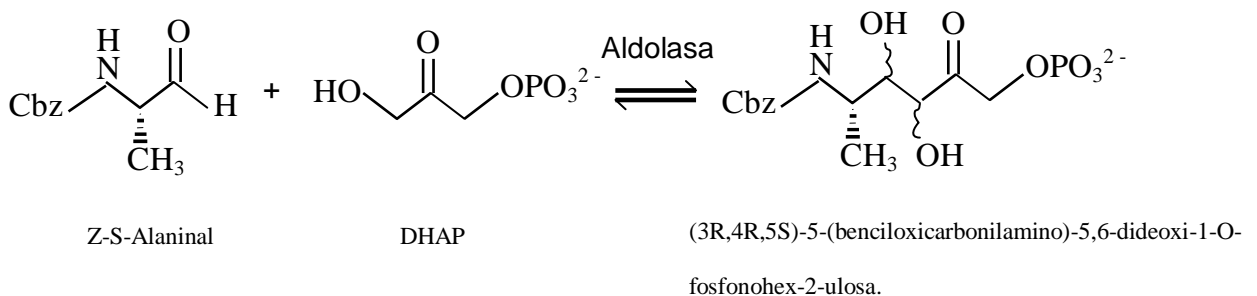


Fig. 2.8. Reacció model de la reacció d'addició aldòlica entre (S)-Cbz-alaninal i dihidroxiacetona fosfat (DHAP) catalitzada per Fuculosa-1-fosfat aldolasa.

Cadascuna de les quatre aldolases depenents de DHAP donen un diastereoisòmer diferent amb els sustrats naturals. Quan s'utilitza la FucA com a catalitzador, s'obté el producte de síntesi (3R,4R) (Espelt et al., 2005; Suau et al., 2006).

Per tal d'assegurar la solubilitat dels components, es requereix dimetilformamida (DMF) com a co-solvent (20 % v/v).

Totes les reaccions aldòliques efectuades són catalitzades per FucA a 4 °C a una concentració de substrats de 28 mM DHAP i 48 mM (S)-Cbz-alaninal (Suau, 2007).

El (S)-Cbz alaninal és dissolt en DMF, mentre que el DHAP es dissol en Tampó 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl a pH=7. Per tal de començar la reacció, es barregen ambdues solucions i s'usen 0.5 mL de suspensió enzimàtica (en cas que es treballi a 1.5 UA/mL) que s'afegeixen al medi de reacció i es manté tot en agitació constant a 4 °C per assolir un volum final de reacció de 2.5 mL. El desenvolupament de la reacció es segueix tot mesurant DHAP per un mètode enzimàtic i el producte i (S)-Cbz-alaninal mitjançant un sistema HPLC (vegeu detalls en el punt 2.5.5.3). Quan la reacció està catalitzada per FucA soluble, les mostres de l'addició aldòlica catalitzada per aldolases solubles es dilueixen prèviament en metanol en una proporció de 1:5 per aturar el progrés de la reacció.

2.5.5.2. Determinació de la concentració de dihidroxiacetona fosfat.

La concentració de DHAP es determina mitjançant la reacció amb NADH catalitzada per α -glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (α -GDH). El consum de NADH s'obté a través de la disminució d'absorbància a 340 nm (Fig.2.9) i es pot relacionar amb la quantitat inicial de DHAP a la mostra a analitzar (Ardao, 2009).



Fig. 2.9. Assaig enzimàtic per a la mesura de la concentració de DHAP mitjançant la reacció d'aquest amb NADH i α -GDH.

La determinació de la concentració de dihidroxiacetona fosfat es realitzava a 25 °C en una cubeta de quars de 1 mL de volum en el que s'afegien les quantitats de reactius que s'exposen a al Taula 2.3.

Taula 2.3. Quantitats necessàries pel test enzimàtic de la determinació de la concentració de DHAP.

(*) Dissolt en aigua tipus MiliQ 18.2 MΩcm desgasificada i freda.

Reactiu	Volum (μL)
100 mM Tris-HCl pH=7.5	970
20 mM β-NADH (*)	10
Mostra	10

La cubeta s'agitava per inversió i es mesurava l'absorbància de la barreja a 340 nm (Abs₁). S'afegien 10 μL de α-glicerol-3-fosfat-deshidrogenasa (50 UA/mL) per iniciar la reacció, es seguia la disminució en l'absorbància de la barreja i s'anotava el valor que s'assolia al final de la reacció (Abs₂). La diferència entre el valor inicial i el final és directament proporcional a la quantitat de DHAP existent a la mostra a través d'una recta de calibrat: $y=20.016x - 0.1486$; $R^2=0.9998$ (vegeu annexes A.1).

2.5.5.3. Determinació de la concentració de (S)-Cbz-alaninal i del producte d'addició.

La determinació de (S)-Cbz-alaninal i del producte d'addició es va dur a terme per HPLC en un equip Ultimate 3000 de Dionex emprant una columna X-Bridge C185 μm 4.6 x 250 mm de Waters. Les condicions cromatogràfiques van ser: fase mòbil A: 0.1 %

v/v TFA en H₂O i fase mòbil B: 0.095% v/v TFA en H₂O: acetonitril 1:4 v/v; gradient de 10 % a 60 % B en 25 minuts; flux 1 mL/min, temperatura 30 °C, detecció UV 215 nm, volum d'injecció 30 µL. Les mostres de reacció es van diluir en metanol i es van centrifugar (Heraeus Pico-21, 18000xg, 1 minut, 4 °C) abans de l'anàlisi.

Prèviament s'ha comprovat la solubilitat dels medis de reacció emprats en les fases mòbils en una concentració 10 % i 100 % de B.

La quantificació es va realitzar mitjançant rectes de calibrat a partir de patrons de (S)-Cbz-alaninal de concentració coneguda. La recta de calibrat emprada és $y=0.0247x + 0.2092$; $R^2=0.994$ (vegeu annexes A.2).

Atès que el grup amb major absorbància a la longitud d'ona de l'assaig és el grup protector Cbz, el qual es troba també en el producte d'addició, es va emprar aquesta mateixa recta de calibrat en la quantificació de producte.

2.6. Tècniques d'immobilització.

Les immobilitzacions es realitzen mantenint en contacte una solució enzimàtica de FucA amb el suport corresponent a les condicions d'immobilització.

Tot i que s'han usat dues tècniques d'immobilització (descrites a continuació), en qualsevol cas la barreja d'immobilització s'ha de mantenir en agitació i realitzar-se el seguiment del procés mitjançant la determinació de l'activitat de FucA al blanc, suspensió i sobrenedant.

La variació de l'activitat del blanc amb el temps indica l'estabilitat de l'enzim a les condicions d'immobilització, mentre que la de l'activitat del sobrenedant indica l'activitat en fase líquida i per tant, que resta sense immobilitzar. A partir d'aquestes dues mesures, es pot calcular el rendiment d'immobilització per diferència. L'activitat de la suspensió és una mesura de l'activitat global, tant en fase líquida com en fase sòlida.

2.6.1. Immobilització en forma de CLEA (Cross-linked Enzyme Aggregates).

El següent procediment es basava en les indicacions descrites a la tesi doctoral de Trinitat Suau (Suau, 2007), però amb algunes modificacions que es detallen a continuació.

La immobilització es realitzà a partir d'una suspensió enzimàtica de FucA emmagatzemada amb 400 g/L de sulfat amònic amb una activitat de 21.7 UA/mL. Es va procedir a la obtenció directa del volum a immobilitzar, sense la prèvia dissolució en una solució tampó, ja que l'enzim havia de trobar-se precipitat per dur a terme la immobilització en glutaraldehid.

El glutaraldehyd provinent d'una solució aquïosa comercial 0.25 M (Sigma Aldrich, Alemanya), s'addicionà (sense dilució previa) en la quantitat necessària per obtenir la concentració final desitjada.

Les concentracions finals de glutaraldehyd estudiades van ser: 1 %, 0.5 % i 0.2 %, per la qual cosa els volums inicials van ser els següents.

Taula 2.4. Volums de treball de solució enzimàtica i glutaraldehyd per a la immobilització en forma de CLEA.

Concentració final de glutaraldehyd (%)	Volum de solució enzimàtica FucA (mL)	Activitat inicial de suspensió (UA/mL)	Volum addicionat de glutaraldehyd (mL)
1	4.8	0.26	0.2
0.5	4.9	0.21	0.1
0.02	4.96	1.3	0.04

Seguint la informació de la taula, es prepararen tres flascons que contenien els volums de solució enzimàtica FucA que es descriu a a taula 2.4. Abans de procedir a l'addició del glutaraldehyd, es va mesurar l'activitat de la FucA en la suspensió enzimàtica inicial, la qual va resultar ser de 0.26 UA/mL en el cas del flascó on es realitzaria la immobilització al 1 % de glutaraldehyd, 0.21 en el flascó etiquetat com a 0.5 % glutaraldehyd i finalment, 1.3 UA/mL quan la concentració final de l'esmentat glutaraldehyd seria de 0.02 %. Posteriorment, s'addicionà el volum de glutaraldehyd que figura a la taula 2.4. A banda dels tres flascons esmentats, es prepararen tres flascons addicionals que corresponien als controls. En aquest cas, el volum de glutaraldehyd fou substituït per aigua MiliQ desgasificada i freda.

Un cop establerts els tres experiments, es va procedir a la presa de mostra per tal de seguir l'evolució de la immobilització tot mesurant l'activitat de FucA del blanc, la suspensió i el sobrenedant. Per a realitzar l'esmentada mesura, es van prendre 268 µL de la suspensió enzimàtica als minuts 0, 30, 60, 90, 180 i 300. Aquest volum va ser centrifugat a 12000 rpm durant 3 minuts i es va obtenir un sobrenedant (SN₁) i un sediment (P₁). Es va mesurar l'activitat de la fracció SN₁ mitjançant el mètode habitual (vegeu secció 2.5.4). Posteriorment, la fracció P₁ va ser resuspesa en 100 µL de tampó 100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl pH=7.5 i es va centrifugar de nou a les condicions esmentades. Conseqüentment, s'obtingueren dues fraccions: SN₂, del qual es mesurà directament l'activitat i P₂, el qual es va resuspendre en 100 µL de tampó 100 mM Tris-HCl, 150 mM KCl pH=7.5 per tal de quantificar-ne l'activitat.

2.6.2. Immobilització per encapsulament a partir de tecnologia Lentikat® (Genialab).

Aquesta immobilització va ser duta a terme tot seguint les indicacions del fabricant (Genialab, Lentikats®).

Inicialment, es fonia el líquid Lentikat®, bàsicament compost per alcohol polivinílic, per calor i es refredava a temperatura ambient per tal de no malmetre el biocatalitzador.

La temperatura de treball va ser de 25 °C a 30 °C. Un cop aquesta era assolida, es barrejava amb el biocatalitzador mantenint una relació entre biocatalitzador i alcohol polivinílic de 4:1 (v/v). Quan la barreja fou homogènia, es van aplicar dos mètodes diferents segons el cas, manualment (en els primers assaigs) o mitjançant un aparell

anomenat Lentikat® printer que permet automatitzar la fabricació de partícules de biocatalitzador en forma de lletia.

En el primer cas (Fig.2.10a), es carregava la barreja en una xeringa estàndard amb una cànula (de 1 mm de diàmetre aproximadament) i s'anaven formant les boles a la superfície d'una placa de petri.

En els segon cas, en comptes de realitzar les boles amb l'ajut d'una xeringa, es partia d'una placa de petri plena de l'esmentada barreja (alcohol polivinílic) que s'introduïa a la premsa, accionant un palanca de manera que el motlle s'omplís (Fig.2.10b). Tot seguit, s'introduïa una segona placa de petri i s'accionava de nou la palanca, de manera que el líquid retingut al primer motlle quedava imprès en el segon.

En qualsevol dels dos casos, les boles resultants van ésser pesades i es va esperar que aquestes haguéssin perdut un 70 % de l'aigua que tenien inicialment. Un cop arribat aquest moment, es pot dir que la gelificació és completa, de manera que es va procedir a abocar un segon component: l'estabilitzador **Lentikat®**, a raó de 200 mL per cada 5 g de conjunt Lentikat®. Després de 2-3 minuts de contacte, les boles es podien separar fàcilment de la superfície de la placa i es van afegir en una ampolla, juntament amb l'esmentat líquid estabilitzador. L'ampolla es deixà en agitació durant 2 hores en un agitador tipus roller a temperatura ambient.

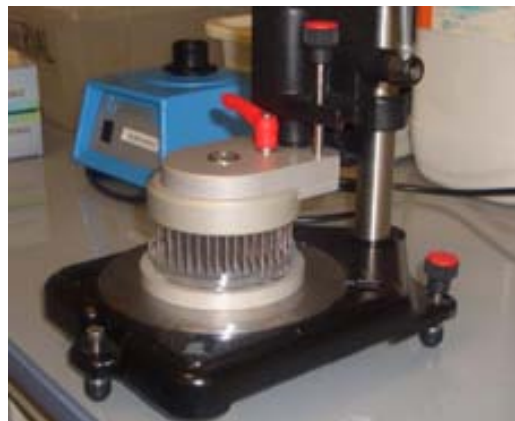
Després de l'estabilització, el sobrenedant va ser retirat i substituït pel tampó d'activitat 100 mM Tris-HCl, 150 mM clorur de KCl pH=7.5. En aquesta forma es va mantenir el conjunt durant més de dos mesos a 4 °C. L'activitat oferida dins les boles era de 51 UA totals.

Finalment, es van realitzar una sèrie d'accions: en primer lloc, un assaig d'activitat enzimàtica tant a la solució estabilitzadora a les 2 hores com en el tampó d'activitat al

llarg del temps; en segon lloc, es va anotar el pes del conjunt Lentikat® de la immobilització i per acabar, un assaig d'activitat a una mostra del conjunt Lentikat®. En aquest últim, l'assaig d'activitat es realitzà a partir d'unes quantes boles de pes conegut, les quals s'introdüïren en una cubeta de 2 mL i es va seguir el mateix procediment que en una mostra heterogènia (veure apartat 2.5.4.2).



a.



b.

Fig. 2.10. Preparació de partícules Lentikat® de manera manual (a) i (b) mitjançant una premsa (Lentikat® printer).

2.7. Referències.

Ardao I. 2009. **Avances en el desarrollo de bioprocesos: adición aldólica catalizada por ramnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Beckwith JR. 1964. **A deletion analysis of the lac operator region in *Escherichia coli*.** J Mol Biol. 8:427.

Durany O. 2003. **Producció de Fuculosa-1-fosfat aldolasa Recombinant en *E. coli*.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Espelt L, Bujons J, Parella T, Calveras J, Joglar J, Delgado A, Clapes P. 2005. **Aldol additions of dihidroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-Fucose-1-Phosphate aldolase in emulsion systems: Inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde.** Chem Eur J. 11:1392-1401.

Fowler AV, Zabin I. 1968. **β -galactosidase: immunological studies of nonsense, missense and deletion mutants.** J Mol Biol. 33: 35.

García-Fruitòs E, González-Montalbán N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Arís A, Ventura S, Villaverde A. 2005. **Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins.** Microb Cell Fact. 4:27.

Korz, DJ, Rinas U, Hellmuth, K, Sanders EA, Deckwer WD. 1995. **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*.** J Biotechnol. 39:59–65.

Laemmli UK. 1970. **Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4.** Nature 227 (5259): 680-8.

Pinsach J. 2009. **Development of recombinant aldolase production process in *E. coli***. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Suau T. 2007. **Fuculosa-1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització**. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Thomas JG, Baneyx XF. 1998. **Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB and HtpG *In vivo***. J Bacteriol. 180 (19): 5165-5172.

Vidal L. 2006. **Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos**. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal L, Pinsach J, Striedner G, Caminal G, Ferrer P. 2008. **Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli***. J Biotechnol. 134 (1-2): 127-136.

Vidal L, Pinsach J, Striedner G, Caminal G, Ferrer P. 2008. **Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli***. J Biotechnol. 134 (1-2): 127-136.

Villarejo MR, Zabin I. 1974. **β -Galactosidase from Termination and Deletion Mutant Strains**. J Bacteriol. 120 (1):466-474.

Zamenhof PJ, Villarejo MR. 1972. **Construction and Properties of *Escherichia coli* strains exhibiting α -complementation of β -galactosidase Fragment *In Vivo***. J Bacteriol. 110 (1):171-178.

CAPÍTOL 3. PRODUCCIÓ DE L'ALDOLASA FUCULOSA-1-FOSFAT RECOMBINANT EN *ESCHERICHIA COLI* MITJANÇANT UNA SOCA AUXOTRÒFICA PER A LA GLICINA.

3.1. Introducció.

El gen que codifica per la Fuculosa-1-fosfat aldolasa d' *E. coli* va ser clonat per primer cop en una soca recombinant d'*E. coli* anomenada XL-1-Blue MRF' amb un vector d'expressió pTrcfuc (Garcia-Junceda et al., 1995). La construcció consistia en un vector d'expressió d'Invitrogen que permetia l'expressió de la proteïna sota el control del promotor *trc* (derivat del promotor *lac*) induïda per l'addició d'IPTG. La proteïna fuculosa-1-fosfat aldolasa estava expressada, com a proteïna de fusió, amb una cua de sis histidines a l'extrem N-terminal.

Durany et al. (2005) van optimitzar la producció de l'enzim recombinant en operació discontinua alimentada per tal d'assolir cultius d'alta densitat cel·lular. Un cop la soca recombinant va ser caracteritzada sota unes condicions de creixement establertes, la producció es va realitzar a un bioreactor operant en discontinu alimentat i a velocitat específica de creixement constant per maximitzar la productivitat de proteïna recombinant.

En aquest moment, va sorgir la necessitat de construir un sistema estàndard per totes les aldolases. Per aquest motiu, es va clonar l'enzim en el mateix vector d'expressió que la resta d'aldolases: pQE-40 (Qiagen) sota el control transcripcional del promotor T5. Aquest sistema d'expressió permetia alts nivells d'expressió (Vidal et al., 2006). Tanmateix, es va observar inestabilitat plasmídica en cultius discontinus alimentats

perllongats. Per tal d'evitar i reduir els costos de medi associats a l'ús d'antibiòtics, es va desenvolupar un nou sistema d'expressió basat en una auxotrofia per glicina.

D'acord amb el mètode descrit per Datsenko i Wanner (2000), es va dur a terme en *E. coli* M15 la deleció del gen *glyA* que codifica per hidroximetil serina transferassa (SHMT), un enzim clau de la ruta metabòlica per la síntesi de glicina (Liu et al., 1991; Vidal, 2006). Conseqüentment, es va obtenir una soca amb una auxotrofia per la glicina (M15 Δ glyA) tal com s'explica continuació.

En el treball de la tesi doctoral de'n Luís Vidal (Vidal, 2006), es demostrà que una complementació gènica d'una auxotrofia per glicina podria mantenir de manera estable el plasmidi episomal pQE-40 en *E. coli*. Concretament, el gen *glyA* va ser inserit a un plasmidi pQE-40 que contenia un gen *rhaD*, el qual codificava per la ramnulosa-1-fosfat aldolasa (RhuA), donant lloc al plasmidi anomenat pQE $\alpha\beta$ rham A, el qual va ser transformat a les cèl·lules d' *E. coli* M15 Δ glyA. Tan sols els clons amb el plasmidi de complementació eren capaços de créixer en un medi definit sense glicina. Per aquesta raó, el creixement estaria subordinat al plasmidi que expressa *glyA*. Cal destacar que aquest sistema va resultar efectiu per a la producció de RhuA en cultius d'elevada densitat operats en discontinu alimentat (Vidal, 2006; Vidal et al., 2008).

En aquest capítol s'estudia l'extensió d'aquesta aproximació per l'expressió de FucA i l'objectiu que es planteja és la construcció d'una soca d'*E. coli* anomenada M15 Δ glyA/pQE $\alpha\beta$ fucA per tal de produir la Fuculosa-1-fosfat aldolasa.

Així mateix, també es realitzaran cultius per verificar la validesa de la construcció, tant a nivell d'Erlenmeyer com de fermentador.

3.2. Materials i mètodes.

3.2.1. Soques, plasmidis i estratègia emprades.

Per tal de realitzar aquesta construcció, es van emprar el plasmidi pQE $\alpha\beta$ rham, d'on es va aïllar el fragment $\alpha\beta$ i aquest es va introduir al plasmidi pQEfucA, ambdós continguts en soques M15 Δ glyA (Vidal, 2006).

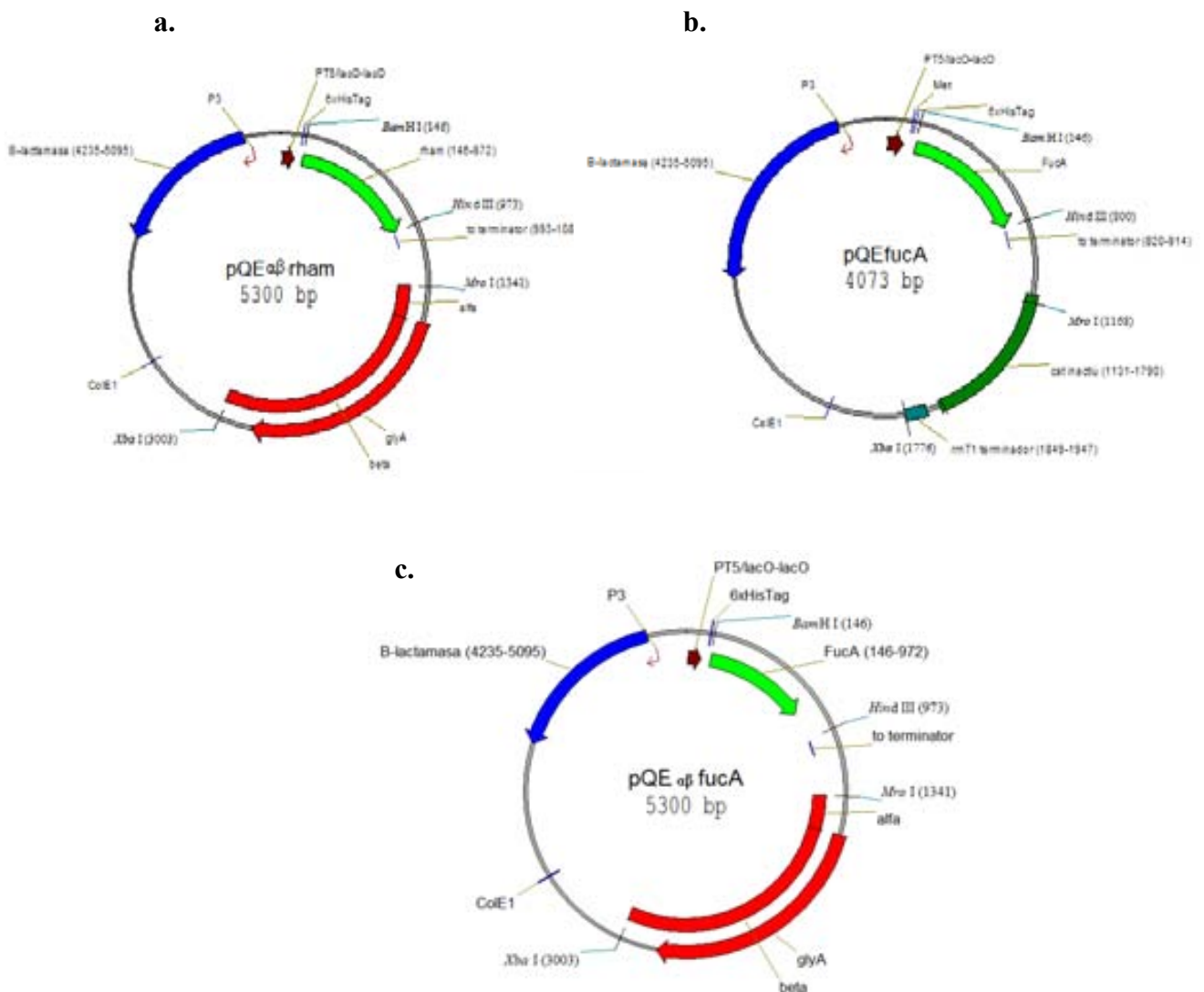


Fig 3.1. Estratègia de clonatge a partir dels plasmidis d'origen construïts per Vidal et al (2006): pQE $\alpha\beta$ rham (a) i pQEfucA (b) que donaren com a resultat el plasmidi pQE $\alpha\beta$ fucA (c) i que posseïx el fragment $\alpha\beta$ de color vermell i el gen *fucA* identificat en verd.

3.2.2. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en Erlenmeyer.

Els cultius en matrassos d'Erlenmeyer es desenvoluparen en Medi Definit (MD), seguint el mateix procediment d'inòculs que es descriu a 2.3. També es descriuen els procediments de disrupció cel·lular, purificació i quantificació de la FucA (2.5).

Adicionalment, es van realitzar uns estudis a nivell d'Erlenmeyer a diferents concentracions de glucosa i, posteriorment, es van determinar els paràmetres cinètics de la soca. La raó de realitzar el creixement amb concentracions de glucosa diverses era estudiar el comportament de la soca davant més o menys substrat i, fins i tot, en casos d'inhibició.

Un cop observada la corba de creixement i amb l'ajuda del programa g-PROMS de Process Systems Enterprise (J. Ruiz, Universitat Autònoma de Barcelona, comunicació personal) es cerquen els paràmetres cinètics els quals permetran tenir més informació de cara al creixement en fermentador.

gPROMS és un sistema de modelització de procés general (Process Modelling System) per a simular, optimitzar i estimar paràmetres cinètics. El mòdul d'estimació determina els paràmetres del model que ajusta a les dades experimentals minimitzant la funció objectiu que té en compte la suma dels errors al quadrat de totes les mesures i la variància de cada variable.

3.2.3. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en fermentador operant en discontinu alimentat.

Els creixements en fermentador es realitzaren en discontinu alimentat, amb un perfil exponencial d'addició i inducció per un pols d'IPTG, tal com es descriu a l'apartat 2.3.3.

Per analogia als antecedents amb M15 Δ glyA/pQE α rham (Vidal, 2006), es treballà amb una velocitat específica de creixement (μ) de 0.21 h⁻¹.

Pel que fa a la purificació de la proteïna a partir del brou del cultiu, es troba descrita també a l'apartat 2.5.

3.3. Resultats i discussió.

Tot seguit, es presenten els resultats més rellevants de les etapes principals de construcció i expressió de la soca M15 Δ glyA/ pQE $\alpha\beta$ fucA (vegeu Fig.3.1).

3.3.1. Desenvolupament de la construcció M15 Δ glyA/pQE $\alpha\beta$ fucA.

El tipus de clonatge per al qual es va optar va ser de tipus clàssic, amb encebadors que, a banda d'amplificar la regió desitjada, continguéssin dianes pels enzims de restricció que s'emprarien per tallar el plasmidi on seria inserit el fragment prèviament tallat amb els esmentats enzims de restricció.

L'amplificació del fragment $\alpha\beta$ es va realitzar per PCR (procediment descrit a l'apartat 2.2.3) a partir dels encebadors que tot seguit es presenten a la Taula 3.1.

Taula 3.1. Parell d'oligonucleòtids usats per l'amplificació del fragment $\alpha\beta$ mitjançant PCR amb la seva direcció de síntesi, seqüència, diana de tall (marcada en vermell) i temperatura de fusió teòrica (Tm) segons la casa comercial (Biomers).

Encebador	Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Diana	Tm (°C)
1	Forward_MroI	atctt tcgg agtgaagacgaaagggcctcg	MroI	76
2	Reverse_XbaI	tcgg tctaga tggcgcgatacgtagaaag	XbaI	71

La polimerasa emprada va ser la KOD polimerasa de Roche, la qual posseeix activitat reparadora d'errors, i es van seguir les indicacions del fabricant pel que fa als volums de cadascun dels components per a un volum final estàndard de 50 µL.

Les condicions per a l'amplificació d'aquest fragment van ser 5 minuts a 98 °C com a preescalfament, 30 segons a 98 °C com a etapa de desnaturalització, 30 segons a la temperatura d'anellament corresponent (5 graus per sota la temperatura mitjana de fusió), 30 segons a 72 °C d'extensió i 5 minuts també a 72 °C com a extensió final. El nombre total de cicles va ser de 35.

Posteriorment, el plasmidi pQEfucA va ser digerit amb els mateixos enzims de restricció (XbaI i MroI) donant un fragment de 3465 bp. La restricció va ser confirmada mitjançant un gel d'agarosa (Fig.3.2).

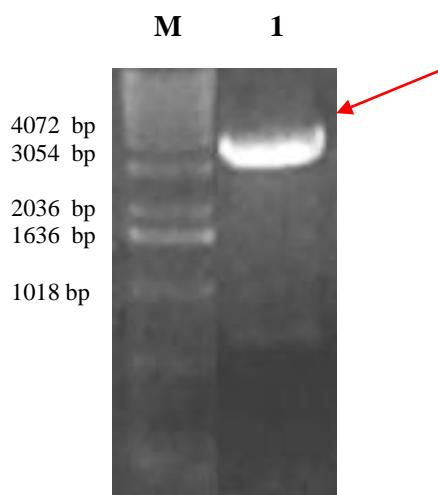


Fig. 3.2. Gel d'agarosa que mostra el producte de digestió (pQEfucA) amb els enzims de restricció XbaI i MroI mitjançant una banda de 3465 pb indicada amb una fletxa vermella (carril 1).

El fragment $\alpha\beta$ va ser obtingut per PCR (Fig.3.3). Segons el gel d'agarosa, aquest fragment tenia una mida aproximada de 1662 pb. El producte de PCR va ser purificat i posteriorment digerit amb els enzims de restricció XbaI i MroI.

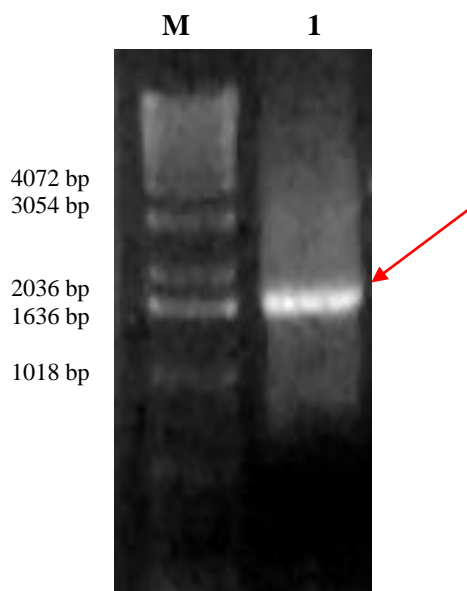


Fig. 3.3. Electroforesis amb gel d'agarosa que mostra un producte de PCR : una banda de 1662 pb corresponent a un fragment $\alpha\beta$, el qual s'indica amb una fletxa vermella (carril 1).

Un cop efectuada la lligació (procediment descrit a 2.2.4), es va dur a terme una transformació, la qual va donar lloc a diversos clons, tres dels quals eren capaços de créixer en Medi Definit (MD). Amb aquests tres clons, calia realitzar una selecció dels positius per verificar que tots els transformants contenien el plasmidi pQEfucA amb el fragment $\alpha\beta$ incorporat. Per assolir aquest objectiu, els minicultius líquids dels clons es van incubar durant 24 h en medi LB amb Ampicil·lina i, tot seguit, es van realitzar unes extraccions de DNA plasmídic. Aleshores, aquest DNA va ser incubat amb els mateixos enzims emprats en la construcció: XbaI i MroI. Els gels d'agarosa resultants

mostraven que els plamidis obtinguts presentaven el patró de restricció corresponent a la construcció amb el nou insert (banda de 1.66 kb) (Fig.3.4).

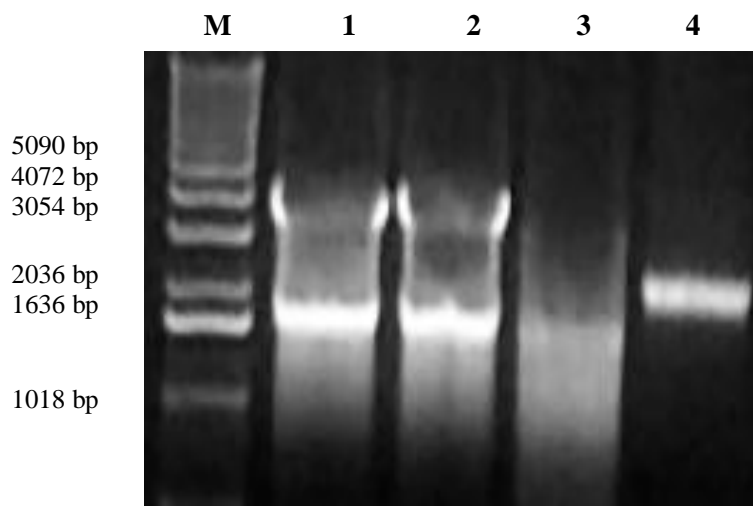


Fig. 3.4. Electroforesi en gel d'agarosa que mostra les digestions amb Xba I i Mro I del DNA plasmídic corresponent als clons 1, 2 i 3 (carrils 1, 2 i 3). Al carril 4, s'inclou com a control la mateixa digestió amb el DNA plasmídic de la soca DH5 α pUC 18.

3.3.2. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQE α fucA mitjançant cultius en matrassos d'Erlenmeyer.

Es van realitzar cinc cultius en matrassos d'Erlenmeyer en MD, un per a cadascun dels clons seleccionats (1, 2 i 3), un control positiu i un control negatiu.

Els controls positiu i negatiu consistien en cultius de la soca *E. coli* M15/pQEfucA (Vidal, 2006), essent l'un induït amb IPTG i l'altre no induït, respectivament.

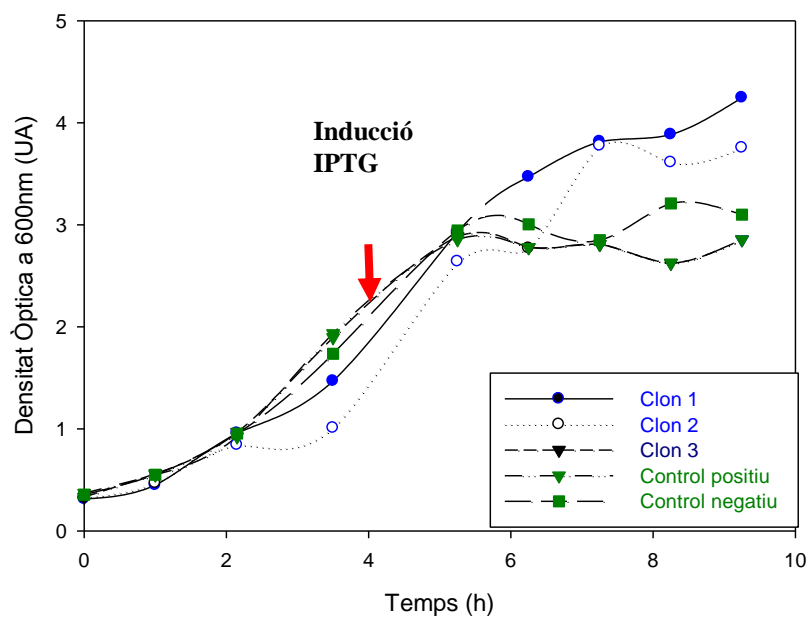


Fig. 3.5. Cultius en Erlenmeyer. Perfil de creixement dels clon 1, 2 i 3, i controls (positiu i negatiu). Els clons 1, 2 i 3 són de cultius d' *E. coli* M15 Δ glyA/pQE α β fucA i el control positiu emprava *E. coli* M15/pQEfucA (induït) i el control amb *E. coli* M15/pQEfucA (no induït).

El perfil de creixement resultant (Fig.3.5) mostrava una evolució de la densitat òptica similar a estudis previs obtinguts amb la soca *E. coli* M15 Δ glyA/pQE α β rham (Vidal, 2006).

3.3.2.1. Proves d'expressió en FucA

Per tal d'analitzar els nivells d'expressió de FucA, el creixement cel·lular va ser aturat a les 5 hores després de la inducció quan el valor màxim assolit per algun dels cultius era de 4.5 unitats de DO i es va seguir el procediment descrit a l'apartat 2.5.1.

En el gel SDS-PAGE, es va observar una banda de 26 kDa, que correspon a un monòmer de la FucA. Addicionalment, es va detectar una segona banda, aquesta de 45 kDa, que correspon a SHMT (Fig.3.6).

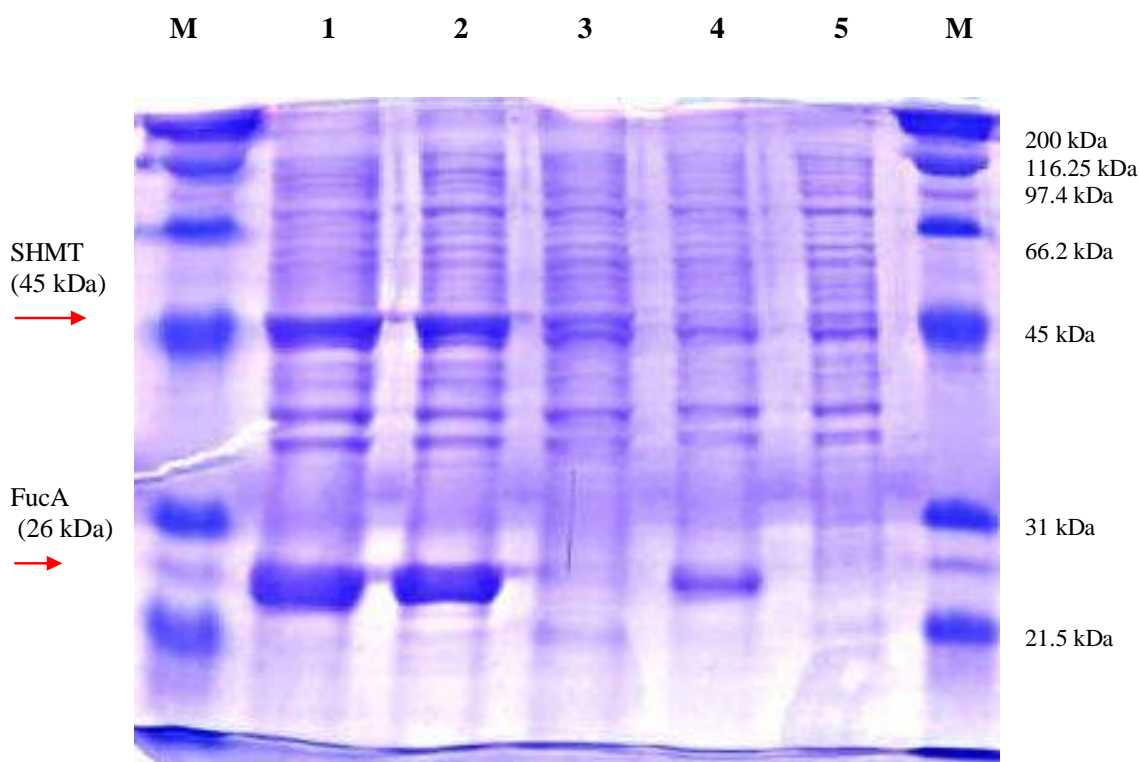


Fig. 3.6. Anàlisi SDS-PAGE de les proteïnes expressades pels clons (1, 2 i 3) i pels controls en cultius en Erlenmeyer detectades mitjançant una tinció amb Blau de Coomassie. Els carrils designats com a M, mostren els marcadors de pes molecular; al carril 1, el clon 1; al carril 2, el clon 2; al carril 3, el clon 3 i el control positiu i negatiu als carrils 4 i 5 respectivament.

La banda que correspon a FucA s'observa de manera clara amb intensitat en els clons 1 i 2, mentre que només dèbilment en el clon 3. Tal com s'esperava, el control positiu mostra una banda de FucA, la qual és absent en el control negatiu.

Així doncs, es demostrava que *E. coli* M15 Δ glyA/pQE $\alpha\beta$ fucA produïa FucA, almenys en els clons 1 i 2.

3.3.2.2. Assaigs d'activitat i quantificació

Amb l'objectiu de quantificar els nivells d'expressió de FucA a partir d'experiments de creixement dels clons i els controls en matrassos d'Erlenmeyer, es va determinar l'activitat de la FucA produïda respecte a la proteïna total i al pes sec de biomassa generada (Taula 3.2).

Taula 3.2. Activitat de la FucA produïda, respecte a la proteïna total i al pes sec de la biomassa generada, pels clons i els controls en experiments de creixement en matrassos Erlenmeyer.

Mostres	UA/mg proteïna total	UA/g pes sec
Clon 1	3.5	1378
Clon 2	5.1	971
Clon 3	1.1	67
Control positiu	3	627
Control negatiu	0.6	53

Considerant l'activitat de FucA per gram de pes sec, el clon 1 obtenia el valor més elevat, mentre que tenint en compte l'activitat de FucA relacionada amb la proteïna soluble total, el clon 2 assolía el valor major. Els nivells del clon 3 eren molt semblants a l'expressió basal que mostrava el control negatiu.

Per altra banda, si es comparen els valors amb els de la soca prèviament dissenyada: M15/pQEfucA (Vidal, 2006), s'observa que en el clon 2 s'assoleix dues vegades més d'activitat que en el control positiu.

Adicionalment, era interessant determinar l'activitat específica de FucA produïda pels diferents clons. Per aquesta raó, es va dur a terme una densitometria, els resultats de la qual es mostren a la Taula 3.3, columna 1. Es va determinar la proporció entre FucA i la resta de proteïnes i l'activitat expressada en UA/ mg FucA (Taula 3.3).

Taula 3.3. Determinació de la proporció de FucA respecte la resta de proteïnes (en %) i valors d'activitat expressats en termes de UA/mg FucA corresponents als diferents clons (1, 2 i 3) i al control positiu.

	% FucA respecte la proteïna total	Activitat en UA/ mg FucA
Clon 1	19	18.2
Clon 2	28	18.4
Clon 3	5	22.7
Control positiu	10	21.8

Com es pot veure, el percentatge de FucA al clon 2 representa gairebé un 30 % del contingut total de proteïna intracel·lular soluble, la qual cosa manté una coherència amb les anàlisis prèvies, on el clon 2 era el que produïa més FucA activa per mg de proteïna, seguit del clon 1 i el clon 3 (Taula 3.2, columna 1).

A la segona columna, s'observa que l'activitat específica posseeix uns valors similars per tots els clons.

Tot i que la FucA és la proteïna més representativa comparada amb les altres, la SHMT és la segona més important (Fig.3.6). Aquest comportament havia estat observat també en els treballs anteriors duts a terme per a l'expressió de ramnulosa-1-fosfat aldolasa o RhuA (Vidal, 2006). Aquesta elevada quantitat de SHMT observada en cultius induïts

podria ésser explicada pel fet que el gen *glyA* (el qual codifica per l'enzim SHMT) es troba sota el control transcripcional d'un promotor constitutiu (P3) . D'altra banda, Vidal (2006) va suggerir la possibilitat d'un fenomen de sobretranscripció ("readthrough") del terminador transcripcional del gen *fucA*, el qual es troba sota el control d'un promotor molt eficient (promotor T5). Aquest fet podria incrementar els nivells transcripcionals del gen *glyA*, situat corrent avall (*downstream*) del gen *fucA* en condicions d'inducció (addició IPTG).

Els resultats obtinguts indiquen que, malgrat les modificacions realitzades a la soca, l'enzim fuculosa-1-fosfat aldolasa manté la mateixa activitat específica que en *E. coli* M15/pQEfucA i amb uns valors de producció majors (Taula 3.2).

A partir d'aquest instant i per les raons esmentades, es procedeix a la selecció del clon 2 per als estudis posteriors.

3.3.2.3. Determinació dels paràmetres cinètics de la soca

La caracterització del creixement de la soca es va efectuar a 37 °C en MD. Els quatre matrassos d'Erlenmeyer es van fer créixer a un rang de concentració inicial de glucosa entre 0 i 100 g/L, per tal de definir la cinètica en funció del consum de substrat. La concentració de biomassa i el substrat van ésser mesurades al llarg del temps en tots els cultius.

Tot i que mancarien punts per fer-ne un anàlisi precís, semblava que les velocitats específiques de creixement inicials mesurades eren similars quan es tractava de concentracions baixes i en canvi, mostraven grans diferències en el cas de cultius crescuts a concentracions inicials elevades. Quan es representaven les velocitats

específiques de creixement inicials envers les concentracions de glucosa inicials per a cada cultiu, s'obtenia una cinètica d'inhibició per substrat (Fig.3.7).

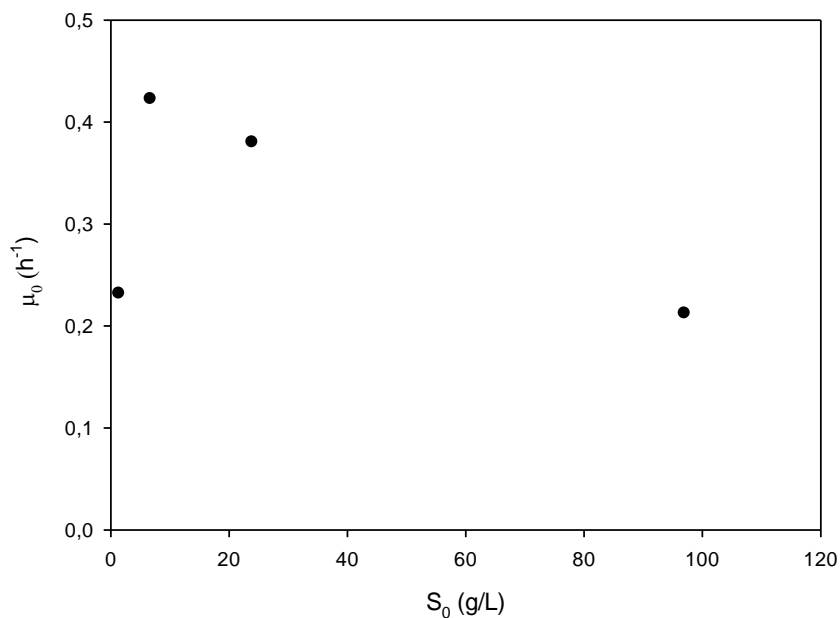


Fig. 3.7. Velocitat específica de creixement inicial envers la concentració inicial de glucosa en cultius Erlenmeyer. Les dades experimentals es representen en cercles.

Les dades experimentals presentades van ser ajustades al model Aiba-Edwards (Fig.3.8), que descriu una cinètica Monod amb inhibició per substrat. Emprant el programa gPROMS es van trobar els paràmetres cinètics següents: $\mu_{m\grave{a}x}=0.53\pm 0.01$ (h^{-1}), $K_s=0.39\pm 5.52$ (g/L) i $K_{si}=55.76\pm 3.18$ (g/L). Aquests valors concorden amb els obtinguts en treballs anteriors amb la soca M15 $\Delta glyA/pQE\alpha\beta rham$ (Pinsach et al., 2008). De la mateixa manera que s'observava en el treball esmentat, existeix molt error en l'estimació de K_s degut a les limitacions en precisió del mètode analític.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot e^{\frac{-S}{K_{si}}}$$

Fig. 3.8. Equació de model d'Aiba Edwards que descriu una inhibició per substrat.

D'altra banda, s'han calculat el rendiment biomassa-substrat, $Y_{x/s}=0.42\pm 0.01$ g pes sec/g glucosa, i el coeficient de manteniment, $m=0.096\pm 0.007$ g glucosa/ g pes sec.h, els quals mostren novament coherència amb els treballs anteriors (Pinsach et al., 2008).

3.3.3. Producció de FucA en M15 Δ glyA/pQEa β fucA mitjançant cultius en fermentador.

S'ha dut a terme un procés de producció de FucA recombinant en discontinu alimentat d'acord amb el procediment indicat a l'apartat 2.3.3. Les dades de rendiment han permès dissenyar un perfil exponencial d'addició per mantenir la velocitat específica de creixement a 0.21 h^{-1} . El procés total va durar 23 hores, 16 h de discontinu (*batch*) i 7 h de discontinu alimentat (*fed-batch*). La inducció es va realitzar amb un pols d'IPTG $150 \mu\text{M}$ (concentració final) quan es van assolir les 40 unitats de DO (Vidal, 2006).

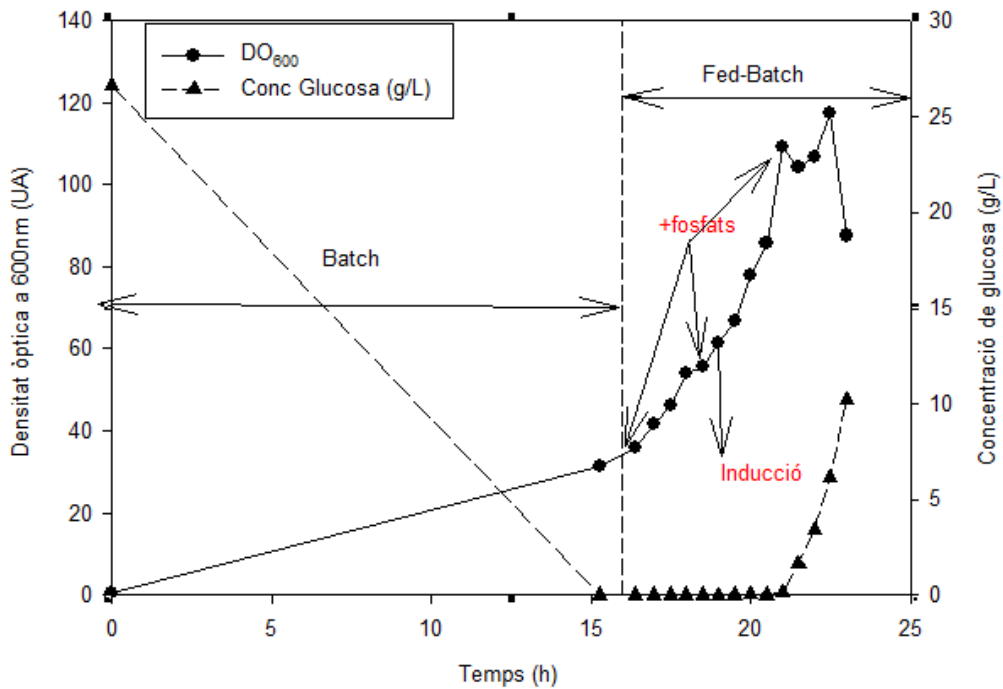


Fig. 3.9. Evolució de la fermentació en termes de densitat òptica a 600nm i concentració de glucosa. S'observa l'etapa de discontinu (*batch*) i la de discontinu alimentat (*fed-batch*) respectivament, les addicions de fosfats i el moment d'inducció quan $DO_{600nm}=40$.

La Fig.3.9 presenta l'evolució amb el temps de la concentració de biomassa (com a DO) i de glucosa, incloent la indicació del moment de la inducció i de les tres addicions de fosfats, tal i com s'especifiquen en el punt 2.3.1.1.

A partir de les mostres recollides des del moment d'inducció fins al final del procés (de 18 a 23 h), es van realitzar els assaigs analítics habituals per tal de determinar els valors de l'activitat total (UA/ g pes sec), l'activitat específica (UA/mg FucA) i la proporció entre FucA (% FucA) i la resta de proteïnes a partir de la densitometria dels gels d'electroforesi. A la taula 3.4, se'n pot observar un resum.

Taula 3.4. Evolució de l'activitat de la FucA expressada després de la inducció. L'activitat de FucA s'expressa com a activitat total (UA/ g pes sec), activitat específica (UA/ mg FucA) i percentatge de FucA (% FucA) respecte a la proteïna total produïda.

Temps (h)	UA/ g pes sec	UA/ mg FucA	% FucA
18.5	87	14.5	1
19.5	184	2.5	10
20	390	2.6	20
20.5	603	3.5	22
21	687	3.7	26
21.5	1066	2.7	31
22	823	2.9	32
22.5	752	3.6	39
23	873	3.1	37

En termes d'activitat total, s'assoleix un màxim de 1065 UA/ g pes sec, valor comparable als estudis realitzats en cultius en matrassos d'Erlenmeyer. Cal tenir en compte que el valor màxim d'activitat total assolit a la soca homòloga productora de RhuA fou de 908 UA/ g pes sec (Pinsach et al., 2009). Tanmateix, a partir de 21.5 h es manifesta un lleuger descens en l'activitat, la qual es manté gairebé constant fins al final del procés. Aquest descens podria ésser explicat pel fenomen de proteòlisi (Pinsach et al., 2008), el qual va ser observat en els processos desenvolupats a 37 °C. També es posava de manifest un descens de l'activitat específica al llarg de la fase d'inducció.

Els valors que s'obtenen d'activitat específica són lleugerament inferiors als obtinguts en matrassos d'Erlenmeyer, però similars als obtinguts mitjançant la soca homòloga productora de RhuA en discontinu alimentat, amb la qual s'obtenien 3.3 UA/ mg RhuA. (Pinsach et al., 2006).

Finalment, el resultat de la densitometria manté la tendència de 30-39 % de representació de FucA, ja observada en els cultius en matrassos d'Erlenmeyer.

3.4. Conclusions.

Tot seguit s'exposen les conclusions que responen als objectius plantejats a l'inici de la tesi, alguns dels quals s'han assolit i d'altres queden pendents de cara a l'etapa següent (motivacions a curt termini) o a posteriors (motivacions a llarg termini).

3.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.

- L'extensió de l'ús de la construcció basada en una auxotrofia per la glicina ha fet possible el desenvolupament d'una soca capaç de produir l'aldolasa Fuculosa-1-fosfat prescindint de l'ús d'antibiòtics en el medi.
- La quantitat de proteïna recombinant obtinguda i la seva activitat específica són superiors o iguals a la soca que requereix l'ús d'antibiòtics en el medi, la qual cosa confirma l'efectivitat de la nova construcció.
- La soca M15 Δ glyA/pQE α fucA d' *E. coli* , capaç de produir Fuculosa-1-fosfat aldolasa, mostra uns paràmetres cinètics de creixement similars a la seva homòloga que produeix l'aldolasa Ramnulosa-1-fosfat.
- L'aplicació d'una estratègia operacional semblant a la desenvolupada en RhuA en discontinu alimentat ($\mu=0.21 \text{ h}^{-1}$) ha permès obtenir una gran quantitat de FucA, la qual és lleugerament més activa que la seva homòloga.

3.4.2. Motivacions.

A curt termini.

Els elevats nivells d' hidroximetil serina transferassa (SHMT), enzim codificat pel gen *glyA*, dirigit pel promotor constitutiu P3, haurien d'ésser reduïts tot minimitzant la càrrega metabòlica resultant del manteniment del vector d'expressió, fet que possiblement podria millorar la producció de la proteïna d'interès.

A llarg termini.

La iniciativa de prescindir de l'ús d'antibiòtics en el medi podria anar un pas més enllà tot eliminant algun dels gens de resistència a antibiòtic del plasmidi, considerant que la soca compta amb un marcador de selecció basat en una auxotrofia.

3.5. Referències.

Datsenko KA, Wanner BL. 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** PNAS. 97 (12):6640-6645.

Durany O, 2003. **Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli*.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Durany O, de Mas C, López-Santín. 2005. **Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*.** Process Biochem. 40 (2): 707-716.

Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. **A New strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of DHAP-Dependent Aldolases-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase.** Bioorgan Med Chem. 3(7): 945-953.

Liu KKC, Kajimoto T, Chen LR, Zhong ZY, Ichikawa Y, Wong CH. 1991. **Use of Dihydroxyacetone Phosphate Dependant Aldolases in the Synthesis Deoxyazasugars.** J Org Chem.56 (22): 6280-6289.

Pinsach J, de Mas C, López-Santín, Striedner G, Bayer K. 2008. **Influence of process temperatura on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures.** Enzyme Microb Technol. 43(7): 507-512.

Pinsach J. 2009. **Development of recombinant aldolase production process in *Escherichia coli*.** Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal L. 2006. **Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal L, Pinsach J, Striedner G, Caminal G, Ferrer P. 2008. **Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*.** J Biotechnol. 134 (1-2): 127-136.

CAPÍTOL 4. MILLORA DEL SISTEMA D'EXPRESSIONI BASAT EN UN MARCADOR D'AUXOTROFIA PER A LA GLICINA.

4.1. Introducció.

En el capítol III, el sistema de manteniment de plasmidis basat en el marcador auxotròfic *glyA* (Vidal, 2006; Vidal et al., 2008) ha estat implementat per a la producció recombinant de FucA. D'altra banda, també s'han aplicat les estratègies de procés desenvolupades per a la producció de RhuA, partint del coneixement previ que aquestes són vàlides ja que es tracta d'una soca amb el mateix fons genètic, sistema d'expressió i promotor, amb una única diferència: el gen d'interès (Pinsach, 2008).

Tanmateix, certs aspectes del sistema d'expressió semblaven millorables. D'una banda, convenia realitzar una reducció de la càrrega metabòlica del vector d'expressió deguda a la sobreexpressió del marcador auxotròfic (*glyA*), fet que podia conduir a una millora del comportament de la soca productora en condicions d'inducció en termes d'estabilitat genètica del vector d'expressió i, conseqüentment, a una millora dels nivells d'expressió del gen recombinant. D'altra banda, calia realitzar l'eliminació dels gens de resistència a antibiòtic encara presents al sistema d'expressió (gen β -lactamasa del plàmid *pQE α β fucA* i gen de la Kanamicina del *pREP-4*), per tal de contribuir a la reducció de contaminants emergents tal com ja s'ha comentat en el capítol I (Pruden et al., 2006; Mairhofer et al., 2010).

Com a punt de partida, es va dissenyar una estratègia per tal d'eliminar el primer gen de resistència a antibiòtic (β -lactamasa) del plàmid construït en el capítol anterior. Durant el seu desenvolupament però, es detectà que el mapa de restriccions no era l'esperat en

diverses ocasions, per la qual cosa es va decidir seqüenciar el plasmidi del sistema d'expressió. En aquest moment, es va descobrir la presència d'una seqüència d'origen transposònic, la qual cosa suggeria que el plasmidi construït al capítol III (pQE $\alpha\beta$ fucA) tenia problemes d'estabilitat genètica de tipus estructural que convenia solventar com a primera prioritat.

Per aquest motiu, es va procedir a seqüenciar els plasmidis disponibles inicialment: pQE $\alpha\beta$ rham, pREP-4 i pQEfucA. El primer d'aquests estava dotat de l'esmentada seqüència transposònica detectada en pQE $\alpha\beta$ fucA; el segon contenia un marcador genètic que corresponia a una part del transposó Tn 9 tal i com era d'esperar (apartat 2.1.6 de *Materials i Mètodes*) i el darrer, romaní intacte (sense presència de seqüències d'origen transposònic). Les seqüències del transposó en la construcció inicial i els alineaments corresponents figuren a Annexes (secció A1).

En aquest punt, es plantejà la hipòtesi que la inestabilitat estructural del vector d'expressió podia venir donada per la mobilitat de seqüències transposòmiques presents en el sistema. *A priori*, hi havia dues possibles fonts d'elements transposòmics: els presents en el locus *glyA* de l'hoste, conseqüència de la generació del *knockout* del gen *glyA* (Vidal, 2006) i el plasmidi pREP-4, el qual, en principi, havia estat prèviament curat (Vidal, 2006).

Així doncs, una possible explicació seria que la soca M15 Δ *glyA*, presumptament curada de pREP-4 (el qual contenia seqüències transposòmiques, apartat 2.1.6 de *Materials i Mètodes*), no ho estigués, sinó que es tractés d'una població mixta de cèl·lules pREP-4⁺ i pREP-4⁻, donat que aquest plasmidi és de baix nombre de còpies i, per tant, molt estable i difícil de curar, fet que va ser comprovat quan es van realitzar nombroses ressembres per tal d'eliminar l'esmentada resistència (vegeu 4.2). Aquest

fet, junt amb la coexistència de seqüències d'origen transposònic en la regió del knockout de *glyA* (la “cicatriu” del qual conté seqüències transposòniques), podria haver afavorit esdeveniments de recombinació i mobilitat d'aquestes seqüències entre alguna de les esmentades regions/molècules de DNA (plasmidi pREP-4, cicatriu del *knockout* del gen *glyA* i vector d'expressió que conté gen *glyA*).

Els transposons, altrament anomenats “gens saltadors”, poden ser simples o compostos. Els transposons simples contenen una seqüència central amb informació per la transposasa i en els extrems una seqüència repetida d'ordre invers. Aquesta no és necessàriament idèntica, però sí molt similar (Madigan et al., 2001).

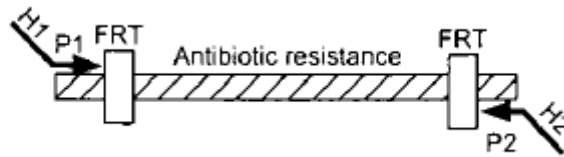
Els transposons compostos (Tn) contenen un element d'inserció (IS) en cada extrem en ordre directe o invers i una regió central que a més, pot contenir informació d'un altre tipus. Per exemple, els Factors de Transferència de Resistència (FTR o RTF) posseeixen informació a la zona central per a la resistència a antibiòtics com ara cloramfenicol, Kanamicina i Tetraciclina (Madigan et al; 2001).

Dos transposons usats amb freqüència en mutagènesi són Tn 5 i Tn 10. En aquesta línia, Goryshin et al (2000) va descriure el sistema de transposoma basat en Tn 5 que conté gens de resistència a Kanamicina, flanquejat en ambdós costats per la repetició invertida de 19 pb del transposó Tn 5. Aquest element va ser fusionat amb una proteïna transposasa, formant el transposoma funcional que pot ser transferit en cèl·lules bacterianes per electroporació (Goryshin et. al., 2000).

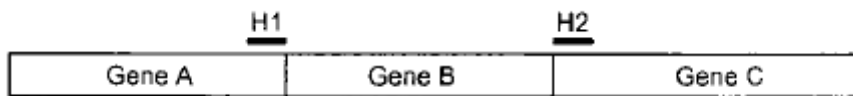
En el present treball, el transposó identificat va ser Tn 5 i estava situat a la regió β -lactamasa de pQE α β fucA (vegeu els alineaments a A.2.2 d'annexes). Aquesta informació donava suport a la nostra hipòtesi, és a dir, que la presència de regions Tn 5 en pREP-4, combinada amb la presència de regions FRT (d'origen transposònic) en la “cicatriu” del knockout semblaven portar a un increment de la mobilitat/recombinació

d'aquests elements, en els quals es basen els antecedents (Datsenko i Wanner; 2000). Aquest mètode, basat en el sistema Red, és altament eficient per disruptar gens cromosòmics en *E. coli*. El sistema Red inclou 3 gens: γ , β i *exo*, els productes dels quals són Gam, Bet i Exo respectivament. Gam inhibeix l'exonucleasa V del complex de recombinació RecBCD de l'hoste de manera que Bet i Exo poden accedir als extrems del DNA per promoure la recombinació. Addicionalment, el sistema inclou el terminador nadiu tL3 *downstream* de *exo* (Vidal, 2006). La seva estratègia bàsica consisteix en reemplaçar una seqüència cromosòmica (gen B de la Fig.4.1) amb un gen de resistència a antibiòtic seleccionable que es genera per PCR usant oligonucleòtids amb extensions d'homologia de 36 nucleòtids (H1 i H2). Això és possible gràcies a la recombinació mediada per Red en aquestes regions d'homologia flanquejants. Després de la selecció, el gen de resistència pot ser eliminat usant un plasmidi "ajudant" que expressi recombinasa FLP, la qual actua directament sobre els llocs repetits de la FRT (lloc de reconeixement de FLP) que flanquegen els gens de resistència. El sistema Red i el plasmidi "ajudant" poden ser curats mitjançant un creixement a 37 °C perquè són replicons sensibles a temperatura.

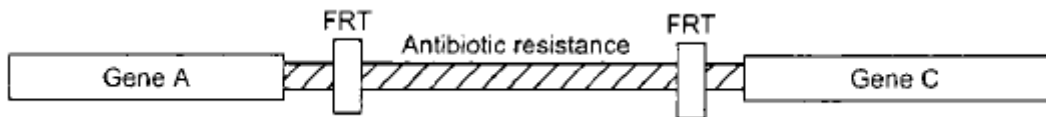
Pas 1: Amplificació per PCR del gen de resistència flanquejat per FRT.



Pas 2: Transformació en una soca que expressa recombinasa lambda Red.



Pas 3: Selecció de transformants resistents a antibiòtics.



Pas 4: Eliminació del cassat de resistència.

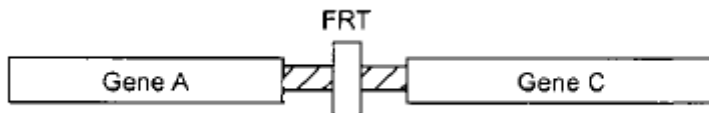


Fig. 4.1. Esquema de l'estratègia de disrupció descrita per Datsenko i Wanner (2000). H1 i H2 es refereixen a les extensions d'homologia o regions; P1 i P2 es refereixen als llocs encebadors. Font de Datsenko i Wanner; 2000.

Tanmateix, quan les disrupcions gèniques s'apliquen a DNA motlle i llocs encebadors, l'eliminació del gen de resistència a antibiòtic deixa una cicatriu de entre 82 i 85 nucleòtids en el lloc del gen disruptat (Datsenko i Wanner; 2000). La presència d'aquestes seqüències d'origen transposònic, en combinació amb les presents en el

plasmidi pREP-4 podrien ser la causa d'una major inestabilitat genètica estructural d'aquests elements.

Una vegada identificat el problema d'estabilitat genètica en els vectors del sistema d'expressió de partida, es va definir l'estratègia per a reconstruir una soca M15 $\Delta glyA/pQE\alpha\beta fucA$ amb les característiques desitjades. Amb aquesta intenció, es va treballar per una banda, a nivell de soca M15 $\Delta glyA$ i per l'altra, a nivell de plasmidi.

El primer objectiu era obtenir una soca productora de FucA lliure de seqüències d'origen transposònic. La soca M15 $\Delta glyA$ duia per plasmidi pREP-4, que tal i com s'ha comentat, contenia una seqüència transposònica. De fet, tot i que es creia una soca lliure de plasmidi pREP-4 (Vidal, 2006), la situació real era que els estocs no corresponien a un clon pur lliure de plasmidi pREP-4, sinó a una població mixta de cèl·lules amb i sense aquests plasmidi. Així doncs, l'eliminació d'una possible font d'inestabilitat genètica deguda a transposons consistia en eliminar o curar totalment pREP-4, atès que és un plasmidi no essencial per a la funcionalitat del vector d'expressió (pQE40 i derivats).

D'altra banda, el plasmidi pQE $\alpha\beta fucA$ havia de ser reconstruït a partir del plasmidi pQE $fucA$ i el fragment $\alpha\beta$, aquest últim provinent del plasmidi pQE $\alpha\beta fucA$, el qual restava intacte de tota contaminació transposònica pel que fa a aquesta zona. Recordem que la contaminació transposònica d'aquest plasmidi es concentrava en el gen de la β -lactamasa. D'aquesta manera, es pretenia disposar d'un sistema d'expressió de FucA basat en el marcador auxotròfic *glyA*, lliure de seqüències transposòniques i, per tant, amb problemes d'estabilitat genètica estructural reduïts.

El segon objectiu pendent fou la minimització dels nivells de SHMT per tal de reduir la càrrega metabòlica cel·lular deguda al manteniment del vector d'expressió, amb la fi d'augmentar-ne la seva estabilitat segregacional i els nivells de producció de la proteïna objecte d'aquest estudi: FucA. Per aconseguir-ho, calia determinar quin era el factor/s més determinants de l'expressió de SHMT a nivells tan elevats, ja que, *a priori*, nivells d'enzim equivalents als de la soca salvatge haurien de ser suficients per garantir la complementació de l'auxotrofia. En el capítol III, s'havia plantejat com a hipòtesi que aquest fet fos conseqüència de l'ús del promotor constitutiu P3, per a la sobreexpressió del gen marcador *glyA* el qual, tot i ser de caràcter dèbil (Vidal, 2006), podria donar lloc a nivells de SHMT elevats, donat que el vector d'expressió en el qual es troba el marcador esmentat és d'un nombre de còpies mitjà de 20-30 per cèl·lula. Per tant, l'ús d'un promotor de caràcter encara més dèbil podria minimitzar aquest problema. D'altra banda, l'anàlisi detallada de la construcció del plasmidi pQE $\alpha\beta$ rham realitzada per Vidal (2006), mostrà que el gen marcador introduït posseïa tan sols un terminador de la transcripció (corresponent al seu terminador "natiu" o propi), per la qual cosa, es podria donar el fenomen de sobrelectura (*readthrough*) d'aquest gen.

En base a aquesta anàlisi "*in silico*", es va plantejar la possibilitat d'introduir un segon terminador fort a continuació del gen marcador com a primera aproximació a la millora de la seva regulació, enlloc de buscar un promotor encara més feble que el P3. Aquesta estratègia es deriva de l'observació que, a resultes de l'estratègia de construcció dels vectors amb cassat $\alpha\beta$, un dels dos terminadors forts presents en el plasmidi pQEfucA, el qual conté el terminador t_0 (situat després del gen FucA) i un segon terminador anomenat rrnBT1 (situat després del gen *cat*) és eliminat. Concretament, els plasmidis pQE $\alpha\beta$ rham i pQE $\alpha\beta$ fucA, posseeixen el terminador t_0 corrent avall del gen a expressar, però els manca el terminador rrnBT1 (vegeu Fig. 2.2 i 2.3).

El terminador T1 de l'operó *rrnB* d'*E. coli* ha estat descrit pel fet de tenir una habilitat intrínseca per interrompre la RNA polimerasa del T7 mitjançant dos mecanismes diferents (Kwon i Kang, 1999). Els autors assenyalen que ambdós han estat estudiats, però sembla ser que el més conegut és el que consisteix en una terminació típicament intrínseca mitjançant la formació d'estructures secundàries en transcripts que no necessiten una cadena de DNA no motlle. En canvi, l'altre consisteix en una terminació que succeeix mitjançant la incorporació d'una estructura que desestabilitza estructures secundàries de RNA i requereix una cadena de DNA no motlle.

En qualsevol cas, el *rrnBT1* comparteix un primer mòdul anomenat CS (TATCTGTT) i un segon mòdul ric en tiamina (T) que facilita l'alliberament de RNA. Les funcions del mòdul CS com a dúplex són de permetre que la polimerasa s'aturi i canviï la conformació (He et al., 1998). La regió de la cadena simple exposada a la bombolla de transcripció es fa curta per uns quants parells de bases abans del lloc de terminació i els complexos d'elongació s'aturen a 2 pb d'aquest punt. La terminació succeeix a una extensió curta des del lloc de pausa, però no a través d'un canvi de conformació al lloc de terminació (Sohn i Kang, 2004).

En aquest capítol, es descriu la construcció que satisfà els dos objectius descrits: en primer lloc, la generació d'una soca lliure de seqüències transposòniques i en segon lloc, amb els nivells de SHMT reduïts, a fi de reduir la càrrega metabòlica del plasmidi d'expressió i, per tant, d'incrementar l'estabilitat genètica i la productivitat de la proteïna d'interès. Un cop generada aquesta construcció, es comprova en cultius a petita escala (matrassos d'Erlenmeyer) i en bioreactor o fermentador.

4.2 . Materials i mètodes: Soques i estratègies emprades.

La reconstrucció de plasmidi consistia en la incorporació del fragment $\alpha\beta$ provinent del pQE $\alpha\beta$ fucA (regió absent de contaminació transposònica) al plasmidi pQEfucA el qual conté el terminador rrnBT1 (Fig.4.2). No obstant, abans d'ésser introduïts en ambdós plasmidis calia fusionar-los. Per assolir aquest objectiu es van dissenyar dues estratègies diferents, les quals seran descrites més endavant.

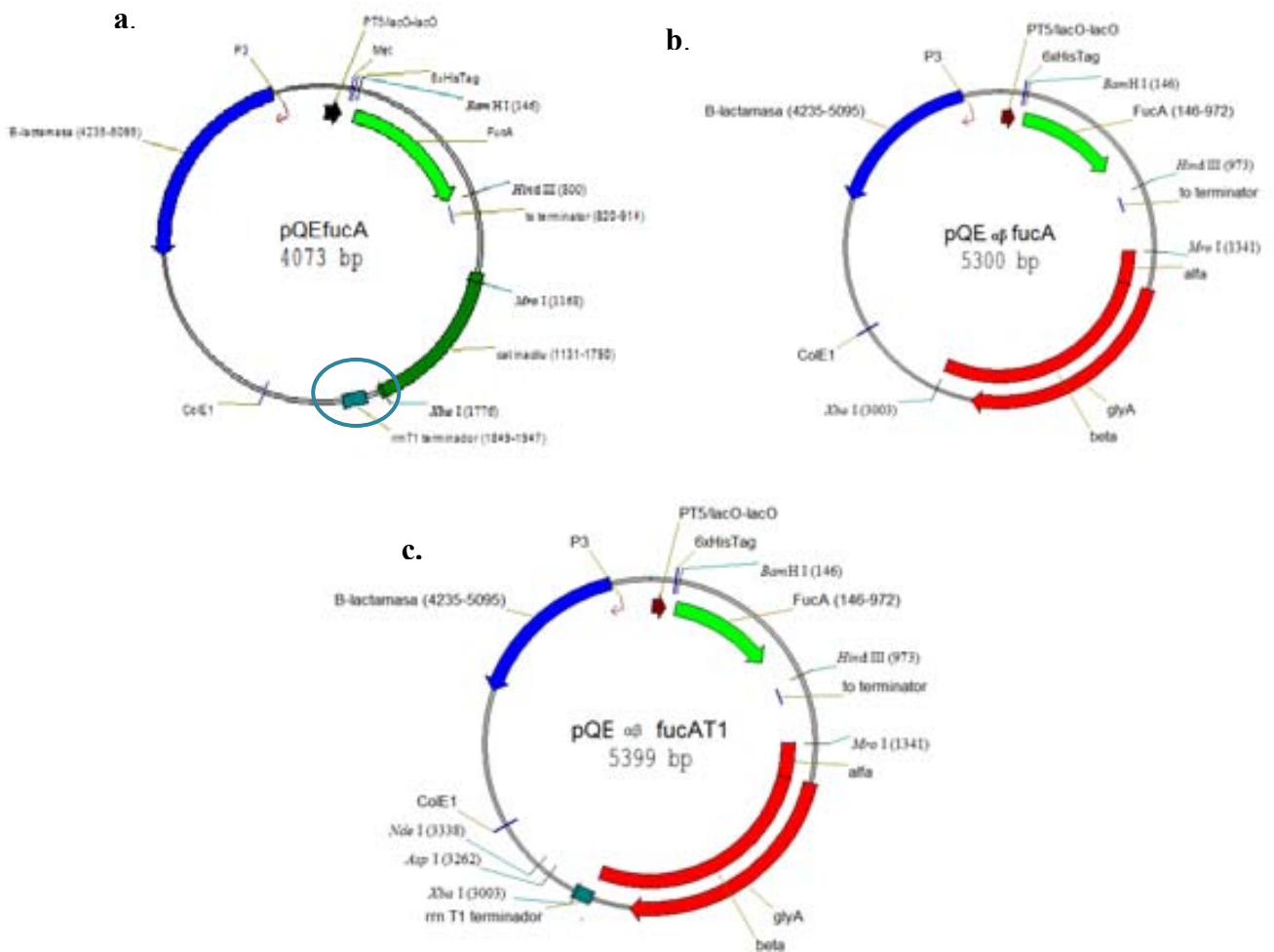


Fig. 4.2. Diagrames de plasmidis. a. pQEfucA (que conté el terminador rrnB T1 assenyalat en blau). b. pQE $\alpha\beta$ fucA (que conté el fragment $\alpha\beta$ que s'indica en vermell, però sense l'esmentat terminador). El plasmidi resultant, pQE $\alpha\beta$ fucAT1, que ha incorporat el fragment $\alpha\beta$, el terminador rrnB T1 corrent avall del gen *fucA* (c).

4.2.1. Primera estratègia.

La primera estratègia consistia en una “Slipping by Overlap Extension PCR” o SOE-PCR (Horton, 1989), és a dir una reacció de la polimerasa en cadena basada en extensions per solapament per tal de realitzar mutagènesis dirigides puntuals (Fig.4.3)

Els oligonucleòtids *reverse* $\alpha\beta$ i el *forward* T1 s'havien de solapar, de manera que es plantejaren tres PCR (Taula 4.1): una per amplificar el fragment $\alpha\beta$ (a), l'altra per amplificar el terminador T1 (b) i l'última per fusionar ambdós fragments (c).

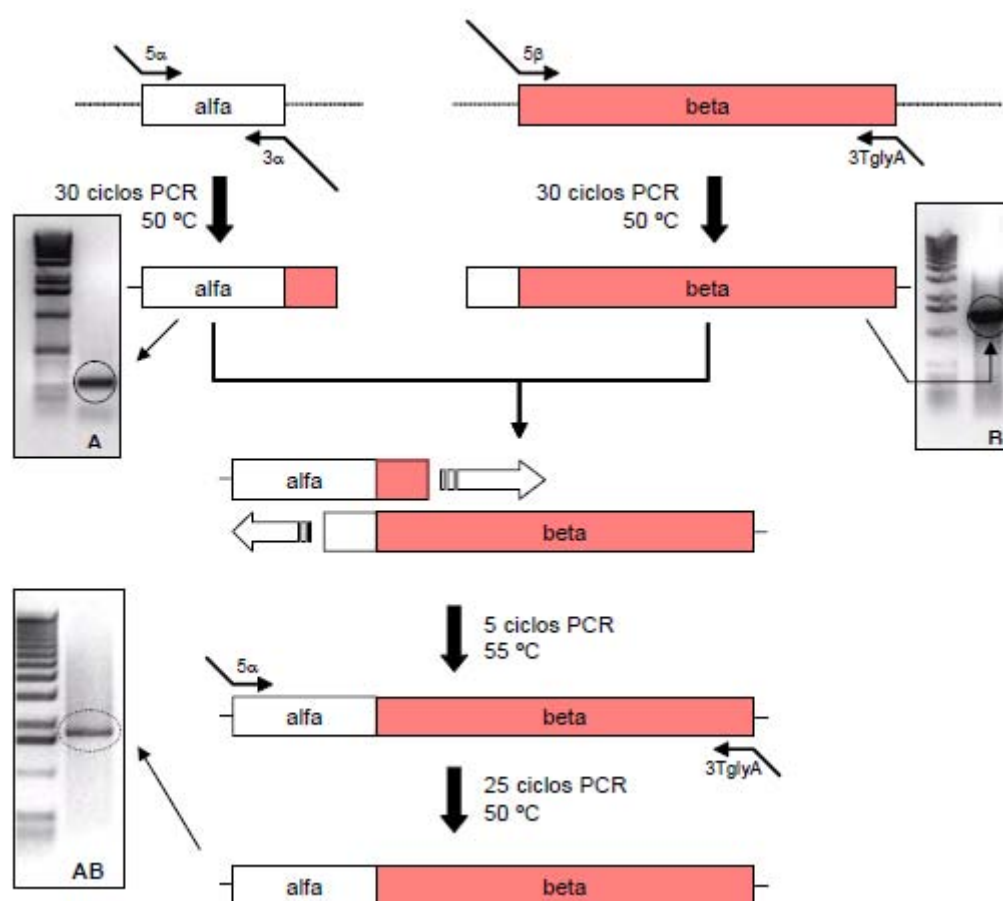


Fig. 4.3. Esquema del mètode SOE-PCR com exemple per tal d'entendre la fusió entre el fragment $\alpha\beta$ i el terminador T1. Les temperatures indicades corresponen a les temperatures d'hibridació (Vidal, 2006).

Els encebadors que es van emprar en cadascuna de les tres PCR (de 25 cicles en a i b; i de 30 cicles a c) es presenten a continuació a la Taula 4.1.

Les condicions de la PCR foren les següents. La primera (a), conté una fase de desnaturalització (15 segons a 98 °C), anellament (2 segons a 69 °C) i extensió (20 segons a 72 °C). La segona (b), consisteix en una desnaturalització de 30 segons a 98 °C, un anellament de 15 segons a 60 °C i una extensió de 5 minuts a 72 °C. La tercera (c), consta d'una desnaturalització (1 minut a 94 °C), un anellament (30 segons a 46 °C) i una extensió (30 segons a 72 °C) amb les etapes de desnaturalització inicials i extensió pertinents.

Taula 4.1. Encebadors emprats en cadascuna de les 3 PCR de la SOE-PCR. S'indiquen les dianes de tall per MroI en vermell i per XbaI en verd.

PCR	DNA motlle	Seqüència i nom de l'encebador (5'-3')	Tm (°C)	Seqüència i nom del'encebador (5'-3')	Tm (°C)
a	pQEαβfucA	agattccggaaatgctca tcggag tgaag (forαβ)	51	ttcgttttattgatgccttggcgcgataacgtagaaa (revαβ)	52
b	pQEfucA	cttctacgttatcgcgccaagcatcaaataaacgaac (forT1)	54	agattc tagatagagggcgattgtcctactcag (revT1)	53
c	Fragment purificat de a i b	5 cicles sense primers i 20 amb el primer for αβ	-	5 cicles sense primers i 25 amb el primer forT1	

4.2.2. Segona estratègia.

Com a estratègia alternativa però lligada a l'anterior, es va plantejar la realització d'una PCR convencional mitjançant l'oligonucleòtid forward descrit anteriorment i un megaprimers de 79 pb que constava de la seqüència del terminador amb unes cues complementàries al gen *glyA* (Taula 4.2).

Taula 4.2. Seqüències dels encebadors que amplifiquen el conjunt $\alpha\beta$ -T1. L'encebador anomenat forward $\alpha\beta$ consisteix en la diana de tall de *MroI* i una seqüència amplificadora del gen *glyA*. L'encebador anomenat Megaprimer consisteix en la seqüència del terminador *rrnBT1* amb les cues del gen *glyA* (en negreta). Motlle de DNA: plasmidi pQE $\alpha\beta$ fucA. En vermell es mostren les dianes de tall.

Encebador	Seqüència de l'encebador (5'-3')	Diana	Tm (°C)
Forward $\alpha\beta$	agatgactgctccggaaatgctcatc ccgga gtgaag agattaccag tctaga gggcggattgtcctactcaggagagcgtt	MroI	68
Megaprimer	caccgacaacaacagataaaacgaaaggcccagctttcgactga gccttcgttttatttgatgcct tggcgcgataacgtagaaagg	XbaI	75

Les condicions per aquesta PCR són les següents: desnaturalització a 98 °C durant 15 segons, anellament a 53 °C durant 15 segons i finalment, una extensió a 72 °C durant 20 segons.

4.3. Resultats i discussió.

Els resultats s'exposen seguint el fil argumental de la introducció, des de la identificació les possibles causes dels elevats nivells de SHMT (4.3.1), fins a la cura definitiva de la soca M15 Δ glyA (4.3.2). Finalment, es realitza la nova construcció (4.3.3) i es comprova la seva eficiència a petita escala (4.3.4) i en fermentador (4.3.5).

4.3.1. Estudi de l'origen dels elevats nivells de SHMT.

A mode de prova preliminar, es va realitzar un creixement en dos matrassos d'Erlenmeyer amb inòculs de la construcció M15 Δ glyA/pQE α fucA (capítol III).

L'única diferència entre ells era que l'un es va induir amb IPTG i l'altre no, el darrer fou considerat un control negatiu. Es va realitzar la inducció al moment i concentració habituals (capítol II) i es va anar seguint l'evolució del cultiu. Aquest va ser llistat i la proteïna aïllada fou analitzada per SDS-PAGE.

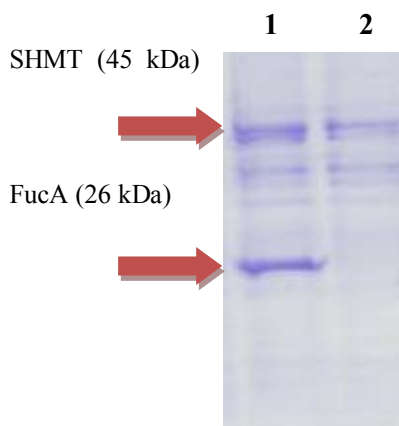


Fig. 4.4. Anàlisi SDS-PAGE (tinció Coomassie) d'extractes solubles de la soca M15 Δ glyA/pQE α fucA induïda (Clon 1 al carril 1) i sense induir (control negatiu que s'indica com a C- al carril 2). Les dues fletxes vermelles assenyalen la SHMT (45 kDa) i la FucA (26 kDa).

Així doncs, la presència d'uns nivells de SHMT semblants i notablement elevats en el clon 1 crescut amb i sense presència d'IPTG confirmaven les observacions dels estudis inicials sobre l'ús del gen *glyA* com a marcador. Tot i així, la inducció de l'expressió de *fucA* (gen situat corrent amunt del gen *glyA*) semblava repercutir lleugerament en els nivells de SHMT i per tant, podia fer pensar que els elevats nivells d'expressió del marcador fossin en part deguts a un fenomen de sobrelectura (*readthrough*) del terminador t_0 del gen *fucA*.

De fet, en estudis previs (Vidal, 2006) també s'havia observat una petita sobreexpressió de SHMT, atribuint-se al mateix fenomen de sobrelectura (*readthrough*) de la RNA polimerasa sobre el terminador de la transcripció t_0 corrent avall del gen d'interès, en aquell cas el gen *rhaD*.

Donat que no es veia clar un efecte dels nivells transcripcionals del promotor T5 sobre els nivells d'expressió de SHMT, es descartà com a primera prioritat buscar un promotor més dèbil que P3 tal com s'havia apuntat a la fi del capítol anterior.

D'altra banda, es disposava d'una dada ja comentada a la introducció que contrastava lleugerament amb la teoria del *readthrough* proposada per Vidal: el terminador *rrnBT1* era absent en el plasmidi pQE α β rham.

A nivell d'aquestes dues observacions, no es considerà prioritaria la necessitat de buscar un promotor més dèbil que P3 tal com s'havia apuntat a la fi del capítol anterior.

4.3.2. Eliminació del pREP-4 de la soca hoste.

La soca M15 Δ *glyA* (la qual contenia pREP-4) va ser inoculada en un matràs d'Erlenmeyer amb medi LB durant 6 hores a les condicions d'agitació habituals, amb l'objectiu de curar el plasmidi. Tot seguit, es va realitzar un banc de dilucions en sèrie

calculat a partir de la DO del cultiu obtingut, de manera que es poguessin obtenir colònies aïllades. Amb aquest objectiu es sembrà una placa de medi LB per a cada dilució realitzada (des de $1/10^5$ fins a $1/10^{12}$) i es deixaren incubar durant tota una nit. El dia següent s'obtingueren colònies aïllables i amb un nombre representatiu a una de les dilucions. Cadascuna d'aquestes colònies fou sembrada paral·lelament en dues plaques, l'una de LB i l'altra de LB amb Kanamicina durant tota una nit, pas que va ser efectuat 6 vegades (6 ressembres).

Les primeres ressembres no van donar cap colònia resultant amb resistència a Kanamicina, però a la tercera ressembla sí que 4 de les 50 colònies sembrades manifestaven un creixement mínim en presència de l'antibiòtic. Tanmateix, a les següents ressembres ja no creixien en presència de l'antibiòtic. Es realitzaren fins a 6 ressembres i es seleccionaren 4 colònies a l'atzar, de les quals es van fer cultius líquids, per tal d'extreure'n el DNA total i realitzar la PCR de comprovació conforme el plasmidi episomal havia estat eliminat. La PCR de comprovació es realitzà tot seguint les instruccions del fabricant de la polimerasa GoTaq a les condicions següents: desnaturalització (30 segons a 95 °C) , anellament (30 segons a 63 °C), extensió (90 segons a 72 °C) durant 30 cicles amb els passos d'escalfament i extensió final corresponents (Fig.3).

Els encebadors emprats posseïen homologia pel plasmidi a identificar: pREP-4 i es mostren a la Taula 4.3.

Taula 4.3. Encebadors emprats (forward i revers) per la PCR de comprovació amb DNA total on s'inclouen les temperatures de fusió corresponents. No contenen dianes de restricció.

Encebador	Seqüència (5'-3')	Tm (°C)
REP-4_for	tgcaatggcgagctctcgacaattcgctaa	68
REP-4_rev	atgatgatgatgcatgcggtatggcatgatagc	68

L'esmentada PCR constava d'un control positiu (DNA plasmídic de pREP-4), un control negatiu (usant aigua estèril com a DNA motlle) i les quatre colònies seleccionades a l'atzar (2, 5, 24 i 48) de l'experiment de pèrdua de plasmidi (Fig.4.5).

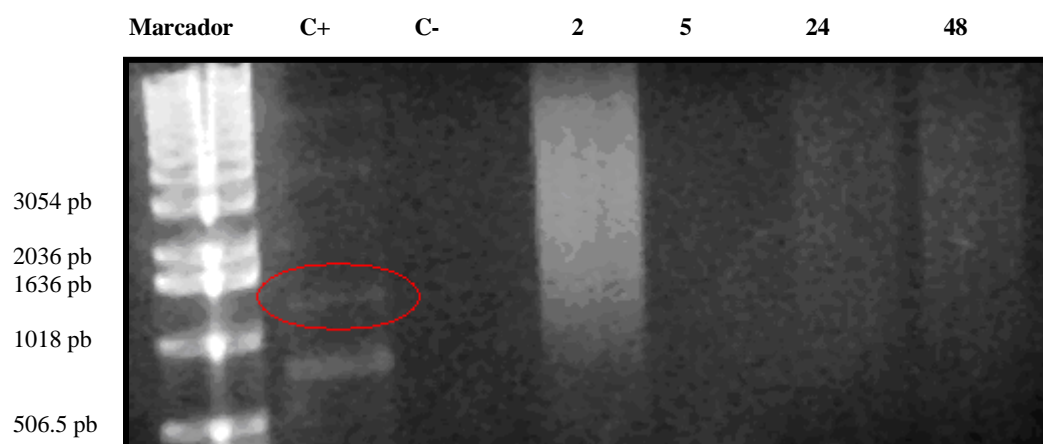


Fig. 4.5. PCR de detecció del plasmidi pREP-4. C+: control positiu que pREP-4 amplificat (banda de 1100 pb assenyalada en vermell), C-: control negatiu amb aigua lliure de nucleases usada com a motlle i clons 2, 5, 24 i 48 amplificats a les mateixes condicions.

Tot i que la PCR mostra una altra banda a 800 pb, la banda de 1100 pb és visible al control positiu i absent tant en el control negatiu com a les altres colònies. Les colònies avaluades no semblaven contenir el pREP-4, de manera que es descartà la presència de transposó: les noves cèl·lules M15 Δ glyA havien quedat lliures de pREP-4 i per tant, de transposó.

Un cop realitzada la PCR, s'obtingué un estoc mare del clon de la soca curada que tenia menys mostres de degradació (el clon 5, vegeu Fig.4.5) a partir dels cultius en placa, així com d'estocs de cèl·lules competents, dels quals es va comprovar el fenotip (kan^r) sembrant una alíquota de 50 µL en una placa de LB amb Kanamicina esperant no observar cap colònia, com a assaig final.

4.3.3. Reconstrucció del plasmidi i fusió del gen *glyA* amb *rrn* T1B

La primera estratègia, basada en una SOE-PCR, va donar un resultat positiu a les dues primeres amplificacions, però no va ser possible fusionar ambdós fragments a la darrera PCR. Per aquest motiu, es va procedir a l'aplicació de la segona estratègia.

La segona estratègia (vegeu estratègia al 3.2) va permetre obtenir el resultat desitjat amb tan sols una PCR (Fig.4.6).

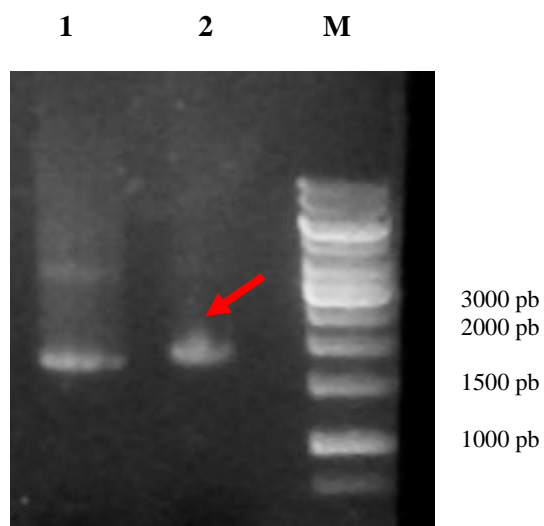


Fig. 4.6. Anàlisi electroforètica mitjançant gels d'agarosa per a l'obtenció del casset $\alpha\beta$ -terminador mitjançant PCR. Carril 1: fragment $\alpha\beta$ de 1664 pb; carril 2: fragment $\alpha\beta$ fusionat amb el terminador *rrn*BT1 (1763 pb) marcat amb una fletxa i M: marcador.

A la Fig. 4.6, es mostren dues bandes diferents: la del carril de l'esquerra corresponent la banda de 1664 pb (fragment $\alpha\beta$) i la el carril de la dreta on s'observa una altra banda de 1763 pb (suma del fragment $\alpha\beta$ i del terminador rrnBT1, prova que indicava la fusió d'ambdós).

Per tal de linealitzar ambdós plasmidis, es realitzaren digestions amb dos enzims de restricció: Mro I i XbaI i a continuació, es va dur a terme la lligació entre l'esmentat fragment i un plasmidi linealitzat de pQEfucA.

Tot seguit, es transformaren en una soca d'*E. coli* M15 Δ glyA lliure de pREP-4.

A continuació, es realitzà una selecció de clons plaquejant en medi MD per verificar que realment posseïen l'auxotrofia pel gen *glyA*. Els clons que creixien en medi MD en placa i medi líquid eren seleccionats i digerits amb Mro I (un dels enzims emprats en el clonatge) i BglII (enzim extern que talla a posició 4528 del plasmidi resultant). Dos dels clons (48 i 49) donaren el patró esperat (Fig.4.2c) per tant, se'n van seqüenciar els plasmidis.

Un cop confirmada la seqüència dels plasmidis continguts en els dos clons, es realitzaren les proves d'expressió pertinents.

Es realitzà un procés idèntic en un plasmidi pQE-40/*glyA* (no expressava FucA) de cara a futurs treballs. La única raó per la qual es procedia d'aquesta manera era la necessitat de tenir una soca estàndard per expressar qualsevol tipus d'aldolasa.

4.3.4. Producció de FucA en matrassos d'Erlenmeyer.

Els estudis en matrassos d'Erlenmeyer en els dos clons transformats a *E.coli* amb pQEfucA es van realitzar seguint la metodologia habitual (*vegeu condicions d'inducció a l'apartat 2.3.2*) i es va afegir un control negatiu, essent la mateixa soca sense induir i

un control positiu amb la soca M15/pQEfucA. El fet de no emprar la soca auxotròfica del capítol III es basa en la decisió de retirar aquesta de l'estoc per evitar més transferències d'elements mòbils entre soques. Els perfils de creixement es mostren a la Fig.4.7.

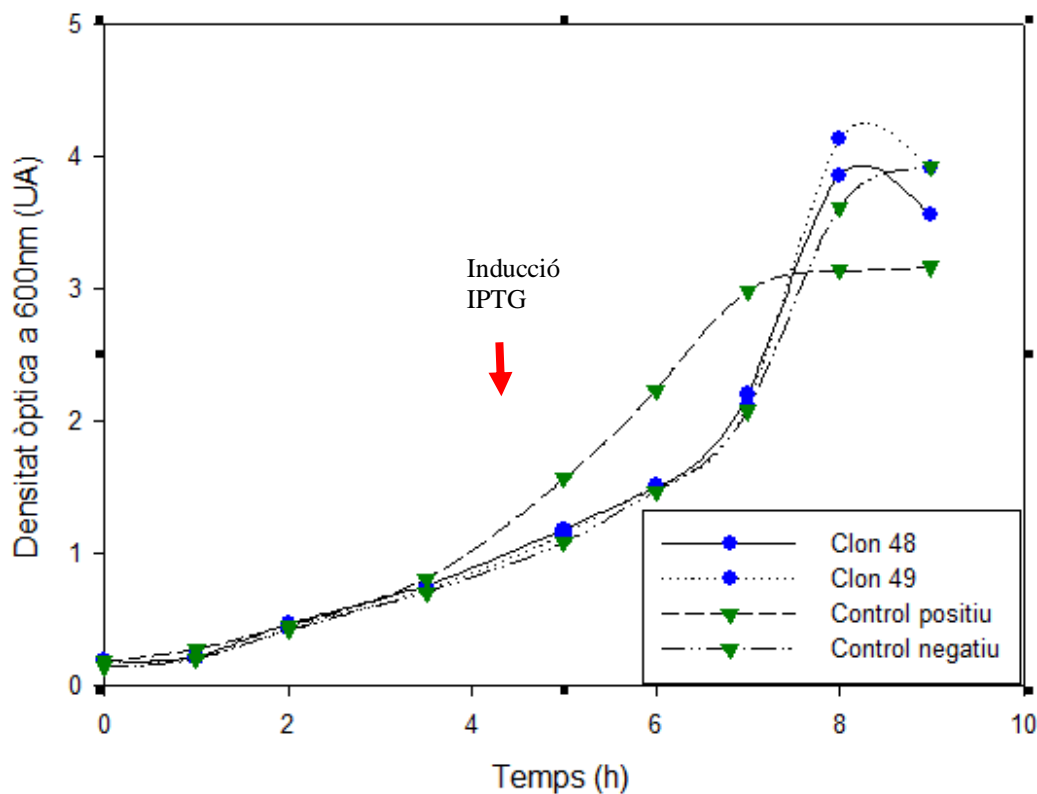


Fig. 4.7. Perfil de creixement dels clons 48 i 49 de la nova soca (M15 Δ glyA/pQE α fucAT1). El control negatiu correspon al clon 48 sense induir i el control positiu correspon a la soca M15 Δ glyA/pQEfucA induïda.

Els perfils de creixement que s'observen a la Fig.4.7 indiquen un comportament gairebé idèntic entre els dos clons i el control negatiu de la mateixa soca fins als últims punts, no gaire diferent del de la soca M15/pQEfucA, amb la diferència que assoleix una DO

menor. Aquest comportament ja s'observava al capítol III i també en els treballs anteriors (Vidal, 2006).

La FucA obtinguda va ésser aïllada i quantificada pels mètodes descrits i es van obtenir els valors que es presenten a la Taula 4.4 pel millor clon (48). Posteriorment, es va realitzar una anàlisi SDS-PAGE, a partir de la qual es realitzà un anàlisi per densitometria de les bandes de proteïnes detectades corresponents a les dues proteïnes (FucA i SHMT), permetent així estimant la relació entre elles, tal i com es recull a la Taula 4.4.

Taula 4.4. Valors de les activitats (UA/g pes sec i UA/mg FucA) a les dues primeres columnes i tot seguit, la relació entre FucA i SHMT (en %) pel millor clon amb terminador incorporat (48), control positiu (M15/pQEfucA) i control negatiu (M15/pQE α fucAT1 sense induir).

	UA/ g pes sec	UA/ mg FucA	Relació FucA/SHMT
Soca amb terminador	1298	2.9	2
Control positiu	636	8.9	2.4
Control negatiu	23	-	-

En termes d'activitat total, el clon 48 i 49 presenten unes 1100 UA/ g pes sec de mitjana, valor comparable i lleugerament superior a la construcció del capítol III, la qual no es va usar com a control positiu a causa de la contaminació transposònica.

L'activitat específica de la FucA es va veure reduïda notablement tant si es compara amb la soca M15/pQEfucA (unes tres vegades), com si es compara amb la soca descrita al capítol III (en aquest cas unes sis vegades).

Pel que fa al resultat de l'anàlisi densitomètric, es va obtenir una relació FucA/SHMT de 2 en el clon 48 (soca auxotròfica amb terminador). Tot i que en el control positiu s'obté una relació major (2.4), per tal d'avaluar la millora caldria prendre el valor de la soca auxotròfica sense terminador (extret de l'anàlisi densitomètric completa del gel SDS-PAGE de la Fig. 3.6), el qual dóna una coeficient de 1.6). Per tant, es podia afirmar que la nova construcció disminuïa lleugerament els valors de sobreexpressió de SHMT.

Per tal de corroborar els resultats es va dur a terme un procés de producció en discontinu alimentat amb el clon seleccionat.

4.3.5. Producció de FucA en fermentador en cultiu discontinu alimentat de la soca M15 Δ glyApQE α fucAT1.

El procés va durar 23 hores: 14 h de discontinu i 9 h de discontinu alimentat (Fig.4.8) i es va fixar la mateixa velocitat específica de creixement (μ) i estratègia d'inducció en pols (IPTG 150 μ M quan DO=40) i d'addició de fosfats que en el capítol III. Es va mesurar la concentració de glucosa i densitat òptica del cultiu durant bona part del procés, tot i que la majoria de punts corresponen a la fase de discontinu alimentat.

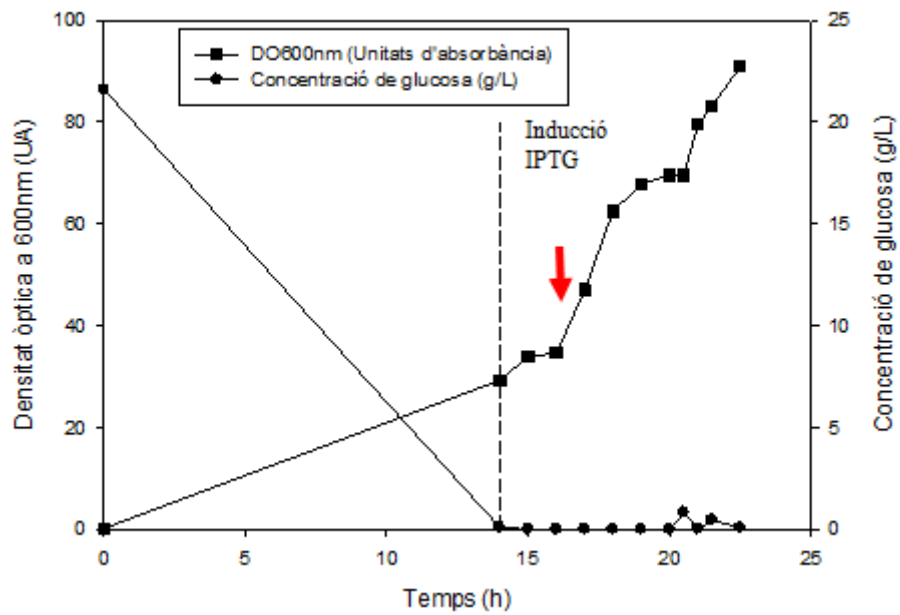


Fig. 4.8. Perfil de la fermentació: evolució de la densitat òptica a 600nm (unitats d'absorbància) i de la concentració de glucosa (g/L) induint amb IPTG 150 μ M (instant marcat amb una fletxa vermella).

El perfil obtingut recordava molt al que es va obtenir en el capítol III.

Les mostres recollides en el període post-inducció de 18 a 23 h van ser analitzades mitjançant els assaigs habituals i es van obtenir els resultats que figuren a la taula 4.5.

Taula 4.5. Evolució amb el temps de l'activitat a de les mostres recollides post-inducció en termes de UA/g pes sec i UA/mg FucA.

Temps de cultiu (h)	UA/g pes sec	UA/mg FucA
18	580	1
19	613	1.6
20	761	3.6
21	664	2.6
21.5	1096	2.6
23	841	1.8

En termes de UA/g pes sec, es pot observar que els valors creixen assolint el seu punt màxim a les 21.5 h: 1096 UA/g pes sec que correspon a un nivell de producció similar a la soca amb marcador *glyA* sense terminador *rrnBT1*. A les hores que segueixen, s'observa una tendència al decreixement, probablement a conseqüència de certa proteòlisi.

Respecte de les construccions anteriors que contenen el plasmidi pREP-4, s'observa una menor regulació de l'expressió (valors abans d'induir ja al voltant de 600 UA/ g pes sec).

Pel que fa a l'activitat específica, la tendència és molt similar a la descrita per l'activitat expressada com a UA/g pes sec. Els valors són del mateix ordre de magnitud que a la soca construïda en el capítol III, però lleugerament inferiors que els obtinguts a la soca sense terminador.

En qualsevol cas, en aquest punt es tornà a fer palès el descens de l'activitat específica que es relacionava amb el fenomen de proteòlisi (Pinsach, 2008) que s'ha comentat en el capítol III.

Tot seguit, amb la proteïna semi-purificada obtinguda a partir d'aquestes mostres finals post-inducció, es va dur a terme un anàlisi SDS-PAGE per tal d'esbrinar quina era la proporció entre la proteïna d'interès i SHMT (Fig.4.9).

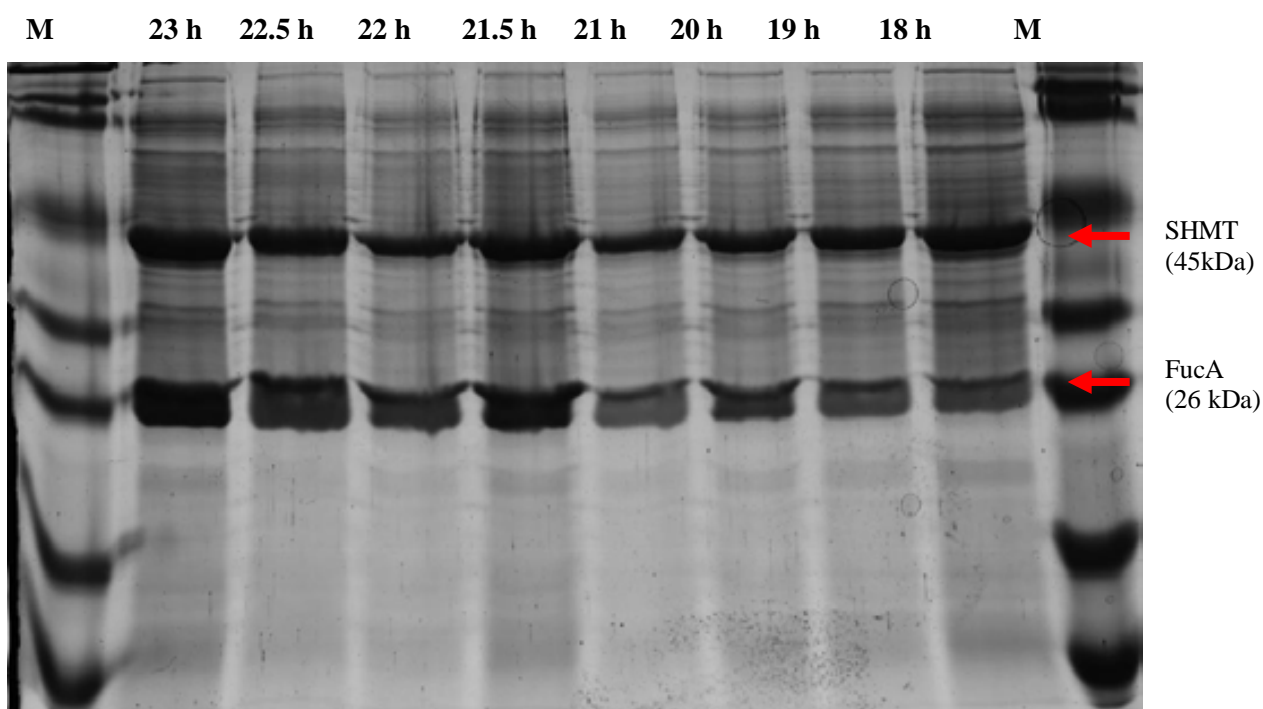


Fig. 4.9. Anàlisi SDS-PAGE (tinció Comassie) de les mostres d'extractes cel·lulars solubles obtinguts a diferents temps de cultiu total en un cultiu en discontinu. S'indica amb una fletxa vermella la SHMT (45 kDa) i la FucA (26 kDa).

En l'anàlisi de SDS-PAGE s'observa un increment de l'àrea de banda al llarg del temps, especialment en el cas de la FucA. Aparentment, en totes les mostres analitzades s'observa una amplitud de banda major en FucA que en SHMT. Tanmateix, una observació més detallada, permet apreciar que en alguns casos la intensitat de la banda

corresponent a FucA és menor que la de SHMT, degut a la tonalitat grisosa de la primera, la qual cosa pot afectar als resultats de la densitometria que es presenten a continuació (Fig.4.6).

Taula 4.6. Resultats expressats en % que indiquen la proporció de FucA i SHMT, provinents d'una densitometria realitzada de cadascuna de les bandes del gel SDS-PAGE del cultiu en discontinu alimentat de la soca M15 Δ glyA/pQE α fucAT1.

Temps (h)	% SHMT	% FucA	Raó FucA/SHMT
18	18.4	13.9	0.7
19	18.6	21.2	1.7
20	18.1	26.6	1.5
21	18.8	27	1.4
21.5	19.8	32.6	1.6
23	15.3	24	1.6

Tanmateix, per tal de poder avaluar la millora que representava la nova soca dissenyada, es necessitava una informació semblant de la soca sense terminador procedent d'una fermentació en discontinu alimentat similar. Aquest experiment es resumeix a la Taula 3.4 del capítol II on figuren les dades de % FucA. L'anàlisi SDS-PAGE de les mostres obtingudes post-inducció per a la soca sense terminador es presenten a la Figura 4.10.

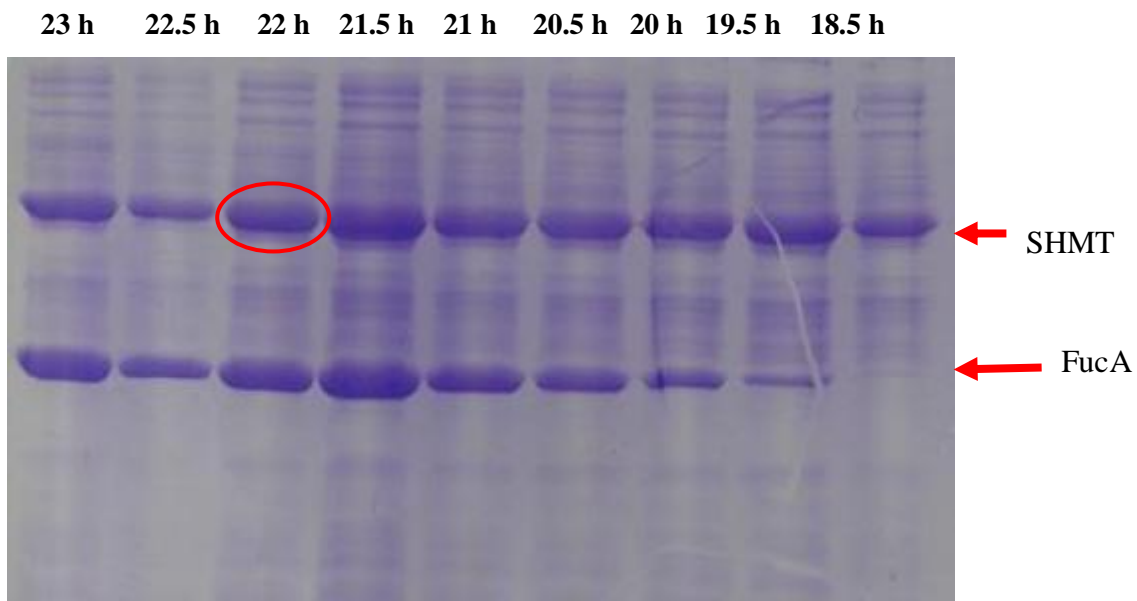


Fig. 4.10. Anàlisi SDS-PAGE de les mostres d'extractes cel·lulars solubles obtingudes a diferents temps del cultiu discontinu alimentat, a partir de la fermentació de la soca M15 Δ glyA/pQE α fucA. Els resultats de la densitometria d'aquest anàlisi figuren a la taula 4 del *capítol III* en termes de % de FucA. La banda de SHMT encerclada en vermell representa el punt que serà avaluat en termes de relació SHMT/FucA i correspon a 22 h.

Per simplificar l'anàlisi, es va establir la comparació en un punt determinat dels dos cultius corresponent a condicions finals.

Un cop establertes les condicions de la comparativa, es va decidir fer un segon anàlisi de quantificació, atès que l'habitual s'havia realitzat en dos períodes naturals de temps molt llunyans i es volien evitar divergències de criteri entre ambdós. A la Taula 4.7 hi figura la proporció d'ambdues proteïnes obtingudes en cadascuna de les soques usant els dos mètodes d'anàlisi esmentats a Materials i Mètodes.

Taula 4.7. Valors obtinguts a partir d'una densitometria comparativa de les soques M15 Δ glyA/pQE α fucA i M15 Δ glyA/pQE α fucAT1 mitjançant dos mètodes de quantificació (Kodak 1D i Quantity One) en % de FucA, % SHMT i relació FucA/SHMT.

Mètode Quantity One				Mètode Kodak1D		
Soca	% SHMT	% FucA	Relació	% SHMT	% FucA	Relació
Sense terminador	34	32	0.9	42	34	0.8
Amb terminador	16	30	1.9	29	43	1.5

En primer lloc, cal indicar que els valors de la relació FucA/SHMT són relativament diferents en cultius d'alta densitat cel·lular (discontinu alimentat) respecte a cultius en matrassos d'Erlenmeyer.

Com es pot veure, encara que pels dos mètodes els % de cada proteïna són lleugerament diferents, la soca amb el terminador presenta una relació FucA/SHMT al voltant de 2 vegades el valor de la soca sense terminador per qualsevol d'ambdós. Aquest resultat tan similar donava validesa al mètode aplicat fins al moment, Quantity One, ja que es tractava d'una diferència entre mètodes de només un 1.5%.

Per altra banda, aquests resultats indiquen que s'ha augmentat la proporció FucA/SHMT unes dues vegades. Tot i que aquest valor podia variar en els diferents punts, observant detingudament les dues anàlisis SDS-PAGE (Fig.4.9 i 4.10), es pot veure una reducció general considerable dels nivells de SHMT en tots els punts. També convé destacar uns valors de densitometria (% de proteïna) molt similars al llarg del temps a la Fig.4.9, la qual cosa va fer pensar que els nivells de sobreexpressió d'aquesta proteïna en la nova construcció s'havien reduït lleugerament respecte la construcció inicial en la qual *glyA* no posseïa el terminador *rrnB T1*. Tot i això, els nivells de SHMT

mostraven encara un valor mínim d'expressió des de la primera fins la última mostra del 16 % (en relació a proteïna total cel·lular) en el millor del casos, la qual cosa suggeria que segurament caldria reduir-los encara més en un futur.

4.4. Conclusions.

4.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.

- La nova construcció del vector d'expressió de FucA és lliure de seqüències d'origen transposònic. Conté el marcador auxotròfic *glyA* seguit del terminador transcripcional fort T1, fets comprovats mitjançant la seqüenciació parcial del nou vector. A més, l'hoste és ara lliure de plasmidi pREP-4 i conseqüentment, del gen de resistència a Kanamicina.
- La soca amb el nou vector d'expressió (el qual conté el marcador *glyA* seguit del terminador T1) no millora significativament els valors d'expressió de FucA en termes de UA/ g pes sec, ni tampoc d'activitat específica (UA/ mg proteïna total), per tant no es pot parlar d'una soca més productiva. Tanmateix, no era l'objectiu que es perseguia en el disseny d'aquesta construcció.
- Pel que fa als percentatges de proteïna expressada, tots els mètodes de quantificació d'anàlisis electroforètiques representen una estimació aproximada de la quantitat de proteïna d'interès respecte la resta de proteïnes intracel·lulars. Per aquesta raó, s'ha pres la iniciativa de comparar dos mètodes. Donat que les estimacions fetes amb els dos programaris han donat valors tan propers entre ells, es dona validesa a ambdós mètodes, però es selecciona com a programari habitual el Quantity One, ja que es tracta d'un mètode més sofisticat, automatitzat i ràpid.

- L'avaluació de la reducció relativa dels nivells de SHMT, expressada mitjançant la relació FucA/ SHMT, demostra que la soca M15 Δ glyA/pQE α fucAT1 ha augmentat dues vegades la relació FucA/SHMT respecte la construcció anterior. Per tant, s'ha aconseguit reduir significativament els nivells de SHMT.

4.4.2. Motivacions

A curt termini.

- Una optimització del sistema d'expressió consistiria en una major regulació de l'expressió del gen d'interès (*fucA*). Cal recordar que el sistema d'expressió original, comercialitzat per Qiagen, consta del plasmidi pREP-4, el qual posseeix el gen *lacI*, repressor de l'operador lac. Donat que aquest plasmidi havia estat eliminat de l'hoste (degut a que podia ser una factor d'inestabilitat genètica lligada a mobilitat transposònica ja exposada a l' inici del capítol), es va plantejar la possibilitat d'incorporar el repressor LacI al vector d'expressió. D'aquesta manera, es podria minimitzar els nivells basals d'expressió del gen *fucA* i per tant, reduir la càrrega metabòlica derivada del manteniment del vector d'expressió.
- D'altra banda, l'ajust dels nivells de transcripció del marcador *glyA* que permetessin reduir els nivells de SHMT als mínims necessaris que asseguressin un bon manteniment del vector d'expressió mitjançant aquest marcador auxotròfic permetria una reducció encara major de la càrrega metabòlica derivada del manteniment d'aquest vector.

A llarg termini.

La conveniència d'eliminar els gens de resistència antibiòtics es contempla encara com a perspectiva de futur, però en primer lloc, és prioritari generar un sistema d'expressió que permeti a l'hora una bona estabilitat plasmídica, càrrega metabòlica mínima i una bona regulació (i nivells d'inducció) de l'expressió del gen d'interès.

4.5. Referències.

Datsenko KA, Wanner BL. 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** PNAS. 97 (12): 6640-6645.

Goryshin IY, Jendrisach J, Hoffman LM; Reznikoff WS. 2000. **Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes.** Nat Biotechnol. 18: 97-100.

He B, Kukarin A, Temiakov D, Chin-bow ST, Lyakhov DL, Rong M, Durbin RK, Mcallister WS. 1998. **Characterization of an unusual Sequence-Specific Termination Signal for T7-RNA Polymerase.** J Biol Chem 273: 8802-10811.

Horton SN, Hunt D, Norton RM, Puller JK, Pease LR. 1989. **Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.** Gene. 11(7): 51-59.

Kwon YS, Kang C. 1999. **Bipartite Modular Structure of Intrinsic RNA Hairpin-independent Termination Signal for Phase RNA Polymerases.** J Biol Chem. 274: 29149-29155.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2001. **Brock: Biología de los microorganismos** (8a edició revisada), Prentice Hall Iberia Inc.

Mairhofer J, Cserjan-Puschmann M, Striedner G, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Grabherr R. 2010. **Marker-free plasmid for gene therapeutic applications-Lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process.** J Biotechnol. 146: 130-137.

Pinsach J, de Mas C, López-Santín, Striedner G, Bayer K. 2008. **Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures.** Enzyme Microb Tech. 43 (7): 507-512.

Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson H. 2006. **Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants.** *Envir Sci Tech Lib.* 20 (23): 7445-7450.

Sohn Y, Kang C. 2004. **Sequential multiple functions of the conserved sequence in sequence-specific termination by T7 RNA Polymerase.** *PNAS.* 102: (75-80).

Vidal L. 2006. **Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Vidal L, Pinsach J, Striedner G, Caminal G, Ferrer P. 2008. **Development of an antibiotic-free plasmid selection system based on glycine auxotrophy for recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*.** *J Biotechnol.* 134 (1-2): 127-136.

CAPÍTOL 5. REINCORPORACIÓ DEL GEN REPRESSOR *LAC I* PER A L'OBTENCIÓ D'UN SISTEMA D'EXPRESSIONI BASAT EN UN MARCADOR AUXOTRÒFIC PER A LA GLICINA AMB UN ÚNIC GEN DE RESISTÈNCIA A ANTIBIÒTIC.

5.1. Introducció.

En el capítol IV, es va procedir a la reconstrucció de la soca M15 Δ glyA/pQE α fucA, a la qual es va incorporar un terminador rrnT1B en el seu vector d'expressió i es va eliminar el pREP-4, un plasmidi amb baix nombre de còpies, atès que semblava ésser una font d'instabilitat genètica degut a la mobilitat potencial de les seqüències transposòniques que contenia. Aquest plasmidi contenia el repressor LacI, el qual va desaparèixer també de la construcció final M15 Δ glyA/pQE α fucAT1.

El gen *lacI* codifica per la proteïna repressora LacI, la qual reconeix la regió operadora on s'uneix. L'esmentat repressor impedeix la transcripció dels gens sota el control del promotor, però estimula la unió de la RNA-polimerasa formant el que es coneix com a complexos tancats. Quan el repressor es retira (en presència d'inductor, sigui lactosa o IPTG), la RNA-polimerasa està preparada per formar complexos i començar la transcripció (Müller-Hill, 1996).

D'altra banda, l'expressió de nivells molt elevats de proteïna recombinant posseeix efectes negatius a la cèl·lula: inhibició del creixement, degradació acumulativa de RNA ribosòmic (Dong et al., 1995; Choi et al., 2006), lisi cel·lular (Georgiou et al., 1988; Pilon et al., 1996) entre d'altres respostes (Soriano et al., 1999; Liao i Oh, 2000). Aquests efectes de la producció de proteïna recombinant contribueixen a augmentar la

càrrega metabòlica, la qual ha estat definida com a porció de font de cèl·lules hoste requerides per mantenir i expressar DNA forani, RNA o proteïnes a la cèl·lula (Glick, 1995). Un altre factor que també participa en aquest augment és la síntesi de proteïnes addicionals (Glick, 1995; Rozkov i Enfors, 2004). En aquest sentit, les cèl·lules d'*E. coli* M15 Δ glyA/pQE α β rham van experimentar un increment de càrrega metabòlica degut a l'expressió excessiva de SHMT, la qual va ser identificada per contribuir en la segregació cel·lular en cèl·lules viables però no cultivables (Pinsach, 2008).

Per tots els motius citats, es considerà que el *lacI* era un element essencial per al bon funcionament del sistema d'expressió i convenia ésser reintroduït. Per tal d'excloure totalment la possibilitat de reintroduir accidentalment DNA plasmídic de pREP-4, la font del gen *lacI* per a ser reincorporat al sistema fou el plasmidi pET21a (Novagen).

Una altra millora necessària, a nivell d'estabilitat genètica, consistia en l'eliminació de tots aquells elements dispensables del nostre vector d'expressió a fi de reduir-ne la mida per tal de facilitar-ne la manipulació. En aquest sentit, els estudis previs generaven un sistema eficient de complementació de glicina que permetia assegurar l'estabilitat plasmídica en cultius en medi MD, representant una alternativa als sistemes basats en la suplementació d'antibiòtics com a marcadors selectius (Vidal, 2006; Pinsach, 2009).

Actualment, els antibiòtics segueixen essent àmpliament emprats en fermentacions bacterianes i la major part de vectors d'expressió contenen gens de resistència a antibiòtics (ARG) com a marcadors de selecció (vegeu Introducció general), però aquests són prescindibles davant la presència d'un marcador basat en una auxotrofia.

En aquest capítol, es construeix una nova soca que conté del vector d'expressió per a FucA, basada en el plasmidi pQE-40 (d'elevat nombre de còpies) amb repressor LacI

incorporat que conserva encara el gen de resistència a Ampicil·lina per a futurs treballs que requereixin la presència d'un marcador de selecció convencional.

Tot seguit, es realitzen uns cultius en matrassos d'Erlenmeyer per comprovar-ne l'expressió de FucA.

5.2. Materials i mètodes: Soques, plasmidis i estratègia emprades.

La construcció M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 requereix la incorporació del gen *lacI* que provingui d'un plasmidi lliure de tota contaminació transposònica. Per aquesta raó, es va emprar un nou plasmidi: pET21a (Novagen), d'on va ser aïllat el gen repressor i incorporat a la construcció generada en el capítol IV (Fig.5.1).

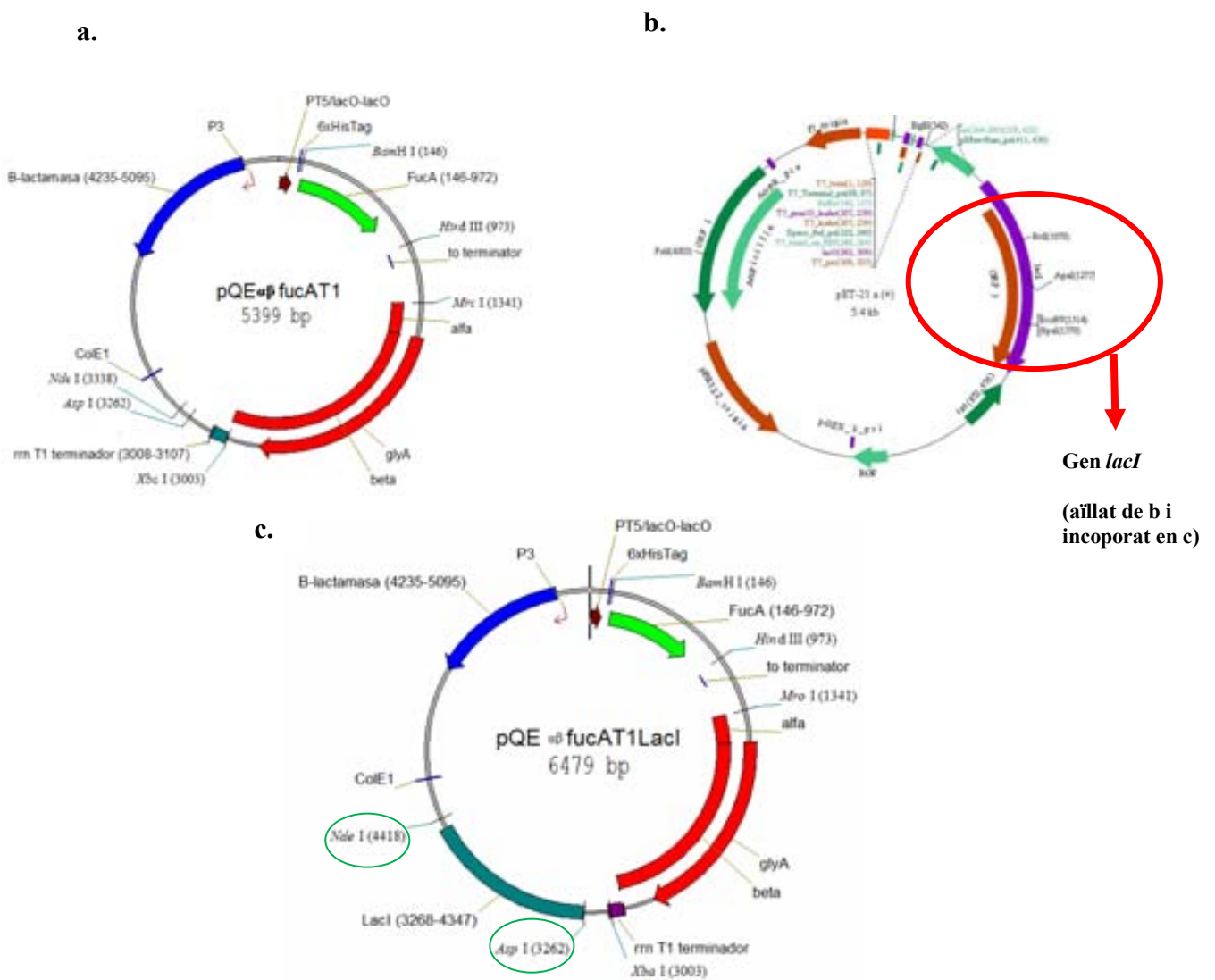


Fig. 5.1. Diagrama dels plasmidis pQE α β fucAT1 (a) obtingut en el capítol IV i pET21a (b) de Novagen. El plasmidi pQE α β fucAT1 mostra en blau el gen de la β -lactamasa i el pET21a conté marcat amb vermell el gen repressor *LacI*. En el plasmidi resultant, pQE α β fucAT1LacI (c), hi figuren els enzims de restricció *NdeI* i *AspI*, els quals han estat emprats en el procés de clonatge.

5.3. Resultats i discussió.

5.3.1. Desenvolupament de la construcció.

L'estratègia per desenvolupar aquesta construcció consisteix en el disseny d'uns encebadors per amplificar l'element *lacI* que continguin en els extrems unes seqüències diana per dos enzims de restricció (NdeI i AspI), els quals a la vegada tallin el vector per tal d'introduir l'esmentat insert. Com en els altres clonatges, s'escullen enzims de restricció de tall únic per tal de simplificar el clonatge (Taula 5.1).

Taula 5.1. Encebadors emprats per amplificar l'element *lacI* amb la seva temperatura d'hibridació segons el subministrador www.biomers.net. Les dianes es subratllen en vermell.

Encebador	Seqüència (5'-3')	Tm (°C)
LacI_AspI	atgcatcgag gacactgt ctcactgcccgcgtttccagtc	72
LacI_NdeI	atggactca catatg atgatagcgcccggaagaga	77

L'amplificació del *lacI* es va realitzar a partir dels oligonucleòtids de la taula 5.1, de la següent manera: desnaturalització (15 segons a 98 °C), anellament (15 segons a 65 °C) i extensió (20 segons a 72 °C) durant 25 cicles amb les etapes de preescalfament i extensió habituals. Es va emprar KOD polimerasa (Novagen) tot seguint les instruccions del fabricant. Es va incloure un control negatiu de PCR que consistia en aigua lliure de nucleases com a DNA motlle.

L'amplificació del gen *lacI* va donar una banda de 1100 pb, corresponent a la mida aproximada del repressor (Fig.5.2).

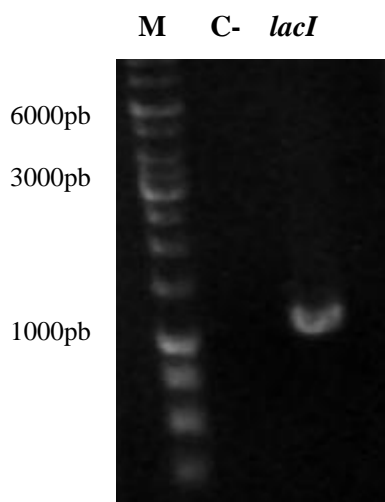


Fig. 5.2. Anàlisi electroforètica (gel d'agarosa) de la PCR d'amplificació del gen *lacI* (1100 pb aproximadament). En el carril 1 es mostra el marcador, en el carril 2 el control negatiu i en el carril 3 el *lacI* amplificat.

Paral·lelament a aquesta amplificació, el vector es va digerir amb els enzims corresponents i es va recuperar el fragment resultant, el qual era gairebé la totalitat del vector (5300 pb) aproximadament.

Un cop el fragment amplificat de 1100 pb fou purificat i digerit, es va procedir a la lligació d'ambdós fragments a les condicions habituals i s'obtingueren un gran nombre de colònies.

Una selecció de clons va ser necessària per verificar la presència de l'insert, és a dir, el gen del repressor LacI, en tots els clons analitzats mitjançant una PCR comprovativa i una digestió amb un enzim de restricció extern al clonatge (Fig.5.3).

La PCR comprovativa es va efectuar amb la polimerasa GoTaq (Fermentas) i els encebadors descrits a la Taula 5.1, a fi d'esbrinar la presència o absència del repressor LacI.

La digestió de comprovació va ser realitzada mitjançant Hind III, atès que aquest tenia un lloc de tall a la construcció final (al vector). Tot i que l'insert procedia d'un vector

amb una diana de tall per l'esmentat enzim, aquesta no es trobava en el gen *lacI*, de manera que es descartaria la possibilitat que s'hagués incorporat una regió indesitjada. Així mateix, el resultat quedaria subjecte a un paràmetre fàcilment avaluable: el nombre de bandes.

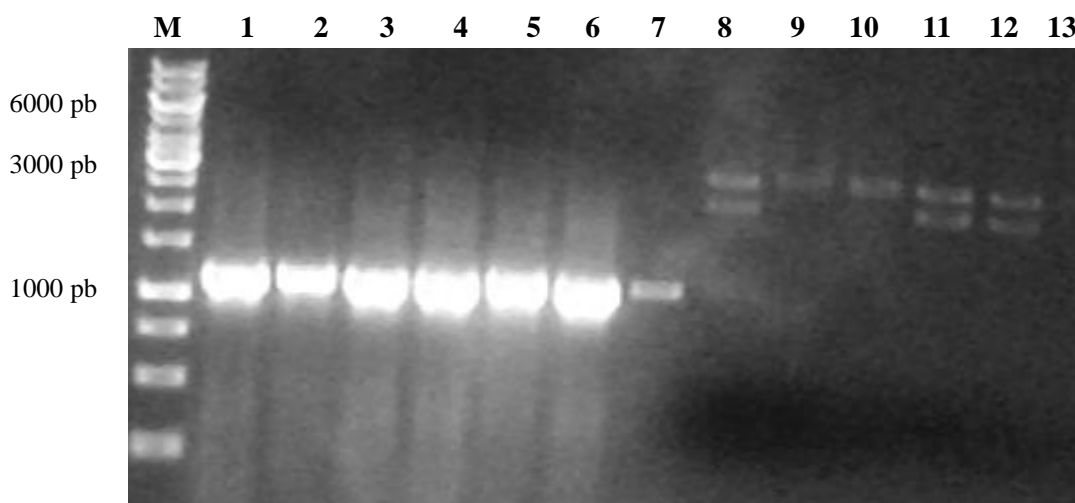


Fig. 5.3. Anàlisi electroforètica de la PCR de comprovació de la presència de l'insert *lacI* en el vector pQEαβfucAT1. Del carrils 1 al 6 es mostra el fragment *lacI* amplificat a partir de DNA plasmídic dels clons 1, 2, 3, 4, 5 i 6 respectivament. En el carril 7 s'ha introduït un control negatiu (consistent en aigua lliure de nucleases) i en els carrils 8, 9, 10, 11, 12 i 13, les digestions amb *Hind III* corresponents als clons 9, 10, 27, 32 i 45 respectivament).

Tanmateix, tot i ésser tots els clons, *a priori*, positius, la digestió amb *Hind III* demostrà que tan sols els clons 10 i 27 tenien el patró de bandes esperat (1 sola banda). Un d'aquests (el 27) fou seleccionat pels estudis posteriors.

5.3.2. Producció de FucA en cultius d'Erlenmeyer.

La producció de FucA es va efectuar mitjançant el cultiu de la soca (clon 27) en nou matrassos d'Erlenmeyer, ja que es va decidir introduir rèpliques biològiques a l'experiment a mode de validació per tal de quantificar l'error. L'error normalitzat fou de $\pm 5\%$ en el cas de la biomassa i de $\pm 4\%$ per la glucosa.

Aquests nou matrassos d'Erlenmeyer incloïen: tres cultius del clon seleccionat a avaluar (construcció amb el gen codificador del repressor LacI), tres controls positius (construcció sense el gen codificador del repressor LacI) i els tres controls negatius consistents en la soca hoste M15 Δ glyA sense plasmidi (vegeu condicions d'inducció a l'apartat 2.3.2). A continuació es mostra el perfil de creixement (Fig.5.4).

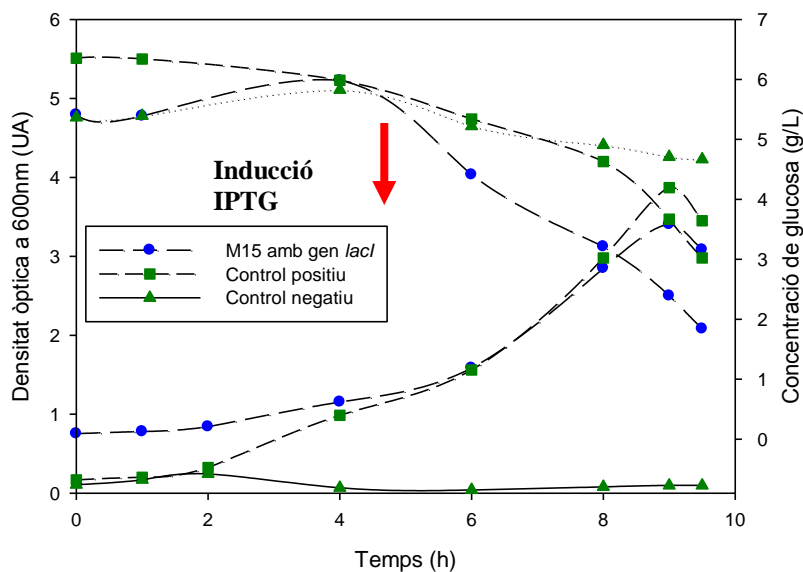


Fig. 5.4. Evolució del creixement i consum de substrat del clon seleccionat M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1LacI, (M15 amb gen *lacI*), M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 (control positiu) i la soca hoste M15 Δ glyA sense plasmidi (control negatiu). S'indica l'evolució dels controls en verd i la del clon seleccionat en blau. El creixement es visualitza a la part inferior i l'evolució de la concentració de glucosa all llarg del temps a la inferior. El moment d'inducció es mostra en el gràfic mitjançant una fletxa vermella. Valors promigts entre les tres rèpliques.

La densitat òptica assolida per la nova construcció assoleix valors entre 3 i 4 unitats, denominador comú amb la soca dissenyada en el capítol IV (M15 Δ glyA/pQE α fucAT1).

La nova soca posseeix un perfil de creixement similar a l'observat anteriorment.

Un cop obtingut el brou de cultiu, es realitzaren les anàlisis habituals a partir de la fracció soluble tal com es descriu a la secció 2.5.1 (test d'activitat, anàlisi Bradford i anàlisi SDS-PAGE).

El gel SDS-PAGE (Fig.5.5) de la proteïna semi-purificada permet visualitzar el conjunt de proteïnes presents en els llisats de l'esmentat clon a partir del cultiu final, així com també del control positiu i negatiu.

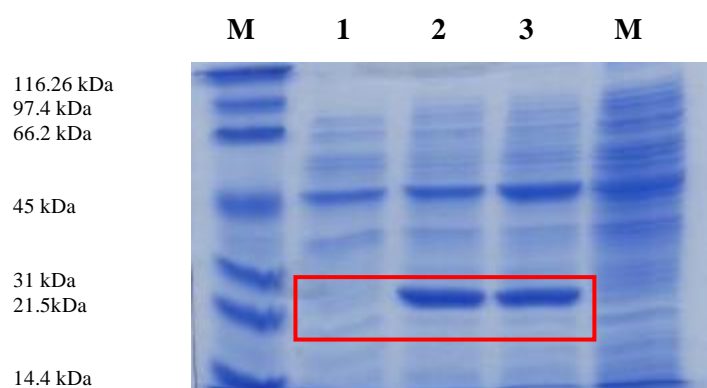


Fig. 5.5. Anàlisi SDS-PAGE d'extractes cel·lulars provinents del cultiu final (fracció soluble) . En el carril 1 i 2, la M15 Δ glyApQE α fucAT1 amb el gen *lacI* abans i després de l'inducció, respectivament. En el carril 3, la M15 Δ glyApQE α fucAT1 induïda (control positiu).

D'acord amb l'anàlisi SDS-PAGE visualitzat a ull nu, la nova construcció (Fig.5.5) presenta una bona regulació, ja que pràcticament no s'observa banda de FucA abans d'induir. Per altra part, reduïa lleugerament els nivells de SHMT en comparació amb la

construcció en absència del gen codificador del repressor LacI. Pel que fa als nivells de FucA eren semblants en ambdues soques.

Contrastant les mostres pre-inducció i post-inducció de la nova construcció, es va fer evident que el nivell de SHMT era gairebé idèntic, la qual cosa suggeria que es tractava d'un nivell constitutiu.

La resta d'anàlisis (Taula 5.2) van permetre expressar l'activitat en termes de UA/g pes sec, UA/mg proteïna i UA/mg FucA, així com també els resultats de la densitometria (% de FucA i % de SHMT) provinents de l'anàlisi SDS-PAGE mostrada (Fig.5.5).

Taula 5.3. Resultats de les activitats expressades en UA/ g pes sec, UA/mg FucA i, densitometria del gel (% FucA i % SHMT) de la soca M15LacI (és a dir, M15 Δ glyA/pQE α fucAT1LacI) després de la inducció, la soca control positiu (M15 Δ glyA/pQE α fucAT1) i la soca control negatiu (M15 Δ glyA/pQE α fucAT1LacI abans de la inducció).

Soca	UA/g pes sec	UA/mg proteïna	UA/mg FucA	% FucA	% SHMT
M15 LacI Post-inducció	1228 \pm 13	1.7 \pm 0.1	5.1 \pm 0.3	35 \pm 0.8	21 \pm 0.4
Control positiu	1358 \pm 13	1.5 \pm 0.1	6.1 \pm 0.5	26 \pm 1.1	26 \pm 0.2
Control negatiu	47 \pm 0.5	0.031 \pm 0.005	0.3 \pm 0.04	5 \pm 0.7	16 \pm 0.1

En termes d'activitat expressada en UA/g pes sec, s'observa que la soca amb repressor incorporat és aproximadament igual d'activa (1228 \pm 13 UA/g pes sec) que la construcció dissenyada en el capítol IV.

D'altra banda, l'expressió estava ben regulada, ja que la expressió basal (abans de la inducció) és només de 47 \pm 0.5 UA/g pes sec, confirmant que la inclusió del gen *lac I* ha permès recuperar aquesta regulació.

Si es centra tota l'atenció en els valors de UA/ mg de proteïna, es fa palesa una certa millora dels nivells de producció (1.7 ± 0.1 UA/mg proteïna). Pel que fa a l'activitat específica (5.1 ± 0.3 UA/mgFucA), el valor obtingut partir dels resultats de la densitometria corresponent a l'anàlisi SDS-PAGE mostrat a la Fig. 5.5 és certament inferior.

Segons els resultats de la densitometria (Taula 5.2, columnes 5 i 6), es podia afirmar que la nova construcció presenta uns valors de SHMT un 24 % inferiors respecte la construcció sense repressor. Pel que fa a la FucA, aquesta es va veure incrementada en un 26 %.

En el control negatiu, el 16 % del total de les proteïnes pertanyia a SHMT, de manera que es podia parlar d'un valor constitutiu que no podia ésser reduït.

La relació FucA/SHMT era de 1 a la soca sense repressor i de 1.7 a la soca amb repressor. Si bé és cert que en el capítol anterior aquest coeficient era de 2 en la soca sense repressor, aquests nous cultius realitzats en triplicats donen uns valors inferiors en ambdues soques. Tot i això, cal tenir en compte que aquell va ser obtingut en fermentació en discontinu alimentat, de manera que caldria donar un significat relatiu a aquests valors.

Per tant, aquestes dades es podrien interpretar com que la nova soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1LacI millora la construcció M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 de manera significativa tant pel que fa a regulació com a la relació FucA/SHMT, tal i com es confirmà en experiments en bioreactors, descrits a continuació.

5.3.3. Producció de FucA en fermentador en discontinu alimentat de la soca M15 Δ glyA/ pQE α fucAT1LacI.

La soca M15 Δ glyA/ pQE α fucAT1LacI (clon 27) va ser emprada pel grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada per a la producció de FucA en creixement discontinu alimentat (Marcel·la Vidal i David Calleja, comunicació personal).

El procés va durar 24 hores: 15.72 h de discontinu i 8.48 h de discontinu alimentat i es va fixar la mateixa velocitat específica de creixement (μ) i estratègia d'inducció en pols. Es van realitzar dues addicions de fosfats (una a les 20.33 h i l'altra a les 22.72 h). Es mesurà la concentració de glucosa i la densitat òptica del cultiu durant bona part del procés i el resultat es mostra a la Fig. 5.6.

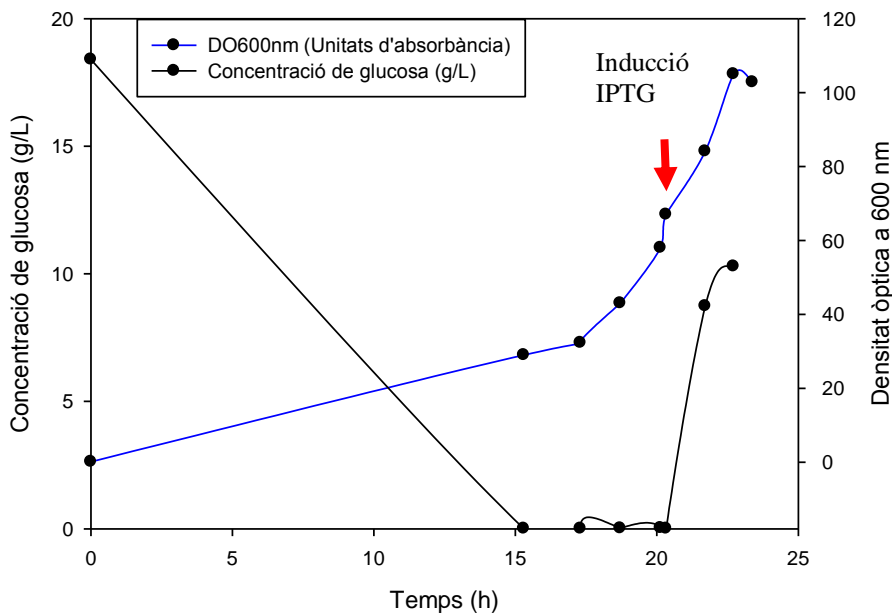


Fig. 5.6. Fermentació de la soca M15 Δ glyA/ pQE α fucAT1LacI en discontinu alimentat: evolució de la concentració de la glucosa representada en negre i de la densitat òptica a 600 nm al llarg del temps assenyalada en blau. El moment d'inducció s'indica de color vermell.

La velocitat específica de creixement (μ) durant la fase de discontinu alimentat abans de la inducció es manté a 0.22 h^{-1} tal com s'esperava, però la inducció de l'aldolasa recombinant amb IPTG causa un decreixement de l'esmentada μ fins a 0.18 h^{-1} .

Un cop transcorregudes 2 hores a partir de la inducció, s'observa una acumulació de glucosa deguda a la càrrega metabòlica generada en la sobreexpressió de FucA.

La FucA obtinguda de la fermentació fou aïllada mitjançant els mètodes habituals i quantificada aquesta vegada en termes d'activitat total (UA/ g pes sec), activitat específica (mg FucA/g pes sec) i quantitat de proteïna per unitat de pes sec (mg FucA/ g pes sec). Aquests últims dos paràmetres es mostren a la Fig. 5.7, juntament amb la concentració de biomassa i substrat.

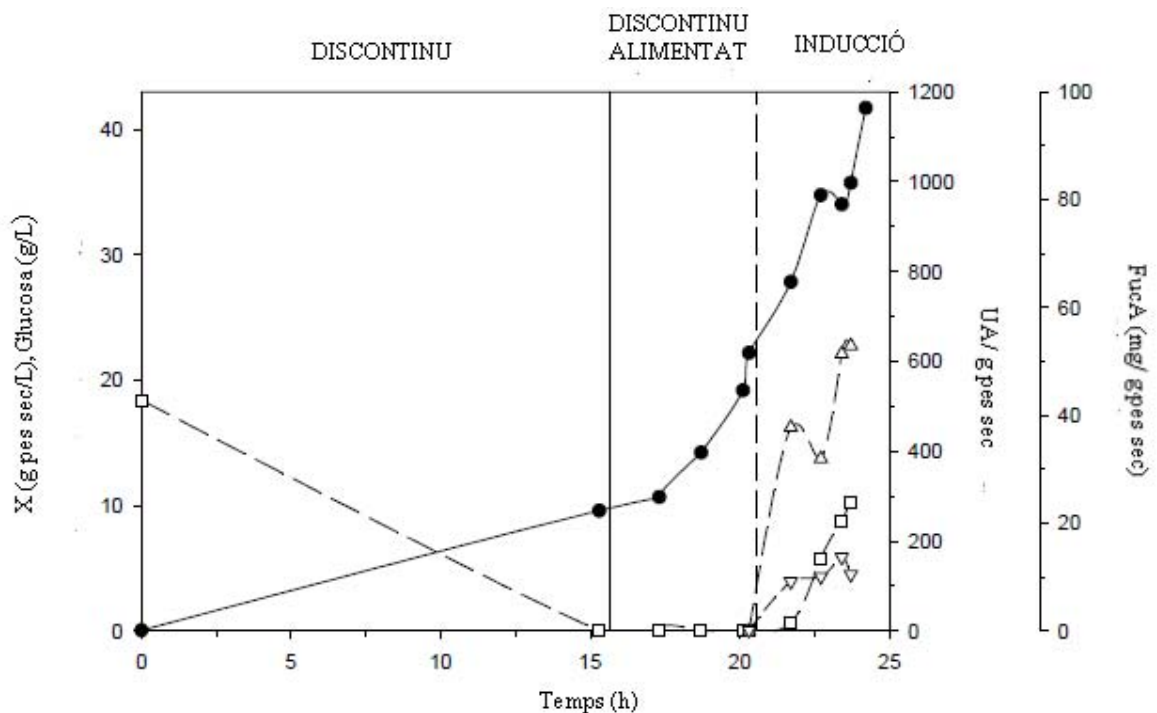


Fig. 5.7. Producció de FucA al llarg del temps en un cultiu discontinu alimentat. El símbol ● indica pes sec, el símbol □ correspon a glucosa, Δ indica activitat en UA/g pes sec i ▽ els mg de FucA/g pes sec.

Considerant la producció de FucA, el valor màxim d'activitat intracel·lular s'assoleix a les 3 hores després de la inducció i és de 634 UA/ g pes sec. Pel que fa a la quantitat màxima de FucA intracel·lular, el valor d'aquesta correspon a 13.7 mg/g pes sec.

La determinació de l'expressió de FucA es realitza mitjançant un anàlisi SDS-PAGE (Fig 5.8) amb les mostres obtingudes de la fermentació abans i després de la inducció, per tal de determinar-ne els nivells basals.

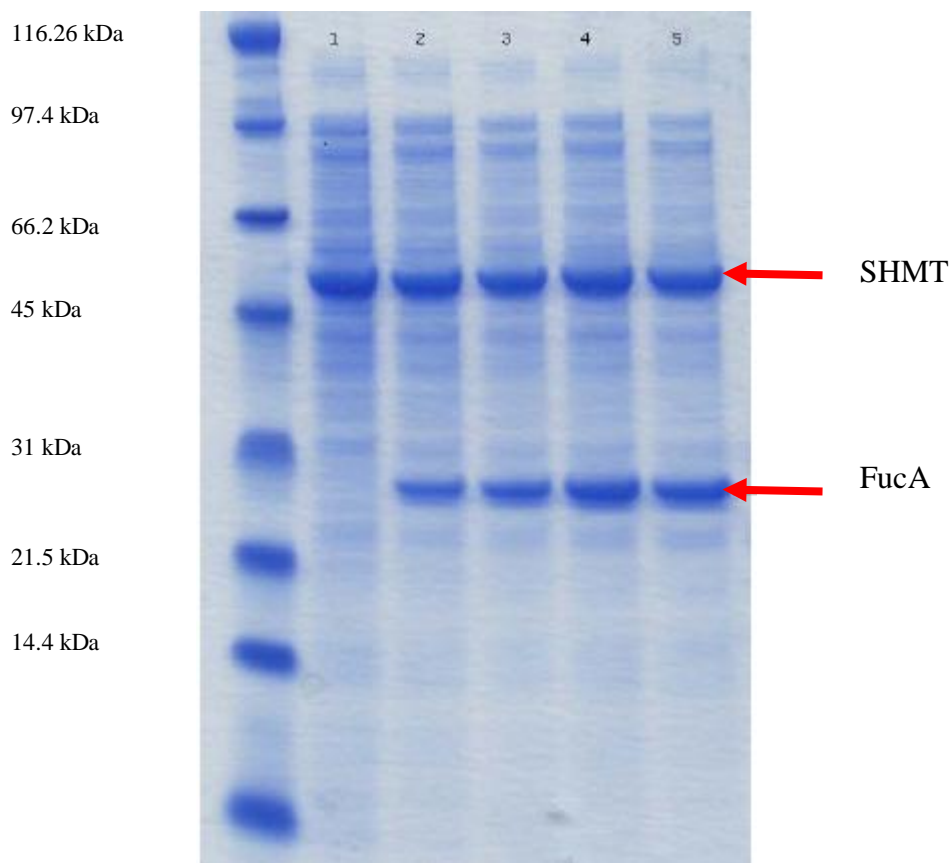


Fig. 5.8. Anàlisi SDS-PAGE a partir de mostres obtingudes: abans de la inducció (1), al cap d'una hora de la inducció (2), a les 2 hores (3), a les 2.5 h (4) i a les 3 h després de la inducció (5). Les dues fletxes vermelles assenyalen les dues proteïnes d'interès (FucA i SHMT).

L'anàlisi SDS-PAGE mostra un nivell de SHMT similar abans i després de la inducció, de manera que s'ha reduït l'expressió de l'esmentada proteïna fins a un nivell constituït de FucA, sense afectar els nivells transcripcionals de *glyA*, confirmant observacions anteriors suggerint que la transcripció a partir del promotor T5 no afecta la del gen *glyA*, situat corrent avall del casset d'expressió T5/fucA/t₀.

A la Taula 5.4, es presenta la quantitat de proteïna d'interès obtinguda en mg de FucA.

Taula 5.4. Nivells de producció de FucA abans i després de la inducció expressats com a mg FucA.

	Temps (h)	mg FucA
Abans de la inducció	0	0.02
Després de la inducció	1	2.41
	2	4.55
	3	5.28

El nivell de producció basal de FucA observat de manera qualitativa a la Fig. 5.8 resulta mínim en termes numèrics (Taula 5.4).

Totes aquestes afirmacions permeten ratificar el que ja s'ha dit a l'apartat 5.3.2: la nova construcció amb gen *lacI* incorporat està ben regulada.

5.4. Conclusions.

Les conclusions presenten l'estructura habitual, tot i que en aquest cas l'apartat de conclusions extretes a partir d'objectius aconseguits (5.4.1) serà més extens que l'apartat de motivacions (5.4.2), el qual passarà a anomenar-se perspectives de futur, en tractar-se de l'últim capítol de disseny de soques.

5.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius assolits.

- ***Millora en els nivells d'activitat assolits.***

La nova soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1LacI produeix FucA activa i ben regulada, amb uns nivells similars a les construccions anteriors. Si bé es cert que no aporta una millora quantitativa a nivell de producció, aquest no era un objectiu prioritari d'aquesta construcció.

- ***Acció del repressor LacI.***

L'acció del repressor LacI com a responsable de la regulació de la transcripció es fa palesa a l'esmentada construcció, ja que permet destinar bona part dels recursos cel·lulars a la producció de la proteïna d'interès, la qual s'expressa a nivells basals baixos i augmenta molt significativament després de la inducció.

D'altra banda, la incorporació del repressor LacI sembla tenir una influència sobre la reducció dels elevats nivells de SHMT que es fa especialment evident en el cas de la construcció M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1LacI, la qual presenta uns nivells de SHMT menors, però poc millorats respecte la soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1.

La relació entre la presència de repressor i la reducció dels nivells de SHMT es podria explicar com que, les còpies múltiples de l'operador lac ajusten el repressor LacI, de manera que en funció del tipus de RNA-polimerasa, l'activitat basal serà més o menys elevada. En el cas de la RNA-polimerasa T7, en provenir d'un promotor molt fort, no permetrà que els diversos gens diana siguin conservats de manera estable. En canvi, la RNA-polimerasa T5 del nostre plasmidi, provinent d'un promotor no tan fort, no reduirà aquests nivells d'una manera tant forta, per la qual cosa sempre quedarà una expressió basal de la proteïna SHMT. Seria possible observar aquests esdeveniments de l'expressió per citometria de flux.

- ***Balanç de la nova construcció.***

La soca generada M15 Δ glyA/pQE α fucAT1LacI permet millorar de manera global la construcció inicial, tant des d'un punt de vista qualitatiu (s'ha eliminat el gen de resistència a la Kanamicina) com quantitatiu (es redueixen els nivells de la proteïna secundària). Convé recordar que es tracta d'una construcció lliure de contaminació transposònica, ben regulada des d'un punt d'expressió de proteïna recombinant i aplicable en cultius discontinus d'alta densitat cel·lular. La conservació d'un gen de resistència a antibiòtic pot ser útil des del punt de vista del vector de clonatge per a construccions futures.

5.4.2. Perspectives de futur.

- La necessitat de generar una construcció que hagi eliminat el gen de la β -lactamasa és prioritària, a fi d'obtenir una soca genèticament acceptada per a la producció de proteïnes d'interès terapèutic segons les recomenacions de les autoritats sanitàries (Statement of EFSA, 2009) . Addicionalment, la tendència general a reduir els vectors d'expressió als elements genètics mínims també representa un mapa de ruta a seguir a continuació.
- El repressor LacI propi de la soca M15 inicial prové d'un plasmidi amb baix nombre de còpies (pREP-4). Considerant que s'ha capturat l'esmentat repressor d'un plasmidi d'alt nombre de còpies (pET21) i s'ha introduït en un plasmidi també d'alt nombre de còpies, es pot parlar d'un cert desajust metabòlic, atès que els nivells de *lacI* són molt forts. Per aquesta raó, caldria regular més acuradament els nivells de *lacI*. Una alternativa seria modular el nombre de còpies del vector d'expressió on es troba a partir dels vectors pET que tenen *lacI*. Aquests podrien ser un bon model a imitar ja que el *lacI* i el gen recombinant a expressar es troben en el mateix vector, la qual cosa evitaria desajustos pel que fa a nombre de còpies.

5.5. Referències.

Choi JH, Keum KC, Lee SY. 2006. **Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli***. Chem Eng Sci. 61(3):876-885.

Dong H, Nilsson L, Kurland CG. 1995. **Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction**. J Bacteriol.177: 1497-1504.

EFSA-Q-2009-00589. **Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinion on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants**. 2009. The EFSA Journal 1108: 1-8.

Georgiou G, Shuler ML, Wilson DB. 1988. **Release of periplasmatic enzymes and other physiological effects of β -lactamase overproduction in *Escherichia coli***. Biotechnol Bioeng.32: 741-748.

Glick BR. 1995. **Metabolic load and heterologous gene expression**. Biotechnol Adv. 13: 247-261.

Liao JC, Oh MK. 2000. **DNA microarray detection of metabolic responses to protein overproduction in *Escherichia coli***. Metab Eng.2: 201-209.

Mairhofer J, Pfaffenzeller I, Menz D, Grabherr, R. 2008. **A novel antibiotic-free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy**. J Biotechnol. 3: 83-89.

Müller-Hill, B. 1996. **The lac operon: a short story of a genetic paradigm**. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.

Peubez I, Chaudet N, Mignon C, Hild G, Husson S, Courtois V, De Luca K, Speck D, Sodoyer R. 2010. **Antibiotic-free selection in E. coli: new considerations for optimal design and improved production.** *Microb Cell Fact.* 9:65.

Pinsach J, de Mas C. López-Santín. Striedner G. Bayer K. 2008. **Influence of process temperatura on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures.** *Enzyme Microb Tech.* 43(7): 507-512.

Pinsach J. 2009. **Development of recombinant aldolase production process in *E. coli*.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pilon AL, Yost P, Chase TE, Lohnas GL, Bentley WE. 1996. **High level expression and efficient recovery of Ubiquitin fusion proteins from *Escherichia coli*.** *Biotechnol Progr.*12: 331-337.

Soriano E, Borth N, Katinger H, Mattanovich D. 1999. **Flow cytometric analysis of metabolic stress effects due to recombinant plasmids and proteins in *Escherichia coli* production strains.** *Metab Eng.*1: 270-274.

Roznov A i Enfors SO. 2004. **Analysis and Control of Proteolysis Recombinant Proteins in *Escherichia coli*.** *Adv Biochem Engin Biot.* 89:163-195.

Vidal L, 2006. **Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

CAPÍTOL 6. PRODUCCIÓ DE LA FUC A EN FORMA DE COSSOS D'INCLUSIÓ ACTIUS I APLICACIÓ D'AQUESTS EN REACCIONS DE SÍNTESI ESTEREOSELECTIVES.

6.1. Introducció.

Actualment i des de fa temps, una limitació comuna en la producció de proteïnes recombinants en alguns bacteris com *Escherichia coli* continua essent la producció d'agregats de proteïna insoluble que es coneixen amb el nom de cossos d'inclusió (IBs).

La formació d'aquests grànuls proteics amorfes en *E. coli* va ser observada inicialment en cèl·lules que creixien en presència de l'aminoàcid canavanina (Prouty et al., 1975).

Aquests grànuls es van descriure com a dipòsits de proteïnes de cèl·lules anormals, les quals no estaven envoltades per cap capa superficial definida. Tanmateix, la implementació de la tecnologia del DNA recombinant i la generació de bacteris recombinants per a la producció de proteïnes revelava la precipitació proteica com a característica comuna durant la sobreexpressió del gen clonat (Marston, 1986).

Per altra banda, aquests agregats o IBs representaven un gran obstacle per la producció de proteïnes recombinants d'una manera soluble i funcional (Buchner i Rudolph, 1991).

El fenomen d'agregació de proteïnes recombinats era degut a una quantitat reduïda de xaperones quan l'expressió recombinant de gens era dirigida a alts nivells (Lorimer, 1996; Rinas i Bailey, 1993; Thomas i Baneyx, 1996). Sota aquestes condicions, en les quals eren produïdes proteïnes en quantitats no fisiològiques, les associacions intermoleculares de superfícies hidrofòbiques exposades abans del repliegament proteic podien conduir cap a la deposició d'intermediaris de plegament (King et al., 1996), principalment quan eren resistents a la degradació proteolítica (Corchero et al., 1996).

Fins fa poc temps, es creia que els cossos d'inclusió significaven tan sols reservoris cel·lulars inactius. Tanmateix, amb el nombre creixent de publicacions sobre la presència de precursors correctament plegats a l'interior dels IBs (Ventura i Villaverde, 2006), aquesta visió va començar a canviar.

La presència d'estructures natives va ésser confirmada mitjançant una espectrometria d'infraroigs de reflectància atenuada (Ami et al., 2006; Jevsevar et al., 2005; Oberg et al., 1994; Peternel et al., 2008) i en alguns d'aquests casos es va detectar activitat biològica (de Groot i Ventura, 2006; Jevsevar et al., 2005; Peternel et al., 2008; Tokatkidis et al., 1991; Worrall i Gross, 1989). En aquest sentit, l'ús de la proteïna de fluorescència verda (GFP per les sigles en anglès) com a “informador” (reporter) per estudiar la cinètica dels IBs a partir d'un microscopi de fluorescència, va significar la confirmació definitiva (Garcia-Fruitòs, 2005), ja que fins aquell moment, la informació sobre la qualitat conformacional d'aquests agregats proteics havia estat negligida.

Publicacions més recents ja parlaven d'enzims basats en IBs i confirmaven de nou la seva activitat (Garcia-Fruitòs et al., 2007; González-Montalbán et al., 2008; Nahalka et al., 2006). Aquesta observació no tan sols corroborava el model de composició dels IBs proposat, (Carrió et al., 1998) sinó que obria un mercat prometedor en la indústria de la biocatàlisi (Garcia-Fruitòs, 2010).

Així doncs, la visió actual dels cossos d'inclusió és la d'unes partícules refràctils, sovint formades al citoplasma (Bowden et al., 1991; Carrió et al., 1998), però amb la possibilitat d'ésser formades al periplasma (Miot i Betton, 2004). És tracta d'una font de proteïna relativament pura que pot ésser fàcilment purificada (Ventura i Villaverde, 2006) i que posseeix un ampli ventall d'aplicacions biotecnològiques i nanotecnològiques.

Aquestes nanopartícules que posseeixen una mida de 50 a 500 nm de mitjana són molt interessants en aïllament i purificació, per la qual cosa podrien aportar molt a la indústria farmacèutica, cosmètica i química (García-Fruitòs, 2010; Peternel et al., 2009). Tot i que pocs enzims han estat expressats i usats com a cossos d'inclusió actius, cal destacar algunes contribucions significatives (Nahálka J et al., 2006, 2007 i 2008): galactosidases (Garcia-Fruitòs et al., 2007 i 2009), reductases (Garcia-Fruitòs et al., 2009), oxidases (Nahálka et al., 2007; Garcia-Fruitòs, 2007), cinases (Nahálka et al., 2006 i 2007), fosforilases (Nahálka et al., 2008) i aldolases (Nahálka et al., 2008), les quals han estat usades amb èxit en reaccions catalítiques específiques. Tanmateix, cal més informació sobre els cossos d'inclusió per tal que aquests siguin usats com a biocatalitzadors eficients.

Aquesta part de la tesi ha estat realitzada en col·laboració amb el grup del Dr. Villaverde de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona, de manera que algunes parts del procés es van realitzar als seus laboratoris.

La voluntat d'ambdós grups era l'obtenció de FucA mitjançant un sistema d'expressió conegut i compatible amb soques d'*E. coli* amb certa tendència a formar cossos d'inclusió.

Com a punt de partida, es va valorar una soca mutant en la xaperona Dna K (JGT20) que havia estat àmpliament estudiada pel grup del Dr. Villaverde (González-Montalbán et al., 2006). A la xaperona Dna K se li atribuïa el control del repartiment funcional de proteïnes entre les fraccions soluble i insoluble. Aquesta soca havia d'ésser combinada amb un plasmidi de promotor fort, un element clau (entre d'altres) per a l'agregació. L'únic plasmidi amb aquesta característica i amb antecedents coneguts en què s'havia observat certa expressió de FucA en forma de cossos d'inclusió (García-Junceda et al., 2000) era pTrcfucA, el qual tenia un promotor *trc* (derivat de *trp* i *lac*). No obstant, en

aquest treball i en altres (Durany et al., 2003) es van centrar tots els esforços en la producció de FucA de manera soluble tot obtenint valors de 276 UA/g de pes sec mitjançant cultius d'alta densitat cel·lular amb la soca XL1 Blue (Durany et al., 2003).

Per tant, XL1 Blue va ser la segona soca escollida i finalment, es va afegir una tercera soca: Origami, la qual havia estat estudiada recentment en la producció de proteïnes en forma de cossos d'inclusió (Di Lorenzo et al., 2005; Sorensen i Mortensen, 2005).

El primer objectiu d'aquest capítol consisteix en expressar la FucA en forma de cossos d'inclusió mitjançant aquestes tres soques inicials (JGT20, XL1 Blue i Origami) amb el mateix denominador comú: el sistema d'expressió pTrefucA. Posteriorment, es comproven els nivells d'activitat i puresa de la FucA expressada en els cossos d'inclusió obtinguts i es comparen amb la FucA expressada en fracció soluble.

Com a segon objectiu, es pretén demostrar, a nivell de prova de concepte, que els enzims com és el cas de les aldolases, expressats com a cossos d'inclusió actius, poden emprar-se eficientment com a biocatalitzadors. El fet de contenir alts nivells de proteïna que poden arribar fins al 95 % en alguns casos (Villaverde i Carrió, 2003), representa l'avantatge de poder-los usar de forma autoimmobilitzada. En aquest sentit, la Fuculosa-1-fosfat aldolasa catalitza la formació de diols R-R (compostos D-eritro) per mitjà d'una addició aldòlica de DHAP a una gran varietat d'aldehids (Espelt et al., 2003 i 2005). En aquest treball, els cossos d'inclusió de FucA s'empren com a biocatalitzadors per a la condensació aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal.

6.2. Materials i Mètodes.

6.2.1. Expressió de FucA en JGT20, XL1 Blue i Origami.

Els estudis preliminars es van desenvolupar en tres soques diferents: JGT20 (mutant *DnaK*), XL1 Blue i Origami (més informació a l'apartat 2.1.4), a les quals se'ls va introduir el plasmidi pTrcFucA (vegeu secció 2.1.9) per mitjà d'un procés de transformació (vegeu descripció general de la tècnica al punt 2.2.5).

Les característiques més importants d'aquests sistemes s'exposen a la taula 6.1.

Taula 6.1. Sistemes d'expressió per a la producció de cossos d'inclusió de FucA, on s'indica la soca hoste, el vector introduït, el promotor, l'origen de replicació i la procedència de la soca i el vector esmentats.

Soca	Vector	Promotor	Origen de replicació	Procedència (soca, vector)
JGT20	pTrcfucA	Trc/lac	pUC	Thomas and Baneyx, 1998 García-Junceda, 1995
XL 1-Blue	pTrcfucA	Trc/lac	pUC	Stratagene García-Junceda, 1995
Origami	pTrcfucA	Trc/lac	pUC	Novagen García-Junceda, 1995

6.2.2. Cultius en matrassos d'Erlenmeyer.

Els experiments en matrassos d'Erlenmeyer es realitzaren en medi ric (LB) mitjançant tres rèpliques per a cada soca a dues temperatures diferents: 37 i 42 °C. La inducció es va efectuar a les condicions descrites en el punt 2.3.2.2.

Es van recollir mostres del cultiu immediatament després de la inducció (0 h), a les 3 h i 5 h després de la inducció i, finalment, un mostra “overnight” (ON) corresponent a unes 18 h. Aquestes van ésser disruptades enzimàticament (vegeu punt 2.5.2) i a partir dels cossos d'inclusió purificats de la fracció insoluble, es van realitzar les anàlisis pertinents per a determinar l'activitat i la quantitat de FucA (procediment descrit a 2.5.3 i 2.5.4).

6.2.3. Desenvolupament dels primers assaigs de la reacció d'addició aldòlica.

El procediment general a seguir per dur a terme la reacció aldòlica es descriu detalladament a la secció 2.5.5, així com també les anàlisis que es requereixen per seguir-ne l'evolució (2.5.5.2 i 2.5.5.3).

Els primers assaigs d'addició aldòlica amb IBs, es van desenvolupar a unes condicions inicials de substrats de 27.8 mM i 42.9 mM respectivament en el cas de DHAP i (S)-Cbz-alaninal. Es tractava d'unes condicions d'excés d'alaninal ja aplicades en treballs anteriors (Suau et al, 2006), per tal que els resultats fossin directament comparables. El volum de reacció establert va ser de 1 mL en el cas dels cossos d'inclusió (0.5 mL de medi i 0.5 mL de suspensió de IBs). Els cossos d'inclusió provenien dels cultius de JGT20 esmentats anteriorment en quantitats que no arribaven a 1 mL, fet que explica el petit volum utilitzat.

6.3. Resultats i Discussió.

L'ús dels IBs com a sistema de producció alternatiu s'avalua en termes de quantitat de FucA obtinguda i activitat biològica d'aquesta (6.3.1). Addicionalment, l'aplicació dels IBs en una reacció de síntesi (condensació aldòlica) dóna informació de la seva eficiència com a biocatalitzadors (6.3.2).

6.3.1. Avaluació de l'activitat biològica i quantitat de FucA obtingudes en forma d'IBs mitjançant les soques utilitzades.

Les soques provades (XL1 Blue, JGT20 i Origami) amb el plasmidi pTrefucA es van fer créixer a 37 °C i 42 °C. Els resultats més rellevants pel que fa a la producció de cossos d'inclusió es donen a les 5 h després de la inducció i s'exposen tot seguit en termes de UA/g pes sec a la Taula 6.2.

Taula 6.2. Activitat dels cossos d'inclusió (UA/g pes sec) produïts, a 37 °C i 42 °C, per les soques XL1 Blue, JGT20 i Origami transformades amb el plasmidi pTrefucA. Valors a les 5 h d'inducció.

Temperatura (°C)	XL1 Blue (UA/ g pes sec)	JGT20 (UA/ g pes sec)	Origami (UA/ g pes sec)
37	15	77	3
42	19	48	3

En totes les soques i temperatures, els cossos d'inclusió mostraven activitat FucA, tot i que amb nivells mínims pel que fa a Origami, fet que contrastava amb estudis previs que la combinaven amb altres plasmidis (Sorensen i Mortensen, 2005) però possible,

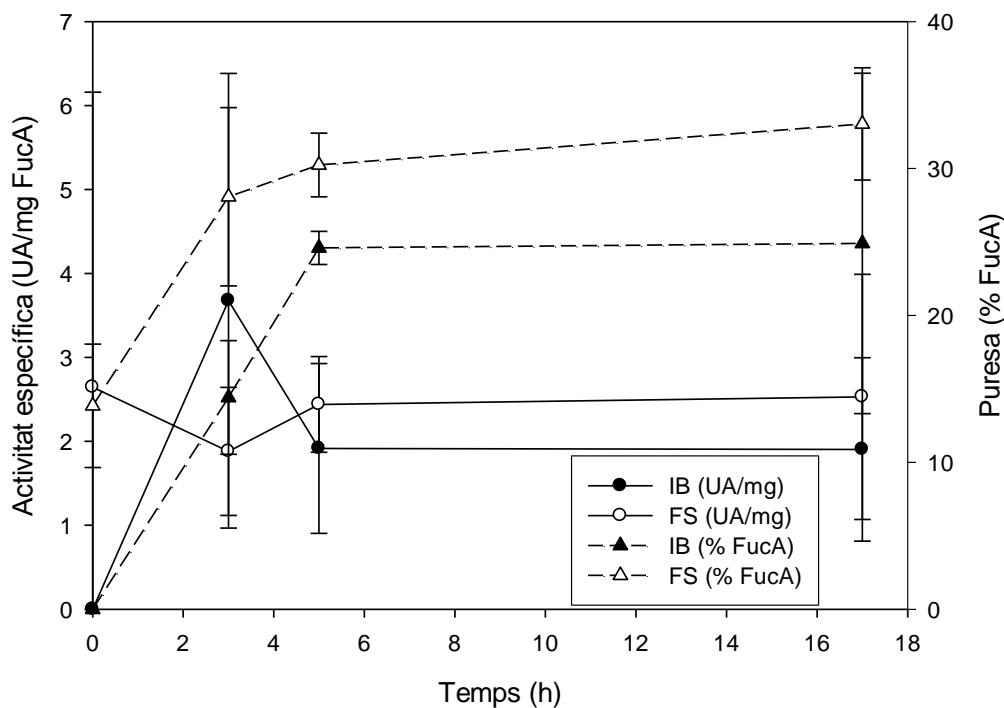
atès que aquesta construcció en concret en aquestes condicions no havia estat mai provada. Considerant la soca XL1 Blue, el nivell detectat ja permetia parlar de certa activitat biològica. Tanmateix, la quantitat d'enzim actiu expressat com a IB a la soca JGT20 era molt més elevada que la corresponent a XL1 Blue.

L'expressió de la FucA va ser quantificada tant a partir de la forma soluble com a partir de cossos d'inclusió en termes de quantitat de proteïna i activitat aldolàsica.

La qualitat dels cossos d'inclusió que expressaven FucA van ser verificats en termes d'activitat específica (UA/ mg proteïna) i % de puresa (mg de FucA continguda en 100 mg de proteïna total), tal com es presenta a les Fig.6.1 i 6.2, per a XL1 Blue i JGT20.

Per a la soca XL1 Blue, els nivells de la proteïna soluble eren, d'acord amb els treballs previs, d'unes 280 UA/g pes sec aproximadament (Durany et al., 2005) i tan sols una fracció reduïda de FucA (un 2 % aproximadament) va ser detectada en cossos d'inclusió a ambdues temperatures. En el cas de la soca JGT20, hi havia una producció enzimàtica més elevada en les formes solubles i insolubles. Els nivells solubles arribaven a més de 2000 UA/g pes sec i la fracció corresponent a IBs representava un 4 % de la proteïna recombinant total a 37 °C i tan sols un 2 % a 42 °C de l'activitat total.

a.



b.

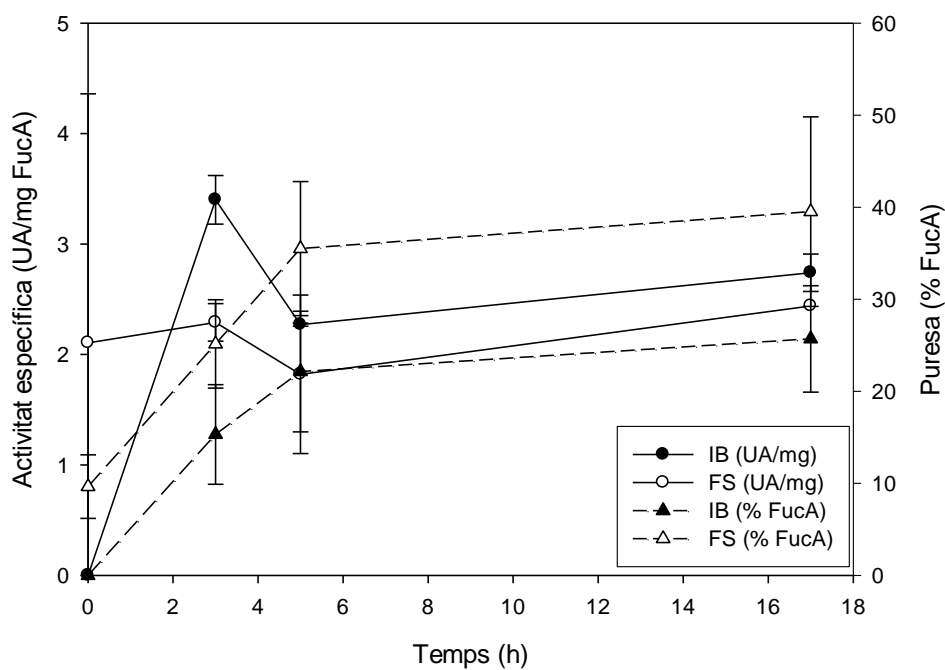
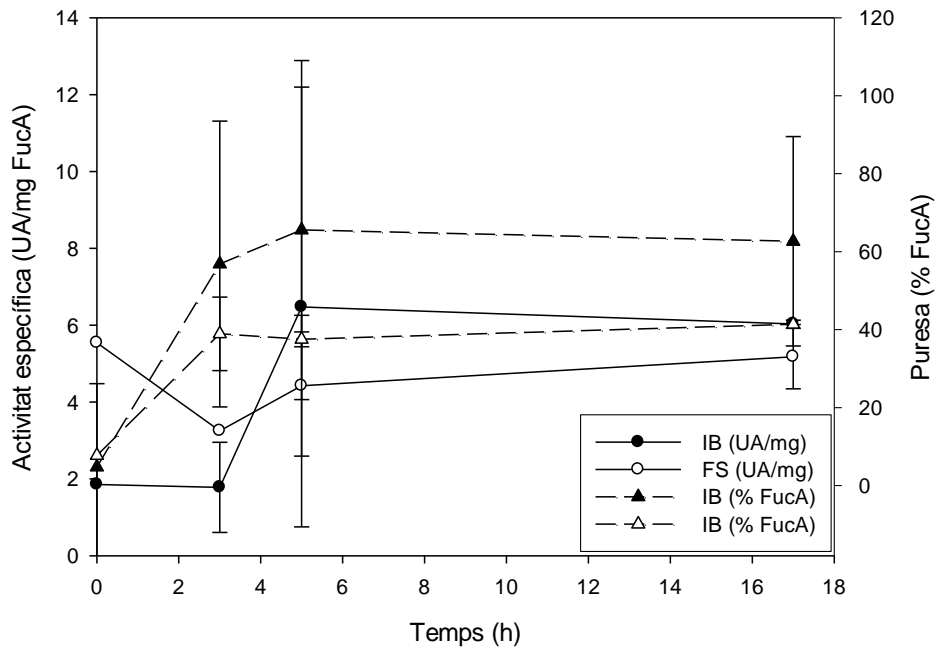


Fig. 6.1. Activitat específica (UA/mgFucA) i puresa (% FucA) en cossos d'inclusió (IB) i fracció soluble (FS) per a XL1 Blue a 37 °C (a) i 42 °C (b). Les barres que es mostren corresponen a l'error estàndard de les tres rèpliques.

Les Fig.6.1a i 6.1b per a la soca XL1 Blue mostren que l'activitat específica dels IB és més elevada a 42 °C que a 37 °C. A la temperatura major, els cossos d'inclusió presenten una activitat específica lleugerament més elevada que a la fracció soluble, amb un valor màxim de 3 UA/mg. Convé assenyalar que les dades d'activitat específica al temps d'inducció (t=0) corresponen a expressió basal. La puresa dels cossos d'inclusió era relativament baixa en ambdós casos (25-30 % de la proteïna total en IBs era FucA).

Considerant la soca JGT20, les dades es mostren a la Fig.6.2 (a i b).

a.



b.

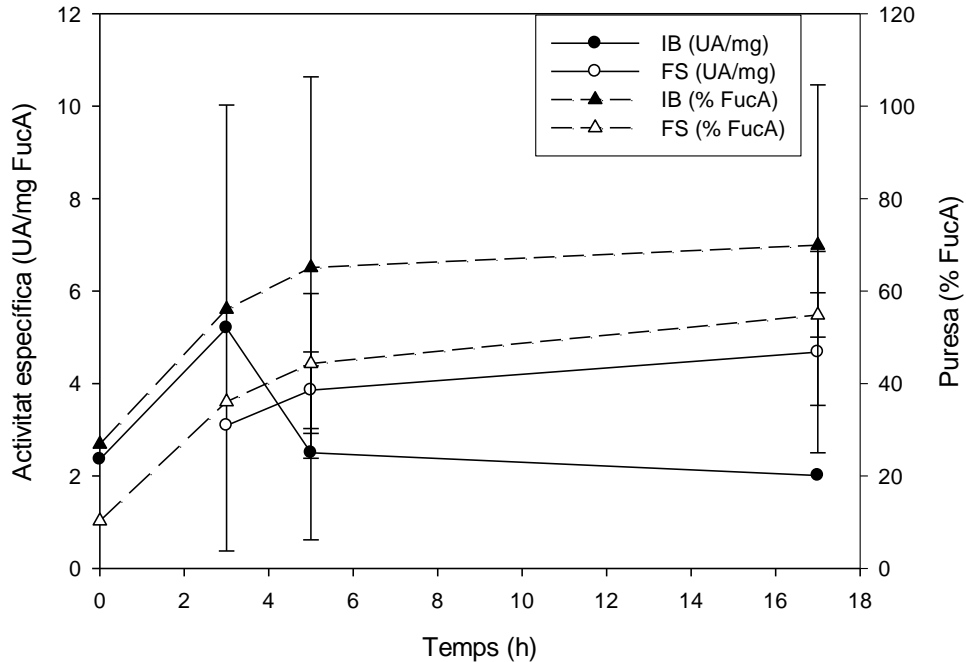


Fig. 6.2. Evolució de l'activitat específica (UA/mg FucA) i puresa (% FucA) al llarg del temps després de la inducció, com cossos d'inclusió (IB) i fracció soluble (FS) per la soca JGT20 a 37 °C (a) i 42 °C (b). Les barres que es mostren al gràfic representen l'error estàndard de les tres rèpliques.

Els gràfics mostren que la soca JGT20 a 37 °C presenta valors més elevats que la soca control XL1 Blue, atès que 6 UA/mg de la proteïna d'interès es troben en forma de IB. Aquests resultats tenen coherència amb la hipòtesi que els IB actius tenen una activitat específica igual o més elevada que la fracció soluble (Villaverde i Carrió, 2003). Aquí es fa palès que un increment en la temperatura a 42 °C té un efecte negatiu en l'expressió dels IB actius per la soca JGT20. De fet, ha estat publicat que a baixes temperatures, el metabolisme funciona més lentament, per la qual cosa els processos de traducció i replegament de proteïnes també es desenvolupen a menys velocitat. Una

agregació de proteïnes més lenta podria conduir a rendiments més elevats de proteïnes correctament plegades, ja que es disposa de més temps per permetre el plegament (Peternel et al., 2009) i les proteïnes correctament plegades es troben preferentment al nucli dels agregats (Garcia-Fruitòs, 2007).

Tal com s'esperava, els IBs de la soca JGT20 posseeixen una qualitat més elevada que els produïts per XL1 Blue, atès que contenen al voltant d'un 70 % d'aldolasa recombinant a ambdues temperatures (Fig.6.2 a i 6.2 b).

Per tots aquest motius, la soca JGT20 va semblar la més prometedora per produir cossos d'inclusió a la temperatura que es va decidir escollir: 37 °C. Doncs en termes generals, era la temperatura que mostrava uns millors resultats i d'altra banda, representava una temperatura de treball habitual en fermentació.

Finalment i partint de les dades existents, es van fer els càlculs pertinents (vegeu Annexes, A3) per tal d'esbrinar amb més detall la quantitat de FucA en mg present a cadascuna de les parts (soluble i insoluble), tal i com es presenta a la Taula 6.3. En aquesta taula es presenten els valors al llarg del temps per la soca i la temperatura seleccionades.

Taula 6.3. Distribució, a la fracció soluble i als IBs, de la FucA produïda a diferents temps, després de la inducció, per la soca JGT20 a 37 °C. Els resultats estan expressats mitjançant un valor promig amb l'error estàndard associat. No s'han inclòs les mostres a temps 0 h a causa de la dispersió de dades.

Temps de cultiu	FS (mg FucA/g pes sec)	IB (mg FucA/g pes sec)	IB/total (%)
Post-inducció (h)			
3h	310±79	9.3±2.1	2.9
5h	386±15	8.9±0.9	2.2
ON	299±30	9.4±0.5	3.1

Els estudis realitzats fins aquest punt havien permès determinar la millor temperatura i la millor soca per a la producció de cossos d'inclusió. Tanmateix, els valors de la Taula 6.3 indicaven que la FucA produïda en forma de cossos d'inclusió representa tan sols un 3 % de la quantitat de FucA total, en el millor dels casos.

6.3.2. Estudis dels IBs a com a biocatalitzadors en una reacció d'addició aldòlica.

Per tal de quantificar el comportament dels cossos d'inclusió com a catalitzadors de la reacció d'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal, es va dur a terme una reacció partint d'una concentració nominal inicial d'enzim de 1 UA/mL. Les condicions i concentracions són les indicades a Materials i Mètodes (6.2).

L'evolució amb el temps de la reacció catalitzada amb cossos d'inclusió es mostra a la Fig.6.3.

El seguiment de l'evolució del substrat només va ser possible pel que fa al (S)-Cbz-alaninal, ja que l'anàlisi de la DHAP requeria un volum de presa de mostra superior al recomanat per tal de no superar al 10 % del volum total del reactor.

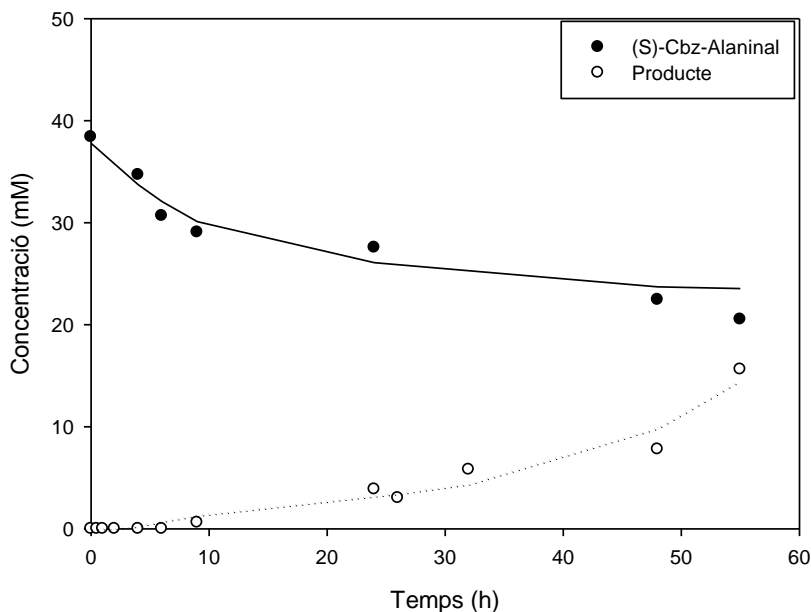


Fig. 6.3. Evolució de la reacció d'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal catalitzada pels cossos d'inclusió. El medi de reacció ($[Tris]=0.05$ mM i $[KCl]=0.15$ mM pH=7) contenia un 20 % (v/v) de DMF. La reacció es va realitzar a 4 °C i amb una concentració d'enzim de 1 UA/mL de reacció. Les concentracions inicials de DHAP i de (S)-Cbz-alaninal van ser 26 mM i 39 mM respectivament.

La Fig. 6.3 mostra que la reacció de d'addició aldòlica evoluciona cap a la formació del producte. Si es calcula la velocitat inicial de desaparició d'alaninal, el valor obtingut és de 2 mmols/L.h.

L'única informació que es podia extreure de la reacció de síntesi desenvolupada en aquest apartat, va ser que la FucA en forma de cossos d'inclusió estava catalitzant la

reacció cap a la formació de producte, cosa que verificava la seva activitat com a biocatalitzador. En aquesta direcció, es plantejava la hipòtesi que els cossos d'inclusió podien tenir més activitat de la que s'observava en el test d'activitat, en el cas que hi haguessin més limitacions difusionals amb el substrat natural que amb els de la reacció de síntesi, però calia avançar més en aquesta direcció per validar-ho.

6.4. Conclusions.

6.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.

La iniciació d'aquesta nova línia al grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada del Departament d'Enginyeria Química permet arribar a les següents afirmacions.

- Els estudis preliminars a partir de les soques iniciadores XL1 Blue, JGT20 i Origami han determinat que totes elles poden produir cossos d'inclusió actius en més o menys quantitat. Tanmateix, en el cas d' Origami, no es pot parlar d'un sistema d'expressió atractiu per a la producció de cossos d'inclusió, degut als baixos nivells d'activitats que mostra en forma de cossos d'inclusió.
- Els resultats obtinguts mitjançant les soques XL1 Blue i JGT20 indiquen que la producció de FucA en forma de cossos d'inclusió permet obtenir nivells d'activitat específica i puresa similars, o fins i tot més elevats que en fracció soluble.
- La soca JGT20 representa una soca prometedora en comparació amb les que s'han provat per la producció de cossos d'inclusió. No obstant, la soca XL1 Blue també és productora de cossos d'inclusió actius.
- Les condicions de treball a les quals es recullen els valors màxims d'activitat i puresa en cossos d'inclusió són a temperatura de 37 °C i entre les 5 h i les 12 h després de la inducció pel que fa a la soca JGT20.

- La utilització dels cossos d'inclusió com a catalitzadors d'una reacció d'addició aldòlica estereoselectiva ha permès verificar l'activitat del cossos d'inclusió, així com també la seva eficiència com a biocatalitzadors aplicats.

6.4.2. Motivacions.

Aquesta primera fase ha permès ésser conscients dels avantatges, però també de les limitacions que representa produir FucA en forma de cossos d'inclusió en els sistemes microbians estudiats. Aquestes últimes s'analitzen a continuació.

- L'obtenció de quantitats majors de cossos d'inclusió és necessària per al desenvolupament d'aquestes reaccions de síntesi amb volums més grans, la qual cosa permetria realitzar un nombre major d'assaigs a diferents condicions.
- Tot i que els IBs de FucA obtinguts han demostrat ser útils com a biocatalitzadors, són de difícil maneig com a catalitzadors sòlids degut a les seva poca consistència i resistència mecànica. Seria desitjable que poguessin utilitzar-se en una formulació més adequada (mitjançant autoimmobilització o inclusió en un suport).
- La purificació dels cossos d'inclusió realitzada a l'IBB a partir d'un mètode habitual mereixeria ésser estudiada. Es plantejava des del grup del Dr. Villaverde la possibilitat de provar altres mètodes més efectius, els quals podrien millorar els resultats obtinguts.
- La proteïna objectiu que es pot produir en forma de cossos d'inclusió a les condicions actuals és ínfima, en comparació amb la que es produïa en forma

soluble, per la qual cosa és necessari trobar la manera de redirigir la producció de FucA cap a cossos d'inclusió.

6.5. Referències.

Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Doglia SV. 2006. **Structural Analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy BBA-Proteins**. *Proteomics*. 1764 (4):739-799.

Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G. 1991. **Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli***. *Nat Biotechnol*.9: 725-730.

Büchner J, Rudolph R. 1991. **Renaturation, purification and characterization of recombinant F-ab-fragments produced in *Escherichia coli***. *Nat Biotechnol* 9: 157-162.

Carrio MM, Corchero JL, Villaverde A. 1998. **Dynamics of in vivo protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria**. *Fems Microbiol Lett*. 169:9-15.

Corchero JL, Viaplana E, Benito A, Villaverde A. 1996. **The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *Escherichia coli***. *J Biotechnol*. 48 (3):191-200.

De Groot NS, Ventura SJ. 2006. **Protein activity in bacterial inclusion bodies correlates with predicted aggregation rates**. *J Biotechnol*. 125:110-113.

Di Lorenzo M, Hidalgo A, Haas M, Bornscheuer UT. 2005. **Heterologous Production oryzae Lipase in *Escherichia coli***. *Appl Environ Microbiol*. 71 (12):8974-8977.

Durany O. 2003. **Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli***. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona

Durany O, de Mas C, López-Santín. 2005. **Fed-batch production of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E. coli***. *Process Biochem*. 40 (2): 707-716.

Espelt L, Parella T, Bujons J, Solans C, Joglar J, Delgado A, Clapes P. 2003a. **Stereoselective aldol additions catalyzed by dihidroxyacetona phosphate dependent aldolases in emulsion systems: Preparation and structural characterization of linear and cyclic aminopolyols from aminoaldehydes.** Chem-Eur J. 9:4887-4899.

Espelt L, Bujons J, Parella T, Calveras J, Joglar J, Delgado A, Clapes P. 2005. **Aldol additions of dihidroxyacetone phosphate to N-Cbz-amino aldehydes catalyzed by L-Fucose-1-Phosphate aldolase in emulsion systems: Inversion of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde.** Chem-Eur J. 11:1392-1401.

García-Fruitòs E, González-Montalban, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Arís A. 2005. **Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins.** Microb Cell Fact.4:27.

García-Fruitòs E, Aris A, Villaverde A. 2007. **Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies.** Appl Environ Microb.73:289-294

García-Fruitòs E, Martínez-Alonso M, González-Montalbán N, Valli M, Mattanovich A. 2007. **Divergent genetic control of protein solubility and conformational quality in *Escherichia coli*.** J Mol Biol.374:195-205.

García-Fruitòs E, Rodriguez-Carmona E, Díez-Gil C, Ferraz RM, Vazquez E, Corchero JL, I. 2009. **Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial.** Adv Mater. 21:42-49.

García-Fruitòs E. 2010. **Inclusion Bodies: a new concept.** Microb Cell Fact 9:80.

García-Junceda E, Shen G, Sugai T, Wong CH. 1995. **A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: Rhamnose-1-phosphate aldolase, fucose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase.** Bioorgan Med Chem. 3 (7) :945-953.

Gonzalez-Montalban N, Natalello A, García-Fruitòs E, Villaverde A, Doglia SM. 2008. **In situ protein folding and activation in bacterial inclusion bodies.** *Biotechnol Bioeng.*100. 4: 797-802.

Jevsevar S, Gaberc-Porekar V, Fonda I, Podobnik D, Grdadolnik F, Menara V. 2005. **Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted.** *Biotechnol Progr.* 21: 632-639.

King J, Haase-Pettingell C, Robinson AS, Speed M, Mitraki A. 1996. **Thermolabile folding intermediates: inclusion bodies precursors and chaperonin substrates.** *FASEB J.* 10:57-66.

Lorimer GH. 1996. **A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo.** *FASEB J.* 10: 5-9.

Marston FA. 1986. **The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli.** *Biochem J.* 240: 1-12.

Miot M, Betton JM. 2004. **Protein quality control in the bacterial periplasm.** *Microb Cell Fact.*3:4.

Nahálka J, Gemeiner P, Buclo M, Chang PG. 2006. **Bioenergy beads: a tool for regeneration of ATP/NTP in biocatalytic synthesis.** *Artif Cell Blood Sub.* 34: 515-521.

Nahálka J, Nidetzky B. 2007. **Fusion to a pull-down domain: a novel approach of producing *Trigonopsis variabilis* D-aminoacid oxidase as insoluble enzyme aggregates.** *Biotechnol Bioeng.* 97:454-461.

Nahálka J, Patoprstky V. 2007. **Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3).** *Org Biomol Chem.*7:1778-1780.

Nahálka J, Vikartovska A, Hrabanova E. 2008. **A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis.** J Biotechnol. 134:146-153.

Nahálka J. 2008. **Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from Pyrococcus furiosus and its application in a process of batch starch degradation to alpha-D-glucose-1-phosphate.** J Microbiol Biotech. 35: 219-223.

Nahálka J, Dib I, Nidetzky B. 2008. **Encapsulation of Trigonopsis varaibilis D-amino acid oxidase and test comparison of the operational stability of free and immobilized preparations of the enzyme.** Biotechnol Bioeng. 99:251-260.

Nahálka J, Mislovicova D, Kavsova H. 2009. **Targeting lectin activity into inclusion bodies for the characterization of a glycoprotein.** Mol Biosyst. 5:819-821.

Oberg K, Chrnyk BA, Wetzel R, Fink AL. 1994. **Native-Like Secondary Structure in Interleukin-1-beta-Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance FTIR.** Biochem. 33 (9):2628-2634.

Peternel S, Grdadolnik J, Gaberc-Porekar V, Komel R. 2008. **Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction functional protein.** Microb Cell Fact 7:34.

Peternel S, Gaberc-Porekar V, Komel R. 2009. **Bacterial Growth Conditions Affect Quality of GFP Expressed Inside Inclusion Bodies.** Acta Chim Slov. 56: 860-867.

Prouty WF, Karnovsky MJ, Goldberg AL. 1975. **Degradation of abnormal proteins in Escherichia coli. Formation of protein inclusion bodies in cells exposed to amino acid analogs.** J Biol Chem. 250:1112-1122.

Rinas U, Bailey JE. 1993. **Overexpression of bacterial hemoglobin causes incorporation of pre-beta-lactamase into cytoplasmatic inclusion bodies.** Appl Environ Microbiol. 59. 2: (561-566).

Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. **Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli***. *Microb Cell Fact.* 4:1.

Thomas JG, Baneyx F. 1996. **Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-Shock Proteins**. *J Biol Chem.* 271. 19: 11141-11147.

Thomas JG, Baneyx F. 1998. **Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB and HtpG *in vivo***. *J Bacteriol.* 180: 5165-5172.

Tokatlidis K, Dhurjati P, Millet J, Béguin P, Aubert JP. 1991. **High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D**. *FEBS Lett.* 282: 205-208.

Ventura S, Villaverde A. 2006. **Protein quality in bacterial inclusion bodies**. *Trends Biotechnol.* 24: 179-185.

Worrall DM, Gross NH. 1989. **The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli***. *Aust J Biol Sci.* 3: 28-32.

Villaverde A, Carrió MM. 2003. **Protein aggregation in recombinant bacteria**. *Biotechnol Lett.* 25 (17): 1385-1395.

CAPÍTOL 7. OBTENCIÓ DE COSSOS D'INCLUSIÓ EN FERMENTADOR I PURIFICACIÓ MITJANÇANT MÈTODES ALTERNATIUS.

7.1. Introducció.

En el capítol anterior, s'ha verificat que els cossos d'inclusió son actius, tant amb el substrat natural (Fuculosa-1-fosfat) com amb la reacció d'addició aldòlica entre DHAP i (S)-Cbz-alaninal, la qual cosa els fa especialment interessants en bioprocessos. En aquest sentit nombroses publicacions afirmen que l'avantatge de produir la proteïna d'interès en forma de cossos d'inclusió és la obtenció d'altres quantitats de producte (proteïna) i que els agregats són fàcilment separats i purificats (Fahnert et al., 2004).

El grup de recerca de Fahnert recomanava la producció de cossos d'inclusió mitjançant un medi mineral amb glucosa o glicerol, com a única font de carboni. Relacionat amb el medi de cultiu, nombroses articles incidien especialment en l'ús d'additius complexos, com ara l'extracte de llevat, el qual podia reduir la proteòlisi (Swartz, 1996) i incrementar els nivells de producte (Tsai et al., 1987). No obstant, també podia causar problemes per la producció d'elevats nivells d'àcid acètic i variabilitat del substrat, si el procés es portava a escala (Swartz, 1996). Per tant, no es recomenava l'ús d'extracte de llevat en cultius discontinus alimentats (Fahnert et al., 2004).

Com a norma general, per a sistemes d'expressió forta destinats a la producció d'IBs, es deia que la fermentació hauria d'ésser aturada entre 3 i 5 hores després de la inducció, però aquesta premissa variava en funció del sistema d'expressió en concret, de la proteïna d'interès i de l'estabilitat del producte (Fahnert et al., 2004).

L'estratègia de purificació dels cossos d'inclusió, una vegada produïts, és un tema d'interès creixent arreu des que s'ha vist la possibilitat que poden ésser usats com a biocatalitzadors en biomedicina, concretament en el camp de l'enginyeria de teixits (Segupta i Heilshorn, 2010; Tran i Webster, 2009; Villaverde, 2010). En aquest tipus d'aplicacions, el procediment de purificació haurà de ser extremadament acurat.

Diverses publicacions mostren que mètodes de lisi mecànics i no mecànics s'usen de manera igualitària per trencar les cèl·lules i obtenir les proteïnes recombinants solubles (Arii et al., 2004; Huang et al., 2006; Wanarska et al., 2007). Els mètodes no mecànics emprats per a la obtenció de cossos d'inclusió consisteixen en una sèrie de rentats després de la centrifugació mitjançant detergents i/ o tractaments amb DNasa I, essent el producte obtingut preparat per ser usat en propostes de plegament proteic (Rodríguez-Carmona et al., 2010). No obstant, cal destacar la gran quantitat d'impureses, com ara membranes, proteïnes unides a membrana, fragments de paret cel·lular, DNA, RNA i fins i tot cèl·lules viables a la mescla d'IBs, que fan que aquestes nanopartícules no siguin adequades per algunes aplicacions biotecnològiques (García-Fruitòs, 2010). Per aquesta raó, han sorgit dues publicacions (Peternel, 2010; Rodríguez-Carmona, 2010) que assenyalen la importància de redefinir un mètode apropiat per aïllar IBs i eliminar completament la presència de bacteris viables a la mostra final, sense malmetre l'estructura dels IBs i la qualitat de les proteïnes dins els agregats proteics.

El grup de Villaverde (García-Fruitòs, 2010) i Komel (Peternel et al., 2010) han explorat de manera exhaustiva l'eficàcia dels mètodes de lisi com ara la lisi enzimàtica, la sonicació, els cicles de congelació/descongelació i la homogenització a alta pressió, entre d'altres. Els resultats mostren que la lisi no mecànica respecta la integritat dels IBs, però no és prou efectiva en termes de disrupció cel·lular (Rodríguez-Carmona, 2010). Per altra banda, mentre la lisi cel·lular millora quan s'apliquen mètodes

mecànics, (Rodríguez-Carmona et al., 2010; Peternel et al., 2010), la qualitat de la proteïna atrapada en IBs és sovint compromesa (Peternel et al., 2010). Per aquest motiu, ambdós assenyalen que calen més estudis per aproximar una alternativa universal per obtenir IBs purs que preservin la seva morfologia tot contemplant la qualitat de la proteïna recombinant.

La citometria de flux s'ha emprat en molts treballs per a controlar l'acumulació de producte durant les fermentacions, però tan sols uns quants mètodes són capaços de mesurar la disrupció de les cèl·lules i la conseqüent recuperació dels IBs (Walberg et al., 2005). No obstant, es tracta d'un mètode tediós que requereix molt temps, així com també la generació d'anticossos altament específics per a les proteïnes expressades. Medwid et al han desenvolupat un mètode ràpid i sensible de citometria de fluxe basat en fluorocroms que s'uneixen a àcids nucleics amb la capacitat de discriminar cèl·lules intactes de cossos d'inclusió en una preparació homogeneïtzada (Medwid et al., 2007).

L'objectiu principal d'aquest capítol consisteix en la obtenció de cossos d'inclusió en quantitats majors, per tal de continuar amb les reaccions de síntesi iniciades en el capítol VI. En aquest capítol, es va concloure que la soca més prometedora per a la producció de FucA en forma de cossos era la soca JGT20 (mutant *DnaK*). Aquesta, en ser defectiva en una xaperona podia precisar, segons estudis previs amb altres soques similars, una font d'extracte de llevat (Swartz, 1996; Tsai et al., 1987).

Per aquesta raó, combinada amb la manca d'experiència amb una soca d'aquest tipus, es realitzen uns assaigs en matrassos d'Erlenmeyer per determinar quin és el medi òptim i tot seguit, una fermentació en batch en fermentador airejat amb l'únic objectiu de produir cossos d'inclusió actius.

Finalment i com a tema centrat d'aquest capítol, s'analitzen diversos mètodes de disrupció des de punts de vista diferents. Tot i que l'aplicació dels IBs obtinguts en teràpia no és la prioritat d'aquest treball, es proposa des del grup del Dr. Villaverde, l'assaig de procediments de purificació alternatius al mètode emprat en el capítol VI, és a dir, a la disrupció no mecànica per tractament amb lisozim. Els antecedents del grup de l'IBB confirmen que es tracta d'un mètode eficient ja que no compromet l'activitat biològica de la proteïna d'interès, però que dona com a resultat un gran nombre d'impureses (especialment cèl·lules senceres) que formen part del conjunt de cossos d'inclusió.

De manera addicional, durant l'estada a l'Institut für Technische Chemie (TCI) del Leibniz Universität de Hannover (Alemanya), s'intentà posar a punt un mètode el més simplificat possible, basat en el treball de Medwid, per tal de quantificar quina proporció existia entre cèl·lules senceres i cossos d'inclusió en mostres d'IBs purificats mitjançant mètodes de disrupció diversos.

7.2. Materials i Mètodes.

Abans de la realització de la fermentació amb la soca JGT20, es van realitzar uns estudis amb matrassos d'Erlenmeyer. Els medis provats van ser en primer lloc, el medi MD (2.3.1.1) amb treonina i arginina (les dues auxotrofies de la soca) a les concentracions de 25 µg/L i 5 µg/L respectivament, medi MD enriquit amb extracte de llevat a raó de 2 g/L i 4 g/L, i medi MD amb un 0.05 % de casaminoàcids. Es van realitzar els inòculs en LB i Ampicil·lina, atès que el plasmidi pTrcfucA tenia una única resistència a antibiòtic.

La producció de cossos d'inclusió mitjançant un cultiu discontinu en fermentador es realitzà amb el medi més eficient dels provats tot escalant les proporcions d'acord amb el rendiment biomassa-substrat. Per tant, el medi semidefinit, el qual es basava en el medi definit descrit a l'apartat 2.3.1.1, consistia en glucosa (12 g/L), MgSO₂·7H₂O (0.45 g/L), FeCl₃ (0.02 g/L), tiamina (0.1 g/L), macroelements (0.72 mL/L), elements traça o microelements (2.29 mL/L), extracte de llevat (12 g/L), inòcul (80 mL/L) i aigua destil·lada (fins a 800 mL).

L'inòcul contenia un medi MD estàndard sense extracte de llevat (vegeu apartat 2.3.1.1) i el preinòcul consistia únicament en LB i Ampicil·lina.

El reactor usat tenia un volum de 2 L (descriu la secció 2.3.3), però en aquest cas es va decidir emprar un volum de treball de 1.5 L.

Els mètodes de disrupció que s'estudien al llarg del capítol són un tractament amb lisozim (apartat 2.5.2) i una sèrie de disrupcions mecàniques (2.5.2) a 21 kPsi en dos i

tres cicles, i a 42 kPsi en un sol cicle. Finalment, es combinen mètodes: tractament amb disruptor i sonicació, així com també tractament amb disruptor i tractament amb lisozim. L'etapa de sonicació fou realitzada a l'IBB mitjançant un sonicador Braun (Labsonic U).

El recompte cel·lular en placa es va realitzar comptant el nombre de colònies d'aquelles plaques que en tenen entre 30 i 300, es calcula el promig i divideix pel producte del factor de dilució i el volum de cultiu sembrat. Els resultats s'expressen en colònies/mL.

Per a l'anàlisi de citòmetre de fluxe, les mostres van ser prèviament diluïdes amb una solució salina stock 0.75 M de tampó fosfat 1X (PBS) i la tinció es realitzà amb iodur de propidi (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). D'aquest stock es van emprar 20 µL/mL per mostra, els quals s'afegiren directament a la mostra diluïda.

Les dades de fluorescència es recolliren en FL3 (senyal de fluorescència de 620 nm, en unitats relatives), emissió corresponent a 620 nm i analitzades a l'aparell Beckman Coulter Epics XL-MCL per detectar la llum de dispersió (*forward scattering light*) i les emissions de fluorescència.

A la fi de l'experiment, les dades eren tractades mitjançant el software SYSTEM2. Es van fixar uns llindars apropiats per reduir l'excés de soroll de fons. Les dades obtingudes es presentaven en un diagrama de dispersió en dos eixos (FSC o dispersió *forward*) que s'empra per detectar la mida de les partícules, en unitats relatives i FL3.

7.3. Resultats i Discussió.

7.3.1. Estudis previs en Erlenmeyer.

Els medis proposats van ser utilitzats en creixements en matrassos d'Erlenmeyer de *E. coli* JGT20 per tal d'esbrinar quin era l'òptim per passar-lo a fermentador. En un primer lloc, es creia que el medi definit amb suplementes de treonina i arginina era suficient perquè responia a les necessitats de la soca, però en no resultar eficient ni tan sols a concentracions més elevades de les recomanades (dades no presentades), es va decidir estudiar les altres opcions, detallades a l'apartat 7.2. (Fig.7.1).

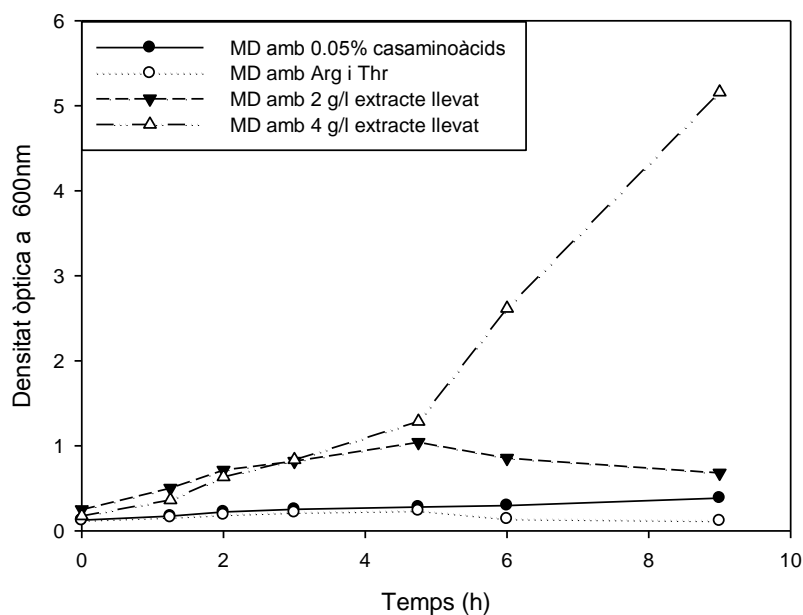


Fig. 7.1. Evolució de la densitat òptica a 600 nm per a cadascun dels creixements d' *E. coli* JGT20 en medis diferents: medi definit (MD) amb 0.05% de casaminoàcids, MD amb arginina i treonina, i MD amb extracte de llevat a 2 g/L i 4 g/L respectivament.

Contràriament al que moltes publicacions afirmaven sobre l'ús generalitzat de casaminoàcids (Lee Y i Chang HN, 1994) en soques que requerien medis semi-complexes, aquesta addició no va resultar efectiva. Pel que fa a la iniciativa de suplementar el medi definit amb els aminoàcids corresponents a les auxotrofies, tampoc va donar un creixement viable.

El medi MD amb 4 g/L d'extracte de llevat va ser l'únic que va donar un perfil de creixement prometedor, el qual sobrepassava les 5 unitats de densitat òptica a 600 nm. A partir de la part exponencial de la gràfica i mesures de concentració de glucosa realitzades per aquest medi, es calcula un rendiment biomassa-substrat de 0.3 (Y_{x/s}) que coincideix amb els estudis realitzats amb XL1 Blue afegint extracte de llevat al MD (Durany, 2003).

7.3.2. Fermentació en discontinu per a l'obtenció de cossos d'inclusió.

El cultiu en discontinu en fermentador airejat va arribar a una DO de 19, tot induint amb IPTG 1 mM quan s'havien assolit 13 unitats de densitat òptica. Es va seguir el cultiu durant 25 hores a fi de poder conèixer el perfil de creixement (Fig.7.2).

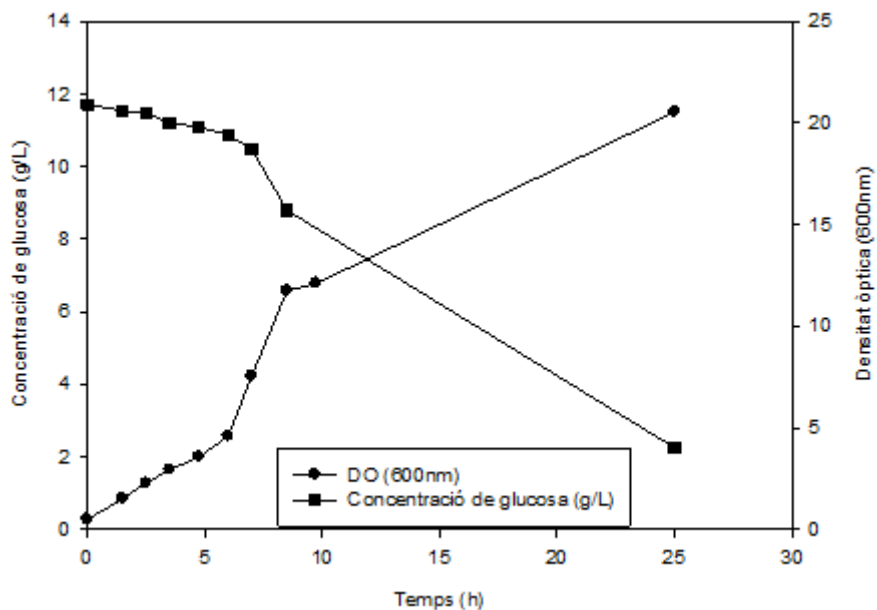


Fig. 7.2. Evolució de la densitat òptica a 600nm i de la concentració de glucosa (g/L) en un cultiu discontinu en fermentador aerat per a l'obtenció de cossos d'inclusió, tot induint amb IPTG 1 mM.

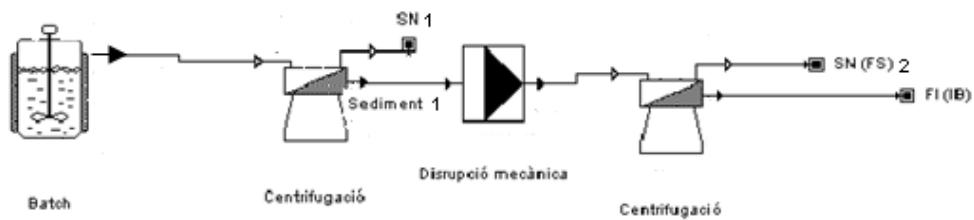
Atès que no es tenia experiència prèvia amb aquesta soca i la intenció d'aquest cultiu no era modelitzar el creixement, sinó únicament obtenir IBs en gran quantitat, es va induir en el moment en què la meitat de la glucosa inicial s'havia consumit.

El cultiu es va aturar quan s'havia esgotat la major part de la glucosa i el brou de cultiu es va dividir en parts iguals per tal d'assajar els diferents mètodes de purificació de cossos d'inclusió tot assumint que tots ells parteixen d'un sediment igual.

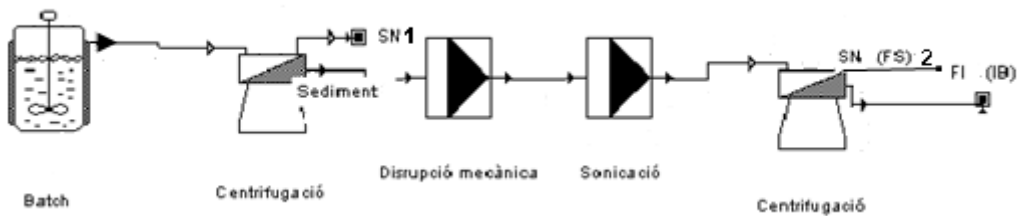
7.3.3. Purificació dels cossos d'inclusió mitjançant diversos mètodes de disrupció.

Els mètodes de disrupció a avaluar han estat una disrupció mecànica (a dues condicions diferents: 1 cicle a 40 kPsi i 3 cicles a 21 kPsi), un tractament amb lisozim, una disrupció seguida d'una sonicació i una disrupció seguida d'una tractament en lisozim. Tot seguit, es mostra a la Fig.7.3 un esquema realitzat amb el programa SuperPro Designer® que compara tots aquests mètodes esmentats.

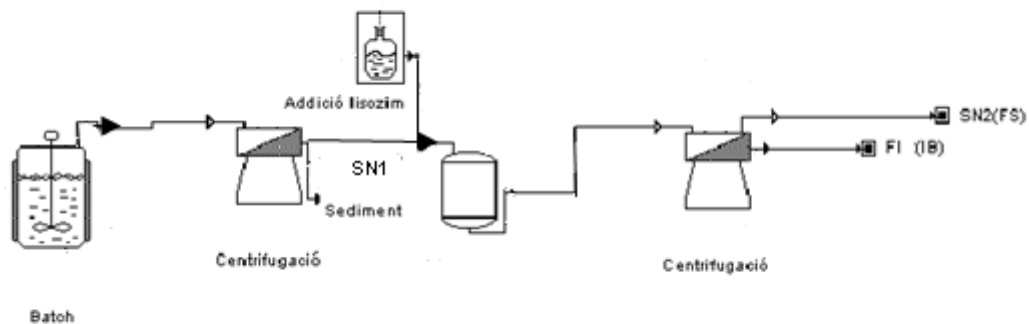
a.



b.



c.



d.

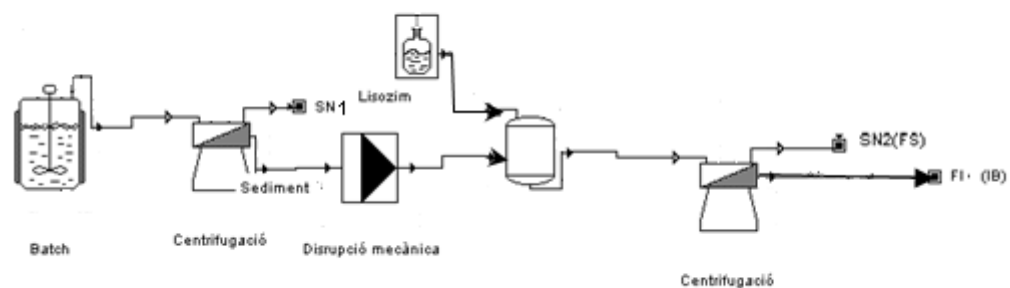


Fig. 7.3. Diagrames del procés de purificació que permeten observar les etapes de cada estratègia (a. Disrupció mecànica, b. Disrupció i sonicació, c. Tractament amb liozím, d. Disrupció i tractament amb liozím) partir d'una fermentació en discontinu, comuna per a totes elles. Les sigles SN signifiquen sobrenedant i FI, fracció insoluble.

Els resultats de la fermentació en discontinu van ser de l'ordre dels que s'havien obtingut a partir dels matrassos d'Erlenmeyer. No obstant això, per a una comparació el màxim de visual possible, els resultats dels assaigs d'activitat i quantificació de FucA s'expressen en valors relatius obtinguts a partir de les dades de UA/ g pes sec, UA/mg FucA i % FucA obtingut a partir de les dades de densitometria dels gels d'electroforesi. Les dades s'exposen a al Taula 7.1. El mètode de referència que equival a un 100 % és el tractament amb lisozim.

Taula 7.1. Recuperació de FucA com a cossos d'inclusió pels diferents mètodes de disrupció en UA/g pes sec, UA/mg FucA i % FucA respecte les proteïnes totals. Valors relatius en referència al mètode de tractament amb lisozim.

Mètode	% UA/ g pes sec	% UA/mg FucA	% FucA
Disrupció mecànica (1 cicle a 40 kPsi)	50	100	86
Disrupció mecànica (3 cicles a 21 kPsi)	3.1	9.9	26
Tractament amb lisozim	100	100	100
Disrupció mecànica i sonicació	87	3.5	66
Disrupció mecànica i lisozim	34	1.4	100

D'entrada, el mètode no mecànic que consisteix en un tractament amb lisozim és el que s'ha emprat com a referència, ja que es tracta d'un mètode eficient que no compromet l'activitat biològica, tal com s'ha vist en el capítol VI.

Els mètodes mecànics mostren uns valors molt inferiors, tot i que el mètode que combina disrupció amb sonicació és el que mostra un valor major d'activitat total de tots els mecànics. Davant el dilema de disrupció mecànica a més o menys potència, sembla ser que preval la opció d'un sol cicle a més potència. Aquest fet podria ésser

explicat per la formació d'escumes durant el procés que s'acumularien al llarg dels cicles i no podrien ser totalment recuperades (Wilde, 2001).

El fet de combinar mètodes mecànics i no mecànics (disrupció i lisozim) no sembla una opció gaire eficient, ja que malgrat obtenir molta proteïna d'interès, aquesta és molt poc activa. Aquest fet verifica el que certes publicacions suggereixen respecte la idea de combinar mètodes (García-Fruitòs, 2010).

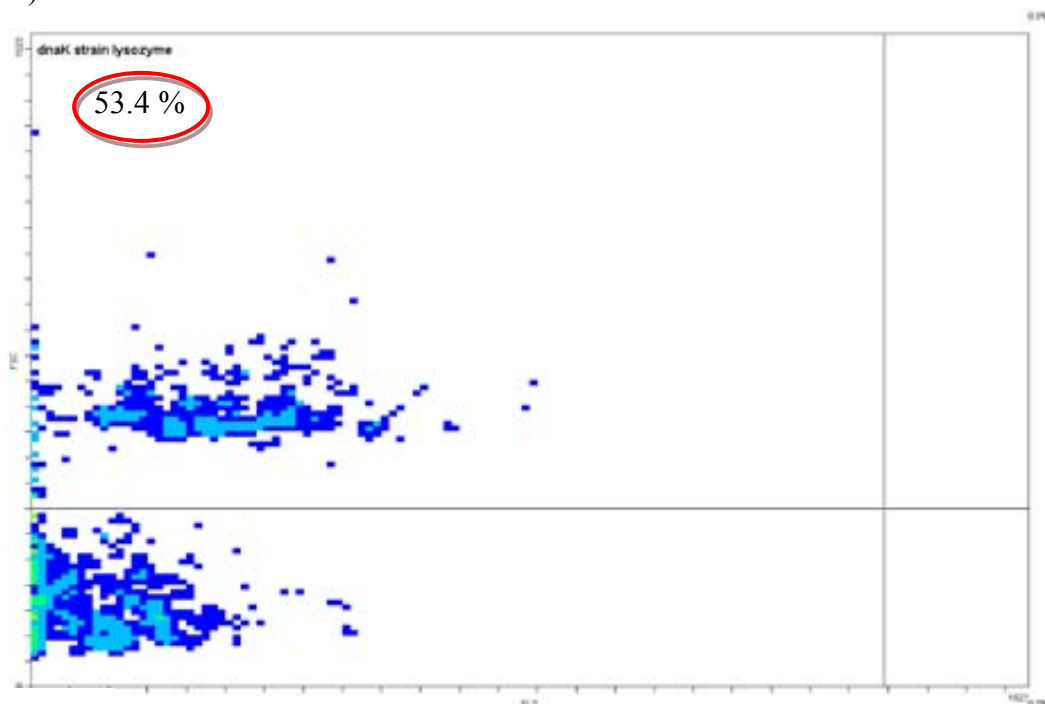
Sintetitzant aquestes informacions, es podria dir que cap dels mètodes estudiats es pot equiparar al tractament amb lisozim. No obstant, es tracta d'un mètode de diverses etapes en les quals resten cèl·lules senceres que poden anar dipositant-se en la fracció insoluble (García-Fruitòs, 2010). Addicionalment, el fet que aquestes cèl·lules es puguin anar trencant de manera gradual i alliberar enzim soluble durant el procés és un tema que preocupa a nivell d'aplicacions biomèdiques.

Tot i que els nivells d'activitat específica obtinguts en la disrupció mecànica a major pressió són equivalents als del tractament amb lisozim, s'obté menys FucA activa. Per tant, considerant els valors del capítol VI que mostren que tan sols un 3 % de la quantitat de proteïna total s'expressa en forma de cossos d'inclusió mitjançant el tractament amb lisozim, no es pot plantejar un mètode alternatiu que millori aquests valors.

Per tal de determinar la quantitat de cèl·lules senceres que pogués acompanyar als cossos, es van realitzar nombrosos recomptes cel·lulars en placa (vegeu mètode descrit al punt 7.2) a partir de mostres d'IBs purificats, els quals donaren un resultat promig de $1.7 \cdot 10^8$ cèl·lules/mL. Si es considera un cultiu que arriba a una $DO=20$, la qual equival a unes $2 \cdot 10^{10}$ cèl·lules, les cèl·lules senceres que es troben entre els cossos d'inclusió no arriben al 1 %.

Com que aquest valor representava tan sols una estimació, es van comparar per citometria de flux tres mostres de cossos obtinguts procedents d'un mateix cultiu, els quals havien estat purificats per tres mètodes de disrupció diferents: sonicació, lisi enzimàtica (tractament amb lisozim) i disrupció amb el kit descrit a la secció 2.5.2 (BugBuster Kit de Novagen®). A les Fig.7.4a, 7.4b, 7.5a i 7.5b s'especifiquen els diagrames de dispersió dels tres mètodes i el control: un mostra de cultiu de cèl·lules sense disruptar. En el mateix diagrama s'especifiquen els eixos FSC i FL3 (definites al punt 7.2), així com també la proporció (en %) de cada diagrama de dispersió corresponent als cossos d'inclusió (paràmetre a avaluar).

a)



b)

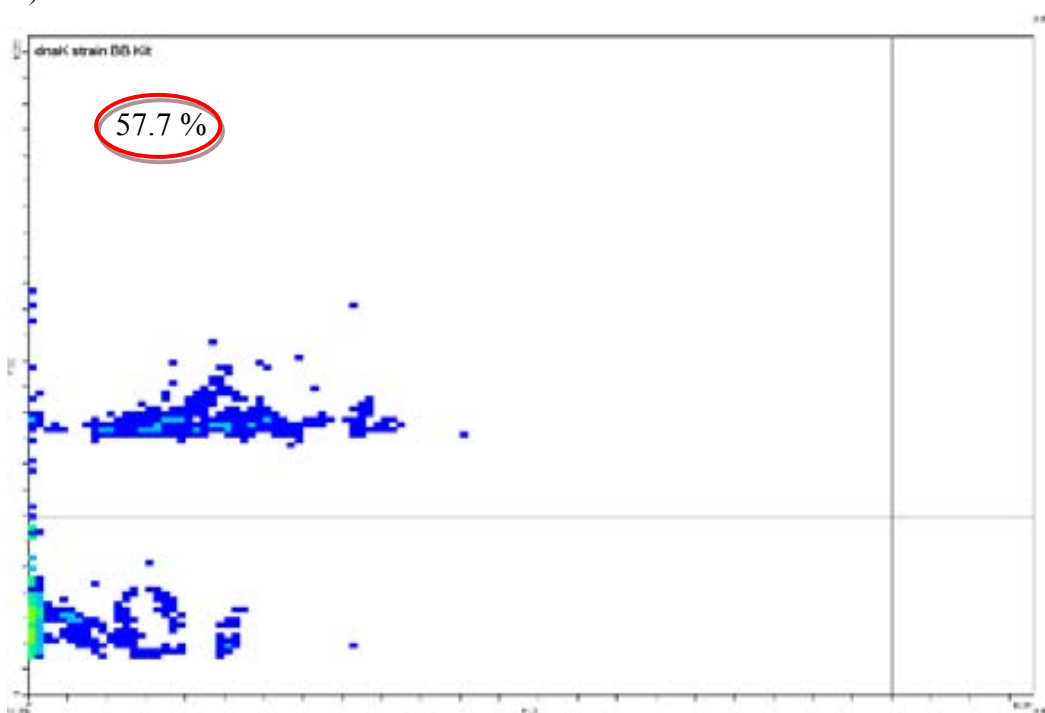
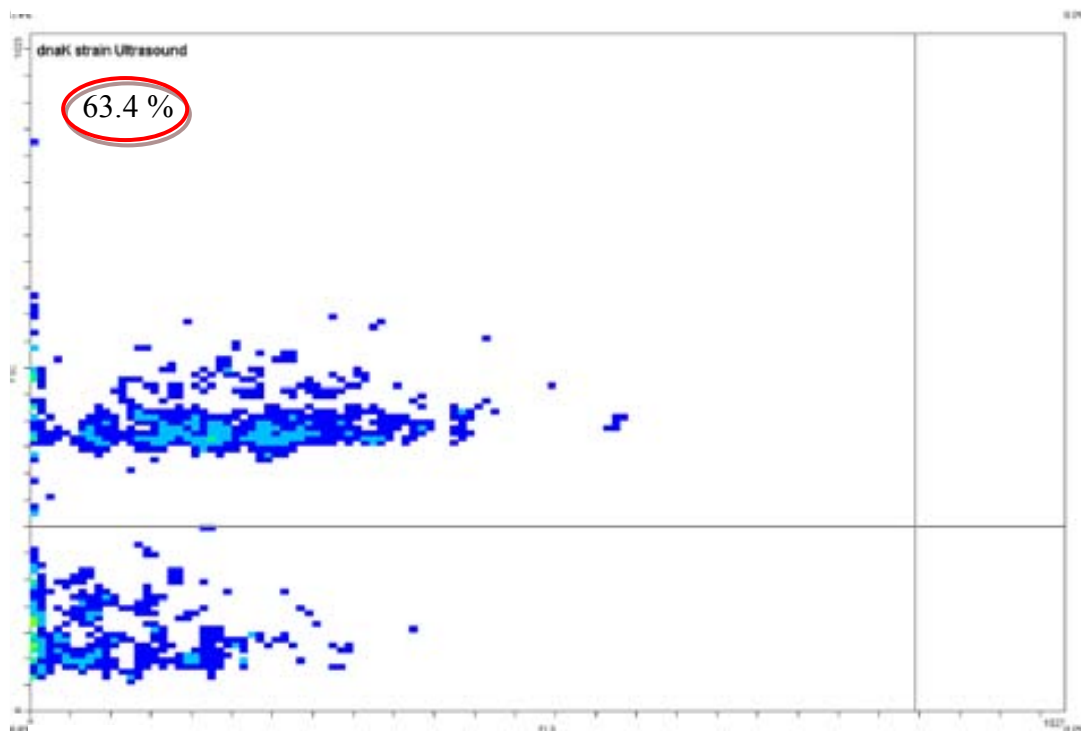


Fig. 7.4. Citometria de flux dels IB purificats a partir de dos mètodes: tractament amb lisozim (a) i purificació a partir d'un kit BugBuster de Novagen® (b). Destaquen dos diagrames diferents separats per 2 eixos (FSC i FL3): el superior correspon a partícules grans (cèl·lules senceres) i l'inferior a partícules petites (IB). El valor encerclat en vermell indica la proporció de cèl·lules senceres entre els cossos d'inclusió.

c)



d)

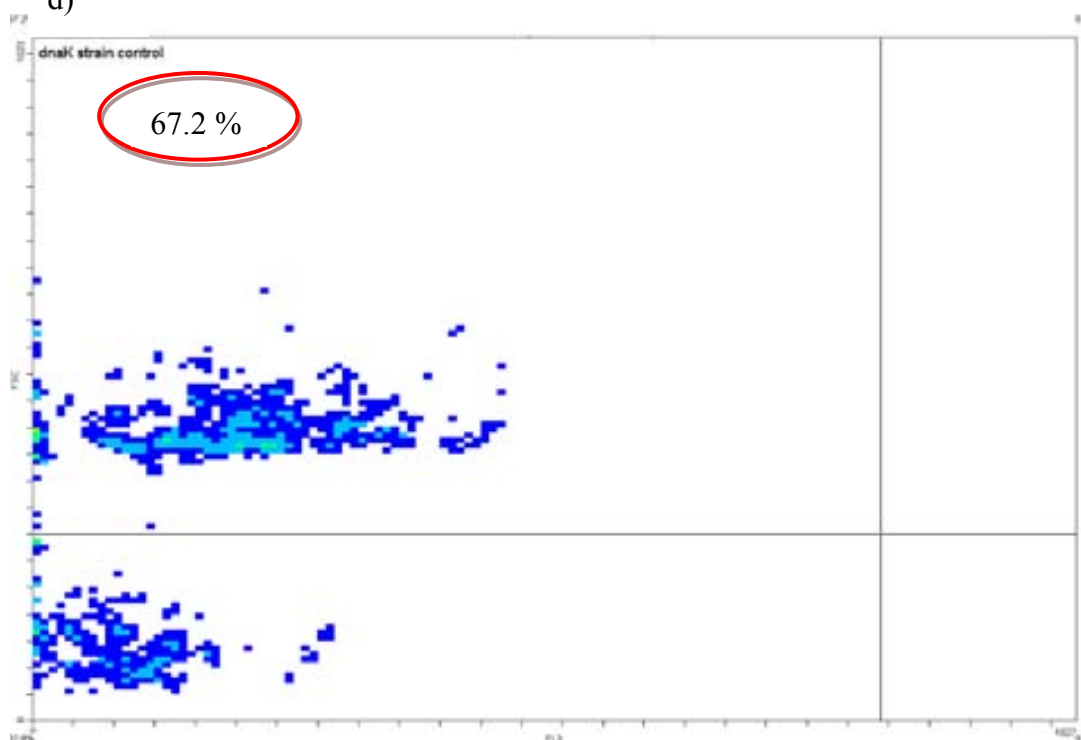


Fig. 7.5. Citometria de flux dels IB purificats a partir de dos mètodes: sonicació per ultrasons (c) i control del cultiu (d). Destaquen dos diagrames diferents separats per 2 eixos (FSC i FL3): el superior correspon a partícules grans (cèl·lules senceres) i l'inferior a partícules petites (IB). El valor encerclat en vermell indica la proporció de cèl·lules senceres entre els cossos d'inclusió.

En els diagrames 7.4a, 7.4b, 7.5a i 7.5b destaquen dues poblacions: l'una corresponent a partícules grans (cèl·lules senceres), i l'altra de partícules petites que podrien ser cossos d'inclusió. Segons el nombre que figura a la part superior, els mètodes presenten uns valors similars pel que fa al nombre de partícules grans, però sembla que el mètode que deixa una quantitat menor de cèl·lules intactes és el tractament de lisozim i la sonicació.

Tanmateix, el control consisteix en un cultiu en el qual encara no s'han purificat els cossos d'inclusió, de manera que les partícules petites corresponen a altres elements no identificats, que podrien ser restes cel·lulars. Aquest fet significa que els resultats no són vàlids, la qual cosa podria ser deguda al soroll de fons propi de l'instrument. Tot i que aquest soroll de fons s'ha reduït, el fet de minimitzar-lo més superaria els umbrals de fiabilitat de l'instrument, cosa que impediria obtenir uns resultats concluent.

7.4. Conclusions.

7.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius assolits.

Aquest capítol consistent en producció i purificació de cossos d'inclusió per a l'obtenció de FucA activa permet concloure una sèrie de punts, almenys a nivell de concepte, que es resumeixen tot seguit.

- El medi òptim per al creixement de la soca JGT20 és un medi definit amb 4 g/L d'extracte de llevat. Per tant, podria tractar-se d'un creixement de tipus diàuxic en la qual el substrat preferent seria l'extracte de llevat, atès que al final del creixement encara resta glucosa.
- El cultiu discontinu amb el seu medi òptim a partir de la soca JGT20 permet produir cossos d'inclusió actius, però amb nivells molt llunyans als òptims per ésser considerada una alternativa de producció atractiva, com ja s'havia determinat anteriorment.
- Els mètodes de disrupció assajats permeten afirmar que l'únic mètode de purificació que no compromet l'activitat biològica és el tractament amb lisozim.
- Les cèl·lules senceres entre els cossos d'inclusió, no han pogut ésser quantificades exactament, però sí estimades. El valor obtingut és d'importància relativa si es té en compte que les cèl·lules senceres no manifesten activitat i que en funció de l'aplicació dels IBs, la puresa requerida varia.
- La citometria de fluxe és una tècnica molt sofisticada i acurada que requereix temps addicional per a la posta a punt i conseqüent obtenció de resultats

concluents per a la quantificació de cossos d'inclusió i la seva diferenciació respecte d'altres restes cel·lulars.

7.4.2. Motivacions.

En aquest punt, encara quedaven molts assumptes a millorar, els quals es tracten en els capítols posteriors.

- Re-direcció de l'expressió de FucA cap a cossos d'inclusió, per tal que aquesta representi una alternativa de producció atractiva obtenint així grans quantitats d'IBs per immobilitzar. Es valora la possible incorporació d'una cua de fusió o la modificació de la construcció per tal d'afavorir la formació de més agregats.
- Millora i estandarització d'un procés de purificació per tal d'obtenir cossos d'inclusió lliures d'impureses.
- Aplicació dels IBs obtinguts en reaccions de síntesi estereselectives i obtenció d'uns biocatalitzadors actius, robustos i aplicables industrialment.

7.5. Referències.

Arii Y, Yamaguchi H, Fukoka S. 2004. **Production of a soluble recombinant prion protein fused to blue fluorescent protein without refolding or detergents in *Escherichia coli* cells.** Biosci Biotech Bioch.71: 2511-2514.

Durany O, 2003. **Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli*.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. 2004. **Inclusion Bodies: Formation and Utilisation.** Adv Biochem Engin Biot .89: 93-142.

García-Fruitòs E. 2010. **Inclusion bodies: a new concept.** Microb Cell Fact. 9:80.

Huang L, Wang J, Zhong Z, Peng L, Chen X, Hu Z et al. 2006. **Production of bioactive human beta-defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression.** Biotechnol. Lett. 28: 627-632.

Lee SY, Chang HN. 1994. **Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and Fed-batch cultures.** J Polym Environ. 2 (3): 169-176.

Medwid RD, Krebs L, Welch S. 2007. **Evaluation of *Escherichia coli* cell disruption and inclusion body release fluorochromes and flow cytometry.** Biotechniques. 43:777-782.

Peternel S, Komel R. 2010. **Isolation of biologically active nanomaterial (Inclusion bodies) from bacterial cells.** Microb Cell Fact. 9:66.

Rodríguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Villaverde A, García-Fruitòs E. 2010. **Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies.** Microb Cell Fact. 9:71.

Sengupta D i Heilshorn SC. 2009. **Protein-engineered biomaterials: highly tunable tissue engineering scaffolds.** Tissue Engineering. 16: 285-293.

Swartz JR, Neidhart FC, Curtis R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE. 1996. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.** ASM Press. Washington, DC. 1693.

Tran N, Webster TJ. 2009. **Nanotechnology for bone materials.** Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 1: 336-351.

Tsai LB, Mann M, Morris F, Rotgers C, Fenton D. 1987. **The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in high cell density Escherichia coli fermentations.** J Ind Microbiol. 2:181.

Villaverde A. 2010. **Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories.** Microb Cell Fact. 9:53.

Wallberg FH, Sundstrom E, Ladung E, Hewitt CJ, Enfors S. 2005. **Monitoring and quantification of inclusion body formation in Escherichia coli by multiparameter flow cytometry.** Biotechnol Lett. 27: 919-926.

Wanarska M, Hildebrandt P, Kur J. 2007. **A freeze-thaw method for disintegration of Escherichia coli cells producing T7 lysozyme used in pBAD expression systems.** Acta Biochim Pol. 54: 671-672.

Wilde PJ. 2001. **Interfases: their role in foam and emulsion behavior.** Curr Opin Colloid In. 5 (3): 176-181.

CAPÍTOL 8. RE-DIRECCIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE FUC A CAP A COSSOS D'INCLUSIÓ.

8.1. Introducció.

Aquest capítol de la tesi va ser desenvolupat parcialment a l'Institut für Technische Chemie (TCI) del Leibniz Universität de Hannover (Alemanya) durant una estada en col·laboració amb el grup de recerca de la Dra. Rinas.

Per tal de redirigir la producció de FucA cap a cossos d'inclusió s'han estudiat alternatives a nivell de modificació del sistema microbià i del medi de cultiu.

La primera aproximació es basa en la incorporació d'una cua hidrofòbica (Nahálka i Nidetzky, 2007). Nahálka i Nidetzky van fusionar l'enzim objectiu amb el domini d'unió a cel·lulosa del microorganisme *Clostridium cellulovorans*. Es coneixia que la tendència d'aquest domini era la formació d'agregats propis sota condicions d'expressió heteròloga, obtenint així IBs catalíticament actius. Com a model enzimàtic de rellevància industrial es va usar el D-aminoàcid oxidasa de *Trigonopsis variabilis* conegut com a Tv-DAO. Tanmateix, aquest domini era propietat de Sandoz®, de manera que la seva petició a l'empresa requeria uns tràmits que demanaven temps, per la qual cosa es va desestimar i es va valorar una segona aproximació.

La segona aproximació consistia en la incorporació del gen que codifica per la proteïna VP1 de la càpside del virus de la febre aftosa a un dels constructes del treball. La proteïna VP1 va ésser estudiada pel grup de l'IBB (Carrió i Villaverde, 2001). Es tractava d'una proteïna que fusionada a altres proteïnes o polipèptids provocava una major acumulació de la proteïna objectiu a la fracció insoluble (Carrió i Villaverde,

2001). Aquest fet conduïa a pensar que la formació d'IB no és un procés final en la xarxa de qualitat de proteïnes (Wickner et al., 1999), sinó una situació transitòria en la qual els IB actuen com a reservori de cadenes polipeptídiques malplegades.

La tercera aproximació plantejada, en cas que aquesta segona no arribés a bon port, es basava en la cerca de medis alternatius de tipus Terrific Broth (TB). Certs estudis investigaven l'efecte del TB (Korz et al., 1995; Krishna et al., 2008) en termes de creixement cel·lular, estabilitat plasmídica i eficiència d'expressió proteica, i trobaven que a concentracions d'IPTG de 4 mM, la formació de cossos d'inclusió tenia lloc a les 2 hores després de la inducció.

El grup de la Dra. Rinas proposava dos tipus de medis basats en el TB però de tipus definit: "Defined Non Inducing Broth" (DNB) i l'anomenat "Smart-Defined Autoinduction Broth" (S-DAB).

El DNB era un medi consistent en glucosa que s'indueïa per IPTG, mentre que el S-DAB era un medi d'autoinducció que consistia en glucosa, glicerol i lactosa.

Pel que fa al medi S-DAB, es troben relativament pocs estudis a la literatura que descriguin l'ús de la lactosa com a inductor en l'expressió de gens foranis en sistemes d'expressió derivats de l'operó *lac* (Kaprálék et al., 1991; Neubauer et al., 1992 i 1994; Foor et al., 1993; Neubauer i Hofmann, 1994; Donovan et al., 1996), probablement a causa de la gran dificultat per establir les condicions d'inducció ideals per tal que la lactosa actuï, com a inductor i com a font de carboni i energia (Gombert et al., 1998).

L'autoinducció ha resultat generalment útil per produir un ampli ventall de proteïnes incloent les de membrana. Alguns estudis referents a l'autoinducció, comparen inductors i afirmen que la lactosa és més econòmica i menys tòxica que l'IPTG per als humans (Donovan et al., 1996) i fins i tot, que permet produir més proteïna objectiu que els induïts per IPTG en alguns casos (Kilikian et al., 2000).

Aquest capítol pretén ésser una comunió entre la part de la tesi destinada a la producció de la FucA a partir de la fracció soluble i la part enfocada als cossos d'inclusió com alternativa. Com ja s'ha indicat en apartats anteriors, els estudis amb la soca JGT20 havien demostrat la viabilitat d'obtenció de IBs actius de FucA però no s'obtenien grans quantitats en expressar-se majoritàriament de forma soluble. Per aquesta raó, la soca emprada fou M15 Δ glyA/pQE α fucAT1, atès que en el moment de fer l'estada al TCI de Hannover era l'única construcció validada.

La soca M15 Δ glyA/pQE α fucAT1 havia estat considerada tan sols per a la producció de FucA soluble, però les aproximacions esmentades podien fer revertir la seva tendència natural, obtenint així la màxima quantitat de FucA en forma d'IB. Tot i que les evidències inicials no garantitzaven un èxit, es tractava d'una decisió de coherència amb la resta de la tesi.

Malgrat que el tema de l'autoinducció resulta interessant des d'un punt de vista d'enginyeria de bioprocessos, aquí es tracta de manera tangencial i es dóna un prioritat especial a la seva funció per assolir l'objectiu principal: la producció d'IBs.

Finalment, es proposa un mètode millorat de purificació de cossos d'inclusió a fi de poder resoldre la problemes plantejats en el capítol anterior.

8.2. Materials i Mètodes.

8.2.1. Soques, plasmidis i estratègia emprades.

El gen que codifica per la proteïna VP1 de la càpside del virus de la febre aftosa va ser aïllat del plasmidi pTVP1GFP (Fig.8.1a) cedit pel grup del Dr.Villaverde i posteriorment introduït a la construcció M15 Δ glyApQE $\alpha\beta$ fucAT1 (Fig.8.1b).

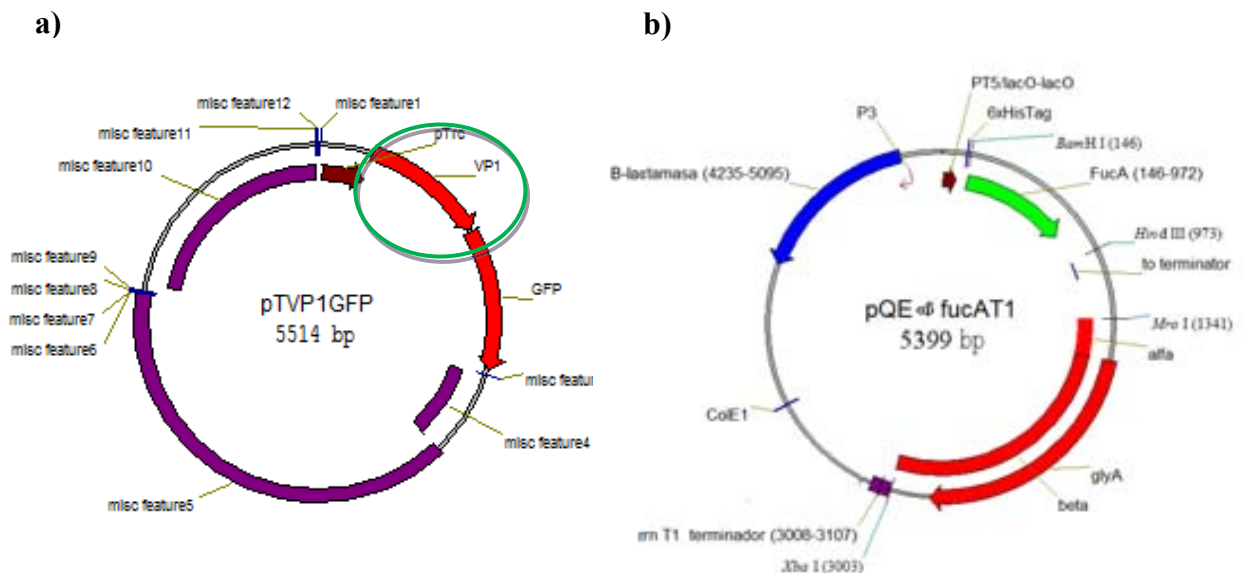


Fig. 8.1. Plasmidis usats en el desenvolupament del nou constructe. El diagrama a correspon al plasmidi pTVP1GFP (García-Fruitòs et al., 2005) del qual s'aïlla el gen de la VP1 (encerclat en verd) de la càpside del virus de la febre aftosa i s'introdueix al plasmidi pQE $\alpha\beta$ fucAT1 (b) plasmidi construït al capítol IV.

8.2.2. Particularitats en les condicions de cultiu.

En els assaigs en matrassos d'Erlenmeyer, s'empren dos medis de cultiu: un medi definit no induït (de les sigles en anglès DNB) i un medi definit d'autoinducció anomenat S-DAB (vegeu composició a la secció 2.3.1.2).

A continuació, es va dur a terme un creixement discontinu en fermentador amb el medi DNB, mantenint les proporcions que s'han explicat pels estudis en Erlenmeyer (veure apartat 2.3.1.2). Per aquest motiu es van preparar 1 L de medi i 150 mL d'inòcul. En aquest cas, els macroelements no van ser introduïts prèviament al fermentador per ésser autoclavats, com en els casos anteriors, sinó que es va introduir tot el medi de manera conjunta. La inducció es va realitzar a les condicions habituals (vegeu 2.3.2.2).

8.2.3. Purificació estandaritzada dels cossos d'inclusió.

La purificació dels cossos d'inclusió es va efectuar mitjançant el tractament habitual amb liozím, però amb l'addició de rentats successius amb tampó de lisi, 100 mM Tris-HCl (pH=7.5), dels cossos d'inclusió resultants. Entre rentat i rentat addicional, es centrifugava la mescla a les condicions habituals (vegeu 2.5.4) i es mesurava l'activitat de la fracció soluble a partir del test d'activitat de la FucA. Es repetia el mateix procediment fins a obtenir un valor proper a 0 UA/mL a la fracció soluble.

A banda de la classificació habitual entre fracció soluble i insoluble, es van prendre mostres abans de la separació d'ambdues fraccions per centrifugació i es van reservar a part. Aquesta nova fracció seria anomenada **fracció total** i permetria visualitzar fàcilment en una anàlisi SDS-PAGE, la part d'aquesta que s'havia dirigit a fracció soluble i a cossos d'inclusió respectivament.

8.3. Resultats i Discussió.

Els resultats s'estructuren en diversos apartats: una breu exposició dels resultats de la construcció M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1VP1 (8.3.1), els estudis en cultius Erlenmeyer dels medis del tipus “defined broth” (8.3.2) i finalment, l'anàlisi de la fermentació en un cultiu discontinu en fermentador (8.3.3).

8.3.1. Producció de FucA amb la construcció M15 Δ glyApQE α β fucAT1VP1.

El procediment de clonatge va consistir en el disseny d'uns primers (Taula 8. 1) capaços d'amplificar la regió VP1, així com també que continguessin les dianes dels enzims de restricció que serien usats per tallar el plasmidi pQE α β fucAT1, a fi de poder incorporar-li l'esmentat insert.

Taula 8.1. Oligonucleòtids usats per amplificar el gen VP1. S'especifica la seqüència, diana de restricció (assenyada en vermell) i temperatura d'hibridació.

Oligonucleòtid	Seqüència (5'-3')	Diana	Tm (°C)
VP1_forward	atcgatcac gaattc ctacgaccactggtgaatct	EcoRI	70
VP1_reverse	acctgtgat ggaatcc gtgccattaccatcacat	BamHI	68

Un cop el gen VP1 va ser amplificat, es va aplicar el procediment de purificació, restricció i lligació, tal i com es descriu al punt 2.2.4.

Les proves d'expressió realitzades amb la nova soca construïda resultaren en una absència de producció de la proteïna d'interès, causada possiblement per la producció de la proteïna d'interès conjuntament amb la proteïna de fusió VP1 (Carrió i Villaverde, 2001). S'hipotetitzava que aquest fenomen de producció conjunta de les dues proteïnes,

havia fet disminuir dràsticament els nivells de FucA que havien estat gairebé indetectables. Per aquesta raó, es va abandonar aquesta aproximació.

8.3.2. Estudis dels cultius en Erlenmeyer en els medis DNB i S-DAB.

La soca M15 Δ glyA/pQE α fucAT1 es va fer créixer a dues temperatures diferents:

30 °C i 37 °C seguint la metodologia descrita al punt 9.3.3. El fet de provar una temperatura menor a l'habitual s'explica pel fet que alguns autors relacionen baixes temperatures amb la producció de cossos de qualitat superior (Peternel et al., 2009) .

L'experiment es desenvolupà en set matrassos d'Erlenmeyer diferents, un per a cada medi i temperatura diferents, tres corresponents als controls.

El control positiu o control de medi consisteix en un creixement de la soca d'estudi en el medi MD desenvolupat per a l'obtenció de FucA a partir de la fracció soluble.

El control negatiu consisteix en el creixement de la soca hoste (M15 Δ glyA) sense plasmidi en el medi DNB.

El doble control negatiu s'introdueix a l'experiment per tal d'esbrinar la funció de la lactosa i es tracta d'un creixement de la soca d'estudi en un medi S-DAB sense lactosa.

El perfil de creixement descrit es mostra a la Fig 8.2.

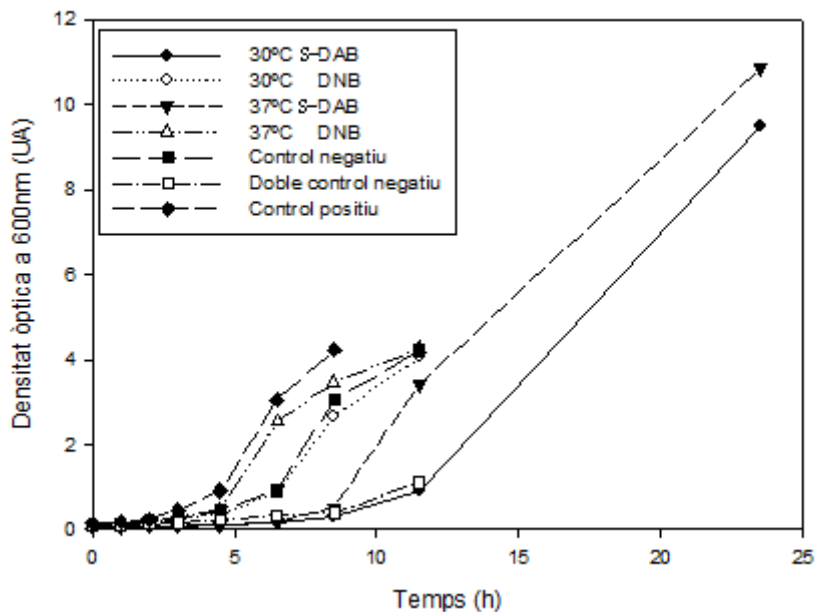


Fig. 8.2. Perfil de creixement de la soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 en dos medis diferents: DNB i S-DAB a 30 °C i 37 °C amb la incorporació de tres controls (un control positiu amb la soca d'estudi i el MD estàndard, un control negatiu amb la soca hoste en medi DNB i un doble control negatiu amb el medi S-DAB sense lactosa).

El creixement de la soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 en el medi DNB dona un perfil relativament semblant a l'observat al control positiu, assolint unes 4 unitats de densitat òptica com a valor màxim. Les soques crescudes en medi S-DAB assoleixen uns valors significativament superiors que poden arribar a les 11 unitats de densitat òptica a les 24 hores.

Els resultats d'anàlisi d'activitat que s'exposen tot seguit (Taula 8.2) s'expressen tan sols en UA/ g pes sec i han estat obtinguts després d'una disrupció amb el mètode més prometedora: un tractament amb lisozim.

Taula 8.2. Activitat de la FucA (UA/g pes sec) en forma cossos d'inclusió i fracció soluble a les dues temperatures estudiades (30 °C i 37 °C) en dos medis diferents (S-DAB i DNB). El control doble negatiu correspon a la soca d'estudi amb un medi d'autoinducció sense lactosa i el control positiu a la mateixa soca en medi MD estàndard a 30 °C.

Temperatura i medi de cultiu	UA/g pes sec	
	Fracció soluble (SF)	Cossos d'inclusió (IB)
30 °C S-DAB	3	20
37 °C S-DAB	34	22
30 °C DNB	554	177
37 °C DNB	339	213
Control doble negatiu	2	3
Control positiu	412	10

Les anàlisis mostren la presència d'activitat FucA en forma de cossos d'inclusió en ambdós medis (S-DAB i DNB), però en el medi DNB es supera amb escreix la quantitat de FucA produïda en el MD estàndard.

Tal com es veu a la Taula 8.2, el control positiu (medi MD estàndard), no dóna cossos d'inclusió, sinó expressió en forma de fracció soluble, tal com s'havia vist en el capítol IV. L'activitat és menor en aquest cas ja que s'ha disminuït la temperatura de treball a 30 °C.

La temperatura de treball no mostra grans diferències en termes d'activitat biològica, però a 37 °C s'obtenen un nivells d'activitat lleugerament majors en forma d'IBs, contràriament al que s'afirmava a la publicació esmentada (Peternel et al., 2009).

Si es comparen els valors de les dues fraccions, per als cultius en medi S-DAB s'observa clarament que es tracta de quantitats del mateix ordre de magnitud, la qual cosa permet parlar d'una evident millora en la direcció de l'expressió cap a cossos d'inclusió actius. Si amb la soca JGT20 s'obtenia com a màxim un 4 % de l'activitat total en forma de cossos d'inclusió, la nova aproximació condueix a un 38 % en el millor dels casos.

La producció de cossos d'inclusió actius en fermentador es decideix dur-la a terme a 37 °C (majors nivells d'activitat en els cossos) emprant el medi DNB.

8.3.3. Fermentació en discontinu amb el medi DNB per a la producció d'IB.

Amb la voluntat d'obtenir una gran quantitat de cossos d'inclusió actius, es desenvolupà un cultiu en discontinu. Es tracta d'una soca coneguda però un medi totalment nou respecte els emprats fins aleshores i es decideix induir mitjançant IPTG 1 mM a les 10 hores quan s'han assolit les 3 unitats de densitat òptica a 600 nm i el nivell de glucosa és de 5.9 g/L.

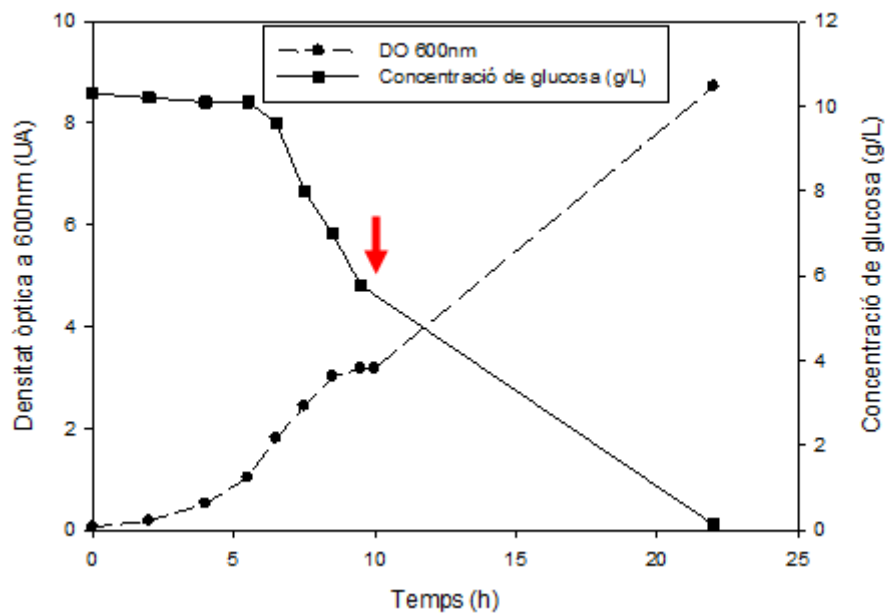


Fig. 8.3. Evolució de la densitat òptica a 600 nm i la concentració de glucosa en g/L al llarg del temps en un cultiu en discontinu. La fletxa vermella indica el moment de la inducció amb IPTG 1mM.

A continuació, es presenta el gel SDS-PAGE a partir de la purificació d'una mostra abans de la inducció i d'una altra post-inducció, de la qual s'analitza la fracció total, la soluble i la insoluble o cossos d'inclusió (Fig.8.4). El tractament aplicat es descriu al punt 8.2.3 i és un tractament amb lisozim que inclou rentats successius.

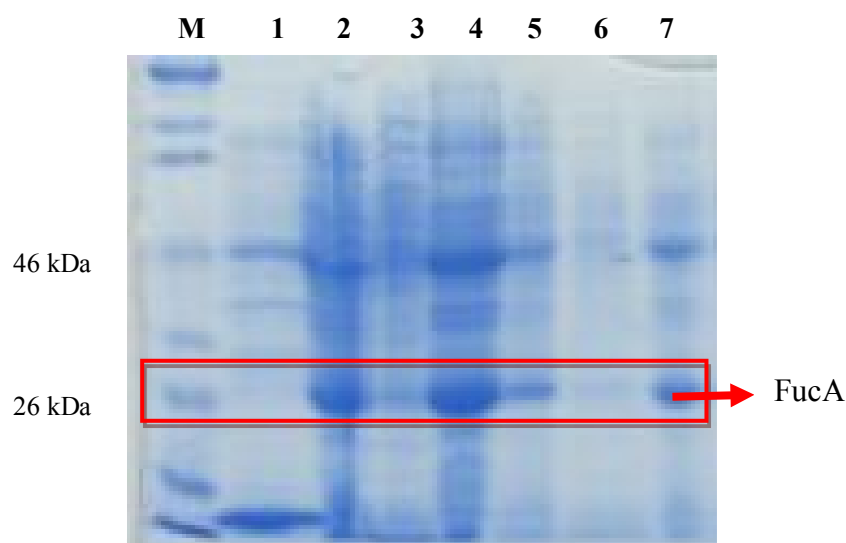


Fig. 8.4. Anàlisi SDS-PAGE a partir d'una mostra pre-inducció (carril 1), una mostra post-inducció de dilució 1/10 que es desglossa en fracció total (carril 2), fracció soluble (carril 3), cossos d'inclusió (carril 4) i la mateixa mostra post-inducció de dilució 1/100 que es desglossa en fracció total (carril 5), fracció soluble (carril 6) i cossos d'inclusió (carril 7).

L'anàlisi dels gel SDS-PAGE mostrava clarament l'expressió de gairebé tota la FucA en forma de cossos d'inclusió, ja que la fracció soluble manifestava tan sols una tímida banda.

Aquesta expressió de la FucA en forma de cossos d'inclusió va ser quantificada amb les anàlisis habituals i els valors resultants s'exposen a la Taula 8.3.

Taula 8.3. Quantificació de l'activitat de la FucA en IB obtinguda en termes de UA/g pes sec, UA/mg FucA, valors de la densitometria (% FucA) i mg de FucA/g pes sec a la fracció corresponent a cossos d'inclusió.

UA/ g pes sec	UA/mg FucA	% FucA	mg FucA/g pes sec
451	8.5	27	53

En termes de UA/ g pes sec, els cossos d'inclusió mostraven més activitat (451 UA/ g pes sec) que la fracció soluble que s'havia obtingut en els assaigs en matrassos d'Erlenmeyer (339 UA/g pes sec). Tot i que aquest valor no és comparable amb els obtinguts a partir dels IBs del capítol VI ja que es tracta de soques diferents, es podria observar que aquells valors no sobrepassaven els 77 UA/g pes sec.

Pel que fa a l'activitat expressada com a UA/ mg FucA, el valor de 8.5 UA/ mg FucA és de l'ordre dels que s'han obtingut en capítols anteriors. El fet que aquí no es manifesti el canvi de tendència podria ser degut a la proporció de FucA entre la resta de proteïna cel·lular, que també mostra un valor inferior al que s'ha vist en producció de cossos d'inclusió, en comparació amb els valors entre 60 i 70 % assolits per JGT20 en capítols anteriors. En aquest sentit, convé recordar que la soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 mostrava uns valors del 31 % de FucA en forma soluble (vegeu capítol IV) com a conseqüència de l'expressió de SHMT per complementar l'auxotrofia.

Finalment, la relació mg FucA/ g pes sec és la prova definitiva que verifica el desplaçament de l'equilibri fracció soluble-insoluble (Villaverde i Ventura, 2006). El valor de 53 mg FucA/g pes sec és un ordre de magnitud superior que el que s'obtenia en forma de cossos d'inclusió mitjançant la construcció més prometedora de les estudiades en el capítol VI (Taula 6.3).

La raó per la qual el medi DNB ha resultat exitós podria respondre a dues hipòtesis. D'una banda, la presència d'EDTA (àcid etilendiaminotetracètic) com a element diferencial en el nou medi respecte l'antic (MD), i per l'altra, l'augment en la concentració de zinc, la qual és un ordre de magnitud major en el medi DNB.

Considerant la primera hipòtesi, l'EDTA va ser estudiat com a additiu del medi MD per Durany (Durany et al, 2003) i es va veure que complexava ions divalents i que reduïa l'activitat aldolàsica FucA intracel·lular final a la meitat en fracció soluble, degut a la seva interacció amb el ió Zn^{2+} del centre actiu. Aquest comportament no ha estat observat en aquest cas, però tampoc es pot afirmar que aquest agent quelant és el responsable de la formació d'agregats.

En canvi, la segona hipòtesi podria ésser més realista, ja que alguns estudis (Garai et al, 2007) afirmen que el zinc pot accelerar la cinètica d'agregació, permetent així el desplaçament de l'equilibri cap a la banda de la fracció insoluble o cossos d'inclusió.

En resum, un canvi en les condicions de cultiu ha permès redirigir l'expressió de FucA cap a la formació de cossos d'inclusió.

8.4. Conclusions.

8.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.

- La soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 presenta poca tendència natural a la formació de cossos d'inclusió, per la qual cosa ha estat necessari modificar aquesta tendència amb tot un seguit d'aproximacions.
- Redirigir l'expressió de FucA cap a cossos d'inclusió actius ha estat possible mitjançant el creixement de la soca M15 Δ glyA/pQE α β fucAT1 en el medi DNB i una inducció amb IPTG 1 mM. S'han obtingut quantitats significatives de cossos d'inclusió per a la seva utilització com a biocatalitzadors.
- Tot i que no era un objectiu prioritari, la modificació del procediment habitual basat en un tractament amb lisozim al qual s'han afegit múltiples rentats, representa una millora significativa ja que ha permès assegurar que tota l'activitat provenia de cossos d'inclusió, tot descartant aquella que provenia de l'enzim soluble.

8.4.2. Motivacions.

En aquest capítol, les motivacions són a curt termini i per tant, han d'ésser desenvolupades al capítol següent, o bé a llarg termini, és a dir, possibles millores de les aproximacions analitzades al punt 8.4.1 no viables per manca de temps, o simplement opcions descartades que es plantegen com a perspectives de futur.

A curt termini.

Els cossos d'inclusió obtinguts en aquest capítol han d'ésser immobilitzats i aplicats a una reacció de síntesi estereoselectiva per tal de crear un biocatalitzador robust i estable, però també que conservi l'activitat al llarg del temps.

A llarg termini.

- El medi d'autoinducció podria ésser provat per a l'obtenció de fracció soluble i resultaria interessant per desenvolupar diversos processos en paral·lel a petita i gran escala, sempre i quan aquesta exhibís els nivells d'activitat biològica desitjats.
- El procés de purificació de cossos d'inclusió millorat s'hauria d'estudiar exhaustivament per tal que fos òptim i poder així validar-lo.

8.5. Referències.

Carrío MM, Villaverde A. 2001. **Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible.** FEBS Lett. 489:29-33.

Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. **Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter.** J Ind Microbiol. 16:145-154.

Durany O, 2003. **Producció de fuculosa-1-fosfat aldolasa recombinant en *E. coli*.** Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Foor F, Morin N, Bostian KA. 1993. **Production of L-dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*.** Appl Environ Microb. 59: 3070-3075.

Garai K, Sahoo B, Kavshalyak K, Desai R, Maiti S. 2007. **Zinc Lowers Amyloide- β -Toxicity by Selectively Precipitating Aggregation Intermediates.** Biochem J. 46 (37).

Gombert AK, Kilikian BV. 1997. **Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer.** J Biotechnol. 60:47-54.

Kaprálék F, Jecmen P, Sedláček J, Fábry M, Zadržil S. 1991. **Fermentation conditions for high level expression of the *tac* promoter-controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101.** Biotechnol Bioeng. 37: 71-79.

Kilikian BV, Suárez ID, Liria CW, Gombert AK. 2000. **Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction.** Process Biochem. 35:1019-1025.

Korz, DJ, Rinas U, Hellmuth, K, Sanders EA, Deckwer WD. 1995. **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli***. J Biotechnol. 39:59–65.

Krishna-Rao DV, Rao JV, Nasaru ML, Bhujanga-Rao AKS. 2008. **Optimization in the AT-content of codons Immediately Downstreams of the Initial Codon and Evaluation of Recombinant Human G-CSF in *Escherichia coli***. Mol Biotechnol 38 (3): 221-232.

Li Z, Kessler W, van den Heuvel J, Rinas U. 2011. **Simple defined autoinduction medium for high level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems**. Appl Microbiol Biotechnol. (acceptat i en fase de publicació).

Nahalka J, Nidetzky B. 2007. **Fusion to a Pull-Down Domain: A novel approach of producing *Trigonopsis variabilis* D-Amino Acid oxidase as Insoluble Enzyme Aggregates**. Biotechnol Bioeng. 97.3.

Neubauer P, Hofmann K. 1994. **Efficient use of lactose for the lac promoter-controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot-and-mouth-disease virus in *Escherichia coli* under fed-batch fermentation conditions**. FEMS Micro Rev. 14:99-102.

Neubauer P, Hofmann K, Holst O, Martiasson B, Kruschke P. 1992. **Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer**. Appl Microbiol Biotechnol. 36: 739-744.

Peternel S, Gaberc-Porekar V, Komel R. 2009. **Bacterial Growth Conditions Affect Quality of GFP Expressed Inside Inclusion Bodies**. Acta Chim Slov. 56: 860-867.

Ventura S, Villaverde A. 2006. **Protein quality in bacterial inclusion bodies**. Trends Biotechnol. 24: 179-185.

Wickner S, Maurizi MR, Gotterman S. 1999. **Posttranslational quality control: Folding, Refolding and Degrading Proteins.** Science. 286:1888-1893.

CAPÍTOL 9. PREPARACIÓ DE BIOCATALITZADORS IMMOBILITZATS BASATS EN COSSOS D'INCLUSIÓ PER A LA SEVA APLICACIÓ EN REACCIONS DE SÍNTESI ESTEREOSELECTIVES.

9. 1. Introducció.

En els capítols anteriors, es demostra l'aplicació dels cossos d'inclusió en reaccions estereoselectives, però per tal d'aconseguir un biocatalitzador robust i estable al llarg del temps, cal l'aportació de noves tècniques d'immobilització d'enzims.

En aquest punt de la tesi doctoral, es plantegen bàsicament dos mètodes d'immobilització: l'enllaç covalent per entrecreuament i l'encapsulació a partir d'algun mètode capaç de retenir els cossos d'inclusió.

El mètode d'immobilització per entrecreuament emprant glutaraldehyd consisteix en un enllaç entre el grup aldehid del glutaraldehyd i els grups amino de l'enzim. Es parla de CLE (Cross-linked Enzyme) quan es parteix d'enzim soluble, CLEC (Cross-linked Enzyme Crystals) si es tracta d'enzim cristal·litzat i CLEA (Cross-linked Enzyme Aggregates) en cas d'enzim agregat o insoluble (Suau et al., 2007).

Els CLEA van ser proposats com a biocatalitzadors de nova generació (Cao et al., 2000 i 2001; López-Serrano et al., 2002; Wilson et al., 2004). Un dels avantatges d'aquesta tècnica és l'obtenció d'un biocatalitzador amb una activitat específica elevada, ja que no conté suport.

En estudis previs (Suau et al., 2007) d'immobilització de FucA soluble mitjançant entrecreuament amb glutaraldehyd per generar CLEAs tan sols es va aconseguir un 10-20 % de FucA retinguda en forma activa. El procediment de preparació dels CLEA de

Suau et al consistia en emprar glutaraldehyd i sulfat d'amoni per a la generació dels esmentats CLEA. Les concentracions usades eren de l'ordre del 0.02 % de glutaraldehyd i amb aquesta aproximació, a les 6 hores de procés, s'immobilitzava entre un 66 % i un 51 % de l'activitat oferta.

Tanmateix, nombrosos articles publicats (Cao et al., 2000 i 2001, López-Serrano et al, 2002; i Wilson et al., 2004), adicionaven entre un 2 i un 4 % de glutaraldehyd. Per tant, com a balanç entre les fonts consultades, es van decidir provar les concentracions següents: 0.02 %, 0.5 % i 1 % de glutaraldehyd.

S'han publicat nombrosos estudis sobre immobilització de cossos d'inclusió, però el més rellevant per raons de similitud és la immobilització de l'aldolasa àcid siàlic (Nahálka et al., 2008) mitjançant tecnologia CLEA malgrat la seva manipulació difícil i consistència gelatinosa (Shoevaart et al., 2004). Els cossos d'inclusió actius van ser posteriorment encapsulats en alginats per un mètode que ja havia estat escalat feia temps (Pruße et al., 1998; Brandenberger i Widmer, 1998). Després del crosslinking químic amb glutaraldehyd, el biocatalitzador va ser usat repetidament en una condensació aldòlica entre piruvat i N-acetil-D-manosamina (Maru et al., 2002).

La tecnologia anomenada Lentikat® ha estat analitzada en una gran quantitat de treballs (Durieux et al., 2000; Czichicli et al., 2001; Gröger et al., 2001; Lozinsky i Plieva, 1998; Rebros et al., 2006 Wilson et al., 2004). Es basa en la utilització de partícules d'hidrogel d'alcohol polivinílic en forma de lletia anomenades Lentikats® a causa de la seves bones propietats mecàniques i geometria adequada en termes de transferència de massa (Jeckel, 1998). Des de 2006, els Lentikats® han estat comercialitzats per diverses companyies, la més coneguda de les quals és Genialab (Braunschweig, Alemanya). Es tractava d'una aproximació d'ús industrial, ja que reduïa molt els costos

d'inversió i d'operació, aportava més productivitat i efectivitat que les tecnologies tradicionals, accelerava el procés de producció i reduïa la producció de residus.

En aquest capítol es pretén immobilitzar els cossos d'inclusió mitjançant una aproximació que permeti mantenir l'activitat al llarg del temps. Per aquesta raó, es va plantejar un mètode combinat: la immobilització per entrecreuament mitjançant glutaraldehyd (CLEA) i l'encapsulament per mitjà de la tecnologia Lentikat®, doncs la morfologia atípica dels cossos d'inclusió requeria una tècnica d'immobilització complexa per tal d'obtenir un biocatalitzador actiu, estable i robust.

9.2. Materials i Mètodes.

Els mètodes d'immobilització estudiats (entrecruament per glutaraldehid i encapsulament mitjançant la tecnologia Lentikat®) es descriuen en detall a la secció 2.6.1 i 2.6.2 respectivament. La observació de les partícules de Lentikat® obtingudes va ser realitzada amb una lupa Leica MZ75 i les imatges van ser capturades amb una càmera Leica DC200, per al tractament posterior amb Leica DC.

La reacció d'adició aldòlica entre (S)-Cbz-alaninal i DHAP es va realitzar fent servir com a biocatalitzadors la fracció soluble, els cossos d'inclusió i aquests immobilitzats.

Les proves preliminars es van realitzar en un volum de 2.5 mL i agitació per "roller". A continuació, es va utilitzar un reactor discontinu agitat de la casa comercial Alco (Fig. 9.1), per tal d'augmentar el volum de treball (10 mL) i de millorar les condicions d'homogeneïtat emprant un agitador magnètic. La temperatura de l'esmentat reactor es mantenia a 4 °C mitjançant un Criostat de la casa comercial Lauda.



Fig. 9.1. Fotografia de reactor de volum útil 25 mL emprat durant la reacció aldòlica.

9.3. Resultats i Discussió.

En aquesta secció s'exposen els resultats extrets de la immobilització per entrecreuament amb glutaraldehyd a diferents concentracions (9.3.1), els del mètode d'encapsulament per tecnologia Lentikat® (9.3.2) i finalment, els obtinguts a partir de la reacció de síntesi en la qual s'han aplicat els IB immobilitzats com a biocatalitzadors (9.3.3).

9.3.1. Immobilització per entrecreuament amb glutaraldehyd.

Les immobilitzacions per entrecreuament van ser dutes a terme amb glutaraldehyd al 1 % (Fig.9.2a), 0.5 % (Fig.9.2b) i 0.02 % (Fig.9.2c) seguint els mètodes descrits a l'apartat 2.6.1.

Tot i que l'objectiu era immobilitzar cossos d'inclusió, el primer pas consistia en posar a punt el mètode, de manera que es va emprar proteïna purificada (vegeu secció 2.6.1).

L'evolució de la immobilització a 4 °C es va seguir al llarg del temps a partir de t=0, quan s'addicionà el glutaraldehyd i es va mesurar l'activitat de la suspensió i el sobrenedant tal com es descriu a l'apartat 2.6.1.

S'inclou un control (o blanc), el qual segueix el mateix tractament que la mostra immobilitzada però sense l'addició de l'agent entrecreuant.

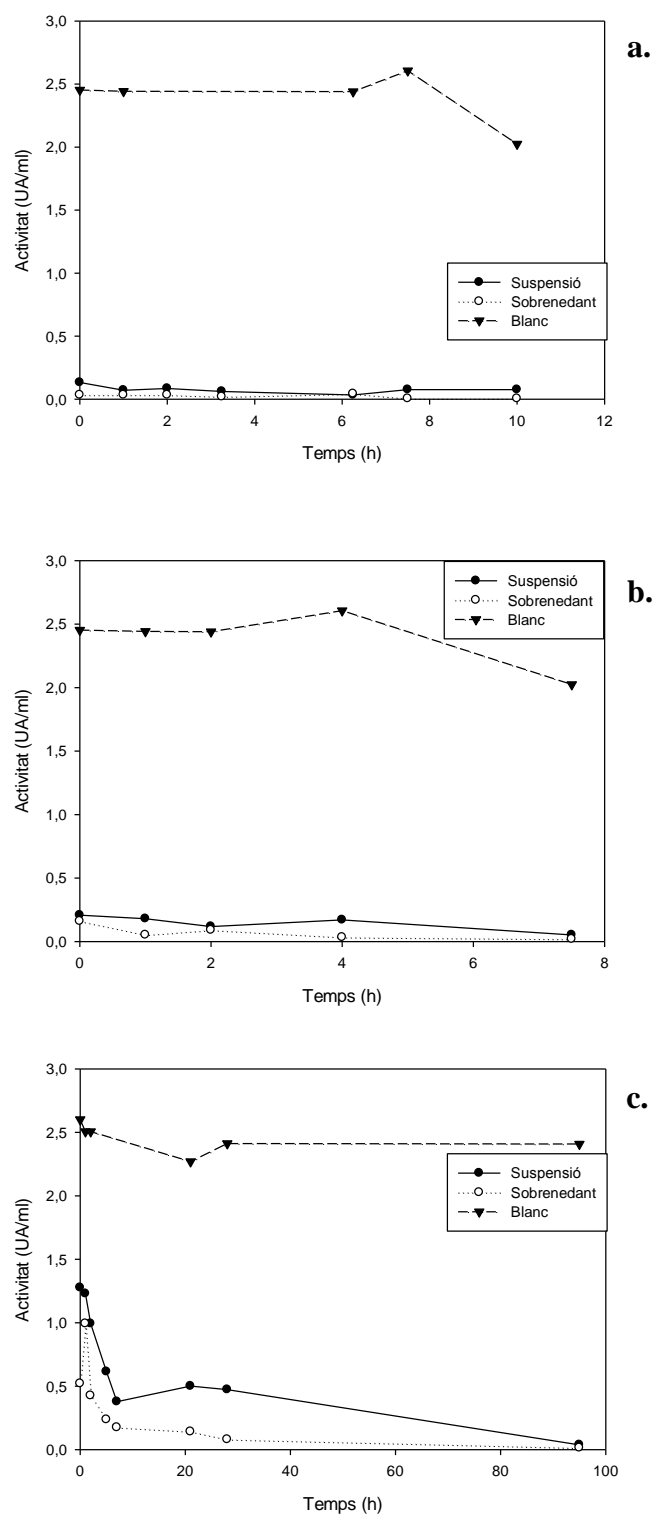


Fig. 9.2. Immobilització per CLEA a diferents concentracions de glutaraldehid a l'1 % (a), 0.5 % (b) i 0.02 % (c). Evolució de l'activitat (UA/mL) mesurada a la suspensió i el sobrenedant. El control segueix el mateix procediment però sense addició de glutaraldehid.

En tots els casos, amb major o menor mesura, es donava un descens dràstic de l'activitat inicial, que es fa palès des del moment d'addició del glutaraldehyd.

Taula 9.1. Valors obtinguts a partir de les tres immobilitzacions realitzades a diferent concentració de glutaraldehyd (1 %, 0.5 % i 0.02 %) a unes condicions de 0.26 UA/mL, 0.21 UA/mL i 1.3 UA/mL respectivament, (activitat inicial a temps 0 que coincideix amb l'addició de glutaraldehyd, UA/mL en el sediment o pel·let i % Activitat recuperada al llarg del procés). El control correspon a la mateixa mostra sense glutaraldehyd.

% Glutaraldehyd	UA/mL inicials suspensió	UA/mL sediment	% Activitat recuperada
1	0.26	0.07	27
0.5	0.21	0.02	9.5
0.02	1.3	0.01	7.7
0 (Control)	2.02	2.14	95

La Taula 9.1 mostra unes pèrdues d'activitat que varien entre un 75 % i un 90 % a totes les condicions avaluades. Aquesta disminució d'activitat es podria atribuir a l'efecte del glutaraldehyd, ja que el blanc no perd activitat.

Per tant, es va considerar que si el mètode CLEA no era un mètode adequat per a la immobilització de FucA de forma soluble, tampoc ho seria per a la immobilització de cossos d'inclusió. Per aquest motiu, l'aplicació del mètode CLEA va ser desestimada i es va considerar la possibilitat d'aplicar directament l'encapsulació dels IB a partir d'un mètode basat en la tecnologia Lentikat®.

9.3.2. Mètode d'encapsulament per tecnologia Lentikat®.

Els cossos d'inclusió, que contenen 51 UA, van ser immobilitzats tal com es descriu al capítol II i es van obtenir 2.9 g de partícules de Lentikat®, les quals tenien l'aspecte que es mostra a la Fig.9.3.



Fig. 9.3. Imatge que mostra tres partícules de Lentikat® solapades que contenen IBs amb l'ajut d'una lupa Leica MZ75.

L'assaig d'activitat de Fuculosa-1-fosfat aldolasa es va aplicar a una quantitat coneguda de partícules de pes conegut com la de la Fig. 9.3 i va donar un valor promig de 0.53 UA/g pes sec, la qual cosa significa una activitat aparent a les lleties de tan sols el 3 % de la càrrega enzimàtica oferta. Per altra banda, es va prendre una alíquota de líquid estabilitzador (vegeu 2.6.2), després d'una incubació de 2 hores i no es van detectar pèrdues d'activitat aldolàsica per difusió a través dels porus de les partícules (Taula 9.2).

Per tant, com que els IB estaven totalment retinguts dins les partícules, la pèrdua d'activitat havia d'ésser atribuïda a una possible desactivació enzimàtica durant el procés (però no associada a les condicions d'operació) o bé a una reducció aparent de l'activitat, degut a limitacions difusionals.

Taula 9.2. Valors obtinguts a partir del test d'activitat de la FucA per a mostres heterogènies del conjunt IB-Lentikat®.

	Activitat oferta	Activitat fora dels Lentikat®- IB	Activitat dins els Lentikat®- IB
Activitat FucA (UA)	51	0.83	1.54
Activitat FucA (%)	100	1.63	3

9.3.3. Ús dels IB com a biocatalitzadors en síntesi.

La reacció de síntesi entre DHAP i S-alaninal va ser estudiada emprant FucA com a biocatalitzador provinent de fracció soluble, cossos d'inclusió i cossos immobilitzats en Lentikats, sota condicions comparables (la mateixa activitat nominal mesurada a partir de l'assaig estàndard de la FucA). La Taula 9.3 mostra els resultats de la velocitat inicial de desaparició de DHAP i l'extensió de la reacció mesurada com a grau de conversió del DHAP i rendiment de producte després de 25 h.

Taula 9.3. Reacció d' addició aldòlica entre DHAP i S-alaninal catalitzada per FucA soluble, IBs i IBs atrapats en Lentikats®. Les reaccions van ser dutes a terme en tampó DMF (1:4 v/v). Concentració de DHAP inicial de 25 mM i concentració d'alaninal inicial de 42.5 mM. Lentikat®-IBs testats en dues reaccions diferents. (*) Valors després de 25 hores de reacció.

	Activitat Nominal (UA/mL)	Velocitat inicial desaparició DHAP (mmol/L.h)	Conversió DHAP (%) (*)	Rendiment de producte (%) (*)
FS	1.5	3.5	50	no determinat
IB	1.5	3.5	46	43
Lent-IB Reacció 1	1.5	18	84	76
Lent-IB Reacció 2	0.2	3.2	68	65

Tal com es pot observar a la Taula 9.3, la fracció soluble i els cossos d'inclusió posseeixen la mateixa velocitat inicial. Aquest fet evidencia que no existeixen limitacions difusionals si s'empren els IBs directament.

Per altra banda, els IBs immobilitzats presentaven una activitat més elevada que la corresponent a la nominal. Això significava que una part significativa de l'activitat enzimàtica oferta estava realment immobilitzada i que les limitacions difusionals eren menys significants en la reacció de síntesi amb substrats no naturals que no pas amb els substrats naturals que s'usaven a l'assaig d'activitat (Suau et al., 2003).

Tanmateix, la difusió era encara l'etapa limitant del procés, ja que la velocitat de la reacció era 5 vegades més elevada que la de l'enzim soluble (1.5 UA/mL) i l'activitat de l'enzim immobilitzat total seria 34 vegades major si contigués tot l'enzim ofertat (valor obtingut dividint 51/1.5). Un comportament similar fou observat en una reacció

realitzada amb menys partícules Lentikat® (0.2 UA/mL), tal com es mostra a la Taula 9.3.

Els perfils de concentració de la reacció catalitzada per IB encapsulats en partícules Lentikat® amb una activitat nominal de 1.5 UA/mL es representa a la Fig.9.4.

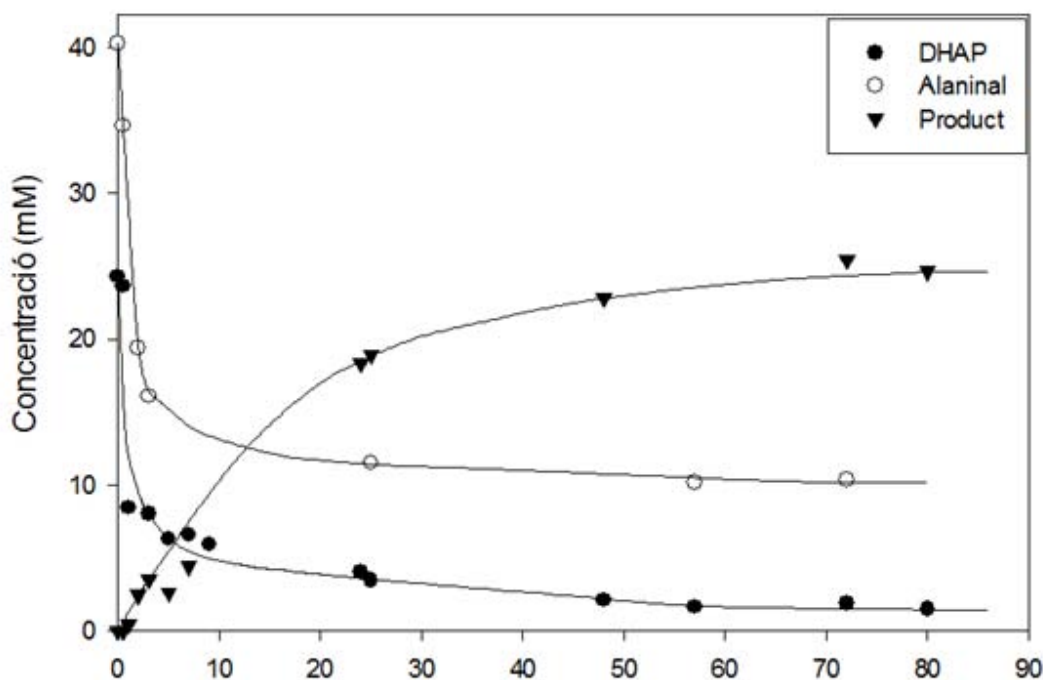


Fig. 9.4. Evolució al llarg del temps de la reacció de condensació aldòlica catalitzada per conjunts Lentikat®-IB. La reacció es va realitzar en tampó DMF (1:4 v/v).

Els IB encapsulats en Lentikat® semblen ser uns bons catalitzadors per a la reacció d'addició aldòlica objectiu, degut als alts graus de conversió obtinguts.

Com a valor afegit, es pot afirmar que es tracta de biocatalitzadors molt estables, atès que resuspesos amb tampó 100 mM, 150 mM KCl pH=7.5 i conservats a una temperatura de 4 °C mantenen l'activitat completa durant més de dos mesos després d'èsser preparats, essent negligible l'alliberament d'enzim al medi líquid.

9.4. Conclusions.

9.4.1. Conclusions extretes a partir dels objectius aconseguits.

Al llarg d'aquest capítol s'han extret un nombre considerable de conclusions, les quals es resumeixen tot seguit.

- ***Immobilització per CLEA.***

La immobilització mitjançant el mètode CLEA no ha resultat vàlida a causa de les pèrdues d'activitat observades en tots les condicions provades.

Per tal d'evitar aquest fenomen, el qual representa un inconvenient freqüent en aquest tipus d'immobilització, convé un control molt acurat de les variables d'entrecruament: naturalesa i concentració de l'agent entrecruant, pH, temperatura del medi i temps d'immobilització.

- ***Immobilització per encapsulament (tecnologia Lentikat®).***

La immobilització per encapsulament mitjançant tecnologia Lentikat® ha resultat una opció molt efectiva ja que s'han millorat les propietats mecàniques del biocatalitzador. Per tant, s'ha aconseguit un biocatalitzador actiu, robust i estable a llarg termini, amb la possibilitat d'ésser reutilitzat.

- ***Aplicació del biocatalitzador a una addició aldòlica.***

La FucA immobilitzada en forma de cossos d'inclusió ha demostrat ésser un biocatalitzador apropiat per a la reacció aldòlica amb característiques similars a l'enzim soluble. Tot i que la reacció entre DHAP i alanina està limitada difusionalment, les velocitats de reacció i estabilitat són prou bones per a ser implementades d'una manera pràctica.

9.4.2. Perspectives de futur.

Tot i que els objectius i interrogants plantejats de bon principi han estat assolits i solventats, en treballs posteriors caldria millorar una mica el sistema d'agitació per tal que aquesta fos òptima, així com també l'alimentació del reactor mitjançant una addició controlada dels substrats de reacció, degut a la degradació de DHAP.

9.5. Referències.

Brandenberger H, Widmer F. 1998. **A new multinozzle encapsulation/immobilisation and characterization of N-acetylneuraminase lyase from *Escherichia coli*.** Biochem J. 276:541-546.

Cao L, van Rantwijk F, Sheldon R. 2000. **Cross-linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilisation of Penicillin Acylase.** Org Lett. 2 (10): 1361-1364.

Cao L, van Langen F, van Rantwijk F, Sheldon R. 2001. **Cross-linked aggregates of penicillin acylase: Robust catalysts for the synthesis of aggregates of β -lactam antibiotics.** J Mol Catal B- Enzym.11: 665-670.

Czichocki D, Dautzenberg H, Capan E, Vorlop K. 2001. **New and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme complexes in Lentikats.** Biotechnol Lett. 23:1303-1307.

Durieux A, Nicolay X, Simon J. 2000. **Continuous malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* entrapped in Lentikats.** Biotechnol Lett. 22:1679-1684.

Gröger H, Wilken J. 2001. **Application of L-Proline as Enzyme Mimic and Further New Asymmetric syntheses using small organic molecules as chiral catalysts.** Angew Chem Int Edit. 40 (3): 529-532.

López-Serrano P, Cao L, van Rantwijk, Sheldon RA. 2002. **Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases.** Biotechnol Lett. 24: 1379-1382.

Lozinsky V, Plieva F. 1998. **Polyvinilalcohol cryogels employed as matrices for cell immobilisation: Overview of recent research and developments.** Enzyme Microb Tech. 23: 227-242.

Maru I, Oshnishi J, Ohta Y, Tsukada Y. 2002. **Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase.** J Biosci Bioeng. 93: 295-306.

Nahálka J, Vikartovská, Hrabárová. 2007. **A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis.** J Biotechnol.134: 146-153.

Pruße U, Fox B, Kirschhoff M, Bruske F, Breford J, Vorlop KD. 1998. **The jet cutting method as a new immobilisation technique.** Biotechnol Tech. 12: 105-108.

Rebros M, Rosenberg M, Mlichová Z, Kristofíková L, Paluch M. 2006. **A simple entrapment of glucoamylase into Lentikats® as an efficient catalyst for maltodextrin hydrolysis.** Enzyme Microb Tech. 39: 800-804.

Suau T. 2007. Fuculosa-1-fosfat aldolasa com a biocatalitzador en síntesi: model cinètic i immobilització. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Wilson L, Illanes A, Benevides C, Pessela C, Abian O, Fernández-LaFuente R, Guisán JM. 2004. **Encapsulation of Crosslinked Penicillin G Acylase Aggregates in Lentikat: Evaluation of a Novel Biocatalyst in Organic Media.** Wiley Periodicals.Inc.

CAPÍTOL 10. CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR.

La tesi desenvolupada dins el grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada ha permès assolir tot un seguit de conclusions que es resumeixen tot seguit.

En el desenvolupament de soques destinades a produir l'aldolasa recombinant soluble d'interès, s'ha dissenyat una soca ben regulada i lliure de seqüències transposòniques tot minimitzant l'expressió de la proteïna secundària SHMT i per tant, que millora els sistemes d'expressió anteriors.

Considerant la part dedicada a l'estudi de cossos d'inclusió com a alternativa productiva, s'ha emprat un dels constructes dissenyats per produir FucA activa de forma insoluble. La puresa de l'aldolasa obtinguda i la seva activitat específica són elevades, de manera que representen uns bons catalitzadors en la seva forma lliure. Tanmateix, la immobilització mitjançant tecnologia Lentikat® ha permès la obtenció d'un biocatalitzador robust i estable a llarg termini. La seva aplicació efectiva en una reacció de síntesi estereoselectiva, així com també la possibilitat d'ésser reutilitzat el fan atractiu a nivell d'aplicació industrial.

Tot i que en aquesta tesi s'ha estudiat un medi d'autoinducció basat en lactosa per a la producció de FucA en forma de cossos d'inclusió, la seva utilització no ha estat implementada. Malgrat ésser capaç de redirigir l'expressió de FucA cap a la part insoluble, els nivells d'activitat biològica es veuen compromesos. Per aquesta raó, es continuà emprant un medi definit induït per IPTG, malgrat ésser un inductor tòxic i de

cost elevat. Per aquesta raó, es planteja la necessitat d'estudiar altres inductors alternatius com ara l'al·lactosa o bé la possibilitat de modificar el constructe per tal que sigui efectiu en medis d'autoinducció, mitjançant un plasmidi pET en el qual s'incorporés el gen FucA a fi d'obtenir cossos d'inclusió.

Les millores pendents pel que fa a les soques destinades a la producció de FucA en forma soluble, es centrarien en l'eliminació definitiva del gen de resistència a Ampicil·lina, per tal de millorar la soca de manera qualitativa. Pel que fa a les millores de tipus quantitatiu, anirien dirigides a un canvi de soca hoste. Les modificacions realitzades a nivell de plasmidi han resultat efectives, però han arribat al seu límit en termes productius. Per aquest motiu, es suggereix l'ús d'una soca emprada de manera rutinària arreu com és la BL21, la qual seria compatible amb l'esmentat plasmidi pET.

La soca BL21 posseeix un sistema d'expressió que conté un promotor fort T7 i un repressor LacI. Les còpies múltiples de l'operador lac en aquests plasmidis ajustarien el repressor lac com a resultat i l'activitat basal de la T7 no seria tan elevada, de manera que no permetria que diversos gens diana es mantinguessin de manera estable, la qual cosa podria significar una major reducció dels nivells de la proteïna SHMT.

D'altra banda, aquesta soca compta també amb una cua d'histidines (6xHis) que en facilita la purificació i un gen de resistència a Kanamicina que es pot mantenir, en cas que es vulgui conservar la selecció, o eliminar en cas que es vulgui incorporar el sistema auxotròfic basat en el gen *glyA*. Aquesta incorporació seria possible en cas que es tractés d'una soca BL21 de tipus DE3.

Finalment, l'aplicació dels cossos d'inclusió immobilitzats en partícules Lentikat® en una reacció de síntesi, podria ésser millorada en dos aspectes.

En primer lloc, per tal d'evitar les limitacions difusionals observades, es podria disminuir la càrrega enzimàtica o fins i tot, reduir el tamany de partícula; tot i que ambdues mesures haurien d'ésser estudiades exhaustivament.

Finalment, per evitar reaccions secundàries, es podria plantejar una addició controlada de substrats.

ANNEXES

A1. Calibracions dels mètodes analítics.

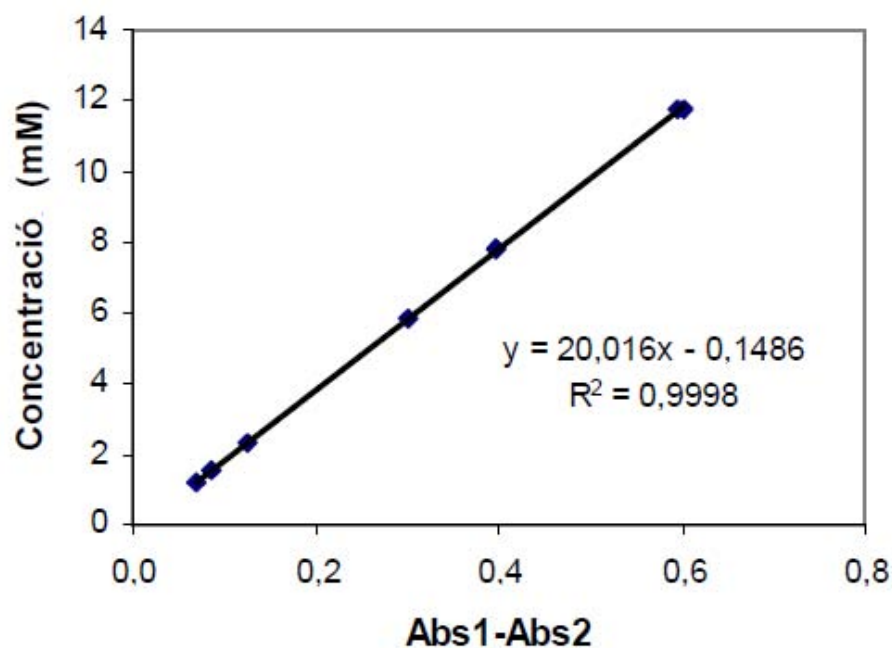


Fig. A.1. Calibració per a la determinació de la concentració de dihidroxiacetona fosfat (DHAP) a partir de la variació d'absorbància observada a 340 nm.

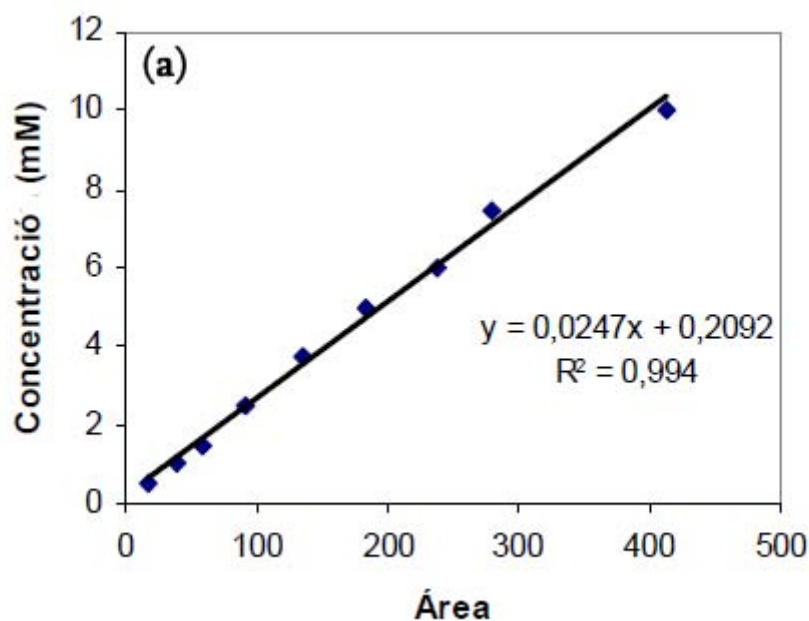


Fig. A.2. Calibració per a la determinació de la concentració de (S)-Cbz-alanina i producte d'addició a partir de l'àrea de pic obtinguda per HPLC en un medi 50 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 20 % v/v DMF a pH=7.

A.2. Identificació del transposó a la seqüència dels plasmidis pQE α β rham, pQE α β fucA i pREP4.

S'especifica la seqüència de la part de plasmidi més rellevant pel que fa a la identificació d'elements significatius en el fenomen de transposició: seqüència del transposó i de les FRT (en negreta).

A2.1. Plasmidi pQE α β rham (2568 pb-5401 pb)

gaggatccgagagcccgttttgacctccggtattcgtgtaggtactccggcgattaccctcgcggcttaaagaagccgaa
gcgaaagaactggctggctggatgtgtgacgtgctggacagcatcaatgatgaagccgttatcgagcgcataaaaggtaaag
ttctcgacatctgcgcacgttaccggtttacgcataagcgaacgggtattgctgtcaatgtgctcgttgctcatgccggatgc
ggcgtgaacgccttatccggcctacaaaactttgcaaattcaatatattgcaatctccgtgtaggcctgataagcgtagcgcatac
aggcaattttctttatgatcatcaaggcttccctcgggaagcctttctacgttatcgcgccatctagatttcagtgaatttatctct
tcaaatgtagcacctgaagtcagccccatacagataaagttgtaattctcatgtttgacagcttatcatcgataagcttcacgctgc
cgcaagcactcagggcgcaagggtgctaaaggaagcggaaacacgtagaaagccagtcgcgagaaacgggtgctgacccc
ggatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgaagagaaagcaggtagcttgcaaggggctta
catggcgatagctagactgggctgtttatggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaaggtgg
gaagccctgcaagtaactggatggctttctgccccaaggatctgatggcgaggggatcaagatctgatcaagagacag
gatgacggctgttcgcatgctgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatg
actgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgtccggctgtcagcgcagggcgccccgggttctttttgtcag
accgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcagacgagcagcgcggctatcgtgctggcacgacggcgtcttgcgcagctgt
gctcgacgtggtcactgagcgggaggactgctgcctatggcgatgctgggcaagattctctgtcaatcctcaccttgagtcacg
gcgacgacggcggcgagcggatggcttactcacggcggggatattgctatccacataatcgggaatcttacaaggaaaatg
tgtgaccgcgggccagccgattgtccggaacctccgccccgccgagttgctggcgttttccataggctccgccccctgacg
agcatcccacaggtctacgtcaagtcaaggtggccaaacgcgacatgactatagagatcccctgcgcttccccctggaatc
tcctcgtgcgttctctgttccgacctgccgcttaccggataacctggccgctttctccctcaggaagcgtgctcctttctcat
ctgtcacgctgaacgtatctcagttcgggtgtagtctgctcccggctggatgtgtgtgagaacccccgttcagacctacc
gctgcgccttagccggtaactatcgtcttgagacctaccgataaaaccctactatctgcactggcaacagccactgtgaaca
ggattattttagcgagggatgtccgccgtgctacatagttcttgaagtggggcctaactacggctacactacaaggacagtattt
ggatctgcgctctgctgaagccagttaccttctgaaaaagagttgtagctcttgatccggataatcaaccaccgctgataacg
gtggtttttgtttgtcagccgcatattacatgacgaagaaaacgatctgacacatgatcctttgatctttctacggggtctgatgc

tcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggcatgagattatcgtagaggatcgtcacctagatgctttgaccttaacaat
gaggttttacatcaatcttactgatatgaataaacttgcctgacgttgccatgctgagtcctgatgcacctatctcaaccgat
ctgtctatttcggcaaccatacttgcctgactcctcgtccgtgtacatcactaccatacggagggttaccatctggcctcagtg
ctgcaatgataccgcgagaccacgctcacggctccagattatcagccataaacagccagccagaaaggatctgagcgca
gagtcgttcatgcactttatccgcctacatgcagcctattcatggatgtctgcagctaagctacgctaggtccgccaggtccata
agaatttggcgacgacacacactcttctcagegaatctgtctatttcgtcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataa
ctacgatacgggagggttaccatctggccccagtgtgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatca
gcaataaacagccagccggaagggccgagcgca**gaagtggctctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattg**
ttgccgggaagctagagtaagtagttgccagttaatagtttgcgcaacgttgtgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgc
tcgtcgtttggtatggcttattcagctccggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcggt
tagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgcatgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctt
actgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatcgggcgaccgag
ttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcg
ggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttc gatgtaacceactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttt
tactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatg
ttgaatactcactcttctcttttcaatattattgaagcatttatcaggtttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaa
aataacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattagctat
aaaaataggcgtatcacgaggcccttctgtctcacctcgagaatcataaaaaatttattgcctttgtgagcggataacattataa
taagatccaattgtgagccgataaccatttccacgaatccttacgagaaatacttgagatc gatccatacattccgatccagaaaca
t

A2.2. Plasmidi pQE α fucA (1526 pb-4695 pb).

cgatgtaggagagcacatcgaactgatgcctccgaaaactacaccagcccgcgtaatgcaggcgcagggttctcagc
*****gen glyA*****

tgaccaacaatatgctgaaggttatccgggcaaacgctactacggcggttgagatggtgatcgttgacaactggcga
*****gen glyA*****

tcgatcgtgcgaaagaactgttcggcgtgactacgtaacgtccagccgactccggctcccaggctaactttgcggtctac
*****gen glyA*****

accgcgctgctggaaccaggtgataccgttctgggtatgaacctggcgcatggcggtcacctgactcacggttctccggtta
*****gen glyA*****

cttctccggtaaactgtacaacatcgttccttacggtatcgatgctaccggtcatatcgactacgccgatctggaaaaacaagcc
*****gen glyA*****

aaagaacacaagccgaaaatgattatcggtggtttctctgcatattccggcgtggtggactggcgaaaatcggtgaaatcgct
*****gen glyA*****

gacagcatcgggtgcttacgttctggtgatggcgacgttcgggcctggtgctgctggcgtctaccgaaccgggttctct
*****gen glyA*****

atgctcacgttggtactaccaccactcacaacacctggcgggtccgcggcggcctgatcctggcgaaaggtggtagcg
*****gen glyA*****

aaagctgtacaaaaactgaactctgccgtttccctggtggtcagggcgtccgtgatgcagtaatgccggtaaacgcg
*****gen glyA*****

ggtgctctgaaagaagcgtgggagcctgagttcaaaactaccagcagcaggtcgctaaaaacgctaaagcgtggtagaag
*****gen glyA*****

tgttcctcgagcgcggctacaaagtgtttccggcggcactgataaccacctgttctggtgatctggtgataaaaacctgac
*****gen glyA*****

cggtaaagaagcagacgccgctctgggccgtgtaacatcaccgtcaacaaaacagcgtaccgaacgatccgaagagcc
*****gen glyA*****

cgtttgacctccggtatctgtaggtactccgggcgattaccgctcgcggctttaaagaagccgaagcgaagaactgctg
*****gen glyA*****

ctgatgtgtgacgtgctggacagcatcatgatgagcgttatcgagcgcacccagtaagtctcggacatctggctacggttaac
*****gen glyA*****

gtaacgtataaggcgaaccgggtgaagttggcgtggtaggctagagcagcagactggctggtggtgatgtgtgacgt
*****gen glyA*****

gctggacagcatcaatgatgaagccgttatcgagcgcatacaaggtaaagtctcgacatctgcgcacgttacccggttacgc
*****gen glyA*****

ataagcgaacggtgattgctgcaatgtgctcgttgcctatgccggatgcggcgtgaacgcctatccggcctacaaaacttt
*****gen glyA*****

gcaaattcaatatattgcaatcctcgtgtaggcctgataagcgtagecgcacagggcaattttcgtttatgatcatcaaggcttctt
*****gen glyA***** *****gen CAT*** -----

cggaagcctttctacgttatcgccatctagaaatatttatctgattaataagatgatcttcttgagatcgttttgctcgcgct
-----Transposó Tn 5-----

aatctcttgcctgaaaacgaaaaaccgcttgcaggcgggtttcgaaggttctctgagctaccaactcttgaaccgaggtta
actggcttggaggagcgcagtcacaaaactgtccttccagtttagccttaaccggcgcagactcaagactaactcctctaa
atcaattaccagtggctgctgccagtggcttttgcagcttccgggttgactcaagacgatagttaccggataagggcga
ggctcggactgaacggggggtcgtgcatacagtcagcttggagcgaactgcctaccggactgagtgtaggcgtgg
aatgagacaaacgcggccataacagcggaaatgacaccgtaaacgaaaggcaggaacaggagagcgcacgaggaggagc
cgccaggggaaacgcctggatctttatagctcctgctgggttccaccactgattgagcgtcagattcgtgatgcttgc
ggggggcggagcctatggaaaacggcttccgcggccctctcacttccctgtaagtatcttctggcatcttccaggaaat
ctccgccccgttgcgaagcatttccgctcggcagtcgacgaccgagcgtagcagtcagtgaggagagcgcagatatacc
tgtatcacatattctgctgacgcaccggtgcagctttttctctgccaatgagcactcactgaatcctcatcagtgactagtaag
cagttacactcgtagctgaagttcgtcagcttttgcgaacatacaccgggacattcgggaagagttgtagctcttgatc
cggcaaacaccaccgctgtagcgggtggtttttggttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaag
atccttgccttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggtttggtcatgagattatcaaaaagg
atcttcactagatccttttaaaataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacctggctgacagttaccaatgc
ttaatcagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttgcctcatcagttgcctgactccccgctgtagataactacgatac
gggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaa
ccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagcttatttaattgttgcggg
aagctagagtaagtagttcggcagtaaatggttgcgcaacgttggcattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgtt
ggtatggctcattcagctccggttcccaacgatcaaggcagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctcct

tcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcat
gccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatggggcgaccgagttgctctt
gcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcga
aaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttca
ccagcgtttctgggtgagcaaaacaggagcaaatgccgcaaaaagggatacgcgaacggaatggttgaatactcatacctct
attccgagtattattgagcattatcaggtatggctccatggagcgcggatactatactgttgag.

A2.3. pREP4 (2565 pb- 3740 pb).

Cttttacctggactgtatgcacgaacccccgtagtccgaccgctgcgcttatccgtaactatcgtcttgagccaaccgg
aaagacatgcaaaagcaccactggcagcagccactggaattgatttagaggagttagtcttgaagtcacgcgccggttaagg
ctaaactgaaaggacaagttttggtgactgcgctcctcaagccagttacctcggttcaagagttgtagctcagagaacctc
gaaaaaccgcctgcaaggcgggtttttcgttttcagagcaagagattacgcgcagacaaaacgatctcaagaagatcatctt
-----Transposó Tn 5-----
attaatcagataaaaatatttctagatggcgcgataacgtagaaaggcttcccgaaaggaagccttgatgatcataaacgaaaatt
-----Transposó Tn 5-----
gcctgatgcgctacgcttatcaggcctacacggagattgcaatatattgaatttgcaaagttttgtagccgggataaggcgttac
gccgcatccggcatgaacaacgagcacattgacagcaaatcaccgttcgcttatgcgtaaacgggtaacgtgcgcagatgt
cgagaactttacctttgatgcgctcgataacggcttcatcattgatgctgtccagcacgtcacacatccagccagccagttcttc
gcttcggcttctttaaagccgcgacgggtaacgccggagtagcttacacgaataccggaggtcacaacgggctcttcggatc
gttcggtacgctggtttgtgacggtgatgtagcacggcccagagcggcgtctgcttcttaccggtcaggttttatcaaccag
atcaaccaggaacaggtggttatcagtgccgccgaaaccactttgtagccgcgctcgaggaacacttctaccatcgttttagc
gttttagcgacctgctgctggttaagttttgaactcagctccatcgttctttcagagcaccgcttacggcgattacgtgcatcacg
gaccgccctgaccacagggaaacgcagagttcagttttgtacagctctcgtctaccacttcgccaggatcagccgcgcgcga
cggcagggatttggagtgggtgtagtacacgtggacatgaagacgtcgttagagtcgcagcacaggccgcaactg

A3. Càlcul dels mg de FucA en cada fracció.

Per tal de realitzar aquest càlcul cal conèixer: els mg de proteïna/ mL, els g pes sec/ L i la proporció de FucA envers la resta de proteïnes (resultat de la densitometria). La obtenció dels dos primers valors s'explica a continuació.

A3.1. Concentració de proteïna (mg de proteïna /mL).

Aquest valor s'assoleix a partir del mètode Bradford que permet quantificar la proteïna total tot relacionant absorbància mesurada a 595 nm amb concentració proteica en mg/mL.

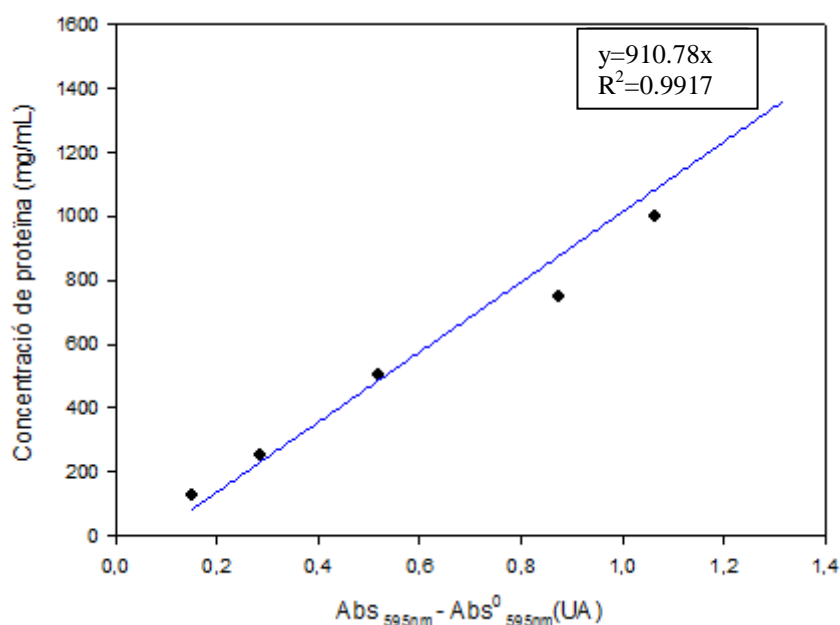


Fig. A3.1. Exemples de calibracions a partir de patrons d'albumina de sèrum boví (BSA) en la determinació de la concentració de proteïna total mitjançant el mètode Bradford en un rang de 100 a 1500 µg/mL.

A3.2. Quantitat de pes sec (g/L).

La quantitat de pes sec (g/L) es relaciona amb el factor de correlació 0.266 determinat per la Fuculosa-1-fosfat aldolasa (Durany, 2003).

$$\frac{\text{g pes sec}}{L} = DO_{600nm} \cdot 0.266$$

Considerant per exemple que s'ha obtingut un valor de 216.7 µg/mL de l'anàlisi Bradford, el quocient d'aquest entre la quantitat de pes sec (0.65 g pes sec/L) dóna una quantitat expressada en µg proteïna/ pes sec. Si es realitza el producte d'aquesta amb el valor de la densitometria (prenent un valor de 46 % de FucA), s'obtenen µg FucA/g pes sec, que es poden passar a mg FucA/ g pes sec.

$$\frac{(\mu\text{g proteïna/ mL}) \cdot 1000}{\text{g pes sec/L}} = \frac{216.7 \mu\text{g/mL} \cdot \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}}}{0.65\text{g pes sec/L}} = 334162 \mu\text{g/ pes sec}$$

$$\frac{\mu\text{g FucA}}{\text{g pes sec}} = \frac{\mu\text{g proteïna total}}{\text{g pes sec}} \cdot \frac{\% \text{ FucA}}{100} = \frac{334162 \mu\text{g}}{\text{g pessec}} \cdot \frac{46}{100} = 152348 \frac{\mu\text{g FucA}}{\text{g pessec}}$$

El valor resultant de 152.3 mg FucA/g pes sec pot ésser comparat directament amb altres valors si es considera una base de càlcul de 1 g pes sec.

A3.3. Càlcul de l'error estàndard.

L'error es pot expressar mitjançant l'anomenat valor estadístic normalitzat o error estàndard. Aquest usat en experiments de difícil reproductibilitat, com ara en la part de

la tesi dedicada a cossos d'inclusió, es va decidir aplicar a tots els anàlisis importants. Es defineix com la diferència entre el valor i la mitjana aritmètica dels valors (x), dividida per un nombre reduït de mostres (N) i es pot expressar mitjançant la fórmula següent en la qual apareix la variància (Sx).

$$\sigma_{est} = \sigma_x = \sqrt{\frac{N \sum_{j=1} (x_j - \bar{x})^2}{N(N-1)}} = \frac{Sx}{\sqrt{N}}$$