

05/2012

Nou mètode per mesurar un inductor de proteïnes recombinants



L'IPTG és un sucre sintètic anàleg de la lactosa que s'utilitza per a la inducció de la producció de proteïnes en el bacteri *Escherichia coli*. En la present tesi doctoral s'ha desenvolupat per primera vegada un mètode analític per mesurar l'IPTG en el medi de cultiu i dins de les cèl·lules que ha permès estudiar el comportament d'inducció en cultius d'alta densitat cel·lular així com optimitzar la seva dosi per obtenir la màxima quantitat de producte.

L'operó *lac* és un grup de tres gens que regulen el transport i el metabolisme de la lactosa que utilitza el bacteri *E. coli* com a font de

carboni. Aquest sistema de regulació gènica s'utilitza com a model didàctic en diversos Graus de les Ciències Experimentals (biologia, biotecnologia, microbiologia,...). Tot i que es porta estudiant l'operó *lac* durant dècades, aquest continua sent un dels paradigmes de la regulació gènica. Els avenços en biotecnologia han permès desenvolupar factories cel·lulars per a la producció de proteïnes utilitzant sistemes d'expressió derivats de l'operó *lac*. Una de les estratègies operacionals emprades més comunament és el cultiu alimentat en un bioreactor de tanc agitat (veure fotografia) on es pot obtenir fins a 100 grams de pes sec cel·lular per cada litre de cultiu.

Abans d'aquest treball de tesi no es disposava de cap eina analítica que pogués quantificar l'IPTG, el qual s'empra com a inductor de proteïnes recombinants (fàrmacs, productes alimentaris, cosmètics,...). El nostre grup de recerca ha pogut desenvolupar un mètode ràpid i molt fiable sense gairebé manipulació de les mostres mitjançant HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) per poder mesurar aquest inductor. Aquest mètode ha estat validat sota les guies de la FDA (Food and Drug Administration).

L'anàlisi de l'IPTG ens ha permès estudiar quins són els patrons de distribució tant al medi de cultiu com dins de les cèl·lules i hem observat diferents comportaments en funció de la concentració inicial d'IPTG utilitzada. Hem pogut comprovar de manera experimental que el nostre sistema d'expressió derivat de l'operó *lac* es comporta de manera biestable ja que coexisteixen dos fenòmens de transport de l'inductor: la difusió i el transport actiu mitjançant la proteïna transmembrana lac-permeasa la qual està codificada per un dels tres gens que formen l'operó *lac*. Una altra possible explicació, és la coexistència de cèl·lules induïdes i d'altres no induïdes en el rang biestable.

Hem observat que la lac-permeasa té un paper poc important a concentracions d'inductor dins el bioreactor per sota d'un llindar (40 μ M IPTG) i això coincideix amb valors intermedis d'activitat de la proteïna recombinant, mentre que per sobre d'aquest valor, la lac-permeasa té un rol important transportant l'inductor a través de la membrana cel·lular coincidint amb valors màxims de la proteïna. En absència d'aquesta proteïna transportadora es pot assumir que l'IPTG entra dins la cèl·lula per difusió. Aquesta elucidació ha estat un dels temes de controvèrsia àmpliament discutits a la literatura.

En concret, la proteïna recombinant produïda és una aldolasa que s'utilitza com a biocatalitzador per sintetitzar compostos que tenen

potencial aplicació a la indústria farmacèutica. Des del punt de vista de producció, hem pogut obtenir la màxima activitat de proteïna recombinant utilitzant una concentració vint-i-cinc vegades menor que la recomanada pel fabricant permetent així un estalvi econòmic important.

Les principals aportacions d'aquest treball de tesi han estat el desenvolupament d'un mètode analític per mesurar l'IPTG, una molècula emprada com a inductor de proteïnes recombinants i obtenir dades experimentals que s'han contrastat amb hipòtesis teòriques i models matemàtics que s'havien realitzat anteriorment. Així doncs, també hem pogut minimitzar la quantitat necessària d'inductor per obtenir el màxim de la nostra proteïna d'interès.

Alfred Fernández Castañé

Alfred.Fernandez@uab.cat

Referències

“Study of transport mechanisms involved in IPTG uptake by E. coli in high cell density cultures” Tesi doctoral d'Alfred Fernández Castañé defensada el 20 d'abril de 2012 sota la direcció de Josep López Santín i Glòria Caminal Saperas.

[View low-bandwidth version](#)