



**Universitat Ramon Llull**

## **TESI DOCTORAL**

Títol: Enginyeria metabòlica en *E.coli* per la producció de glicoglicerolípid

Realitzada per: Neus Mora i Buyé

en el Centre Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull)

i en el Departament de Bioenginyeria

Dirigida per Magda Fajjes Simona i Antoni Planas i Sauter



Arriba el moment aquell tan esperat i difícil: el moment d'escriure els agraïments. Esperat per tenir la oportunitat d'agrair a tothom qui m'ha ajudat, acompanyat, recolzat al llarg d'aquests tres anys i mig de tesi doctoral. I, difícil, per poder recollir totes les sensacions viscudes en només una pàgina.

En primer lloc m'agradaria agrair al Toni la oportunitat de formar part del seu grup de treball. Al laboratori he crescut com a persona però sobretot com a científica i ho he fet acompanyada en tot moment de la Magda. Per mi tu has estat la peça clau per iniciar la tesi permetent-me demanar la beca que he tingut la gran sort de gaudir durant aquests anys, però també, sent la clau per anar tirant endavant dia a dia i superar cada una de les etapes que comporta fer el doctorat. Espero que per tu hagi estat com a mínim la meitat d'enriquidor del que ha estat per mi i que recordis sempre amb alegria els anys de la teva primera doctorant.

M'agradaria recordar a tota la gent que per una banda o una altra han format part d'aquests anys de la meua vida. Per començar, agrair a la Marta Palomo la meravellosa introducció que em va fer al món de la bioquímica, i l'energia que em va transmetre des d'un principi. A més, em va permetre arribar al Laboratori de Bioquímica coneixent una mica més el tarannà i la forma de ser del que seria la gran família del laboratori amb els que hem viscut experiències de tot tipus: des de sortides a la platja, la fageda, esquíades, calçotades, el Canigó, el Puigmal... Començant pels veterants: en Joao que amb els teus ànims, amb el teu saber fer, amb la teua gran experiència (en segons quins temes...), els teus comentaris i les llargues converses m'han fet créixer molt i m'han fet veure el món des d'una altra perspectiva. En Trevor, el "ianqui" del laboratori, amb les teves aventures no hi havia dinar sense rialles i, tot i intentar semblar molt dur, m'has demostrat en més d'una ocasió que tens un cor molt i molt gran. Espero que algun dia ens puguem veure per les teves terres i seguim com hem fet fins ara. A la Núria, la mami, que amb la teua paciència vas aconseguir que el màster fos més lleuger i que cada dia quan arribàvem al laboratori tot fos al seu lloc. A l'Albert, el lince, el papi, l'esquirol... bé, l'ànima que m'ha donat força més d'una vegada per tirar endavant. Gràcies per viure-ho tot tant i per organitzar les magnífiques calçotades i festes a l'hort. A la Pilar per les esquíades a Andorra i els grans moments de "playback". A l'Andrea de qui he d'agrair els meus coneixements de microbiologia i les classes de microscopi. Gràcies per parar-ho tot sempre que t'he necessitat.

A la Rosa pel seu somriure permanent, l'Anto pels acudits, especialment el de la granoteta, l'Anna per tenir sempre l'orella a punt per escoltar-me en tot moment, la Mercè, per ajudar a defensar la Catalunya Central, en Lepage per fer de guia de muntanya, la Victòria per compartir sobretot aquests últims temps i molt especialment el congrés a Granada, has de seguir sempre així. I l'Ori per tenir tanta paciència amb mi i la cromatografia, sense tu tot hagués estat molt més complicat. A l'Anabella pels últims experiments i els consells que m'has donat.

També m'agradaria agrair a tota la gent nova del laboratori. Alguns ens vam conèixer al màster on vaig intentar ensenyar-vos tot el que jo he anat aprenent durant aquest temps, d'altres fa molt i molt poc que ens coneixem però tot i així hem compartit alguns aniversaris i celebracions. A tots molts ànims per continuar!!

Moltes gràcies al laboratori de Cromatografia de l'IQS, al Francesc Broto pels seus consells i molt especialment a la Cristina que a part de donar-me ànims m'ha posat totes les facilitats del món per poder fer els assaigs de gasos.

Gràcies al laboratori de Biologia Molecular de l'IBB, sobretot al Miquel, per permetre'm fer els assaigs de radioactivitat. I en Salva de la unitat d'imatge de la facultat de Bioquímica de l'UAB per facilitar-me el procés de quantificació.

Moltes gràcies pels cafès, xerrades, ànims i prestacions d'equip a la Gemma, en Gregori i la Mònica del CSIC.

Per acabar, m'agradaria agrair al Jesús, la Gemma i l'Ari per ser qui sou. Gràcies per escoltar-me tot i parlar de temes aliens als vostres i recolzar-me en tot moment. Gràcies per deixar-me desfogar i fer-me riure quan ho he necessitat.

I, finalment, a vosaltres pares. Ja sabeu que sense vosaltres jo no hagués arribat fins aquí. Espero que el meu optimisme i alegria us compensi els grans esforços que heu dipositat en mi i que dia rere dia seguim sent la família unida que formem. Tots sabem que la vida és dura, per això, hem de celebrar les alegries per petites que siguin. Gràcies Oriol. Ets el millor germà que hagi pogut tenir. Des de petita has confiat en mi i m'has donat ànims per tirar endavant, sempre amb la màxima responsabilitat i sinceritat. Gràcies Glòria per ser com una germana més. Sempre tens un moment per escoltar-me. I sobretot gràcies als dos per portar al món el Guim, l'alegria de la casa des de fa dos mesos, i deixar-me ser la seva padrina. I per acabar, agrair al Miquel tota la paciència i energia. Una part d'aquesta tesi et pertoca simplement per l'esforç que hi has deixat. Han estat anys molt difícils. Els dos hem pres decisions molt importants però mai hem deixat de confiar un amb l'altre ni hem deixat enrere la força que ens ha portat fins aquí. Gràcies pels petits gestos que em demostren cada dia el perquè de la vida.

L'enginyeria metabòlica és una estratègia molt útil per produir molècules d'alt valor afegit mitjançant microorganismes. Molècules d'interès per la seva funció biològica, d'estructura complexa i amb dificultats en la seva obtenció i síntesi s'han obtingut de forma molt satisfactòria mitjançant aquesta metodologia (Ruffing i Chen, 2010).

En el laboratori de Bioquímica de l'IQS s'estudia la glicosiltransferasa de *Micoplasma genitalium* codificada pel gen *mg517* i responsable de la síntesi de glicoglicerolípid (Andrés *et al.*, 2011). S'ha vist que aquesta proteïna sobreexpressada en *E.coli* és funcional i acumula diferents glicoglicerolípid en la membrana plasmàtica. Aquests glicoglicerolípid mostren diferents punts d'interès. D'una banda, són tensioactius d'alt valor afegit que permeten la construcció de niosomes per l'alliberament controlat de fàrmacs i, d'altra banda, s'han relacionat com agents terapèutics amb inhibició de tumors cancerígens.

Degut al creixent interès d'aquests productes, en el present treball s'ha escollit *E. coli* com a microorganisme a modificar per enginyeria metabòlica per la producció de glicoglicerolípid, ja que per una banda, no presenta aquests lípid però sí sintetitza els seus precursors UDP-glucosa (UDP-Glc) i diacilglicerol (DAG). S'han dissenyat diferents soques d'*E.coli* on se sobreexpressen la glicosiltransferasa MG517 i, a més, la uridiltransferasa GalU procedent d'*E.coli* JM109, que sintetitza el precursor UDP-Glc a partir de glucosa 1-fosfat, i l'aciltransferasa PlsC involucrada en la biosíntesi del precursor DAG.

En les soques on les proteïnes GalU i PlsC s'han sobreexpressat, les seves activitats han augmentat 220 i 80 vegades, respectivament. La glicosiltransferasa MG517 és activa en totes les soques però, sorprenentment, la seva activitat després de les cinc hores d'inducció és 10 vegades inferior quan es dona la coexpressió de MG517 i PlsC. S'observa que la sobreproducció de UDP-Glc no incrementa la quantitat total de glicoglicerolípid mentre que el DAG sí, de manera que la soca AbC amb els gens *mg517* i *plsC* és la que sintetitza més glicoglicerolípid, arribant a nivells de 1059 nM per biomassa. Dels tres glicoglicerolípid formats, el diglucosilacilglicerol és sempre el més abundant i el seu percentatge varia entre 57 i 82% en funció de la coexpressió dels enzims. La producció d'aquests nous lípid en la membrana d'*E. coli* implica que el percentatge del fosfolípid fosfatidiletanolamina disminueixi un 20%, mentre els fosfolípid aniònics es mantenen constants.

Es conclou que la soca modificada d'*E. coli* AbC és una bona plataforma per la producció de nous glicolípid amb diferent estructura.



Metabolic engineering is a useful strategy to achieve target molecules using microorganisms. Molecules of high biological value, with complex structure and difficulties to be obtained and synthesised, as for example, glycoconjugates, have been successfully obtained by this methodology (Ruffing i Chen, 2010). Our group studies the *Mycoplasma genitalium* glycosyltransferase encoded by *mg517* gene and responsible of glycolipid synthesis. (Andrés *et al.*, 2011). This protein overexpressed in *E. coli* is functional and accumulates the glycolipids in its plasma membrane.

These glycolipids have different points of interest. On one hand, they are biosurfactants and even can form vesicles for drug delivery systems. On the other hand, they have been related to inhibition of cancer tumors. Due to growing interest of these products, and in order to improve production of glycolipids, different metabolic engineered *E. coli* strains have been designed in this work. This microorganism has been chosen since on the one hand, it does not produce these lipids but its metabolism produces the glycolipid precursors, UDP-glucose and diacylglycerol (DAG). In these strains, the glycosyltransferase is coexpressed with genes related to biosynthesis of both precursors. Therefore coexpression of the glycosyltransferase MG517, the uridylyl transferase GalU from *E. coli* JM109, which synthesizes the precursor UDP-glucose from glucose-1-phosphate, and the acyl transferase PlsC involved in the biosynthesis of the precursor DAG have been studied.

Once modified strains were constructed, their phenotype have been analysed. On one hand, the three enzymatic activities have been determined *in vitro* from the cell extracts. When GalU and PlsC were overexpressed, their activities increased 220 and 80-fold, respectively, compared to the controls. The glycosyltransferase MG517 was active in these modified strains but, surprisingly, its activity decreases 10-fold when MG517 and PlsC were coexpressed. It is observed that overproduction of UDP-glucose does not increase total glycolipids amount while DAG have a positive impact on this production, being strain with *mg517* and *plsC* genes which produces more glycolipids achieving 1059 nM per biomass. . Furthermore, the modified strains showed different glycolipid profiles. In all strains the disaccharide glycolipid is the most abundant but its percentage varies from 57% to 82% depending on enzyme coexpression. Production of these new lipids in *E. coli* membrane implies less synthesis of phosphatidylethanolamine phospholipid, which is characteristic of this microorganism.

Our results show the modified *E. coli* strain with *mg517* and *plsC* genes is a good platform microorganism for the production of new glycolipids with different structure.





## ABREVIACIONS

14:0: àcid mirístic  
 16:0: àcid palmític  
 16:1: àcid palmitoleic  
 17:0 $\Delta$ : àcid 2-hexilciclopropanoic  
 18:0: àcid esteàric  
 18:1: àcid oleic  
 18:2: àcid linoleic  
 19:0 $\Delta$ : àcid 2-octilciclopropanoic  
 2D: 2 dimensions  
 abc: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+) / pCDF-1b / pRSF-1b  
 aBc: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+) / pCDF-galU / pRSF-1b  
 abC: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+) / pCDF-1b / pRSF-plsC  
 aBC: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+) / pCDF-galU / pRSF-plsC  
 Abc: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+)-mg517 / pCDF-1b / pRSF-1b  
 ABc: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+)-mg517 / pCDF-galU / pRSF-1b  
 AbC: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+)-mg517 / pCDF-1b / pRSF-plsC  
 ABC: *E.coli* BL21(DE3) *star* amb pET44b(+)-mg517 / pCDF-galU / pRSF-plsC  
 $\alpha$ -GalCer:  $\alpha$ -galactoceramida  
 Amp: ampicil·lina  
 ATCC: American Type Culture Collection  
 ATP: adenosina trifosfat  
 BCA: àcid bicincohònic  
 BSA: Bovin Serum Albumin  
 CdsA: CDP-diglicèrid sintasa  
 CHAPS: (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate)  
 CL: cardiolipina  
 Cls: cardiolipina sintasa  
 CMP: citidina monofosfat  
 CTP: citidina trifosfat  
 CV: coeficient de variació  
 DAG: diacilglicerol / diacylglycerol  
 DAR1: glicerol 3-fosfat deshidrogenasa  
 dG: energia de Gibbs  
 DGDAG: diglicosildiacylglicerol  
 DgkA: diacylglicerol quinasa  
 dhaB1, dhaB2, dhaB3: glicerol deshidratasa  
 dhaBX, orfX: factors d'activació de glicerol deshidratasa  
 DHAP: dihidroxiacetona fosfat  
 DOG: dioleoilglicerol  
 DOPG: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol-3-phospho-*rac*-(1-glycerol)  
 DTNB: àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic)

DTT: Dithiothreitol  
 ELS: *Evaporative Light Scattering*  
 FID: Detector d'ionització de Flama  
 G3P: glicerol 3-fosfat  
 G6P DH: glucosa 6-fosfat deshidrogenasa  
 Gal: galactosa  
 GalE: UDP-galactosa 4-epimerasa  
 GalU: UDP-glucosa pirofosforilasa / glucosa 1-fosfat uridiltransferasa  
 GAP: glicerolaldehid fosfat  
 gap: glicerol 3-fosfat deshidrogenasa  
 GC: cromatografia de gasos  
 GL: glicolípide  
 Glc: glucosa  
 GldA: glicerol deshidrogenasa  
 Glic: glicerol  
 GlpF: facilitador de glicerol  
 GlpK: glicerol quinasa  
 GlpT: transportador de glicerol 3-fosfat  
 GPP2: glicerol 3-fosfat fosfatasa  
 GT2: glicosiltransferasa de la família 2  
 HEPES: àcid 4-(2-hidroxietil)piperazine-1-etansulfonic  
 HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*  
 HSCoA: coenzim A  
 IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
 Kan: kanamicina  
 KEGG: Kyoto Enciclopedia de Gens i Genomes  
 LB: Luria Bertani  
 $\lambda_{\text{màx}}$ : longitud d'ona màxima  
 LPA: àcid lisofosfatídic  
 MalP: maltodextrinofosforilasa  
 MCS: *multiple cloning site*  
 MG517: glicosiltransferasa de *Mycoplasma genitalium*  
 MGalDEG: monogalactosildiestearilglicerol  
 MGDAG: monoglicosildiactilglicerol  
 $\mu_{\text{màx}}$ : velocitat de creixement màxima  
 NAD<sup>+</sup> / NADH:  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotid  
 NADP<sup>+</sup> / NADPH: b-nicotinamide adenina dinucleotid fosfat  
 OD<sub>600</sub>: densitat òptica a 600 nm  
 ON: *over-night*  
 OtsA: trehalosa 6-fosfata sintasa  
 PCR: reacció de polimerització en cadena  
 PE: fosfatidiletanolamina  
 PEP: fosfoenolpiruvat  
 PG: fosfatidilglicerol  
 PGM: fosfoglucomutasa

PgpA: fosfatidilglicerol fosfatasa A  
PgpB: fosfatidilglicerol fosfatasa B  
PgsA: fosfatidilglicerol fosfat sintetasa  
Pi: fosfat  
PlsB: *sn*-glicerol 3-fosfat aciltransferasa  
PlsC: 1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat aciltransferasa  
PnuE: CDP-diacilglicerol fosfatidilhidrolasa  
PPi: pirofosfat  
Psd: fosfatidilserina decarboxilasa  
PssA: fosfatidilserina sintasa  
PtsG: sistema PTS per glucosa  
RCOSCoA: àcid gras amb coenzim A  
RMN: ressonància magnètica nuclear  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SmR: estreptomycina  
T<sub>f</sub>: temperatura de fusió  
TG DAG: triglicòsildiacilglicerol  
Tincub: temperatura d'incubació  
TLC: *thin layer chromatography* / cromatografia de capa fina  
TNB: 2-nitro-5-tiobenzoat  
tpi: triosa fosfat isomerasa  
t<sub>R</sub>: temps de retenció  
Tris: 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol  
UDP: uridina difosfat  
UDP-Gal: UDP-galactosa  
UDP-Glc: UDP-glucosa  
UGD: UDP-glucosa 6-deshidrogenasa  
UPLC-ES+/TOFMS:  
UTP: uridina trifosfat  
UV: ultraviolat  
Vo: velocitat inicial  
XocT: xoc tèrmic  
yqhD: oxidoreductasa



<b>Abreviacions .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>1 INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>1 Enginyeria metabòlica .....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>2 Els glicolípidos .....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1 Estructura dels glicolípidos .....	- 25 -
2.2 Funció dels glicoglicerolípidos .....	- 26 -
2.3 Interès dels glicolípidos .....	- 27 -
2.3.1 Els glicolípidos com a tensioactius d'alt valor afegit .....	- 27 -
2.3.2 Els glicolípidos com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs .....	- 28 -
2.3.3 Els glicolípidos per la inhibició de tumors mitjançant NKT cells.....	- 30 -
2.4 Producció dels glicoglicerolípidos .....	- 32 -
2.4.1 Síntesi orgànica .....	- 33 -
2.4.2 Síntesi quimioenzimàtica.....	- 34 -
2.4.3 Síntesi a partir de microorganismes.....	- 36 -
<b>2 OBJECTIUS .....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>3 RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>Capítol 1: Disseny d'enginyeria metabòlica .....</b>	<b>- 41 -</b>
1.1 Enginyeria metabòlica en <i>E.coli</i> .....	- 41 -
1.2 Estudi del metabolisme cel·lular d' <i>E.coli</i> .....	- 42 -
1.2.1 Metabolisme de l'UDP-glucosa .....	- 42 -
1.2.2 Metabolisme del 1,2-diacilglicerol .....	- 45 -
1.3 Coexpressió de proteïnes en <i>E.coli</i> .....	- 48 -
1.3.1 Coexpressió en <i>E.coli</i> amb múltiples vectors.....	- 49 -
1.3.2 Coexpressió en <i>E.coli</i> amb un sol vector .....	- 50 -
1.4 Construcció dels vectors de coexpressió dels gens <i>galU</i> , <i>plsC</i> i <i>mg517</i> . .....	- 50 -
1.4.1 Disseny dels vectors de coexpressió.....	- 50 -
1.4.2 Construcció dels vectors pCDF – <i>galU</i> i pRSF - <i>plsC</i> .....	- 52 -
1.4.2.1 Obtenció dels gens <i>galU</i> i <i>plsC</i> .....	- 53 -
1.4.2.2 Digestió dels gens <i>galU</i> i <i>plsC</i> i els plasmidis pCDF-1b i pRSF-1b.....	- 56 -
1.4.2.3 Lligació entre gens i vectors .....	- 58 -
1.4.2.4 Anàlisi de seqüenciació.....	- 58 -
1.4.3 Construcció del vector pET44b(+) – <i>mg517</i> .....	- 59 -
1.4.3.1 Digestió dels plasmidis pET38b(+) – <i>mg517</i> i pET44b(+) .....	- 60 -
1.4.3.2 Lligació entre gen i vector .....	- 60 -
1.4.3.3 Anàlisi de seqüenciació.....	- 61 -

<b>Capítol 2: Soques modificades per enginyeria metabòlica.....</b>	<b>- 63 -</b>
2.1 Condicions de creixement i viabilitat.....	- 64 -
2.1.1 Selecció del medi de cultiu .....	- 64 -
2.1.2 El medi de cultiu relacionat amb les tècniques d'expressió d'MG517.....	- 66 -
2.2 Anàlisi de la coexpressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC .....	- 71 -
2.2.1 Coexpressió de les proteïnes MG517 i GalU .....	- 71 -
2.2.2 Coexpressió de les proteïnes MG517 i PlsC.....	- 73 -
2.2.3 Coexpressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC.....	- 75 -
2.3 Estudi de la lisi cel·lular.....	- 77 -
2.4 Seguiment del creixement al llarg del temps .....	- 80 -
2.5 Estudi de l'estabilitat dels plasmidis.....	- 83 -
<b>Capítol 3: Anàlisi del fenotip de les soques modificades .....</b>	<b>- 85 -</b>
3.1 Activitats enzimàtiques dels extractes cel·lulars.....	- 85 -
3.1.1 Activitat UDP-glucosa pirofosforilasa .....	- 85 -
3.1.2 Activitat 1-acil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfat aciltransferasa.....	- 88 -
3.1.3 Activitat glicosiltransferasa MG517 .....	- 91 -
3.2 Els glicoglicerolípid de les soques modificades.....	- 94 -
3.2.1 Identificació dels glicoglicerolípid.....	- 94 -
3.2.2 Anàlisi dels glicoglicerolípid per UPLC – ES+/TOFMS .....	- 96 -
3.2.2.1 Determinació d'àcids grassos per cromatografia de gasos .....	- 100 -
3.2.2.1.1 Determinació dels àcids grassos de MGDAG i DGDAG purificats .....	- 100 -
3.2.2.1.2 Determinació dels àcids grassos totals de les soques modificades.....	- 104 -
3.2.2.2 Quantificació de glicoglicerolípid per UPLC - ES+/TOFMS .....	- 105 -
3.2.2.2.1 Anàlisi dels cromatogrames .....	- 108 -
3.2.2.2.2 Quantificació dels glicoglicerolípid.....	- 110 -
3.2.2.2.3 Quantificació dels àcids grassos dels glicolípid per UPLC – ES(+)/TOF ..	- 114 -
3.3 Anàlisi dels lípid de <i>E.coli</i> en presència de glicoglicerolípid.....	- 118 -
4. CONCLUSIONS .....	125
5. PART EXPERIMENTAL.....	129
<b>Part 1: Biologia molecular .....</b>	<b>- 131 -</b>
Protocol 1.1: Revifament de la soca comercial <i>E.coli</i> JM109.....	- 131 -
Protocol 1.2: Extracció i purificació d'ADN genòmic.....	- 132 -
Protocol 1.3: Quantificació d'ADN genòmic i plasmídic.....	- 133 -
Protocol 1.4: Reacció de polimerització en cadena o PCR .....	- 133 -
Protocol 1.5: Electroforesis en gel d'agarosa de l'1% .....	- 135 -

Protocol 1.6: Purificació d'ADN a partir d'una electroforesi en gel d'agarosa. ....	- 135 -
Protocol 1.7: Transformació de cèl·lules .....	- 136 -
Preparació de cèl·lules competents. ....	- 136 -
Transformació tèrmica de les cèl·lules .....	- 137 -
Protocol 1.8: Purificació d'ADN plasmídic amb el <i>Gene Elute™ HP Plasmid Midiprep kit</i> ..	- 137 -
Protocol 1.9: Purificació d'ADN plasmídic amb el <i>Gene Elute™ Plasmid Miniprep kit</i> ..	- 138 -
Protocol 1.10: Digestió d'ADN amb l'enzim de restricció <i>NcoI</i> . ....	- 138 -
Protocol 1.11: Digestió d'ADN amb l'enzim de restricció <i>AvrII</i> .....	- 139 -
Protocol 1.12: Doble digestió d'ADN amb els enzims de restricció <i>NdeI</i> i <i>AvrII</i> .....	- 139 -
Protocol 1.13: Lligació de gen i vector .....	- 140 -
Protocol 1.14: Anàlisi de seqüenciació .....	- 141 -
<b>Part 2: Creixement cel·lular i anàlisi qualitatiu .....</b>	<b>- 143 -</b>
Protocol 2.1: Creixement cel·lular en medi definit .....	- 143 -
Pas de placa .....	- 143 -
Preinòcul .....	- 143 -
Creixement en matràs Erlenmeyer .....	- 143 -
Creixement en bioreactor.....	- 144 -
Inducció.....	- 145 -
Protocol 2.2: Extracte lipídic.....	- 145 -
Protocol 2.3: Cromatografia de capa fina .....	- 145 -
Protocol 2.4: Preparació dels extractes cel·lulars .....	- 146 -
Protocol 2.5: Electroforesi en gel d'acrilamida SDS-PAGE .....	- 147 -
Protocol 2.6: Digestió tròpsica de la proteïna PlsC .....	- 147 -
Rentada de la banda del gel .....	- 147 -
Reducció i alcalinació dels residus cisteïnes.....	- 148 -
Digestió .....	- 148 -
Extracció dels pèptids i anàlisi .....	- 149 -
<b>Part 3: Activitats enzimàtiques.....</b>	<b>- 150 -</b>
Protocol 3.1: Assaig acoblat per mesurar l'activitat específica de la proteïna GalU .....	- 150 -
Desenvolupament del mètode: G6PDH, PGM i GalU comercial.....	- 150 -
Determinació de l'activitat específica de l'enzim GalU obtingut experimentalment ..	- 151 -
Protocol 3.2: Assaig plsC .....	- 151 -
Desenvolupament del mètode .....	- 152 -
Protocol 3.3: Assaig mg517 .....	- 153 -
<b>Part 4: Anàlisi de lípids .....</b>	<b>- 156 -</b>
Protocol 4.1: Determinació del TGDAG .....	- 156 -
Metanòlisis alcalina.....	- 156 -

Acetilació i purificació.....	- 156 -
Protocol 4.2: Purificació de glicoglicerolípid.....	- 157 -
Protocol 4.3: Determinació d'àcids grassos.....	- 157 -
Protocol 4.4: Assaig UPLC-ES+/TOFMS.....	- 158 -
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>- 159 -</b>
<b>7. ANNEXES.....</b>	<b>- 175 -</b>
<b>Annex 1: Seqüenciacions d'ADN .....</b>	<b>- 177 -</b>
Seqüències del plasmidi pCDF-galU .....	- 177 -
Seqüències del plasmidi pRSF-plsC.....	- 181 -
Seqüències del plasmidi pET44b(+)-mg517.....	- 184 -
<b>Annex 2: Desenvolupament dels assaigs d'activitat .....</b>	<b>- 189 -</b>
A2.1 Assaig d'activitat per l'enzim GalU .....	- 189 -
A2.1.1 Desenvolupament del mètode.....	- 189 -
A2.1.1.1 Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH) .....	- 190 -
A2.1.1.2 Fosfoglucomutasa (PGM).....	- 192 -
A2.1.1.3 UDP – glucosa pirofosforilasa .....	- 193 -
A2.2 Assaig d'activitat per l'enzim PlsC.....	- 194 -
A2.2.1 Desenvolupament del mètode.....	- 195 -
A2.3 Assaig d'activitat per l'enzim MG517.....	- 197 -
A2.3.1 Adaptació del mètode desenvolupat .....	- 197 -
<b>Annex 3: Desenvolupament dels assaig dels lípids. ....</b>	<b>- 201 -</b>
A3.1 Anàlisi UPLC-ES+/TOFMS per quantificar glicoglicerolípid .....	- 201 -
A3.1.1 Validació del mètode .....	- 201 -
A3.1.2 Efecte matriu .....	- 205 -
A3.2 Autoradiografia de capa fina per determinar els diferents lípids de membrana....	- 207 -
A3.2.1 Desenvolupament del mètode.....	- 207 -
A3.2.1.1 Selecció de la fase mòbil.....	- 208 -
A3.2.1.2 Condicions de creixement i detecció de radiació .....	- 210 -



# 1 INTRODUCCIÓ



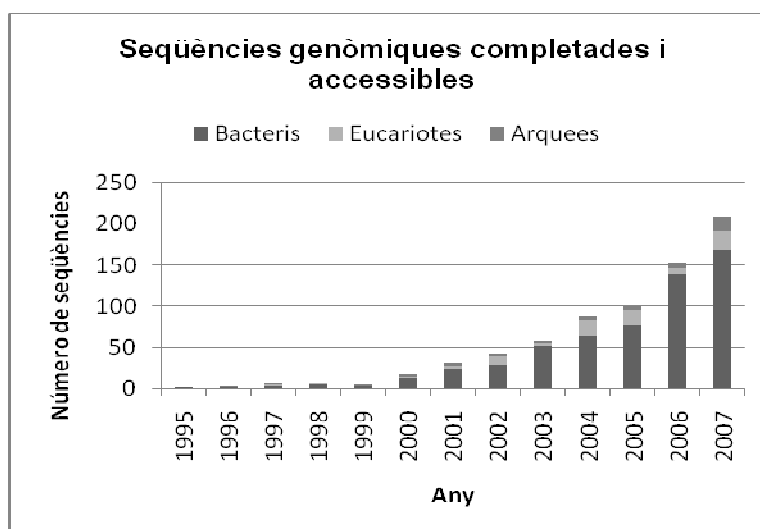
## 1 Enginyeria metabòlica

L'enginyeria metabòlica sorgí amb l'aparició de la tecnologia d'ADN recombinant que va permetre, per primer cop, la recombinació de gens entre diferents organismes. Mentre les primeres aplicacions de l'enginyeria genètica foren simplement la producció de proteïnes humanes en bacteris per finalitats terapèutiques, ràpidament s'observà el gran potencial d'aquesta tècnica per generar noves rutes metabòliques mitjançant la introducció de múltiples gens amb la finalitat de produir una gran diversitat de compostos a partir de diferents substrats (Stephanopoulos, 1999).

La diferència entre l'enginyeria metabòlica i les altres estratègies d'enginyeria genètica és l'abast en què es planteja l'objectiu. L'enginyeria genètica es basa en la realització de modificacions genètiques dels enzims involucrats directament en la síntesi del producte d'interès sense considerar les conseqüències que aquestes poden tenir a tot el sistema, la qual cosa pot donar lloc a un metabolisme no desitjat. En canvi, l'enginyeria metabòlica se centra en desenvolupar soques dins un sistema biològic en el que s'optimitza la gran xarxa que formen les rutes metabòliques al mateix temps que es consideren el creixement cel·lular i els processos posteriors d'obtenció del producte. Així doncs, es tracta d'un camp multidisciplinar basat en principis de biologia molecular, bioquímica, ciències computacionals i d'enginyeria química (Yang *et al.*, 1998, Raab *et al.*, 2005 i Park *et al.*, 2008).

L'obtenció del fenotip desitjat és complicada inclús en microorganismes degut a les interaccions complexes entre les rutes metabòliques centrals i les perifèriques intentant superar, a més, la regulació del sistema. Per tant, sense un bon coneixement de les xarxes metabòliques, és complicat progressar en aquest camp (Raab *et al.*, 2005 i Patnaik, 2008).

La gran diferència entre l'inici de l'enginyeria metabòlica, cap a la dècada dels 90, i el moment actual és l'augment en les anotacions de les seqüències genòmiques dels hostes. Tal com es mostra en la Figura 1, el número de seqüències completades i accessibles públicament al llarg dels anys presenta una tendència exponencial, on destaquen els bons resultats en el camp de l'ADN bacterià (Otero i Nielsen, 2010).



**Figura 1: Número de seqüències genòmiques completades i accessibles per any entre 1995 i 2007 en funció del tipus d'organisme (bacteris, eucariotes i arquees).**

A partir de l'anotació de les seqüències genòmiques i gràcies a les diferents bases de dades s'ha evolucionat cap a la genòmica funcional que estudia el desenvolupament d'eines experimentals i teòriques per determinar les funcions de les proteïnes codificades pels gens seqüenciats. Amb aquests coneixements, el desenvolupament de les rutes metabòliques s'ha centrat en l'efecte del consum del substrat, la formació de subproductes i altres manipulacions que afecten la distribució de les reaccions químiques intracel·lulars, és a dir, els fluxos (Raab *et al.*, 2005 i Otero i Nielsen, 2010).

El flux és un determinant fonamental de la fisiologia cel·lular i un paràmetre crític de la ruta metabòlica en unes condicions ambientals donades. El flux també determina el grau de compromís entre diferents enzims en un procés de conversió. Així doncs, com que el control dels fluxos ofereix les bases per la modificació racional de les rutes metabòliques, apareix una connexió entre els fluxos metabòlics i l'enginyeria metabòlica. A més a més, els fluxos metabòlics són molt útils per calcular els rendiments teòrics, determinar les velocitats de formació de metabòlits i per observar la funció de les rutes *in vivo*.

A partir dels diferents coneixements adquirits tant amb la genòmica funcional com amb la mesura dels fluxos, s'ha iniciat el desenvolupament de models de predicció. Amb aquesta finalitat, han sorgit noves empreses com *METabolic Explorer*, *Fluxome Science* o *Genomatica* especialitzades en la biologia de sistemes industrials que preveuen els perfils de concentració com a funció del temps i l'estequiometria, i velocitats cinètiques de reacció per cada procés en una cèl·lula sota les condicions fisiològiques requerides. De totes maneres, els models existents fins el moment són molt limitats per la seva complexitat. Un exemple és el del bacteri *Escherichia coli* en el que s'han introduït 660 gens que inclouen 627 reaccions i 438 metabòlits i, tot i així, només es representa el 15.6% del genoma. A

part d'*E.coli*, també s'està treballant amb la reconstrucció d'altres bacteris com el *Lactococcus lactis* del que es té el 30.6% del genoma o el *Lactobacillus plantarum* amb un 23.6% (Otero i Nielsen, 2010).

A la pràctica, degut a la falta de coneixement de les rutes i les seves regulacions, i la dificultat que representa obtenir aquesta informació, una soca modificada per l'enginyeria metabòlica, generalment, es construeix a través d'aproximacions sistemàtiques. D'aquesta manera, a partir d'alguna modificació realitzada s'estudia el fenotip obtingut i es prediuen noves modificacions que semblin indicades per l'evolució de l'enginyeria metabòlica. La importància de realitzar els passos de forma seqüencial rau en què certes modificacions, com podria ser l'augment en l'activitat de l'enzim que permet la síntesi del producte d'interès, poden no resultar en un augment de la productivitat o inclús disminuir-la. Aquest fet és lògic pensant que una cèl·lula ha evolucionat per catalitzar centenars de reaccions emprades amb la finalitat de mantenir la fisiologia cel·lular i el bon estat físic en el seu medi (Raab *et al.*, 2005 i Patnaik, 2008).

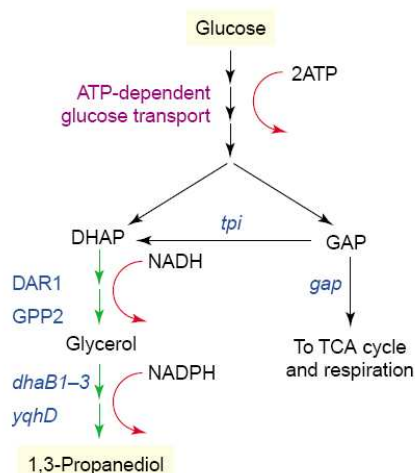
Bibliogràficament, es descriuen molts exemples demostrant l'eficàcia i eficiència d'aquestes aproximacions per produir tant productes naturals com nous productes en una gran diversitat de cèl·lules. De fet, l'enginyeria metabòlica s'aplica sobretot quan l'economia del procés es millora substancialment fent productes més competitius que els obtinguts químicament ja sigui millorant rendiments, evitant l'ús de substrats massa cars i/o disminuint els excessos dels subproductes d'interès. A més, aquests processos industrials persegueixen objectius relacionats en desenvolupaments sostenibles i química verda (Horn *et al.*, 1996, Raab *et al.*, 2005 i Patnaik, 2008).

A mode d'exemple, s'han desenvolupat soques modificades per enginyeria metabòlica per la síntesi d'aminoàcids com la fenilalanina i la lisina en *E.coli* i *Corynebacterium glutamicum*, respectivament, que es produeixen entre 50 i 80 g/L (Gerigk *et al.*, 2002, Koffas *et al.*, 2003 i Ikeda *et al.*, 2006). També s'han obtingut additius alimentaris com són vitamines i glucosamina, en *Bacillus subtilis* i *E.coli*, amb una productivitat d'entre 30 i 100 g/L. Altres molècules sintetitzades emprant aquesta tècnica són l'àcid cítric (Aiba i Matsuoka, 1979), intermedis sintètics de la síntesi de medicaments com la bioconversió de l'indè a indandiol, intermedi de la síntesi de Crixivan, medicament per la SIDA, (Stafford *et al.*, 2001), etanol (Ohta *et al.*, 1991), àcid làctic (van Maris *et al.*, 2004), licopè (Farmer i Liao, 2000), proteïnes terapèutiques (Vives *et al.*, 2003), el blau d'indigo de Genencor i el propilenglicol de DuPont (Danner i Braun, 1999).

L'1,3-propanediol és un exemple de producte obtingut recentment mitjançant processos biotecnològics i que antigament es produïa per conversió petroquímica. L'1,3-propandioli es considera un producte químic específic sent un intermedi important en la producció de polímers emprats en les indústries de roba, fibra i moquetes (Otero i Nielsen, 2010).

Tot i que no es coneixen microorganismes capaços de sintetitzar aquest producte a partir de sucres de forma natural, se sap de l'existència d'un ampli ventall de microorganismes que són capaços de fermentar glicerol produint 1,3-propandioli (Nevoigt, 2008). Amb aquesta informació, Genencor i DuPont han desenvolupat tot una sèrie de patents i aplicacions centrades en l'estratègia de dissenyar i construir una soca capaç de convertir glucosa directament a 1,3-propandioli (Nevoigt, 2008). L'enginyeria metabòlica es realitza a la soca d'*E.coli* K12, la qual té capacitat de produir glicerol tot i que a nivells molt baixos i no és capaç de sintetitzar l'1,3-propandioli. Per tant, en la soca modificada per enginyeria metabòlica predomina la introducció d'una ruta heteròloga. Aquesta ruta desvia el carboni des de la dihidroxiacetona fosfat (DHAP) a 1,3-propandioli en condicions aeròbiques (Nakamura i Whited, 2003).

En la Figura 2 es mostra un esquema del metabolisme de la soca modificada per enginyeria metabòlica capaç de sintetitzar el producte d'interès. Tal i com s'observa, la ruta del carboni utilitza els gens glicerol 3-fosfat deshidrogenasa (DAR1) i glicerol 3-fosfat fosfatasa (GPP2), obtinguts de *Saccharomices cerevisiae*, per obtenir el glicerol a partir de DHAP. La glicerol deshidratasa (*dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3*) i els seus factors d'activació (*dhaBX*, *orfX*), de *Klebsiella pneumoniae*, permeten la conversió de glicerol a 3-hidroxi-propionaldehid. Sorprenentment, una oxidoreductasa endògena d'*E.coli* (*yqhD*), prèviament no caracteritzada, completa la ruta sintetitzant el producte final 1,3-propandioli (Nakamura i Whited, 2003).

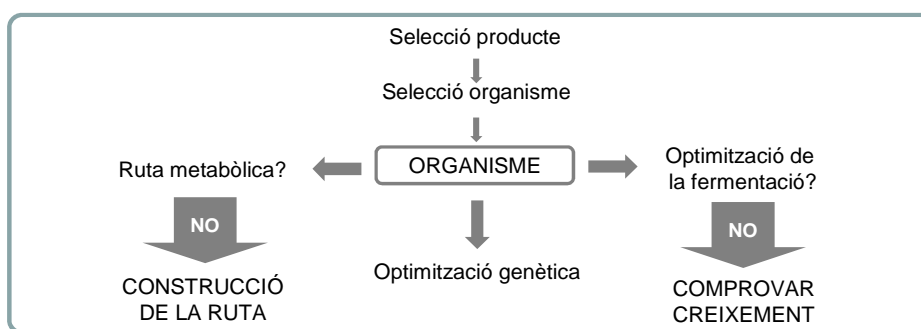


**Figura 2: Ruta metabòlica de la soca modificada per enginyeria metabòlica *E.coli* K12 per la producció de 1,3-propandioli a partir de glucosa.**

A part de la introducció de la ruta de síntesi del producte, la soca també s'ha modificat per obtenir un rendiment més elevat. Per això, s'han evitat reaccions no productives com la reintroducció del glicerol al metabolisme del carboni mitjançant l'eliminació dels gens que codifiquen per la glicerol quinasa (GlpK) i la glicerol deshidrogenasa (GldA). A més, s'ha modificat el transport de la glucosa perquè sigui funció de ATP ja que d'aquesta forma la fosforilació que es duu a terme és energèticament més eficient que amb el sistema endogen dependent de fosfoenolpiruvat (PEP). Finalment s'ha inhibit l'acció del sistema gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (*gap*) la qual cosa ha modificat el flux de la triosa fosfat isomerasa (*tpi*). Aquesta proteïna reacciona en ambdós sentits, és a dir, de gliceraldehid fosfat (GAP) a DHAP, reacció desitjada, però també de DHAP a GAP. Aquesta última, un cop inhibida l'acció del *gap* es veu limitada per l'acumulació de GAP al medi, la qual cosa afavoreix la formació de 1,3-propandiol (Nakamura i Whited, 2003).

A part d'aquestes aproximacions, s'ha optimitzat el procés de la soca d'*E.coli* modificada per enginyeria metabòlica examinant reaccions alienes a la ruta del carboni i millorant expressions enzimàtiques. De totes maneres, aquests últims retocs encara no han estat publicats tot i que es coneixen els nivells de productivitat finals: 135 g L<sup>-1</sup> amb un 51% de rendiment respecte la glucosa introduïda en el fed-batch de 10 L (Otero i Nielsen, 2010).

Tot i el procés de construcció de soques modificades per enginyeria metabòlica no té un mètode confinat i en funció de cada cas s'ha d'actuar i emprar les tècniques i conceptes que es considerin més apropiats, un esquema general del procés seria el mostrat en la Figura 3.

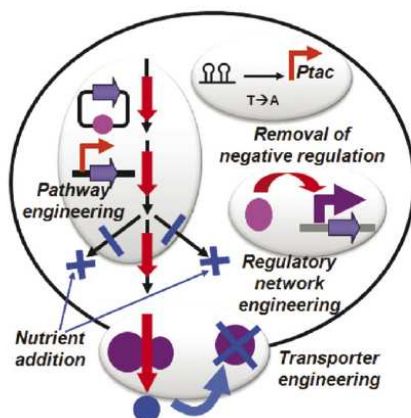


**Figura 3: Primer pas a realitzar per dissenyar una soca modificada per enginyeria metabòlica.**

Tal i com es mostra, la primera consideració seria seleccionar el bioproducte d'interès per ser produït mitjançant l'ús de microorganismes. Aquesta decisió s'ha de basar en la situació del mercat, el creixement de la seva demanda potencial i els costos tant de l'obtenció actual com del que pot suposar l'enginyeria metabòlica per tal de justificar aquest nou procés.

Un cop s'ha seleccionat el producte, la segona decisió és escollir la soca hoste per a la producció. A part de ser fàcilment manipulable i àmpliament utilitzada, hi ha més criteris que ajuden a fer aquesta selecció. D'una banda, conèixer la ruta metabòlica que permet la síntesi del producte d'interès i, si aquesta és present o no dins el metabolisme cel·lular, és a dir, tenir informació del seu genoma i enzims necessaris. D'altra banda, ha de ser una soca que permeti l'ús de tècniques genètiques que permetin optimitzar el procés de síntesi. Finalment, ha de ser capaç de créixer a gran escala arribant a sistemes biològics industrials (Park *et al.*, 2008).

Un cop seleccionada la soca, se segueix amb el procés d'optimització de la ruta i dels recursos de la cèl·lula per passar de la soca original a la soca modificada per enginyeria metabòlica.



**Figura 4: Segon pas per la realització de soques modificades per enginyeria metabòlica.**

En la Figura 4 es mostra un esquema de les principals modificacions emprades on es destaquen: la incorporació d'una nova ruta o optimització d'una ruta ja existent; addició de nutrients ja sigui mitjançant la inserció o modificació de transportadors, o bé, eliminant o inhibint rutes secundàries que consumeixen el nutrient d'interès; noquejament de regulacions negatives; addició de regulacions positives i la creació de transportadors del producte final al medi extern (Yang *et al.*, 1998).

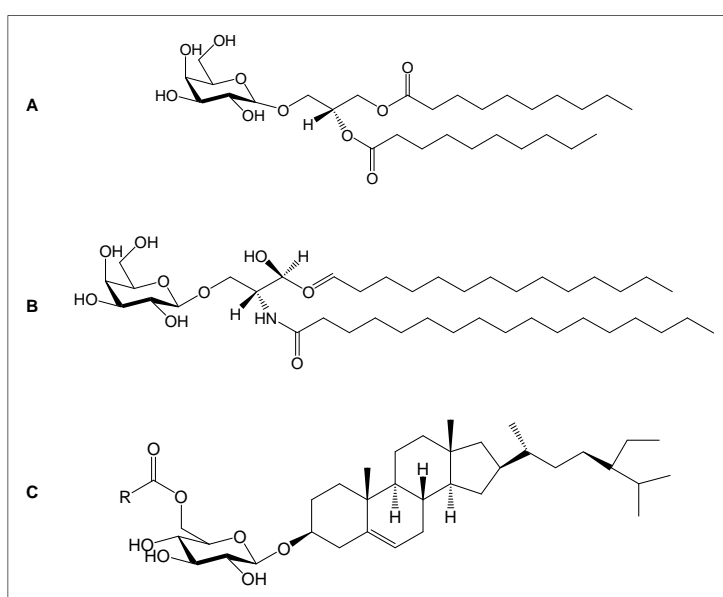
A partir de tots aquests coneixements, en la present tesi s'inicia un projecte d'enginyeria metabòlica per la producció de glicolípid, concretament, glicoglicerolípid.



## 2 Els glicolípids

### 2.1 ESTRUCTURA DELS GLICOLÍPIDS

El terme glicolípida designa qualsevol compost que contingui un o més residus de sucre units per un enllaç glicosídic a una unitat hidrofòbica com seria un acilglicerol o un esfingolípida (Figura 5 A i B respectivament). Els glicolípids són col·lectivament part d'una gran família, els glicoconjugats, que comprenen: glicoproteïnes, glicopèptids, peptidoglicans, proteoglicans glicolípids i lipopolisacàrids (Faivre i Rosilio, 2010).



**Figura 5: Exemples d'estructures de glicolípids.** A: galactosildiacilglicerol; B: galactosilceramida i C: esterolglucòsid (Faivre i Rosilio, 2010).

Els glicolípids es formen mitjançant la transferència d'un sucre a esterols, cermides i diacilglicerols per l'acció de glicosiltransferases. Donat la gran diversitat de carbohidrats que poden presentar, la classificació dels glicolípids es basa en l'estructura de la part lipídica. Així doncs, el terme glicoglicerolípida s'usa per designar els glicolípids que comprenen un o més residus de glicerol i els glicoesfingolípids, els que contenen com a mínim un residu de monosacàrid unit a un esfingoid o una ceramida (Hölzl i Dörmann, 2007 i Faivre i Rosilio, 2010).

En condicions controlades, les molècules de glicolípids hidratades rendeixen la formació d'estructures supramoleculares com poden ser vesícules similars a liposomes anomenades niosomes. Aquestes s'han utilitzat, en un primer moment, per aplicacions cosmètiques i, posteriorment, per l'alliberament controlat de fàrmacs tal com es veurà més endavant. La

formació d'aquestes vesícules és similar a la formació de liposomes per part dels fosfolípids. L'estructura química dels glicolípidos afecta la formació de les vesícules on la hidratació dels caps dels tensioactius és funció de la naturalesa del sucre amb el que es controla la formació de bicapes o monocapes. La llargada de les cadenes hidrofòbiques influeix en la temperatura de transició de fases del tensioactiu. Com més llarga és la cadena acílica, més alta la temperatura de transició entre fases gel i líquid i, per tant, incrementa l'eficiència d'encapsulament i l'estabilitat del niosoma i a més, disminueix la seva toxicitat. Igual que en el cas dels liposomes, alguns additius com són el colesterol i lípidos carregats sovint són necessaris per millorar-ne l'estabilitat. El colesterol elimina la transició entre les fases gel i líquid reduint així possibles fuites mentre que els lípidos carregats prevenen l'agregació de niosomes (Faivre i Rosilio, 2010).

## **2.2 FUNCIO DELS GLICOLIPIDOS**

Els glicoglicerolípidos es poden trobar en membranes de bacteris, fongs, plantes i animals on formen part de blocs estructurals i contribueixen en la estabilitat de la bicapa lipídica (Hözl i Dörmann, 2007). En aquestes membranes, els glicolípidos tenen una conformació estable per mitjà de les forces febles com són les interaccions electrostàtiques, ponts d'hidrogen i van der Waals. En funció de la seva estructura química, les propietats d'aquests lípidos varien. Tant la llargada de les cadenes lipídiques com la localització de les unitats de sucre afecten l'organització dels lípidos i les proteïnes que els envolten determinant dominis de propietats específiques i, per tant, funcions específiques. Estructures tridimensionals obtingudes per raigs X de proteïnes de membrana cristal·litzades suggereixen que els glicolípidos són indispensables degut a les interaccions entre proteïna i lípid que presenten donant lloc a la formació de components complexes de la membrana (Faivre i Rosilio, 2010).

A part de formar part dels blocs estructurals de la membrana, els glicoglicerolípidos predominen en els cloroplasts de les plantes, algues eucariotes i cianobactèries i, en general, s'associen a teixits fotosintètics ja que col·laboren en el transport dels electrons (Hözl i Dörmann, 2007).

A més, els glicolípidos situats a les membranes poden orientar la seva part sacarídica cap al medi extracel·lular on són reconeguts de forma específica per hormones, anticossos, toxines, virus i bacteris. Aquesta unió específica depèn no només de la seqüència de carbohidrats sinó també del caràcter de la part lipídica ja que canvis en l'estructura lipídica pot resultar en l'alteració de l'orientació o la conformació de la unitat de carbohidrat a la interfície, permetent o restringint la unió del lligand (Faivre i Rosilio, 2010). La funció de

reconeixement dels glicolípid ha atorgat a aquests compostos papers claus en el reconeixement entre cèl·lules, la inflamació, el càncer, la metastasi i molts altres processos biològics (Máñez *et al.*, 1999, Larsen *et al.*, 2003 i Mao, *et al.*, 2006).

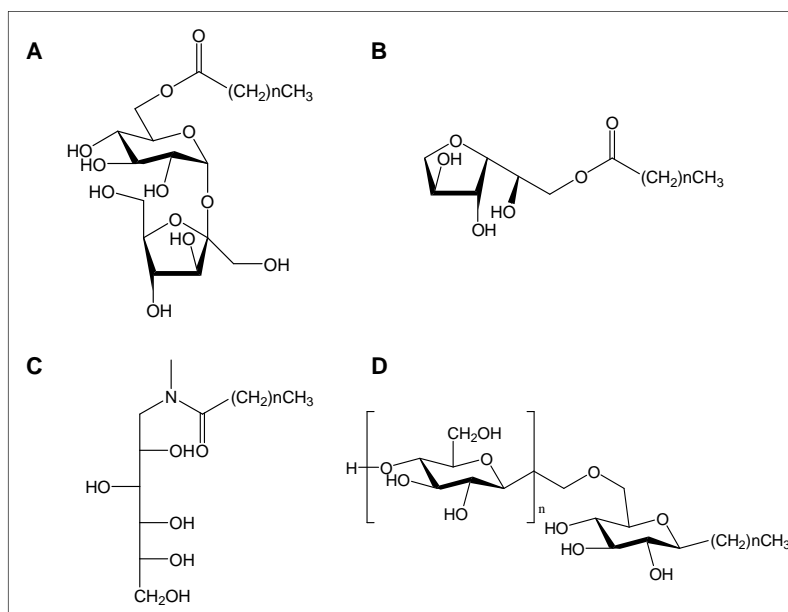
## **2.3 INTERÈS DELS GLICOLÍPIDS**

Durant les últimes dues dècades, els glicolípid han estat objecte d'un creixent interès sobretot en les indústries farmacèutica i cosmètica. En el context de desenvolupament sostingut amb la necessitat d'obtenir productes derivats de recursos naturals, la substitució dels tensioactius no iònics d'origen sintètic per glicolípid degradables ha esdevingut una àrea de recerca important. En les formulacions bàsiques els glicolípid s'usen majoritàriament per les seves bones propietats com a detergents, emulsionants, escumejants i dispersadors.

### **2.3.1 Els glicolípid com a tensioactius d'alt valor afegit**

Al món es produeixen anualment de forma sintètica més de 10 milions de tones de tensioactius per diverses aplicacions en el camp del tèxtil, plàstics, paper, alimentació, cosmètica i farmacèutica (Faivre i Rosilio, 2010). Aquests tensioactius presenten diverses estructures podent ser iònics o no iònics. Per la seva naturalesa, els glicolípid formen part dels tensioactius no iònics i en funció de la llargada de la cadena del lípid, la presència i naturalesa d'un espaiador entre les parts lipídica i sacarídica, el nombre d'unitats de sucres i la polaritat, les propietats de la superfície de les estructures supramoleculares que formen pot variar significativament (Faivre i Rosilio, 2010).

Des d'un punt de vista industrial, els tensioactius amb base sucre que actualment tenen un major potencial són els alquilpoliglicòsids (50000 t/any), els àcids grassos N-metilglucamides (40000 t/any), l'éster de sorbitan (20000 t/any) i els ésters de sacarosa (5000 t/any) tal i com es mostra en la Figura 6.

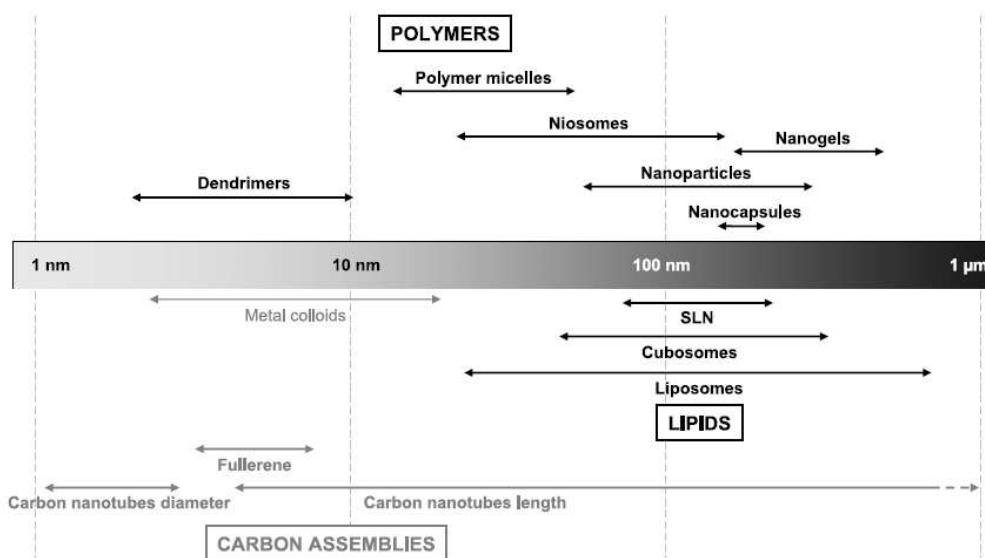


**Figura 6: Exemples de glicolípid sintètics comercials.** A: Éster de sacarosa; B: Éster de sorbitan; C: N-metilglucamida i D: Alquilglucòsid.

Els tensioactius amb base sucre generalment es degraden ràpidament tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques i presenten una baixa toxicitat en l'aigua comparat amb els compostos no iònics basats en el clàssic polietilenglicol. A més, s'ha demostrat que es poden aplicar els 12 principis de la química verda (Anastas i Kirchoff, 2002). Entre aquests principis és possible citar l'ús de síntesis menys perilloses, la seguretat relativa als dissolvents i l'ús d'energies renovables en el 100% de les matèries primeres entre altres (Faivre i Rosilio, 2010).

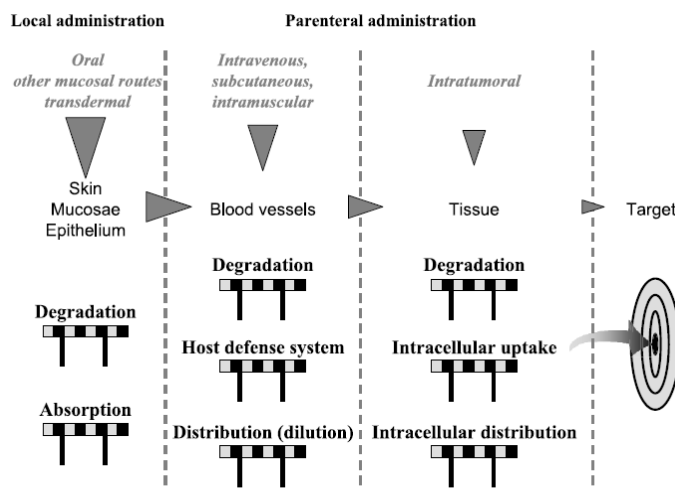
### 2.3.2 Els glicolípid com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs

Actualment, l'entrada de la nanotecnologia en farmacologia té com a objectiu aconseguir l'alliberament de fàrmacs en el lloc específic, tant pel que fa en l'espai com en el temps. Així, el concepte de "bala màgica" proposat fa cent anys per l'immunòleg premi Nobel Paul Ehrlich, s'ha dut a terme a la realitat amb l'aparició de diverses formes de medicaments dirigits als sistemes específics amb la finalitat de tractar determinats càncers i certes malalties infeccioses. Des dels primers liposomes proposats al 1974 (Gregoriadis *et al.*, 1974) fins ara, hi ha hagut un augment en el nombre de nanodispositius capaços d'alliberar fàrmacs. En la Figura 7 es mostra un esquema dels tipus de molècules de nanotecnologia emprats per l'orientació i alliberament de fàrmacs. Els majors components són polímers i lípids, tot i que la incorporació de metalls i colòides permet obtenir propietats específiques addicionals com seria el magnetisme (Couvreur i Vauthier, 2006).



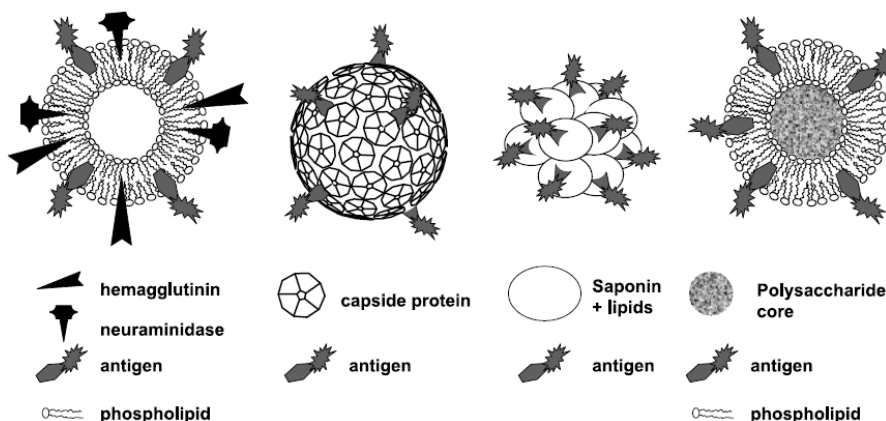
**Figura 7: Tipus de nanotecnologia emprada per l'orientació i alliberament de fàrmacs.** L'eix representa el diàmetre. En negre els components que s'usen majoritàriament i en gris els que s'usen en menor quantitat. (Couvreur i Vauthier, 2006)

Aquests sistemes s'utilitzen amb finalitats terapèutiques permeten la conducció dels fàrmacs pel cos de forma controlada des del lloc d'administració fins a la diana terapèutica. Això implica el pas de les molècules dels fàrmacs juntament amb el sistema d'alliberament a través de diverses barreres fisiològiques, la qual cosa dificulta enormement el procés. En la Figura 8 es mostra un esquema de les dificultats que es va trobant un fàrmac al llarg del seu recorregut des de la seva administració fins a arribar a la diana terapèutica (Couvreur i Vauthier, 2006).



**Figura 8: Diferents tipus de barreres que es troben les molècules dels fàrmacs i els sistemes d'alliberament i que han de sobrepassar per arribar a la diana biològica del cos.** (Couvreur i Vauthier, 2006)

En general, els nanoportadors o sistemes d'alliberament han de protegir el fàrmac de la degradació, millorar l'absorció facilitant la difusió, modificar tant la farmacocinètica com el perfil de distribució en el teixit i/o millorar la penetració i distribució intracel·lular (Couvreur i Vauthier, 2006). Per exemple, en el cas del càncer, encara que es descobreixin noves molècules per tractar-lo, l'ús i l'eficàcia clínica es veu obstaculitzada per la resistència del fàrmac a la presència de barreres fisiològiques tant a nivell de tumor com a nivell cel·lular i, a més, es dificulta la distribució, biotransformació i la eliminació del fàrmac en el cos. Per tant, és important desenvolupar nanotecnologies per alliberar als tumors diana evitant els problemes tant a nivell cel·lular com de teixit i, per tant, millorar l'acció terapèutica de les molècules anticancerígenes. En el disseny de les nanopartícules sovint és necessari realitzar construccions en les que s'introdueixen anticossos, proteïnes o pèptids amb la finalitat d'activar-se en el lloc necessari o facilitar-ne la orientació. En la Figura 9 es mostren diferents sistemes de presentació d'antígens (Couvreur i Vauthier, 2006).



**Figura 9: Sistemes derivats de la nanotecnologia que presenta els antígens a la superfície (Couvreur i Vauthier, 2006).**

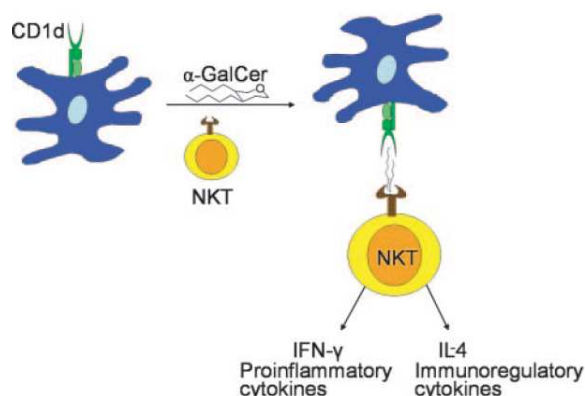
De la mateixa forma, els carbohidrats que s'uneixen a proteïnes poden ser específics per alguns teixits, cèl·lules o patologies i tenen un potencial enorme com a dianes biològiques. Així, els glicolípid permeten al mateix temps formar niosomes i exposar els carbohidrats dels mateixos lípids que poden interaccionar amb els receptors de superfície de les cèl·lules (Faivre i Rosilio, 2010).

### **2.3.3 Els glicolípid per la inhibició de tumors mitjançant NKT cells**

Tal i com ja s'ha comentat, els glicolípid són components de les membranes cel·lulars i juguen un rol important com a transductors de senyals en biologia cel·lular. Al 1993, sis noves galatosilceramides amb un únic enllaç glicosídic, entre elles la  $\alpha$ -galactoceramida, es van aïllar de l'esponja marina *Agelas mauritianus* a prop de Okinawa, Japó. Aquests

compostos mostraren una activitat antitumoral molt potent (Du *et al.*, 2007). Diferents estudis mecanístics indicaren que l'activitat antitumoral adjudicada resultava de l'estimulació de les cèl·lules *natural killer T* (NKT) dependents de CD1d. Les molècules CD1 són una família molt conservada de proteïnes que presenten antígens i uneixen i mostren varietat de lípids i glicolípid als limfòcits T. Es coneixen 6 isoformes que s'han classificat en dos grups, el grup I (CD1a, CD1b, CD1c i CD1e en humans) i el grup II (CD1d en humans i rates), segons la similitud entre les seqüències de nucleòtids i aminoàcids (Wu *et al.*, 2005).

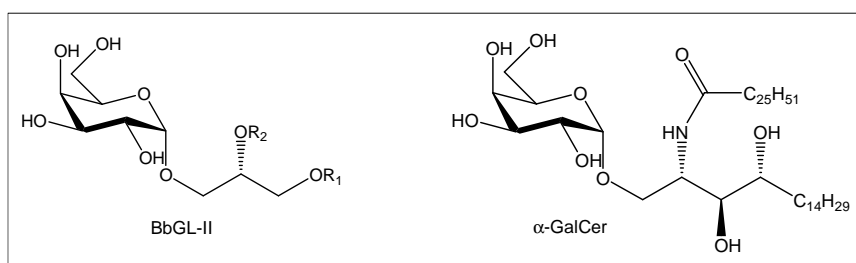
Així doncs, el CD1d és un membre de la família de proteïnes CD1 que presenta antígens lípids a les cèl·lules NKT per activar la resposta immunitària. El model d'activació suggereix que la CD1d reconeix el glicolípid i s'uneix formant un complex que interacciona amb el receptor de les cèl·lules T de les cèl·lules NKT, estimulant el despreniment de dues citosines majoritàries conegudes com IFN- $\gamma$  (citosina proinflamatòria) i IL-4 (citosina immunoreguladora) (Figura 10). Diferents estudis suggereixen que la producció d'aquestes citosines es pot modificar alterant l'estructura de la ceramida (Du *et al.*, 2007 i Wu *et al.*, 2005).



**Figura 10: Les cèl·lules NKT reaccionen amb la unió de CD1d i el glicolípid  $\alpha$ -galactoceramida ( $\alpha$ -GalCer). Aquesta estimulació resulta amb la producció d'importantes quantitats de citosines com són les IL-4 i IFN-I (Wu *et al.*, 2005).**

Molts estudis han demostrat que les cèl·lules NKT són pivots durant la varietat de les respostes immunològiques incloent el desenvolupament de l'autoimmunitat, manteniment de la pròpia tolerància i respostes a tumors i agents infecciosos. El glicolípid  $\alpha$ -galactoceramida ( $\alpha$ -GalCer), en un estudi d'anàlisi de compostos que poden prevenir la metàstasi tumoral, resultà com un potent agonista de les cèl·lules NKT. Al contrari de la majoria de glicoesfingolípid de la natura, l' $\alpha$ -GalCer presenta una unió  $\alpha$  entre el sucre i el lípid ceramida. Donat que en la naturalesa generalment es troben unions  $\beta$ , es pensa que aquest compost no és un antigen natural d'aquestes cèl·lules (Kinjo *et al.*, 2006).

Fins fa poc temps, els glicoesfingolípidis reconeguts per aquest tipus de cèl·lules eren únicament els trobats en esfingomones no patogèniques. Tot i això, des de fa uns anys s'ha vist que a part de les cèl·lules NKT dels humans, les dels ratolins també reconeixen glicoglicerolípidis. Així doncs, s'ha demostrat l'activitat d'inhibició de tumors per part de diferents glicoglicerolípidis presents en l'alimentació com per exemple els glicoglicerolípidis de *Citrus hystrix*, una herba tradicional de Tailandia (Li *et al.*, 2003; Morimoto *et al.*, 1995 i Murakami *et al.*, 1995). Un altre cas és el que prové de *Borrelia burgdorferi* que provoca la malaltia de Lyme. Aquest bacteri sintetitza dos glicolípidis majoritaris: BbGL-I i BbGL-II. El primer representa un 23% del total de lípids i és un glicolípid en base colesterol. En canvi, el segon que representa un 12% del total de lípids és un 1,2-diacil-3-O- $\alpha$ -galactosyl-sn-glicerol i, per tant, és un glicoglicerolípid (Figura 11).



**Figura 11: Estructures dels glicolípidis BbGL-II i  $\alpha$ -GalCer.** El BbGL-II és un monogalactosil diacilglicerol amb una mescla d'àcids grassos en les posicions  $R_1$  i  $R_2$ .

La purificació d'aquest glicoglicerolípid conté una mescla d'àcids grassos 14:0, 16:0, 18:0, 18:1 i 18:2, sent el 16:0 i 18:1 els més comuns. Un estudi realitzat on s'han obtingut diferents glicoglicerolípidis de forma sintètica combinant els diferents àcids grassos ha demostrat que tots els compostos analitzats induïen la producció de citosines. Tot i així, la presència de les cadenes d'àcid oleic i palmític representen els antigens més potents (Kinjo *et al.*, 2006).

## 2.4 PRODUCCIÓ DE GLICOLÍPIDIS

Els glicoglicerolípidis són els lípids predominants en els cloroplasts de les plantes, algues eucariotes i cianobacteries (Hözl i Dörmann, 2007). Certs estudis han determinat la concentració d'aquests lípids en diferents plantes i s'ha vist que la seva concentració varia de 8 a 700 mg de glicolípid per cada 100 g de planta fresca (Yunoki *et al.*, 2009). Glicolípidis similars amb una àmplia diversitat estructural s'han trobat en bacteris grampositius com són els Micoplasmes o el *Lactobacillus plantarum* però la seva producció no ha estat quantificada.



El treball tant amb teixits eucariotes com amb *Micoplasmes* és llarg i l'extracció dels compostos complicada. Així doncs, degut a la necessitat d'obtenir grans quantitats pels interessos comentats anteriorment, és interessant produir aquests compostos ja sigui mitjançant síntesi orgànica, enzimàtica o a partir de microorganismes.

### 2.4.1 Síntesi orgànica

S'han invertit grans esforços en la síntesi orgànica tant de glicoglicerolípidis com de glicoesfingolípidis. Però, sens dubte, el major obstacle en la síntesi orgànica dels glicoglicerolípidis és la reacció de glicosidació entre l'acilglicerol i el sucre, i la dificultat que presenta la química dels carbohidrats. L'assoliment de la quimio- i estereoselectivitat requereix molts passos en la protecció i desprotecció degut a la presència de diferents grups hidroxil de reactivitat similar, la qual cosa fa que la ruta sintètica sigui llarga i disminueixi la seva eficiència (Du *et al.*, 2007). Un exemple de síntesi d'aquests glicoglicerolípidis es mostra en la Figura 12.

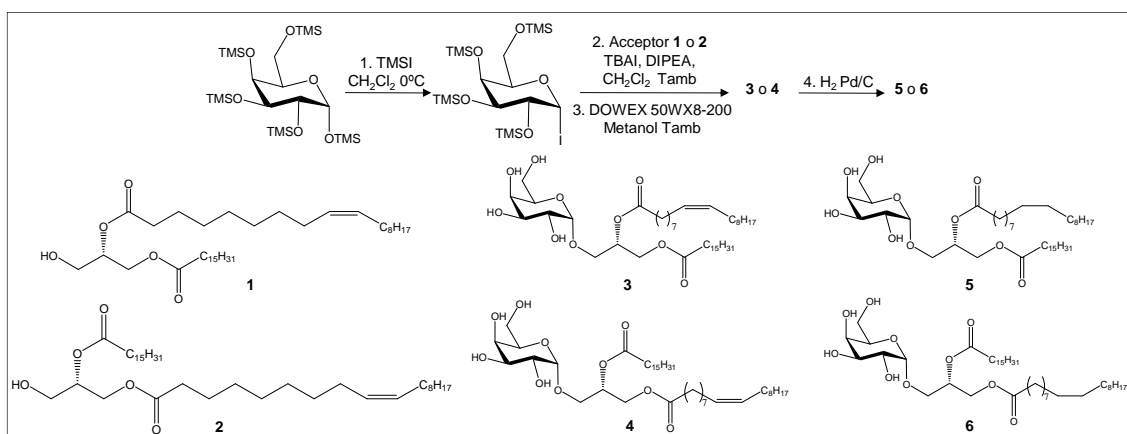


Figura 12: Exemple de síntesi de glicoglicerolípidis.

En l'exemple de síntesi només s'ha introduït una unitat de galactosa. Com més complicades són les estructures dels carbohidrats, més llarga és la síntesi i els posteriors passos de purificació. Actualment s'estan realitzant molts treballs amb la finalitat de reduir el número de passos de síntesi emprant enzims bacterians per incrementar el rendiment i els volums de producció (Faivre i Rosilio, 2010).

### 2.4.2 Síntesi quimioenzimàtica

Les estratègies basades en enzims per la síntesi de carbohidrats complexos aporten alta regioselectivitat i esteraselectivitat i poden, per tant, evitar els passos de protecció i desprotecció en l'assemblatge complex de molècules de carbohidrats (Mao, *et al.*, 2006). La síntesi dels glicoglicerolípid *in vivo* es realitza per l'acció de les glicosiltransferases que catalitzen la transferència d'una molècula de sucre a partir de la seva forma activada a un acceptor diacilglicerol (Figura 13).

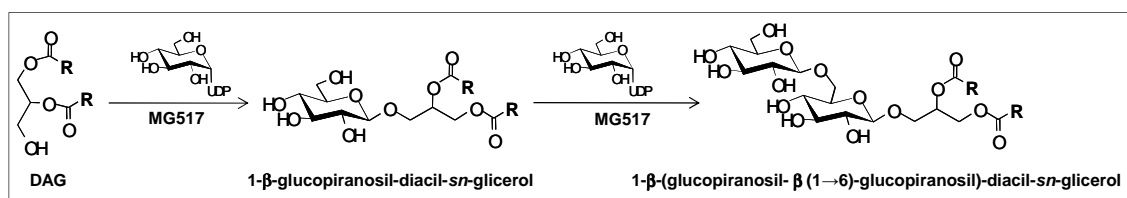
Aquestes sintases de glicolípid es troben classificades en diferents famílies en funció de la seva seqüència però, en general es defineixen com a proteïnes de membrana o associades a la membrana. Això fa que la seva extracció i purificació sigui complicada per la qual cosa, són pocs els estudis enzimàtics realitzats i representen menys d'un 1% de totes les estructures de proteïnes resoltes. La majoria presenten activitat mono o disintasa, és a dir, un enzim fa la primera glicosilació del diacilglicerol donant lloc al monoglicosildiactilglicerol o MGDAG i, un segon enzim, diferent del primer, permet la introducció d'una segona molècula de sucre donant com a producte el diglicosildiactilglicerol o DGDAG. Tot i així, s'han descrit enzims capaços de sintetitzar ells mateixos els dos productes, el MGDAG i el DGDAG com és el cas de la glicosiltransferasa del bacteri *Mycoplasma pneumoniae* (Klement *et al.*, 2007) o la MG517 de *Mycoplasma genitalium* (Andrés *et al.*, 2011).

Els micoplasmes són organismes procarïotes dels quals destaca, d'una banda, la seva mida reduïda i, d'altra banda, l'absència de paret cel·lular la qual cosa li atorga a la membrana plasmàtica una importància cabdal per a la supervivència d'aquests bacteris. Curiosament, aquests micoplasmes no presenten fosfolípids a la seva membrana a diferència de la majoria de bacteris, sinó que està composta bàsicament dels glicoglicerolípid MGDAG i DGDAG. La combinació d'aquestes lípid permet regular les propietats de la membrana i mantenir l'homeòstasi cel·lular sobretot gràcies a les diferents característiques dels glicolípid. Per una banda, el MGDAG és una molècula amb tendència a generar fases no lamel·lars, mentre que el DGDAG, és propens a la formació de fases lamel·lars o bicapa.

Degut al rol fonamental dels glicoglicerolípid en l'estabilitat de la membrana dels micoplasmes i el fet que aquestes estructures lipídiques no es troben en les cèl·lules dels hostes que infecten els micoplasmes, dins el marc del laboratori de Bioquímica de l'IQS s'ha pensat que les glicosiltransferases involucrades en la biosíntesi d'aquests lípid pot ser una diana terapèutica potencial pel disseny de nous antibiòtics. En aquesta línia, un

dels projectes del laboratori finançat pel Ministeri se centra en caracteritzar l'enzim MG517 responsable de la síntesi de glicoglicerolípid en *Mycoplasma genitalium*. Aquest bacteri és l'organisme més petit capaç de sobreviure i és considerat un model de cèl·lula mínima amb un genoma reduït de només 580 Kb i uns 480 gens que codifiquen per proteïnes. A part de paret cel·lular, aquest bacteri no té moltes rutes metabòliques com són les de la síntesi d'aminoàcids, nucleòtids, àcids grassos i colesterol.

Al laboratori s'ha identificat i clonat el gen *mg517* que codifica per la glicosiltransferasa MG517 del genoma de *M. genitalium*. Després de sobreexpressar-la en *E.coli* i determinar la seva activitat, s'ha vist que aquesta proteïna actua amb inversió de configuració i posseeix tant l'activitat mono com diglucosildiactilglicerol sintasa generant un enllaç  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6) entre les unitats glucosídiques tal com s'observa en la Figura 13 (Andrés *et al.* 2011).



**Figura 13: Reaccions catalitzades per l'enzim MG517 a partir de diactilglicerol (DAG) i UDP-glucosa.**

A més, s'ha observat que la seva activitat enzimàtica es troba associada a la membrana, tant *in vivo*, en extractes de *Mycoplasma genitalium*, com quan la proteïna s'expressa en *E. coli* de forma recombinant. S'ha aconseguit purificar aquesta proteïna, sent el primer cas de caracterització enzimàtica d'una glicilípida sintasa de la família GT2 amb proteïna purificada. Actualment, s'estan duent a terme estudis de cristallització per determinar la seva estructura tridimensional, i paral·lelament s'estan construint models estructurals per mètodes bioinformàtics. Aquesta informació estructural permet guiar els estudis mutacionals per analitzar les relacions estructura-funció amb l'objectiu final de dissenyar inhibidors de la proteïna en base a la nostra hipòtesi de que les glicolípida sintases de la família GT2 són dianes terapèutiques pel disseny d'antibiòtics contra micoplasma.

Altres estudis de glicosiltransferases són els de les espècies de micoplasma *Acholeplasma laidlawii* i *Mycoplasma pneumoniae* realitzades pel grup d'Åke Wieslander que s'ha centrat en l'estudi dels glicoglicerolípid. El primer bacteri presenta com a glicolípid principals: el monoglucosildiactilglicerol i el diglucosildiactilglicerol, i la seva síntesi es realitza mitjançant l'actuació de dues glicosiltransferases independents (Berg *et al.*, 2001). Pel que fa a l'anàlisi dels glicolípid sintetitzats pels extractes cel·lulars del *Mycoplasma pneumoniae*, aquests compostos contenen únicament galactosa (Klement *et al.*, 2007).

És notòriament difícil treballar amb proteïnes de membrana o associades a la membrana tant l'expressió, solubilització amb detergents, purificació i cristal·lització (Savage, *et al.*, 2007). En general, les proteïnes de membrana s'expressen en nivells molt més baixos que les proteïnes solubles i, quan la sobreexpressió *in vivo* és possible, la proteïna pot ser citotòxica o incorporada dins de cossos d'inclusió insolubles. Seguint un procés d'expressió satisfactori, s'han de trobar unes condicions adequades per un detergent que simultàniament permeti l'extracció de la proteïna fora de la membrana al mateix temps que retengui el plegament i la funció. Aquest complex entre proteïna i detergent, sovint és heterogeni creant bastants problemes en la purificació i cristal·lització. A més, els substrats de reacció són cars, especialment els sucres activats amb nucleòtids. Tot plegat fa que la utilització *in vitro* d'aquests enzims es vegi limitada per a la seva aplicació en síntesi enzimàtica preparativa.

### **2.4.3 Síntesi a partir de microorganismes**

Al llarg dels últims anys, s'han desenvolupat diversos projectes en els que s'han mostrat solucions pràctiques per la síntesi a gran escala de diferents molècules a partir de microorganismes. Pel que fa als glicoglicerolípid, tot i les llargues rutes de síntesi orgànica necessària degut a la presència de carbohidrats i les dificultats pel que fa a l'obtenció de proteïnes de membrana aptes per a la síntesi quimioenzimàtica, no es troba descrit cap cas d'enginyeria metabòlica per sintetitzar aquests lípids. Així, en el present treball s'opta per modificar mitjançant enginyeria metabòlica cèl·lules d'*E.coli* per la producció de glicoglicerolípid.

2 OBJECTIVUS



L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral és l'obtenció de diferents soques recombinants d'*E.coli* mitjançant enginyeria metabòlica que produeixin glicoglicerolípid. Amb aquesta finalitat, els objectius concrets són:

- Disseny d'enginyeria metabòlica de la soca *E.coli* BL21(DE3) *star* seleccionant els gens que permetin la sobreproducció dels precursors UDP-Glucosa (UDP-Glc) i diacilglicerol (DAG) de la síntesi de glicoglicerolípid.
- Construcció dels vectors aptes per la coexpressió de les proteïnes d'interès.
- Obtenció de les soques d'*E.coli* modificades per enginyeria metabòlica i determinació de les condicions de treball que permetin l'expressió de les tres proteïnes.
- Anàlisi del fenotip de les soques modificades des del punt de vista d'activitat enzimàtica i producció de glicoglicerolípid. Per això, s'han desenvolupat diferents anàlisis:
  - Posada a punt de mètodes per determinar les activitats enzimàtiques de les proteïnes sobreexpressades.
  - Posada a punt d'un mètode de quantificació de glicoglicerolípid directament d'extracte cel·lular mitjançant UPLC-ES+/TOFMS.

### 3 RESULTATS I DISCUSSIÓ



## Capítol 1: Disseny d'enginyeria metabòlica

L'objectiu de la present tesi és aplicar les tècniques d'enginyeria metabòlica per l'obtenció d'una soca bacteriana que produeixi glicoglicerolípid. En primer lloc, se selecciona la soca de treball i s'estudien el seu metabolisme. A continuació, es realitza el disseny metabòlic de les soques a construir amb la finalitat de sobreproduir els precursors UDP-Glc i DAG de la producció dels glicoglicerolípid d'interès.

### **1.1 ENGINYERIA METABÒLICA EN *E.COLI***

La selecció de la soca hoste per la producció comercial de productes, ja siguin metabòlits o proteïnes de la pròpia cèl·lula o no, és un punt crític que es veu influenciat per la capacitat d'adaptar les cèl·lules a les tècniques d'ADN recombinant, biologia sintètica i el fet que sigui una soca apropiada per operacions de fermentació comercial i capacitat de regulació (Patnaik, 2008). *Escherichia coli* és l'hoste més àmpliament utilitzat per a l'expressió recombinant de proteïnes heteròlogues tant en treballs de recerca bàsica com en la producció industrial. Fer créixer aquest bacteri fins a altes densitats cel·lulars ha estat l'objectiu de molts estudis des de la dècada dels 70 amb la finalitat d'aconseguir una productivitat màxima (Shiloach i Fass, 2005).

L'ús de l'enginyeria metabòlica en *E.coli* es veu impulsat d'una banda per la indústria de proteïnes terapèutiques i d'enzims per a la seva aplicació en biotransformacions ja que es troba en plena expansió (Walsh, 2003). D'altra banda, la genòmica i la proteòmica són camps de recerca en ple desenvolupament que requereixen de quantitats importants de polipèptids per al seu anàlisi funcional i estructural (Wang i Hewick, 1999). A més a més, la producció no només de proteïnes sinó també de productes d'alt valor afegit s'ha dut a terme els últims anys mitjançant enginyeria metabòlica d'*E.coli*. Algun exemple és la producció d'àcid glucàric pel seu potencial com a bloc de construcció de polímers com són nilons i polièsters (Moon *et al.*, 2009) o la producció d'oligosacàrids de la llet materna (Fierfort i Samain, 2008).

En tots aquests camps, els bacteris i molt especialment *E.coli* són la primera elecció per provar de clonar el gen heteròleg i produir les proteïnes en estudi. Altres hostes com llevats, cèl·lules animals o cèl·lules d'insecte s'utilitzen generalment quan *E.coli* no resulta ser una bona alternativa per a l'expressió de la proteïna clonada d'interès o la producció d'algun metabòlit en concret. És a dir, quan els nivells d'expressió de proteïna són molt

baixos o inapreciables, quan no s'expressa en la seva forma activa degut a plegaments incorrectes no funcionals, o quan són necessàries modificacions post-traduccionals com ara glicosidacions que no es poden dur a terme en organismes procariotes, o el producte sintetitzat és altament tòxic per a la cèl·lula (Shao *et al.*, 2003, Mao i Chen, 2007 i Widner *et al.*, 2005).

Els principals avantatges d'*E.coli* front altres hostes són el fet que sigui el microorganisme més ben caracteritzat a nivell fisiològic, que s'hagi desenvolupat un bon coneixement de tecnologia de procés per al seu cultiu que permet obtenir grans quantitats de cèl·lules i que disposi d'un gran nombre d'eines de genètica molecular que han permès desenvolupar moltes soques i plasmidis especialment dissenyats i modificats per a la seva aplicació en aquest camp (Shiloach i Fass, 2005; Cottaz i Samain, 2005; Kennedy *et al.*, 2003 i Dayem *et al.*, 2002).

A part dels diferents plasmidis comercials existents, un altre mètode consisteix en la modulació de les activitats enzimàtiques cel·lulars a partir de modificacions en el genoma bacterià. Amb aquesta finalitat, s'han construït diferents llibreries de promotors. De totes maneres, en general, l'expressió de les proteïnes no es realitza de forma constitutiva i, a més, hi ha molt poca informació sobre l'ús d'aquests promotors. Així, generalment, es realitza de forma aleatòria i, després d'estudiar-ne els resultats, s'escull la construcció amb una sobreexpressió més bona per la proteïna en qüestió. De totes maneres, actualment, s'estan dissenyant llibreries de nous promotors sintètics en *E.coli* per poder desenvolupar aquest nou mètode de forma racional ja que resulta de gran interès en el disseny de soques per enginyeria metabòlica (Mey *et al.*, 2007 i Mey *et al.*, 2010)

A part dels avantatges generals que presenta aquest bacteri i que s'han comentat anteriorment, en el cas en concret de la producció de glicoglicerolípids, cal esmentar que tot i que aquests compostos no s'obtenen de forma nativa en *E.coli*, sí que se sintetitzen els seus precursors: UDP-Glc i DAG. Per tant, l'expressió de la proteïna de *Mycoplasma genitalium* MG517 en aquest bacteri permet la síntesi d'alguns dels glicoglicerolípids, principalment DGDAG, tal i com s'ha comprovat en treballs anteriors al laboratori (Martínez, *Comunicació personal*).

## **1.2 ESTUDI DEL METABOLISME CEL·LULAR D'*E.COLI***

### **1.2.1 Metabolisme de l'UDP-glucosa**

L'UDP-glucosa (UDP-Glc) és un precursor en la síntesi de glicoconjugats en *E.coli*. La biosíntesi de lipopolisacàrids, polisacàrids capsulars i oligosacàrids derivats de la

membrana requereixen UDP-Glc com a donador glucosídic. A més a més, l'UDP-Glc és un intermedi essencial pel creixement d'*E.coli* en certes condicions com seria en presència de galactosa (Weissborn, *et al.*, 1994).

A la Figura 14 es mostra la ruta metabòlica per l'obtenció d'aquest nucleòtid a partir de glucosa extracel·lular i les rutes que en fan ús. Tal i com s'observa, la glucosa del medi de cultiu s'uneix a la proteïna PtsG que, després de certs canvis conformacionals, permet el transport del sucre a l'interior de la cèl·lula al mateix temps que es fosforila donant lloc a la glucosa 6-fosfat (D'Auria *et al.*, 2007). Aquesta es converteix en glucosa 1-fosfat mitjançant l'activitat de la fosfoglucomutasa i finalment passa a UDP-Glc per l'activitat de l'enzim UDP-Glc pirofosforilasa (GalU) (Boels, *et al.*, 2001).

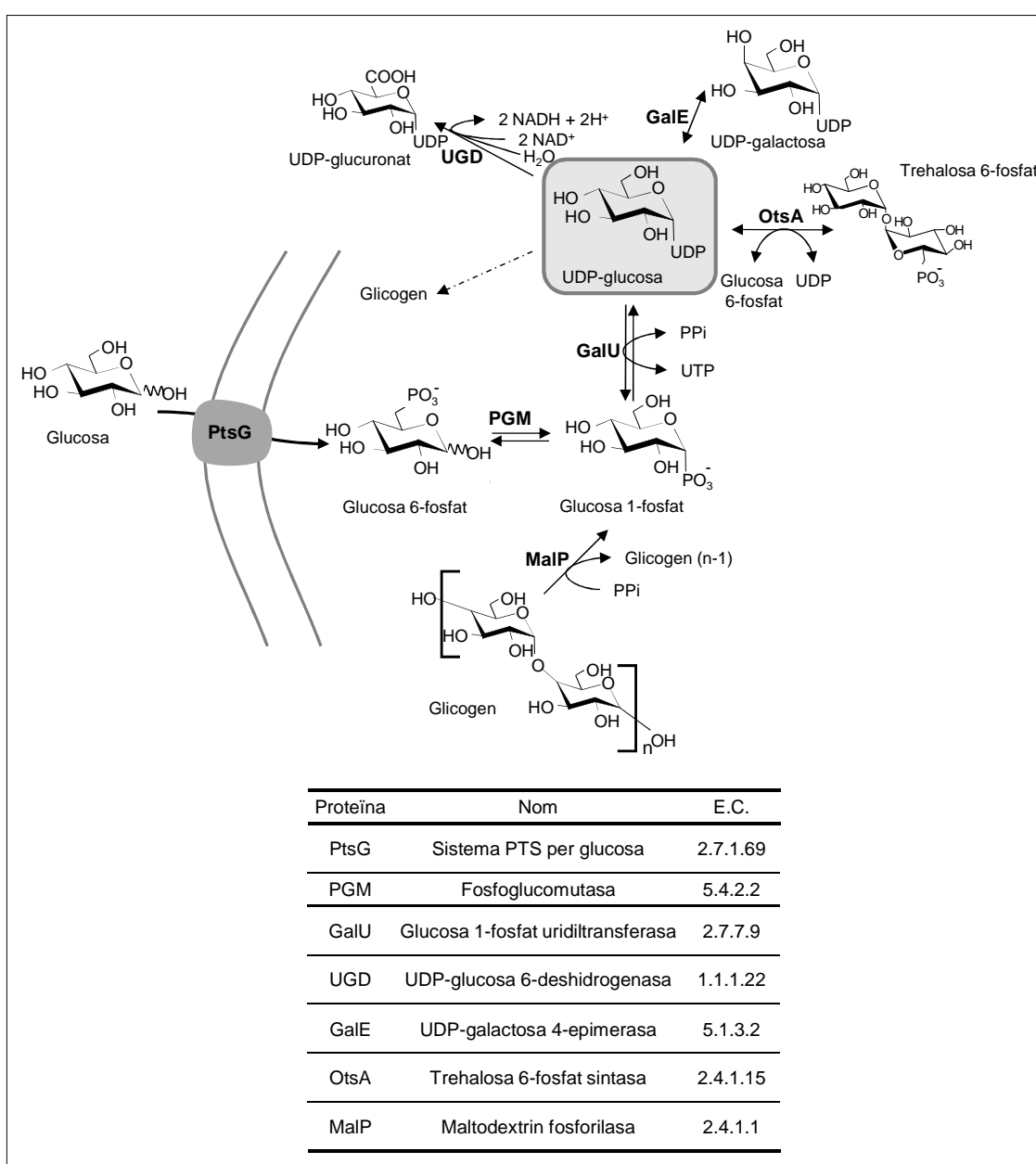


Figura 14: Metabolisme d'*E.coli* des de la introducció de glucosa extracel·lular fins a l'obtenció d'UDP-Glc.

L'UDP –glucosa sintetitzada per GalU intervé en un gran nombre de funcions cel·lulars vitals, incloent la síntesi de glicogen, la síntesi de glicoconjugats com són glicolípid, glicoproteïnes, i proteoglicans, la entrada de galactosa dins de la glicòlisi i la síntesi d'àcid UDP-glucurònic (Mizanur and Pohl, 2008).

Com a estratègia d'enginyeria metabòlica, amb la finalitat que la soca d'*E.coli* incrementi la síntesi de glicoglicerolípid, és important que aquests precursors metabòlics es mantinguin a uns nivells adequats per permetre el creixement cel·lular i no sigui limitant en la síntesi dels glicoglicerolípid d'interès (Widner, *et al.*, 2005).

Encara que les cèl·lules d'*E.coli* són capaces de sintetitzar UDP-Glc, la seva concentració intracel·lular és baixa (1-2mM). En canvi, cèl·lules preparades per la sobreexpressió de les proteïnes PGM i GalU són capaces de canalitzar el flux de carboni cap a la síntesi de UDP-Glc i, com a resultat, augmenta la concentració intracel·lular de UDP-Glc i la dels productes que es formen a partir d'aquí (Mao, *et al.*, 2006).

Boels *et al.* 2001, estudia l'efecte de la sobreexpressió de GalU en *Lactococcus lactis* i observa que en sobreexpressar l'enzim, aquest ha augmentat la seva activitat específica 20 vegades respecte l'expressió genòmica. A més, pel que fa a la producció de nucleòtids ha augmentat unes 8 vegades la concentració d'UDP-Glc. Tot i així, en aquest cas en concret l'increment en l'activitat GalU no va suposar un efecte significat en la producció dels exopolisacàrids. Per tant, sota aquestes condicions l'UDP-Glc no era limitant.

L'enzim UDP–Glc pirofosforilasa (GalU) es troba al centre del metabolisme primari i és àmpliament distribuït en totes les formes de vida com són animals, plantes i microorganismes (Mizanur and Pohl, 2008 i Lai *et al.*, 2008). Aquest enzim i el gen *galU* que codifica per aquesta proteïna varen ser el tema de més interès en els primers estudis de la síntesi dels carbohidrats de la superfície cel·lular en *E.coli* i del metabolisme de la galactosa (Weissborn *et al.*, 1994). L'UDP-Glc pirofosforilasa és una proteïna essencial per l'adhesió i virulència en bacteris gram – negatius ja que és necessari per la biosíntesi de polisacàrids capsulars i la biosíntesi del cor dels lipopolisacàrids, catalitzant la producció de forma reversible d'UDP-Glc i pirofosfat des de glucosa 1-fosfat i UTP (Mizanur i Pohl, 2008).

Després d'analitzar la ruta metabòlica del precursor UDP-Glc, es decideix sobreexpressar la proteïna GalU. Es clona el gen que codifica per aquesta proteïna directament d'*E.coli* i concretament de la soca JM109 per ser una de les soques seqüenciades i sense modificacions en aquesta zona del genoma.

### 1.2.2 Metabolisme del 1,2-diacilglicerol

El DAG és l'altre precursor de la síntesi dels glicoglicerolípids. En la Figura 15 es detalla la seva ruta de síntesi que tal i com s'observa va molt lligada a la síntesi dels fosfolípids de membrana d'*E.coli*.

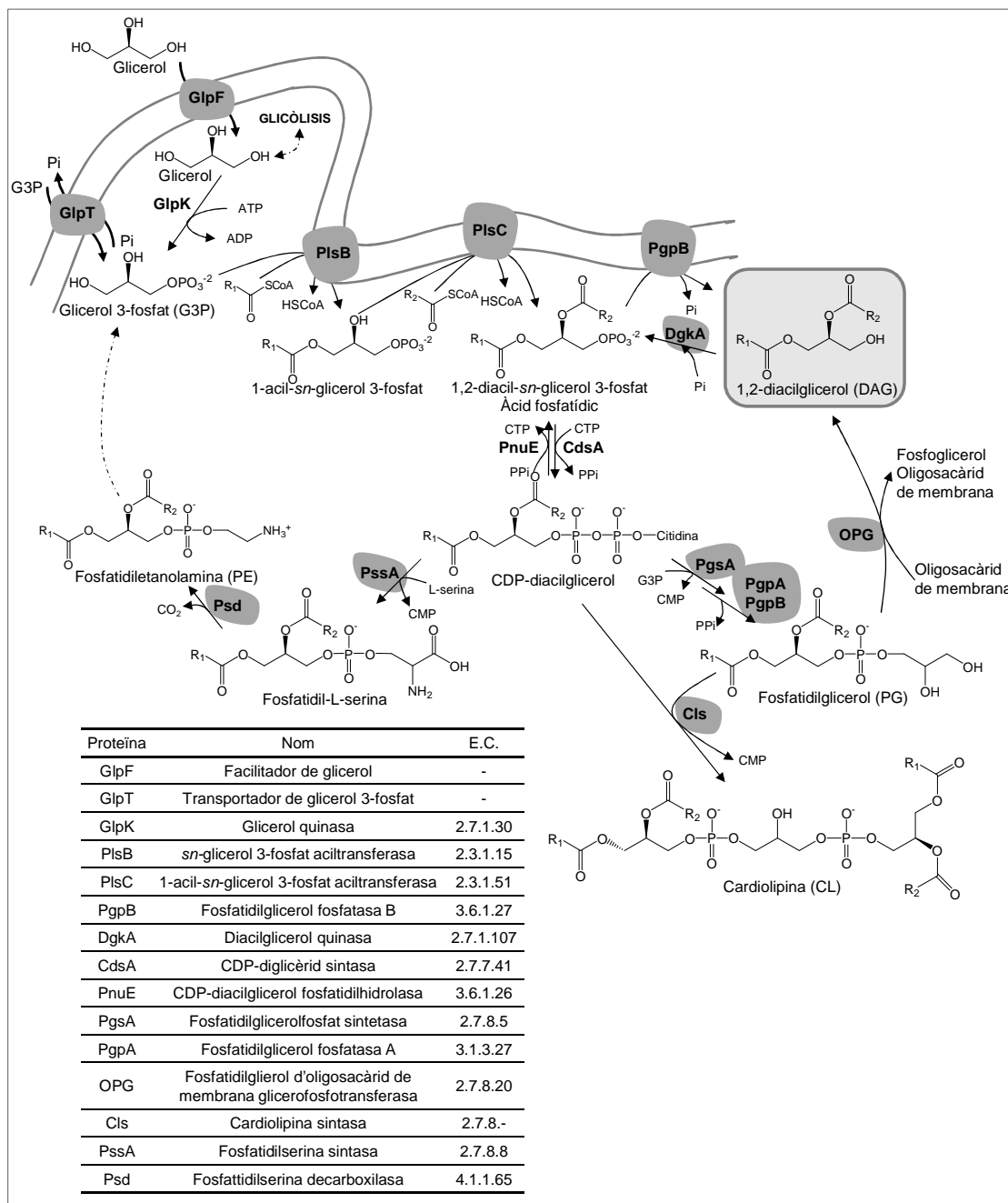


Figura 15: Metabolisme d'*E.coli* des de la introducció de glicerol extracel·lular fins a la obtenció de DAG.

Un intermediari important tant en la glicòlisi com en la biosíntesi de DAG i fosfolípids és el glicerol 3-fosfat (G3P) (Yoshimura *et al.*, 2007). En *E.coli* el G3P es pot usar com a única

font de carboni introduint-se a la cèl·lula a través del transportador de glicerol 3-fosfat (GlpT) (Lemieux *et al.*, 2004). A part de la introducció directa del G3P a partir del medi de cultiu, aquest intermedi cel·lular també es pot sintetitzar a través de la glicòlisis, mitjançant la degradació de fosfolípids o a partir de glicerol per l'acció de la glicerol quinasa (GlpK) emprant una molècula d'ATP (Pettigrew *et al.*, 1988). Aquest glicerol pot provenir directament del medi de cultiu mitjançant difusió facilitada (GlpF) (Zwaig *et al.*, 1970 i Heller *et al.*, 1980).

El G3P és convertit a àcid fosfatídic per l'acció d'aciltransferases. En primer lloc s'introdueix una primera cadena d'àcid gras per l'acció de l'enzim *sn*-glicerol 3-fosfat aciltransferasa o PlsB (Larson *et al.*, 1980). Aquest enzim, que presenta un paper important en la regulació de la membrana cel·lular, catalitza la reacció del G3P i l'acilCoA (Lightner *et al.*, 1980). El PlsB és responsable de la selecció dels àcids grassos incorporats en la primera posició dels fosfolípids de membrana sent els acilCoA de l'àcid palmític i l'àcid oleic els preferits per l'enzim (Zhang i Rock, 2008). En segon lloc, s'introdueix una segona cadena d'àcid gras a l'1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat per l'acció de l'enzim PlsC, que transfereix aquesta cadena d'un altre acilCoA formant l'1,2-diacilglicerol 3-fosfat o àcid fosfatídic.

És a partir de l'àcid fosfatídic que es bifurquen les rutes de síntesi per l'obtenció dels fosfolípids fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) i cardiolipina (CL), i la del DAG, precursor dels glicoglicerolípid d'interès. Pel que fa a la ruta dels fosfolípids, en *E.coli*, i en general en tots els bacteris, l'àcid fosfatídic es converteix a CDP-diacilglicerol sent aquest el precursor dels tres fosfolípids més importants. Els fosfolípids són, d'una banda, punts finals de metabolisme aportant els components majoritaris de la membrana cel·lular i, d'altra banda, precursors d'altres rutes metabòliques involucrades en la síntesis de macromolècules com són derivats oligosacàrids de la membrana, lipopolisacàrids i lipoproteïnes. En *E.coli* els principals fosfolípids són la fosfatidiletanolamina (PE) amb una abundància del 75% dels fosfolípids totals de la cèl·lula, el fosfatidilglicerol (PG) amb un 20% i la cardiolipina (CL) que hi és present amb un 5%. Se sap que aquests fosfolípids són totalment essencials per la cèl·lula tot i que no s'han definit exactament les bases moleculars del seu requeriment (DeChavigny *et al.*, 1991).

Es coneix que cada un d'aquests fosfolípids presenta una naturalesa química que pot aportar un efecte diferent a la membrana. Així, la PE és un lípid zwiteriònic que no forma bicapa lipídica, el PG és aniònic i forma bicapa i la CL és aniònica i no forma bicapa. La cèl·lula regula de forma acurada la síntesi d'aquests lípids en funció de les necessitats de la membrana. Les característiques estructurals d'aquesta són l'existència d'un estat líquid

– cristal·lí, una longitud òptima de les cadenes d'àcids grassos i uns percentatges crítics de lípids aniònics i lípids no formadors de bicapa (Wikström *et al.*, 2004). La importància de la membrana cel·lular és òbvia i es demostra clarament quan en la majoria dels casos en què s'han realitzat mutacions en enzims relacionats amb la síntesi de fosfolípids, les cèl·lules han mort o han presentat grans restriccions en el seu creixement. A més a més, canvis considerables en la composició de fosfolípids poden causar canvis remarcables en la fisiologia cel·lular (Coleman, 1990).

Per obtenir el DAG, la fosfatasa PgpB desfosforila l'àcid fosfatídic. Aquest enzim no és específic per aquest substrat sinó que també actua sobre l'1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat i el fosfatidilglicerolfosfat obtenint-se directament el PG. És per aquest motiu que, tot i ser l'enzim de l'últim pas de la producció de DAG, no sembla indicat sobreexpressar aquest enzim ja que al mateix temps es podria sobreproduir el PG i descompensar innecessàriament el balanç de fosfolípids. A més, es podria desviar la ruta tant del DAG com dels fosfolípids per la desfosforilació del 1-acil-*sn*-glicerol 3-fosfat.

El pas biosintètic anterior a la ruta del DAG és l'acció de l'aciltransferasa PlsC. Tot i que existeixen poques dades cinètiques del PlsC (Brenda Database), es decideix sobreexpressar aquesta proteïna ja que a diferència de la PgpB, la PlsC duu a terme només aquesta reacció i, per tant, es minimitza la possible interferència en altres rutes o intermedis (Icho i Raetz, 1983). A més, s'espera que la presència de la proteïna MG517 que utilitza el DAG contribuirà a desplaçar la biosíntesi d'aquest precursor cap a glicoglicerolípids.

A part de la sobreproducció del DAG, es pot plantejar alhora la realització de mutacions o supressions dels gens que expressen els enzims relacionats amb la síntesi de fosfolípids per tal d'accumular àcid fosfatídic i, així, probablement, DAG. Però es coneix que aquestes modificacions han suposat la mort de les cèl·lules o grans restriccions en el seu creixement (Coleman, 1990). Un exemple és la interrupció dels gens *pgsA* i *pgpB*, de la síntesi del PG, la qual cosa no permet el creixement cel·lular. Per tant, aquest fosfolípid es considera essencial en *E.coli* ja que, a més, es relaciona amb el moviment de les proteïnes de membrana i l'inici de la replicació de l'ADN. En el cas de la inactivació del gen *cls* que sintetitza la CL es veu que aquest gen no és essencial tot i que l'anàlisi dels lípids d'aquestes cèl·lules presenta una certa quantitat del fosfolípid. Finalment, el gen *pss* responsable de la síntesi de la PE es considera essencial en condicions de creixement normals ja que, sota aquestes condicions, no es dona creixement cel·lular. Tot i així, sorprenentment l'ús d'un medi ric que contingui altes concentracions d'ions divalents pot

substituir la funció estructural de la PE, la qual cosa restaura el creixement cel·lular tot i que amb certes dificultats (DeChavigny *et al.*, 1991 i Wikström *et al.*, 2004).

Per tant, en una primera modificació per enginyeria metabòlica s'opta per no inactivar cap gen i, així, no dificultar innecessàriament el creixement cel·lular. En resum, en el present treball, es pretén sobreexpressar la proteïna MG517 que permet la síntesi de glicoglicerolípids amb les proteïnes GalU, per la sobreproducció de UDP-Glc, i PlsC, per sobreproduir DAG tal i com es mostra en la Figura 16.

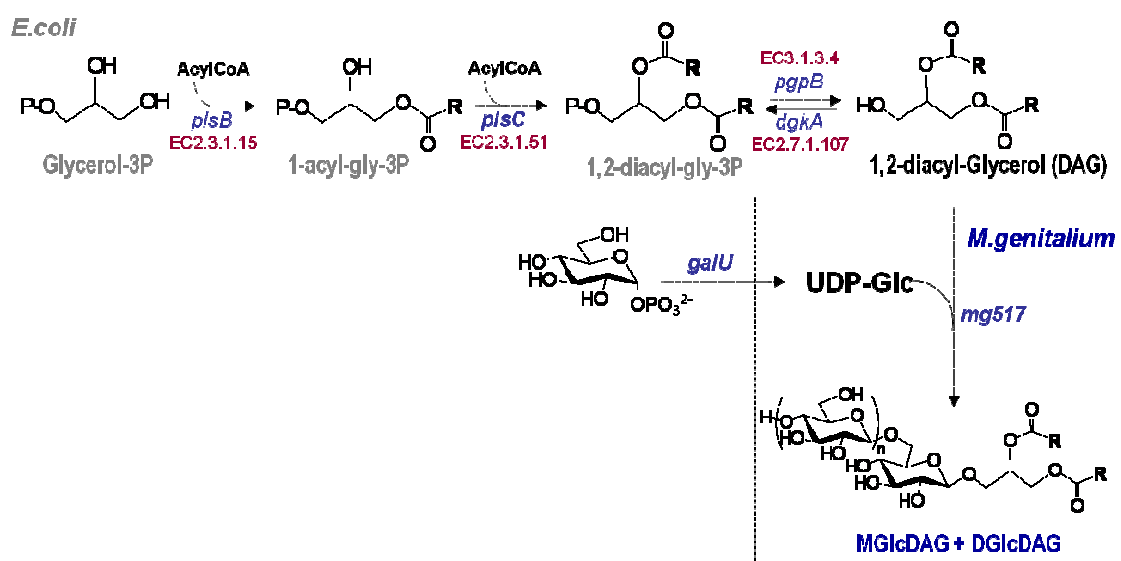


Figura 16: Ruta biosintètica proposada per la producció de glicoglicerolípids en *E. coli* recombinant.

Per l'expressió de les tres proteïnes dins una mateixa cèl·lula és necessari realitzar una coexpressió.

### 1.3 COEXPRESSIÓ DE PROTEÏNES EN *E. coli*

La coexpressió de proteïnes en una mateixa cèl·lula sorgí com un bon compromís entre purificacions endògenes i reconstruccions *in vitro* de proteïnes expressades individualment. La coexpressió ofereix la possibilitat d'obtenir alts rendiments de proteïnes expressades conjuntament permetent la reconstrucció de complexes proteínics o la cooperació d'activitats enzimàtiques dins la cèl·lula. Tot i això, aquesta tècnica pot presentar alguna limitació com és la disminució dels rendiments d'expressió davant l'augment del número de gens expressats. Aquesta limitació es pot superar amb l'ús de microfermentadors o amb medis d'autoinducció (Geerlof *et al.*, 2006 i Studier F. W., 2005).



De totes maneres, en enginyeria metabòlica no es busca l'optimització de l'expressió sinó la màxima productivitat del producte d'interès.

En *E.coli*, les estratègies de coexpressió més emprades són l'ús d'un sol vector on s'insereixen els gens d'interès o l'ús de múltiples vectors que contenen els diferents gens.

### 1.3.1 Coexpressió en *E.coli* amb múltiples vectors

En *E.coli*, l'aproximació més fàcil per coexpressar proteïnes és la transformació d'una mateixa cèl·lula amb més d'un vector en els quals s'han inserit els gens de forma individual, és a dir, en cada vector un sol gen. En la Figura 17 es detallen tres característiques importants dels plasmidis.

<b>Gens de resistència a antibiòtics</b>	Confereixen resistència als antibiòtics facilitant les fases de selecció cel·lular.
<b>Multiple Cloning Site (MCS)</b>	Seqüència d'ADN que conté diverses dianes d'enzims de restricció que apareixen una única vegada en tot el vector. Permet la introducció de fragments d'ADN externs com són els gens.
<b>Origen de replicació</b>	Permet la síntesi de còpies durant la multiplicació del bacteri.

**Figura 17: Principals característiques dels vectors de clonació.**

En aquest tipus de coexpressió, donat que es busca la convivència de més d'un plasmidi dins la mateixa cèl·lula, s'han de tenir presents els següents aspectes. D'una banda, amb la finalitat d'assegurar la transformació de les cèl·lules amb tots els vectors i, per tant, realitzar una bona selecció cel·lular, tots els vectors que es vulguin coexpressar han de comptar amb gens de resistència a diferents antibiòtics. D'altra banda, s'ha de tenir present que plasmidis amb el mateix origen de replicació són, en principi, incompatibles ja que poden competir dins la cèl·lula durant els passos de replicació i partició cel·lular i, per tant, no es garanteix el número de còpies de cada un dels plasmidis o fins i tot se'n pot eliminar algun (Romier *et al.*, 2006). Per això, és important que cada plasmidi compti amb un origen de replicació diferent.

### 1.3.2 Coexpressió en *E.coli* amb un sol vector

La coexpressió amb un sol vector es basa en inserir diferents gens dins un mateix vector. Aquesta estratègia requereix l'ús d'un vector amb més d'un *Multiple Cloning Site (MCS)*. Existeixen dos tipus de vectors d'aquest tipus en funció de si els dos gens comparteixen el mateix promotor realitzant una única transcripció d'ARN per als dos gens, anomenada transcripció policistrònica o simple, o si existeixen dos promotors independents, un per cada gen, transcripció monocistrònica o múltiple (Sheich *et al.*, 2007).

Cal destacar que totes aquestes estratègies de coexpressió en *E.coli*, és a dir, l'expressió a partir d'un sol vector o amb múltiples vectors són compatibles i, per tant, es poden combinar per incrementar el número de proteïnes coexpressades dins una mateixa cèl·lula d'*E.coli*.

Donat que es vol estudiar l'efecte de la sobreproducció de cada precursor de la síntesi dels glicoglicerolípidis de forma independent i conjunta, es decideix emprar la coexpressió amb múltiples vectors utilitzant un vector per cada proteïna expressada: MG517, GalU i PlsC. D'aquesta forma, es facilita l'estudi dels efectes de cada gen tant en el creixement com en la producció dels glicoglicerolípidis d'interès.

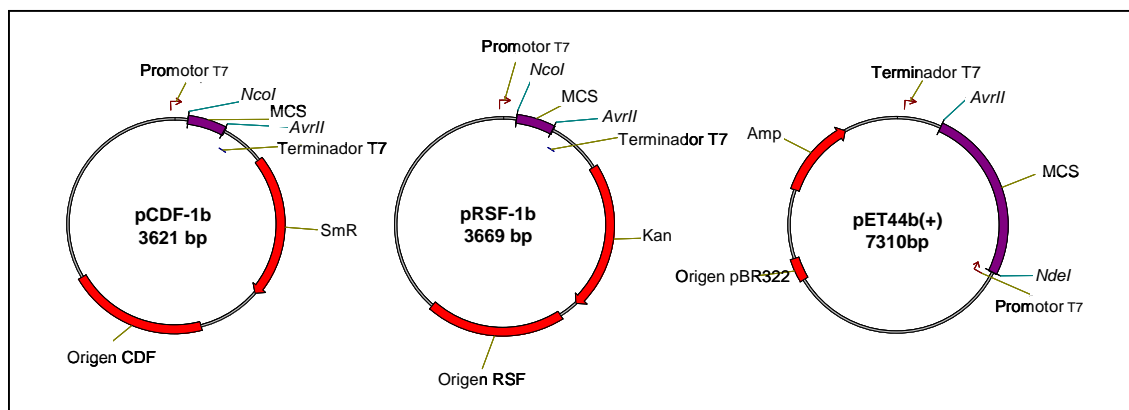
## 1.4 CONSTRUCCIÓ DELS VECTORS DE COEXPRESSIÓ DELS GENS *galU*, *plsC* I *mg517*.

### 1.4.1 Disseny dels vectors de coexpressió

Els tres vectors seleccionats per la coexpressió dels enzims *galU*, *plsC* i *mg517* es basen en el sistema pET. Aquest sistema és un dels més utilitzats per la clonació i expressió de proteïnes recombinants en *E.coli*. Els gens d'interès es clonen en els plasmidis pET sota el promotor T7. L'expressió s'indueix proveint una font d'IPTG que activa la síntesi de la polimerasa d'ARN T7 de la sòca hoste. Aquesta polimerasa és suficientment activa com perquè la majoria dels recursos de la cèl·lula es converteixin en l'expressió del gen en estudi. A més, cal destacar que el sistema pBR322 i molts dels seus derivats, on s'inclouen els vectors pET, són relativament estables i es mantenen retinguts en una gran fracció de cèl·lules hostes fins i tot després del creixement de varies generacions sense la presència de l'antibiòtic selectiu (Studier i Moffatt, 1986).

Els vectors seleccionats en aquest treball són el pET44b(+), el pRSF-1b i el pCDF-1b, cadascun amb un gen de resistència a antibiòtic i un origen de replicació diferents i

compatibles entre ells per tal d'assegurar la coexpressió dels tres plasmidis (Taula 1 i Figura 18) (Selzer *et al.*, 1983).



**Figura 18: Esquema dels tres vectors d'expressió seleccionats.** En cada plasmidi s'observen: el promotor T7, el terminador T7, el MCS, les dianes de restricció que flanquegen el MCS, l'origen de replicació i el gen de resistència a antibiòtic (on: SmR significa estreptomicina; Kan, kanamicina i Amp, ampicil·lina).

En aquest cas no interessa la purificació de les proteïnes, sinó l'activitat que presenten *in vivo*. És per aquest motiu que els gens s'introdueixen entre les dues dianes de restricció que flanquegen la regió del MCS en cada un dels vectors i, per tant, s'eliminen les proteïnes de fusió que faciliten purificacions per afinitat com per exemple la *HisTag*. D'aquesta manera, no s'allarga innecessàriament la seqüència del gen. Així doncs, en la Taula 1 es resumeixen els plasmidis seleccionats amb els antibiòtics als quals són resistents, els orígens de replicació, les dianes de restricció entre les que s'introduiran els gens i, finalment, cada un dels gens a clonar.

**Taula 1: Plasmidis de treball, resistència a antibiòtics, orígens de replicació, dianes de restricció entre les que s'introduiran els gens i cada un dels gens a clonar.**

Plasmidi	Resistència antibiòtic	Origen replicació	Dianes de restricció	Gens
pCDF-1b	Estreptomicina	CloDF13	<i>NcoI</i> i <i>AvrII</i>	<i>galU</i>
pRSF-1b	Kanamicina	RSF1030	<i>NcoI</i> i <i>AvrII</i>	<i>plsC</i>
pET44b(+)	Ampicil·lina	ColE1 (pBR322)	<i>NdeI</i> i <i>AvrII</i>	<i>mg517</i>

El plasmidi pCDF-1b té origen de replicació CloDF13 (originari de *Enterobacter cloacae* DF13) i mostra resistència a l'estreptomicina (Veltkamp *et al.*, 1979). Utilitzant les dianes de restricció *NcoI* i *AvrII*, es clona el gen *galU* donant lloc a un nou vector anomenat pCDF – galU. El plasmidi pRSF-1b presenta l'origen de replicació RSF1030 i és resistent a la kanamicina. En aquest cas, les dianes emprades per clonar el gen *plsC* són també la *NcoI* i la *AvrII* donant lloc al vector pRSF – plsC. Finalment, s'introdueix el gen *mg517* entre les dianes *NdeI* i *AvrII* del plasmidi pET44b(+) l'origen de replicació del qual és ColE1

(pBR322) i presenta resistència a l'ampicil·lina. Aquest últim vector construït rep el nom de pET44b(+) – mg517. Cal destacar que cap dels altres dos gens poden ser clonats al plasmidi pET44b(+) entre les dianes seleccionades perquè en la pròpia seqüència del gen tenen la diana de restricció *NdeI* emprada en la clonació.

Així doncs, tal com es mostra en la Figura 19, el gen *galU* es clonarà en el plasmidi pCDF, el *plsC* al pRSF i el gen de la glicosiltransferasa al plasmidi pET44b(+).

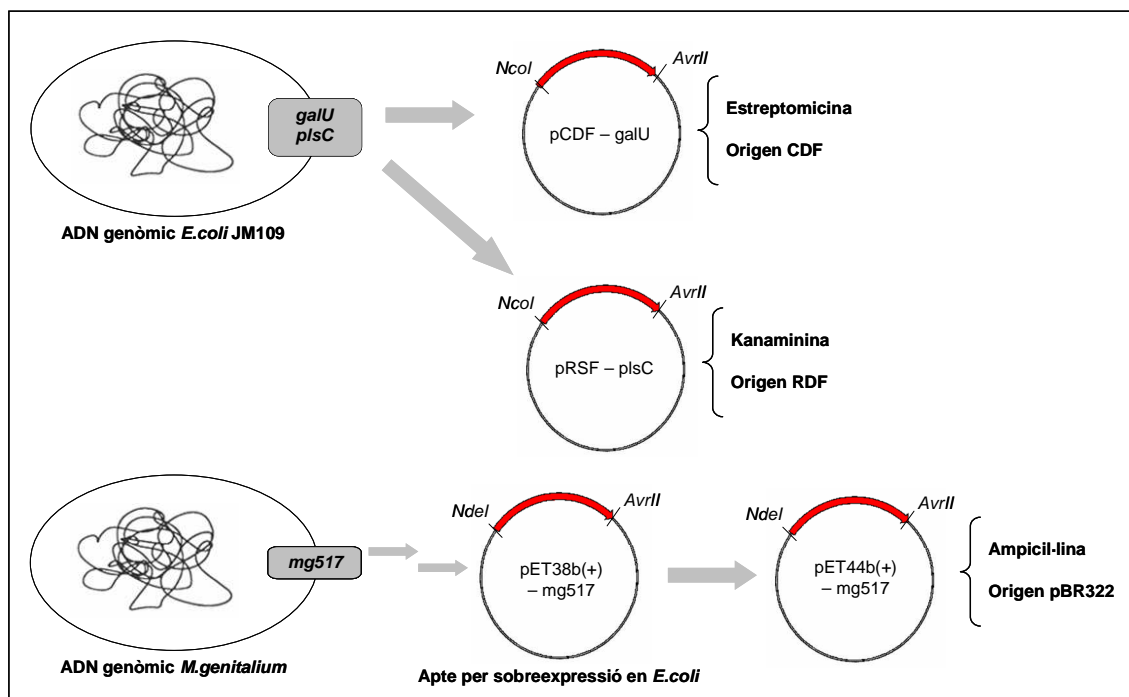


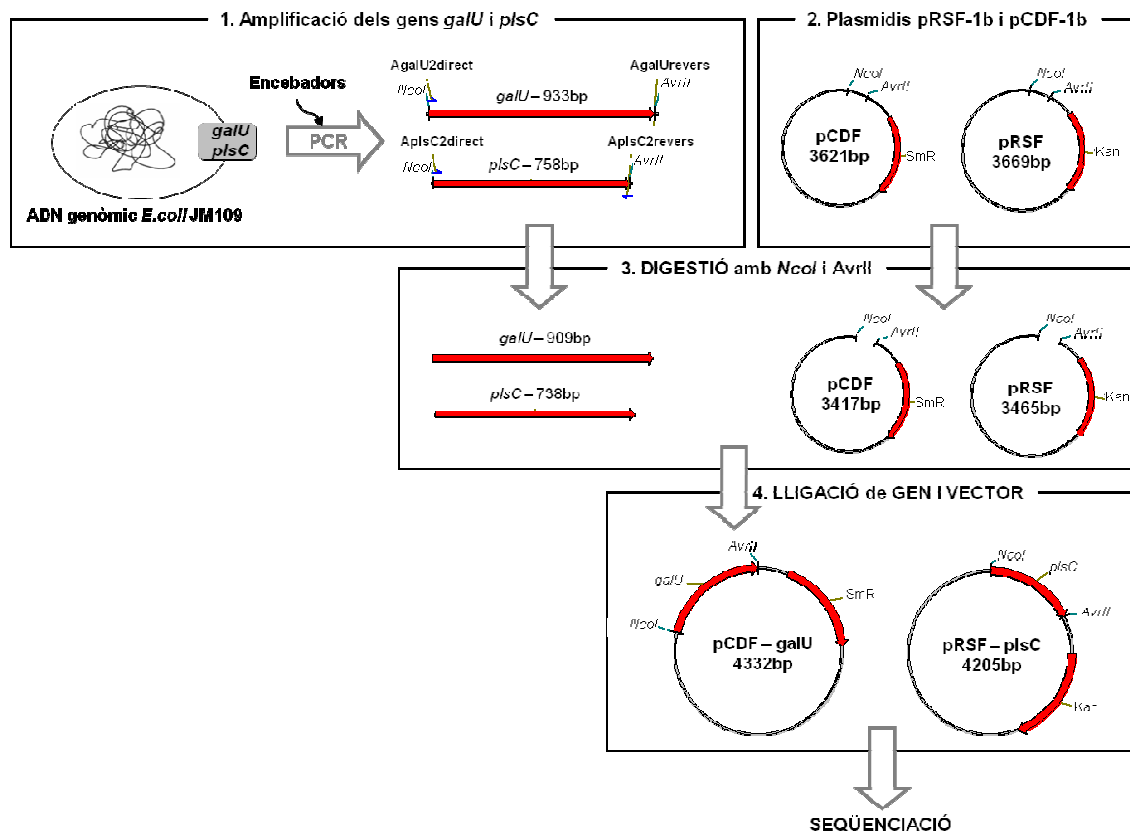
Figura 19: Esquema dels vectors de coexpressió dels gens *galU*, *plsC* i *mg517*.

D'una banda, els gens *galU* i *plsC* s'obtenen de l'ADN genòmic de la soca d'*E. coli* JM109. D'altra banda, el gen que codifica per la glicosiltransferasa prové del genoma de *Micoplasma genitalium*. Aquest gen ja s'havia clonat amb anterioritat al laboratori al vector d'expressió pET38b(+) apte per l'expressió en *E. coli* (Andrés *et al.*, 2011). Aquest plasmidi presenta resistència a la kanamicina, igual que el pRSF-1b, la qual cosa no permet la coexpressió d'ambdós vectors. És per aquest motiu que se subclona el gen *mg517* directament del pET38b(+) al plasmidi pET44b(+) resistent a l'ampicil·lina i, per tant, apte per a la coexpressió.

#### 1.4.2 Construcció dels vectors pCDF – galU i pRSF - plsC

Els plasmidis pCDF – galU i pRSF – plsC es construeixen tal com es mostra en la Figura 20. En primer lloc i un cop confirmades les seqüències d'ADN al GenBank, s'amplifiquen

els gens d'interès a partir de l'ADN genòmic prèviament purificat de la soca d'*E.coli* JM109. Per això, es dissenyen els encebadors per amplificar els gens per PCR i s'introdueixen les dianes de restricció prèviament definides *NcoI* i *AvrII*. Després de l'amplificació, el producte obtingut i els plasmidis es digereixen i es procedeix amb la lligació de l'insert i el vector per finalment analitzar-ne la seqüència.



**Figura 20: Esquema del procés a seguir per a l'obtenció dels plasmidis pCDF – galU i pRSF – plsC.**  
 1: Amplificació dels gens amb els encebadors AgalU2direct i AgalUrevers pel *galU* i AplsC2direct i AplsC2revers pel *plsC*; 2: Obtenció dels plasmidis; 3: Digestió i 4: Lligació.

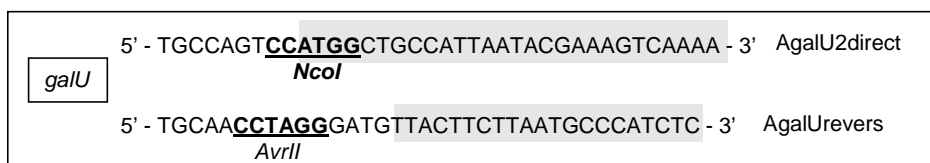
#### 1.4.2.1 Obtenció dels gens *galU* i *plsC*

Amb la finalitat d'obtenir els gens *galU* i *plsC*, és necessari realitzar l'amplificació d'aquests mitjançant una PCR a partir de l'ADN genòmic d'*E.coli* JM109 prèviament revifada segons el Protocol 1.1. L'amplificació es realitza a partir dels encebadors dissenyats. Aquests són oligonucleòtids sintètics capaços d'hibridar-se als extrems del fragment d'interès de l'ADN motlle i que permeten iniciar la reacció d'amplificació. A més, les dianes de restricció necessàries s'han d'introduir a les puntes dels oligonucleòtids per tal de fer la posterior digestió del producte d'amplificació. Hi ha diferents punts importants a l'hora de fer el disseny d'aquests encebadors (Maniatis *et al.*, 1988):

1. El contingut en G i C ha d'estar entre un 40 i un 60%.
2. La zona complementària a l'ADN motlle ha d'anar entre 18 i 25 pb. En casos d'ADN genòmic se sol treballar entre 20 i 40 pb per assegurar la correcta hibridació.
3. S'han de tenir en compte les restriccions que puguin tenir certes polimerases.
4. La introducció de les dianes de restricció necessàries ha d'anar acompanyat del número de bases nitrogenades de marge que es detallen al catàleg dels enzims de restricció. Aquest punt és important per la posterior digestió de l'ADN.
5. Cal comprovar que les dianes de restricció no es trobin en la seqüència dels gens.

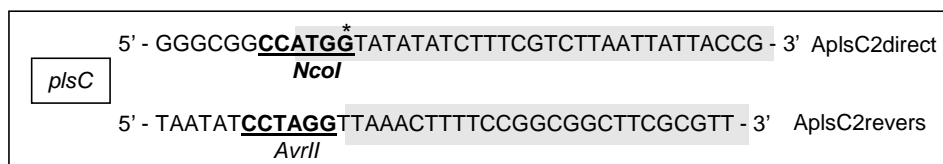
Les dianes a introduir en els dos gens són la *NcoI* (C/**CATGG**) i l'*AvrII* (C/**CTAGG**). La seqüència d'aquesta última s'introdueix després del codó de parada del gen, la qual cosa no comporta cap problema en la seqüència d'aquest. En canvi, l'ATG de la diana *NcoI* correspon a la metionina inicial del gen. Per tant, es comprova que la següent base nitrogenada (G), necessària en la diana de restricció, sigui present en els gens formant part del segon codó.

En el gen *galU* es donen totes les premisses anteriors ja que el segon codó del gen és GCT i, per tant, ja conté de forma natural la G inicial necessària per la diana *NcoI*. Així doncs, la introducció d'aquesta diana no obliga cap modificació i no es trenca el marc de lectura. Els encebadors dissenyats per l'amplificació d'aquest gen es mostren en la Figura 21.



**Figura 21: Encebadors per l'amplificació del gen *galU*.** En negra es ressalten les dianes de restricció i ombrejat en gris, la zona complementària al gen.

En el cas del gen *p/sC*, la seqüència original d'aquest gen conté una citosina (C) després de l'ATG inicial en comptes d'una guanina (G). Per solucionar-ho, en el disseny de l'encebador es decideix introduir una mutació canviant la citosina per una guanina la qual cosa farà que el gen codificarà per valina, en comptes de per leucina, l'aminoàcid original. De totes maneres, aquest canvi no comportarà problemes ja que ambdós aminoàcids tenen una estructura similar i, a més a més, la mutació està situada a l'extrem N-terminal de la proteïna. En la Figura 22 es mostren els encebadors dissenyats per l'amplificació del gen *p/sC* on es marca amb un asterisc la base nitrogenada modificada.



**Figura 22: Encebadors per l'amplificació del gen *pIsC*.** En negreta es ressalten les dianes de restricció i ombrejat en gris, la zona complementària al gen. La base nitrogenada modificada es marca amb un asterisc.

Un cop dissenyats els encebadors, es calculen diferents paràmetres mitjançant el programa Vector NTI (Versió 4.0, InforMax, Inc.) tal com es mostra en la Taula 2. D'aquests paràmetres es destaca la temperatura de fusió ( $T_f$ ) i les energies de Gibbs per la seva importància en el disseny de la PCR.

- La  $T_f$  ve determinada directament del disseny dels oligonucleòtids i es defineix com la temperatura en la qual el 50% de les molècules es troben unides al motlle. Aquesta temperatura és funció del nombre de bases que formen la seqüència i el contingut en G+C, ja que aquestes generen una hibridació més forta, i, per tant, com més gran el contingut en G+C, més elevada serà la temperatura d'hibridació.
- D'energies de Gibbs se'n destaquen tres: la d'hibridació entre ADN motlle i encebador i la de formació d'homodímers i heterodímers. Aquests últims poden dificultar la unió desitjada entre el motlle i l'oligonucleòtid i, per tant, és molt important que les energies de formació d'aquests dímers siguin molt menys negatives que la d'hibridació.

**Taula 2: Paràmetres dels encebadors segons el programa Vector NTI:** longitud total de l'encebador, contingut en G i C, temperatura de fusió i energies de Gibbs per evitar la formació d'homo i heterodímers que dificultin la unió entre els oligonucleòtids i el motlle.

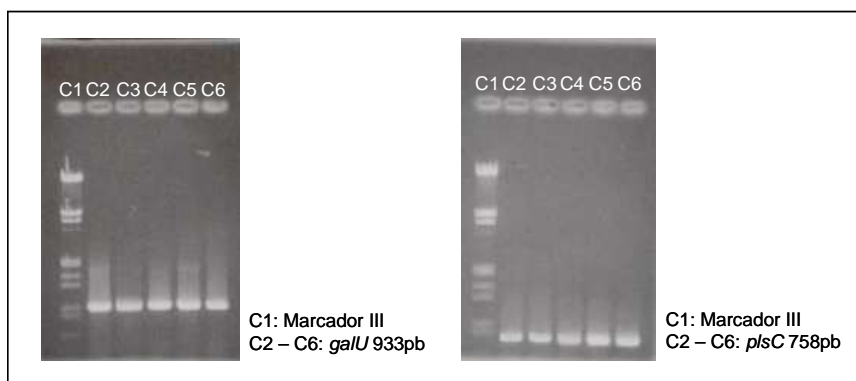
	<i>galU</i>		<i>pIsC</i>	
	Directe	Revers	Directe	Revers
Longitud total (pb)	37	36	39	38
Contingut en G i C (%)	43.2	44.4	43.6	44.7
Temperatura de fusió ( °C)	73.4	68.6	70.1	72.6
dG d'hibridació (Kcal mol <sup>-1</sup> )	-67.5	-61.7	-70.7	-73.6
dG homodímer (Kcal mol <sup>-1</sup> )	-6.5	-5.3	-6.5	-5.3
dG heterodímer (Kcal mol <sup>-1</sup> )	-3.3		-1.7	

Per tal d'amplificar els gens d'interès per PCR és necessari, d'una banda, els encebadors dissenyats anteriorment i, d'altra banda, l'ADN motlle a partir de la qual es copiarà la seqüència del gen. Aquest ADN és el genòmic de la soca *d'E.coli* JM109 i s'obté emprant

el *GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit* preparat per l'extracció d'ADN genòmic tant de bacteris *gram +* com *gram -* (Protocol 1.2). Un cop s'obté l'ADN es quantifica per espectrofotometria seguint el Protocol 1.3 i es prepara la reacció de PCR mesclant l'ADN i els oligonucleòtids juntament amb les bases nitrogenades, la polimerasa PfuTurbo i el tampó de reacció.

En la realització de PCR és important el programa de temperatures emprat. Aquest permet la separació i unió dels ADNs i l'actuació de la polimerasa sintetitzant l'amplificació desitjada. Cal destacar la temperatura d'hibridació que ha de ser suficientment baixa perquè s'uneixi l'encebador amb el motlle i s'obtingui un bon rendiment, però suficientment alta perquè aquesta unió sigui el més específica possible. Generalment, la temperatura seleccionada per a la reacció és entre 3 i 5 °C per sota la temperatura de fusió dels encebadors. Tot i així, en aquest cas, com que les temperatures de fusió són molt elevades, pel *galU* 73,4 °C i 68.6 °C i pel *plsC* 70.1 °C i 72.6 °C, degut a que els oligòmers s'han dissenyat molt llargs per tractar-se d'una amplificació d'ADN genòmic, la temperatura seleccionada és de 60 °C (Protocol 1.4).

La PCR sota aquestes condicions permet la obtenció dels productes d'interès previstos tal com mostren els gels d'agarosa a l'1% de la Figura 23. El producte d'amplificació pel *galU* és de 933 pb i de 758 pb pel *plsC*. Aquestes bandes s'extreuen del gel i es purifiquen seguint el Protocol 1.6.



**Figura 23: Gels d'electroforesi d'agarosa a l'1% de les PCRs preparatives d'amplificació dels gens *galU* i *plsC*.**

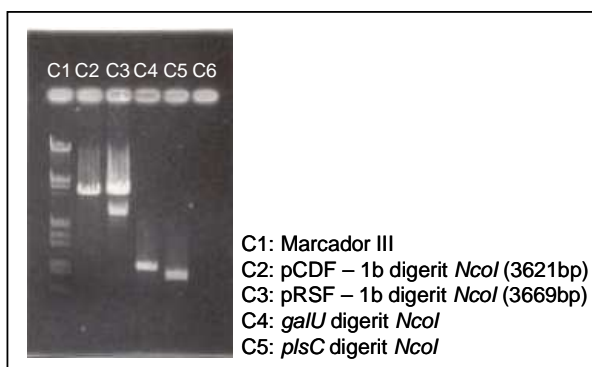
#### 1.4.2.2 Digestió dels gens *galU* i *plsC* i els plasmidis pCDF-1b i pRSF-1b.

En primer lloc, s'obté un estoc dels plasmidis pCDF-1b i pRSF-1b a partir de l'ADN comercial. Per això, es transformen cèl·lules d'*E.coli* DH5 $\alpha$  (Protocol 1.7) i es purifica l'ADN plasmídic mitjançant el *Gene Elute™ HP Plasmid Midiprep kit* (Protocol 1.8).



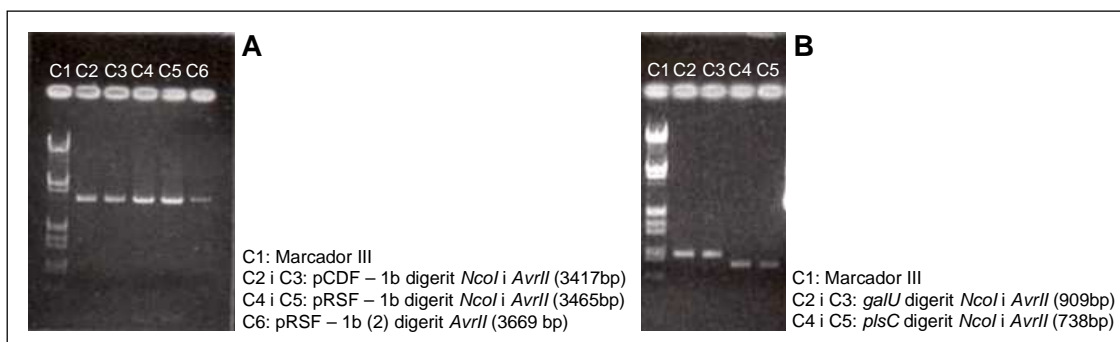
A continuació, s'inicia la digestió tant dels plasmidis com dels productes d'amplificació obtinguts anteriorment utilitzant els enzims de restricció *NcoI* i *AvrII*. Cada enzim de restricció té unes condicions de reacció característiques i conegudes. Cal destacar l'activitat *star* de l'enzim de restricció *NcoI* la qual cosa li atorga una alta capacitat de digestió de seqüències teòricament no reconegudes com a dianes i, per tant, és especialment important no excedir-se amb la concentració d'enzim de restricció. Per aquest motiu i donat que les dues dianes es troben properes en els vectors, es decideix fer el procés de digestió de forma seqüencial, és a dir, primer l'enzim *NcoI* i posteriorment amb l'*AvrII*.

Així doncs, per ser el més problemàtic, s'inicia la digestió tant de vectors com de gens amb l'enzim *NcoI*. (Protocol 1.10) El resultat es mostra en la Figura 24 on, en primer lloc, s'observa que el plasmidi pCDF – 1b s'ha linealitzat totalment (Carril 2) mentre que la digestió del pRSF – 1b no ha estat complerta, veient dues bandes (Carril 3). Alhora, es mostra la digestió dels productes d'amplificació.



**Figura 24: Digestió de plasmidis i gens amb l'enzim de restricció *NcoI*.**

A continuació, es tallen totes les bandes dels corresponents plasmidis i gens, es purifiquen i es procedeix a la digestió amb l'enzim de restricció *AvrII* seguint el Protocol 1.11. El resultat es mostra en la Figura 25. En el gel A, es confirma la doble digestió del pCDF – 1b obtenint un fragment de 3417 bp i del pRSF – 1b sent la banda de 3465 bp. En cap dels dos casos s'aprecia l'ADN resultant de la doble digestió ja que són d'unes 200 bp i, per tant, en ser un fragment tan petit no es veuen al gel. A més a més, també s'observa que la banda anomenada pRSF – 1b (2), considerada no linealitzada en l'experiment anterior, després de la digestió amb *AvrII*, es linealitzava donant un fragment de 3669 bp, lleugerament superior al plasmidi doblement digerit de 3665 bp. En el gel B es mostren els productes d'amplificació digerits per les dues dianes de restricció corresponent a 909 bp pel *galU* i 738 bp pel *plsC*.



**Figura 25: Digestió de plasmidis i gens amb l'enzim de restricció *AvrII*.** **Gel A:** C1 – Marcador III de New England Biolabs; C2 i C3 – Doble digestió del plasmidi pCDF – 1b; C4 i C5 – Doble digestió del plasmidi pRSF – 1b; C6 – Digestió simple del plasmidi pRSF – 1b (2). **Gel B:** C1 – Marcador III de New England Biolabs; C2 i C3 – Doble digestió del fragment corresponent al gen *galU*; C4 i C5 – Doble digestió del fragment corresponent al gen *plsC*.

Totes les mostres doblement digerides es purifiquen seguint el Protocol 1.6.

#### 1.4.2.3 Lligació entre gens i vectors

Un cop digerits els productes d'amplificació i els vectors es procedeix a realitzar les lligacions per obtenir els plasmidis amb els gens *galU* i *plsC* clonats: pCDF – *galU* i pRSF – *plsC*. Les condicions de lligació emprades són les més genèriques amb una mescla 1:3 de vector i insert (Protocol 1.13). Es realitza la transformació de cèl·lules DH5 $\alpha$  amb els productes de lligació (Protocol 1.7) i s'obtenen entre 50 i 100 colònies. De quatre d'elles s'aïlla l'ADN plasmídic i es confirma la presència dels gens inserits mitjançant PCR.

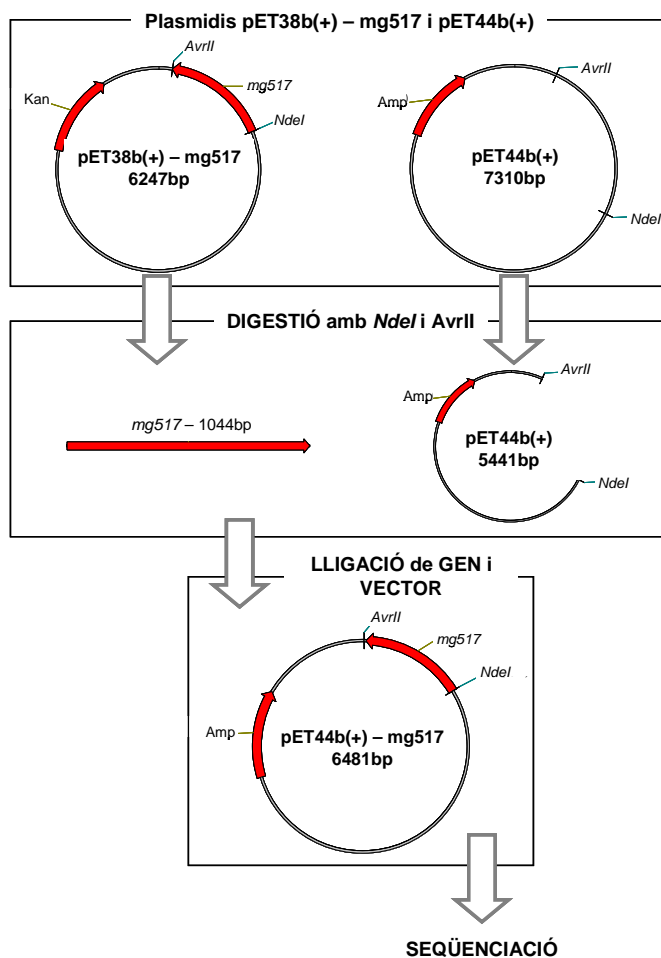
#### 1.4.2.4 Anàlisi de seqüenciació

L'anàlisi de seqüenciació permet assegurar la correcta inserció dels gens i certificar que no s'hagi produït cap mutació durant tot el procés de clonació. Per a l'anàlisi, és necessari l'ús d'uns encebadors externs als MCS per poder veure la integritat del gen clonat. Per aquests plasmidis ja hi ha definits uns encebadors universals anomenats Promotor T7 i Terminador T7 que reuneixen aquestes característiques.

Els resultats de la seqüenciació emprant el mètode del *BigDye Terminator v3.1 ABSPrism* segons el Protocol 1.14 han confirmat la correcta construcció dels dos plasmidis pCDF – *galU* i pRSF – *plsC* (veure Annex 1).

### 1.4.3 Construcció del vector pET44b(+) – mg517

El procés a seguir per la construcció del plasmidi pET44b(+) – mg517 és més senzill donat que ja s'havia clonat aquest gen en treballs anteriors al laboratori (Martínez, Comunicació personal). Així doncs, l'esquema a seguir en aquest cas és el mostrat en la Figura 26. Tal i com es pot veure es parteix de dos plasmidis: el pET44b(+) comercial on es vol introduir el gen d'interès i el pET38b(+) – mg517 obtingut anteriorment al laboratori. Aquest últim és un vector pET que té introduïda la seqüència del gen *mg517* entre les dianes de restricció *NdeI* i *AvrII*. Donat que aquestes dianes són les seleccionades per la introducció del mateix gen al pET44b(+), el procés de construcció d'aquest plasmidi s'inicia amb la digestió dels dos plasmidis. D'aquesta forma, i després d'una purificació de l'ADN resultant, s'obtenen tant el pET44b(+) com el gen *mg517* preparats per la lligació. Un cop units insert i vector, es transforma i només resta la seqüenciació que es duu a terme amb el mètode del *Big Dye Terminator 3.1*.



**Figura 26:** Esquema del procés a seguir per a l'obtenció del plasmidi pET44b(+) – mg517 a partir del plasmidi pET38b(+) – mg517. Es digereixen els dos plasmidis amb *NdeI* i *AvrII* obtenint el fragment amb el gen *mg517* i el plasmidi pET44b(+) preparats per la lligació de gen i vector.

A continuació es detallen els diferents passos realitzats.

#### 1.4.3.1 Digestió dels plasmidis pET38b(+) – mg517 i pET44b(+)

Amb la finalitat de clonar el gen *mg517* present al pET38b(+) al pET44b(+) es realitza la digestió dels dos plasmidis amb les dianes de restricció *NdeI* i *AvrII*. En aquest cas la digestió es fa directament amb els dos enzims de restricció segons el Protocol 1.12. El resultat es mostra en l'electroforesi en gel d'agarosa de la Figura 27 on s'observen tots els fragments d'ADN esperats. Els dos fragments de la digestió del pET38b(+) corresponen a 5203 bp i 1044 bp, sent aquest últim el que conté el gen. I els dos fragments del plasmidi pET44b(+) són de 5441 bp, on es lligarà el fragment amb el gen, i de 1869 bp. A continuació, es purifiquen els fragments que corresponen al pET44b(+) digerit i l'*mg517*.

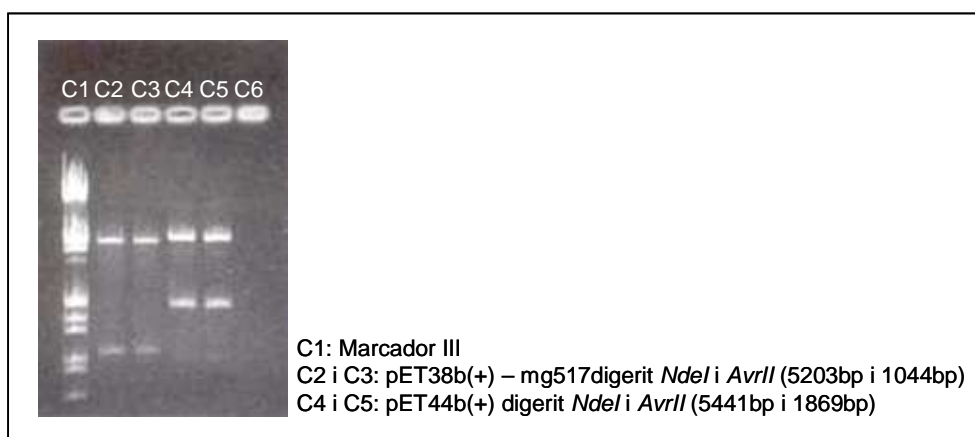


Figura 27: Digestió dels plasmidis pET38b(+) – mg517 i pET44b(+) amb els enzims de restricció *NdeI* i *AvrII*.

#### 1.4.3.2 Lligació entre gen i vector

Un cop digerits els gen i el vector es procedeix a realitzar la lligació per obtenir el plasmidi pET44b(+) – mg517 utilitzant una mescla 1:3 de vector i insert. Es transforma el producte de lligació en cèl·lules DH5 $\alpha$  i s'aïlla l'ADN plasmídic. Es confirmen les mostres d'ADN que contenen el gen mitjançant una digestió del plasmidi amb les dianes de restricció *NdeI* i *AvrII* i posteriorment es procedeix amb la seqüenciació de les noves construccions.

#### **1.4.3.3 Anàlisi de seqüenciació**

En la seqüenciació d'aquest plasmidi s'usa l'encebador T7 Promotor i un oligonucleòtid que s'uneix a la meitat del gen *mg517*. La combinació dels dos permet observar tota la seqüència del gen. Els resultats de la seqüenciació emprant el mètode del *BigDye Terminator v3.1 ABSPrism* han confirmat la correcta construcció del plasmidi pET44b(+) – *mg517* (veure Annex 1).



## Capítol 2: Soques modificades per enginyeria metabòlica

Un cop obtinguts els tres plasmidis, cada un amb el gen d'interès, l'objectiu és obtenir les 8 soques modificades d'*E.coli* BL21(DE3) *star* que es mostren en la Taula 3. Per això, es transformen les cèl·lules fent diferents combinacions de gens donant lloc a: una soca control sense cap gen, tres soques amb un dels tres gens d'interès, tres soques amb combinacions de dos gens i finalment la soca que conté els tres gens.

**Taula 3: Soques d'*E.coli* BL21(DE3) *star* modificades.** La nomenclatura seleccionada es basa en la presència (majúscula) o no de cada gen (*mg517*: A, *galU*: B i *plsC*: C).

Soca	Plasmidis	Gens		
		<i>mg517</i>	<i>galU</i>	<i>plsC</i>
abc	pET44b(+)/ pCDF-1b / pRSF-1b	-	-	-
aBc	pET44b(+)/ pCDF-galU / pRSF-1b	-	+	-
abC	pET44b(+)/ pCDF-1b / pRSF-plsC	-	-	+
aBC	pET44b(+)/ pCDF-galU / pRSF-plsC	-	+	+
Abc	pET44b(+)-mg517 / pCDF-1b / pRSF-1b	+	-	-
ABc	pET44b(+)-mg517 / pCDF-galU / pRSF-1b	+	+	-
AbC	pET44b(+)-mg517 / pCDF-1b / pRSF-plsC	+	-	+
ABC	pET44b(+)-mg517 / pCDF-galU / pRSF-plsC	+	+	+

En la Taula 3 s'especifiquen els gens introduïts en cada una de les soques i la nomenclatura seleccionada. S'ha atribuït una lletra per cada gen: **A** per l'*mg517*, **B** pel *galU* i **C** pel *plsC*. Donat que es volen fer comparacions entre les soques que contenen un gen o un altre és necessari que totes les cèl·lules continguin el mateix nombre de plasmidis, ja que en cas contrari els creixements poden ser diferents. Per això, en el cas de no introduir el gen s'ha transformat la cèl·lula amb el plasmidi comercial, és a dir, sense el gen d'interès inserit. Així doncs, les lletres minúscules simbolitzen que només hi ha el plasmidi mentre que les majúscules signifiquen que s'ha introduït el plasmidi amb el gen inserit. Per exemple, la soca abc conté els plasmidis sense cap gen inserit i, en canvi, la soca ABC té tots els tres gens d'interès. La transformació de les cèl·lules d'*E.coli* amb els diferents plasmidis es realitza de forma seqüencial. Cal remarcar, que les soques que només tenen el plasmidi també expressen la part d'ADN corresponent a la continuació del promotor i, per tant, el seu comportament no és igual que la soca d'*E.coli* on no s'ha introduït cap gen.

El següent pas a realitzar amb aquestes soques és observar-ne la seva viabilitat, determinar les condicions de creixement i analitzar de forma qualitativa la sobreexpressió dels diferents gens i la producció dels glicoglicerolípid d'interès.

## **2.1 CONDICIONS DE CREIXEMENT I VIABILITAT**

### **2.1.1 Selecció del medi de cultiu**

La importància d'un bon disseny d'enginyeria metabòlica no rau simplement en una estratègia a nivell d'ADN adequada sinó també en seleccionar correctament les condicions de creixement cel·lular. Per això, és primordial definir un medi de cultiu en base a les necessitats cel·lulars i experimentals desitjades.

Un medi de cultiu correctament dissenyat ha d'aportar tots els nutrients necessaris, i en quantitats suficients, per garantir la no limitació del creixement cel·lular. L'aproximació més senzilla són els medis anomenats complexos. Aquests medis estan formats a base d'hidrolitzats proteics (extractes de llevat, casaminoàcids, peptones) que aporten abundants quantitats de varietat d'aminoàcids, vitamines i elements traça i mantenen el creixement cel·lular sense necessitat de conèixer estrictament la seva composició. Com a alternativa oposada es troben els medis definits que contenen únicament productes de composició química definida i en quantitats conegudes: una font de carboni, una font de nitrogen, minerals, elements traça i sovint alguna vitamina o aminoàcid concret necessari pel creixement de soques modificades que en són auxotròfiques (Yee i Blanch, 1993).

Cada un d'aquests tipus de medi presenta diferents avantatges. D'una banda, els medis definits faciliten el control de l'evolució del cultiu ja que permeten:

- El seguiment d'aspectes com la disponibilitat de substrats que podrien limitar el creixement o l'acumulació de productes tòxics per al metabolisme.
- El disseny i control d'estratègies de creixement basades en la disponibilitat de nutrients al medi.
- L'obtenció de resultats previsibles i més reproduïbles (Samain *et al.* 1997).

D'altra banda, els medis complexos aporten aminoàcids, vitamines i altres productes de metabolisme que la cèl·lula pot utilitzar directament sense necessitat d'emprar recursos en la seva síntesi. D'aquest manera, aquest tipus de medi facilita el creixement cel·lular la qual cosa permet:



- Treballar a velocitats de creixement molt superiors a la dels medis definits.
- Alleugerir l'estrès metabòlic associat a l'expressió recombinant.
- I, en general, les productivitats específiques assolides descrites acostumen a ser considerablement superiors (Glick, 1995 i Winter *et al.*, 2000).

Dels diferents avantatges de cada un dels medis i tenint com a objectiu l'enginyeria metabòlica per la producció de glicoglicerolípid, es destaca el control i reproducibilitat que ofereix el medi definit. A més a més, pensant en futurs treballs sembla indicat seleccionar aquest medi ja que, d'una banda, és escalable a bioreactor i, d'altra banda, permetrà la introducció de certs metabòlits que podran oferir un cert control en la síntesi dels productes d'interès. Per exemple, la presència d'un àcid gras al medi de cultiu inhibeix el creixement cel·lular (Fay *et al.*, 1975), però, en canvi, en afegir alcohol de la sèrie *n*-butanol – *n*-octanol incrementa la relació d'àcids grassos saturats respecte als insaturats a qualsevol temperatura de creixement. Aquesta regulació de la composició d'àcids grassos dels lípids de membrana es dona tant en la biosíntesi dels àcids grassos com en la incorporació d'aquests als fosfolípids (Sullivan *et al.*, 1979). Per tant, també pot succeir pels glicoglicerolípid.

Bibliogràficament, existeixen molts medis definits emprats en el creixement de bacteris i més concretament d'*E.coli*. La majoria es basen en glucosa com a font de carboni (Winter *et al.*, 2000; Antoine *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2006), tot i que els últims anys s'han obert línies d'investigació basades en l'ús de glicerol com a font de carboni en les fermentacions bacterianes (Samain *et al.*, 1997 i de Almeida *et al.*, 2007). Aquest fet rau en l'afany de trobar productes d'alt valor afegit a un dels majors subproductes de la producció de biodièsel. Així doncs, el glicerol que en altres ocasions es considerava una font de carboni cara, ha vist disminuir dràsticament el seu valor i, per tant, l'obtenció de productes d'alt valor afegit és una oportunitat excel·lent per, al mateix temps, sumar valor a la producció de biodièsel (Solaiman *et al.*, 2006 i Dharmadi *et al.*, 2006).

Donat que al laboratori ja s'havia treballat en altres ocasions amb medis definits per *E.coli* BL21(DE3) *star* recombinant obtenint creixements significatius i sempre bons resultats (Durany Türk, 2003, Nieto, 2010 i Sellabona, 2009) el medi definit seleccionat és el que s'especifica a la Taula 4. Tal i com s'observa la font de carboni és glucosa i la de nitrogen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Cal remarcar que s'ha duplicat la quantitat de tampó fosfat respecte a treballs anteriors donat que inicialment els creixements es realitzaran en matràs Erlenmeyer i, per tant, no hi ha control de pH. A més, hi ha disponibilitat de la vitamina tiamina i d'elements traça. La preparació d'aquestes dissolucions i el medi de cultiu en concret es detalla en el Protocol 2.1.

**Taula 4: Components i concentracions del medi definit seleccionat pel creixement de les soques modificades per enginyeria metabòlica.**

Glucosa	25 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.10 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.79 g L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.34 g L <sup>-1</sup>
NaCl	2.04 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g mL <sup>-1</sup>
Tiamina	1 mg mL <sup>-1</sup>
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.114 mg mL <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.458 mg mL <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.029 mg mL <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.029 mg mL <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.49 mg mL <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4.43 mg mL <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.06 mg mL <sup>-1</sup>
NaMoO <sub>4</sub>	0.057 mg mL <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.12 mg mL <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub>	0.026 mg mL <sup>-1</sup>

### **2.1.2 El medi de cultiu relacionat amb les tècniques d'expressió d'MG517**

Al laboratori s'han fet créixer cèl·lules d'*E.coli* en medi ric LB per obtenir i aïllar la glicosiltransferasa d'interès (Martínez, Comunicació personal). L'expressió de la proteïna s'ha fet a partir de cultius de LB a 37 °C induïts amb l'addició d'IPTG i posterior incubació. Tal com s'observa a la Taula 5, aquesta última etapa s'ha realitzat a diferents temperatures i amb la introducció o no d'un xoc tèrmic. Aquest es basa en l'augment dràstic de la temperatura del medi de cultiu durant un cert període de temps. D'aquesta manera, s'afavoreix el plegament correcte de proteïnes gràcies a la presència de les *Heat Shock Proteïns* sintetitzades quan la cèl·lula se sotmet a situacions d'estrès. Després d'aquests estudis, s'observà que s'obtenia més proteïna soluble quan es realitzava un xoc tèrmic i després d'induir amb IPTG es realitzava la incubació a 20 °C. Cal destacar que l'objectiu d'aquests experiments era l'obtenció de proteïna soluble per la posterior purificació, en canvi, en aquest treball es busca la major producció de glicoglicerolípids, la qual cosa pot anar relacionada o no amb la quantitat de proteïna soluble.

**Taula 5: Condicions de cultiu i expressió de la soca *E.coli* BL21(DE3) *star* expressant la glicosiltransferasa MG517.**

	Condicions		Medi	Expressió
Condicions 1	Creixement inicial	37 °C	LB	Fracció insoluble
	Inducció	1mM IPTG		
	Incubació	6h a 37 °C		
Condicions 2	Creixement inicial	37 °C	LB	Fracció soluble
	Inducció	1mM IPTG		
	Incubació	6h a 20 °C		
Condicions 3	Creixement inicial	37 °C	LB	Fracció soluble
	Xoc tèrmic	30min a 42 °C		
	Inducció	1mM IPTG		
	Incubació	6h a 20 °C		

Per tant, amb la finalitat de determinar unes condicions de creixement en medi definit en les que es produeixin glicoglicerolípid i tenint en compte els resultats anteriors, s'han estudiat els següents paràmetres i les seves influències.

- Temperatura d'incubació un cop realitzada la inducció (Tincub)
- Xoc tèrmic a 42 °C durant 30min (XocT)
- Addició de 0.8% glicerol en el medi de cultiu (Glic) (Antoine *et al.*, 2003)

S'analitza l'efecte de la temperatura d'incubació un cop induït el cultiu i el xoc tèrmic per si a part de produir proteïna soluble també afecta en la producció de glicoglicerolípid. A més a més, també s'ha inclòs com a factor l'addició de glicerol en el medi de cultiu un cop es realitza la inducció de l'expressió de la proteïna. D'aquesta forma, aquest glicerol, que no té perquè actuar com a font de carboni ja que la glucosa és la que té aquest objectiu, potser facilitarà la síntesi dels lípid d'interès degut a l'entrada directa d'aquest a l'interior de la cèl·lula mitjançant la proteïna de membrana GlpF (Bachmann *et al.*, 1980) i, augmentant la quantitat de glicoglicerolípid.

Per tal d'analitzar els efectes d'aquests paràmetres per la producció de glicoglicerolípid s'ha optat per un disseny experimental emprant el Mètode de Taguchi amb el que es pretén aconseguir un o més dels tres objectius següents: (Roy, 1990)

- Establir les condicions òptimes o les millors per un producte o procés
- Estimar la contribució de factors individuals
- Estimar la resposta sota condicions òptimes

Es defineixen els nivells per a cada un dels tres factors. Es valora la temperatura d'incubació a dos nivells, sent aquests 37 °C i 20 °C, si la presència o no de xoc tèrmic influeix i si la contribució del glicerol és important o no emprant una concentració de 0.8%. En la Taula 6 s'especifiquen tots els nivells i es mostren els graus de llibertat per a cadascun dels factors. Tal com es veu no es considera cap tipus d'interacció.

**Taula 6: Nivells i graus de llibertat per cadascun dels tres factors escollits.** Els graus de llibertat es defineix com a número de nivells menys 1.

		Nivells	Nº de nivells	Graus de llibertat
Factors	Tincub	37 °C	2	1
		20 °C		
	XocT	Sí	2	1
		No		
	Glic	Sí	2	1
		No		
Total de Graus de llibertat				3

Seguint el Mètode de Taguchi es duen a terme els experiments que es mostren a la Taula 7 i es realitzen els 4 cultius amb els que s'exploren tots els nivells de cada factor.

**Taula 7: Experiments dissenyats segons el Mètode de Taguchi per l'estudi dels factors seleccionats.**

Experiment	Tincub	XocT	Glic
1	37 °C	Sí	Sí
2	37 °C	No	No
3	20 °C	Sí	No
4	20 °C	No	Sí

Els creixements es duen a terme amb cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3) *star* transformades amb el plasmidi pET38b(+) – mg517 ja que és la soca emprada en els treballs anteriors. Els cultius es realitzen en 100 mL de medi definit complementat amb kanamicina. Un cop inoculats amb el mateix preinòcul, s'incuben ON a 37 °C. Posteriorment, en funció de cada experiment es realitza el xoc tèrmic i finalment la inducció de l'expressió de les proteïnes mitjançant l'addició d'IPTG. A continuació, s'incuben els cultius 1 i 2 a 37 °C i els cultius 3 i 4 a 20 °C durant 5h. El creixement se segueix per densitat òptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) i la producció de glicoglicerolípids per cromatografia de capa fina (*Thin layer chromatography* – TLC).

La mesura d'OD<sub>600</sub> al final de cada cultiu, és a dir, després d'incubar a 37 °C ON, induir i finalment incubar o bé a 37 °C o bé a 20 °C, es mostra a la Taula 8. Tal com s'observa i

com és d'esperar, els cultius 3 i 4 que s'han mantingut a 20 °C han crescut molt menys que la resta.

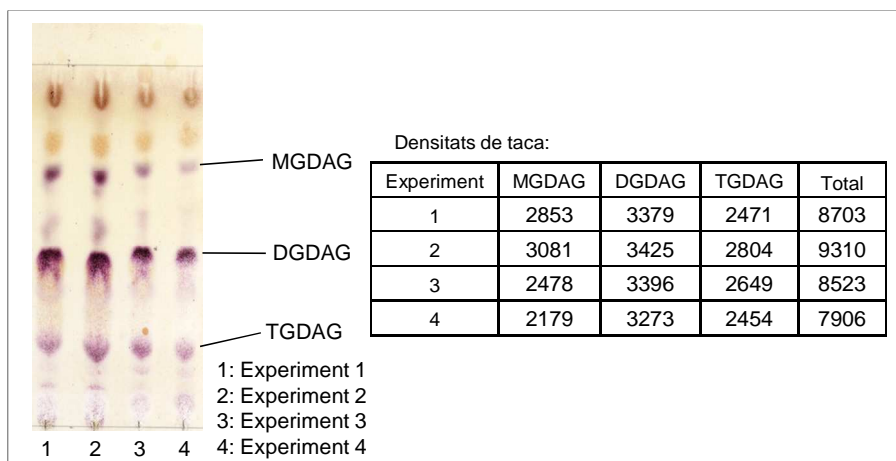
**Taula 8: Mesures de l'OD<sub>600</sub> al final de cada cultiu.** Els cultius 1 i 2 s'han mantingut a 37 °C després d'induir i els cultius 3 i 4, a 20 °C.

Cultiu	OD <sub>600</sub>
1	1.420
2	1.412
3	0.732
4	0.536

Pel que fa a glicoglicerolípid, l'assaig seleccionat per analitzar el resultat de la producció és la visualització a partir d'una TLC i quantificació per densitometria.

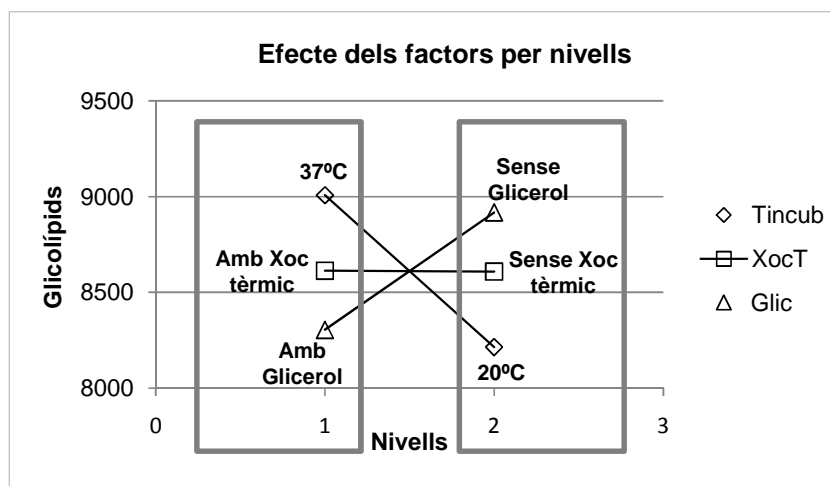
Així doncs, un cop realitzats els creixements, s'agafen 10 mL de cultiu i s'extreu la fracció lipídica mitjançant una modificació del mètode de Bligh i Dyer (1959) emprant una mescla cloroform / metanol (2:1, v/v) (Protocol 2.2) (Kates, 1972). Aquesta fracció de lípids s'analitza per cromatografia de capa fina usant com a fase mòbil cloroform / metanol / aigua 65:25:4 (Protocol 2.3). La tinció emprada en aquest cas és específica pel revelat de glicolípid i consisteix primer en una dissolució 0.5% d'α-naftol en metanol i després d'una dissolució d'àcid sulfúric / metanol / aigua 45:45:10. Aquesta combinació proporciona als glicolípid una coloració lila i evita la tinció d'altres lípids d'*E.coli*.

En la Figura 28 s'observa que en totes les condicions de creixement i inducció la soca és capaç de sintetitzar glicolípid. A més, a diferència dels treballs anteriors en el grup en els que es feia créixer en LB i pràcticament només s'observava DGDAG, en aquest cas en la TLC es detecta la presència de MGDAG, DGDAG i un tercer glicoglicerolípid d'estructura desconeguda (TGDAG). La densitometria permet analitzar que hi ha els mateixos lípids a totes les condicions però, la producció no és igual en tots els creixements. En l'experiment 3 i 4, en els que s'ha mantingut la temperatura d'incubació un cop induïda l'expressió de les proteïnes a 20 °C de forma comuna, produeixen menys glicoglicerolípid.



**Figura 28:** Cromatografia de capa fina i densitometria dels extractes lipídics dels experiments dissenyats segons el mètode de Taguchi.

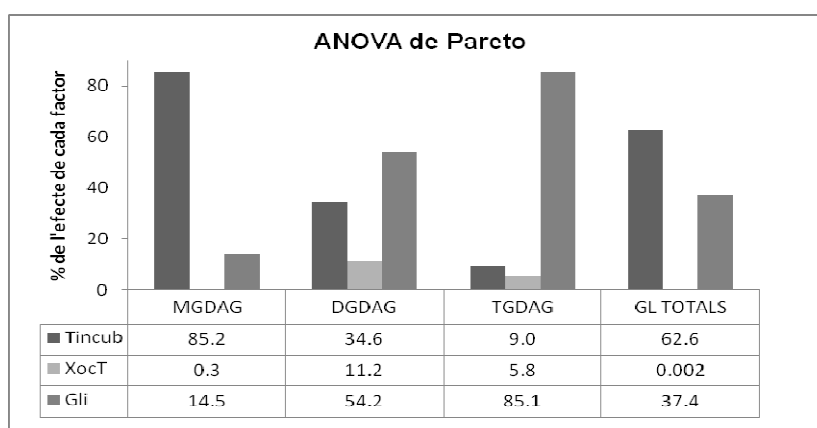
En la Figura 29, es representen els glicolípid sintetitzats respecte cada factor en cada nivell estudiat. S'indica la mitjana dels glicoglicerolípid total dels cultius que s'incuben al nivell 1, és a dir, a 37 °C (cultius 1 i 2) i que correspon a 9007 i la del segon nivell a 20 °C (cultius 3 i 4) sent 8215 (Taula 7).



**Figura 29:** Efecte dels factors estudiats per Taguchi per nivells. Densitometria total de glicolípid per cultiu respecte els nivells 1 i 2 de cada factor. Es requadren els nivells 1 i 2 per separat.

Així doncs, en la Figura 29 s'observa que pel que fa al factor Tincub la millor temperatura d'incubació després d'induir és la de 37 °C (Nivell 1). En canvi, l'addició de glicerol al 0.8% (Nivell 1) fa disminuir la quantitat de glicoglicerolípid mentre que el xoc tèrmic és indiferent pel que fa a la quantitat total de glicoglicerolípid. Per tant, amb la finalitat d'obtenir la quantitat màxima de glicolípid per cultiu les millors condicions són 37 °C després d'induir i sense l'addició de glicerol. Pel que fa al xoc tèrmic, aquest no és necessari.

Per veure la magnitud dels efectes de cada factor, en la Figura 30 es representa l'ANOVA de Pareto, és a dir, el percentatge d'efecte de cada factor (Tincub, XocT i Glic) per cada glicoglicerolípid (MGDAG, DGDAG i TGDAG) i la producció total d'aquests (GL Totals). Tal com es veu, la temperatura té una influència del 62.6% per la producció total de glicolípid, el xoc tèrmic té un efecte despreciable i l'addició de 0.8% de glicerol afecta amb un 37.4% que per l'anàlisi dels nivells anterior se sap que és un efecte negatiu.



**Figura 30: Anova de Pareto dels tres glicoglicerolípid formats de forma individual i la totalitat de glicolípid sintetitzats.** Es representa el % de l'efecte de cada factor per cada lípid.

A partir de tota la informació obtinguda, es conclou que els creixements es realitzaran en medi definit complementat amb els antibiòtics necessaris per mantenir els tres plasmidis i s'incubaran a 37 °C al llarg de tot el procés, tant creixement com expressió. La inducció de l'expressió de proteïnes es realitzarà amb IPTG després que el cultiu hagi crescut ON i posteriorment es deixarà 5h més.

## 2.2 ANÀLISI DE LA COEXPRESSION DE LES PROTEÏNES MG517, GalU I PlsC

A partir de les condicions de creixement seleccionades per la soca que només expressa el gen *mg517*, és important assegurar la sobreexpressió de les proteïnes codificades pels gens *galU* i *plsC* i l'obtenció dels glicolípid. En primer lloc es realitza l'estudi de les coexpressions MG517/GalU i MG517/PlsC, per finalment veure la coexpressió dels tres gens d'interès MG517/GalU/PlsC.

### 2.2.1 Coexpressió de les proteïnes MG517 i GalU

S'analitza la sobreexpressió i presència de glicolípid en introduir els gens *mg517* i *galU* a les cèl·lules d'*E.coli*. Es preparen cultius de les soques: abc, Abc i ABc (Taula 9). La

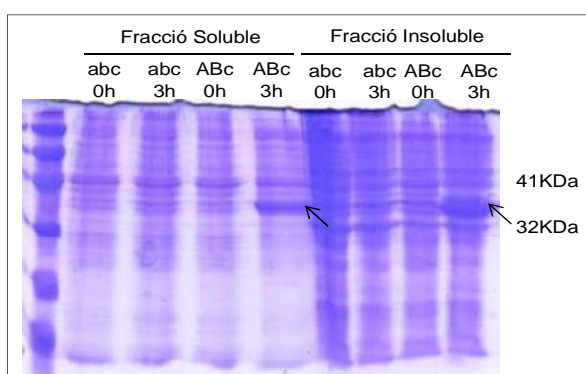
primera és el control sense cap dels gens d'interès, la segona sobreexpressa la MG517 i l'última és la soca en estudi que presenta la coexpressió de les proteïnes MG517 i GalU.

**Taula 9: Soques modificades per la coexpressió de les proteïnes MG517 i GalU.**

Soques	Gens		
	<i>mg517</i>	<i>galU</i>	<i>plsC</i>
abc	-	-	-
Abc	+	-	-
ABc	+	+	-

Després del creixement de 50 mL en medi definit a 37 °C, inducció amb IPTG i incubació durant 3 h a 37 °C, es lisen les cèl·lules per sonicació i s'obté un extracte cel·lular de proteïnes solubles i un sediment que conté proteïnes insolubles. S'analitza la sobreexpressió de la proteïna GalU mitjançant electroforesi en gel d'acrilamida SDS-PAGE (Protocol 2.5).

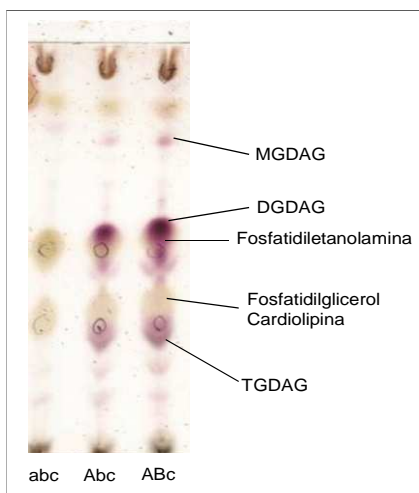
En la Figura 31 es mostren les proteïnes de les fraccions solubles i insolubles de les soques abc i ABc abans i després d'induir. Tal i com s'observa, un cop induïda l'expressió de les proteïnes augmenta notablement la presència d'una proteïna de pes molecular aproximat 32 KDa quan se sobreexpressa la proteïna GalU en la soca ABc tal com també es descriu bibliogràficament (Mao *et al.*, 2006). En estudis anteriors, s'ha demostrat que el pes molecular d'aquesta proteïna es mou entre 130 i 168 KDa i, per tant, es troba en forma homotetramèrica o homopentamèrica amb subunitats de 32 KDa (Hossain *et al.*, 1994 i Chang *et al.*, 1999). Pel que fa a la proteïna MG517 amb un pes de 41 KDa no se sobreexpressa però la seva presència es detectarà en l'anàlisi dels glicoglicerolípids per ser la responsable de la síntesi d'aquests productes.



**Figura 31: Electroforesi en gel d'acrilamida SDS-PAGE de les soques abc i ABc.** S'han analitzat les proteïnes solubles i insolubles abans (0h) i després (3h) d'induir. Es detalla el pes molecular de les proteïnes GalU, 32 KDa, i MG517, 41 KDa.



A continuació, es realitza una cromatografia de capa fina per analitzar els glicoglicerolípidis de l'extracte lipídic de 10 mL de cultiu de cada soca. En la Figura 32 es mostra que en la soca abc només es veuen els fosfolípids típics d'*E.coli*, mentre que en les altres dues s'aprecien els glicoglicerolípidis d'interès. Per tant, es demostra la sobreexpressió de la proteïna MG517 ja que sense la seva presència no se sintetitzen els productes d'interès. Cal destacar que en tractar-se d'un anàlisi qualitatiu, de moment, no es poden treure conclusions de l'efecte de la producció de glicoglicerolípidis en coexpressar les proteïnes MG517/GalU respecte l'expressió de la proteïna MG517 sola.



**Figura 32: Cromatografia de capa fina dels extractes lipídics de les soques abc, Abc i ABc.** Es detallen els fosfolípids d'*E.coli* i els glicoglicerolípidis sintetitzats.

Per tant, es conclou que les condicions de creixement seleccionades permeten tant la sobreexpressió de la proteïna GalU com l'obtenció de glicoglicerolípidis en realitzar la coexpressió MG517 / GalU.

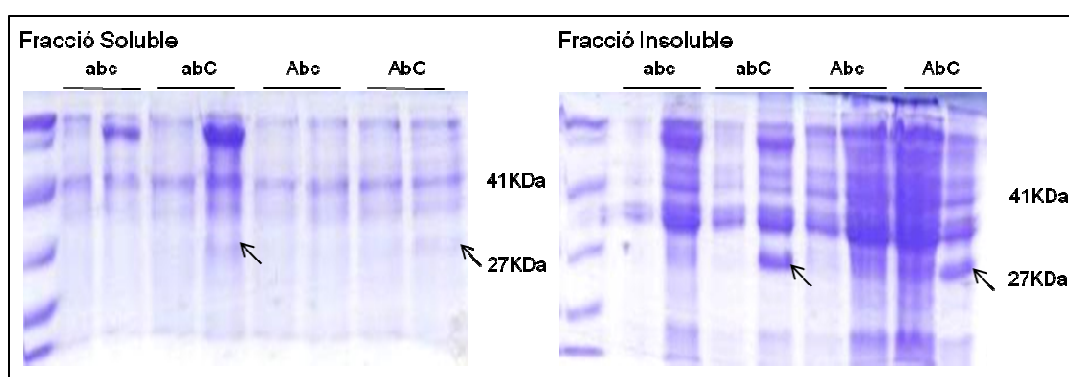
### 2.2.2 Coexpressió de les proteïnes MG517 i PlsC

A continuació s'analitza la coexpressió de les proteïnes MG517/PlsC. Així doncs, es fan créixer les soques abc, abC, Abc i AbC (Taula 10).

**Taula 10: Soques emprades en la coexpressió de les proteïnes MG517 i PlsC.**

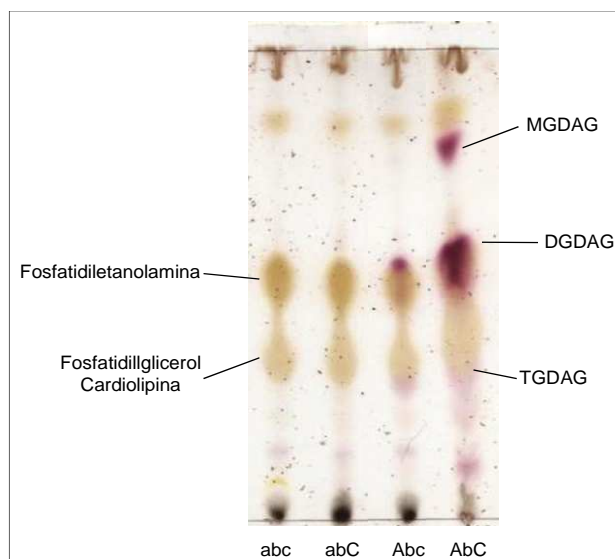
Soques	Gens		
	mg517	galU	plsC
abc	-	-	-
abC	-	-	+
Abc	+	-	-
AbC	+	-	+

Es realitzen els cultius en medi definit complementat amb els tres antibiòtics de la mateixa forma com s'ha fet anteriorment. S'obtenen els extractes cel·lulars per obtenir les proteïnes solubles i els sediments amb les proteïnes insolubles. Seguidament, s'analitza la sobreexpressió de les proteïnes MG517 i PlsC per l'SDS-PAGE que es mostra en la Figura 33. Al gel s'observa la sobreexpressió d'una proteïna de baix pes molecular (aproximadament uns 27KDa) que pot correspondre a la proteïna PlsC. La identitat d'aquesta proteïna es corrobora retallant la banda del gel i duent a terme una digestió tròpsica que posteriorment s'ha analitzat per MALDI-TOF (Protocol 2.6). El mapa peptídic d'aquesta proteïna es contrasta a la base de dades Swiss Prot i es confirma que la proteïna correspon a la 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfat aciltransferasa de la soca K-12 d'*E.coli*. Aquesta proteïna s'observa majoritàriament en la fracció insoluble ja que es tracta d'una proteïna de membrana.



**Figura 33: Electroforesis en gel d'acrilamida SDS-PAGE de les soques abc, abC, Abc i AbC.** De cada cultiu s'han analitzat les fraccions soluble i insoluble abans (primer carril de cada soca) i després (segon carril de cada soca) d'induir. Es detallen els pesos moleculars de la proteïna PlsC (27KDa) i la MG517 (41KDa).

Com abans, amb l'objectiu de veure que la proteïna MG517 és activa, s'extreu la part lipídica de 10 mL de cultiu de cada soca i s'analitzen els glicoglicerolípidis per cromatografia de capa fina. En la Figura 34 es mostren els resultats on s'observa que les soques abc i abC, sense la sobreexpressió de la glicosiltransferasa, no presenten glicoglicerolípidis. En canvi, les soques Abc i AbC confirmen la sobreexpressió de la proteïna MG517.



**Figura 34: Cromatografia de capa fina dels extractes lipídics de les soques abc, abC, Abc i AbC.** En les soques abc i abC només s'observen els fosfolípids d'*E.coli*, en canvi, en afegir la proteïna MG517 s'observen els glicoglicerolípid.

Per tant, es conclou que la soca AbC també sobreexpressa la proteïna PlsC i produeix glicoglicerolípid.

### 2.2.3 Coexpressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC

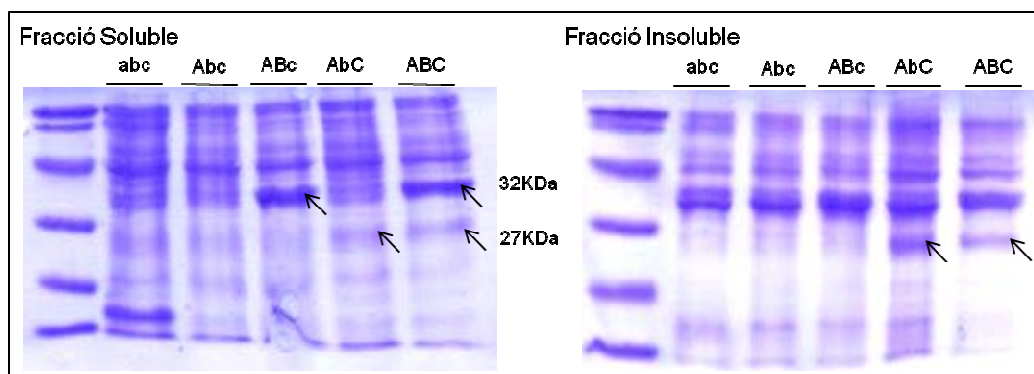
Finalment, es fa el cultiu de la soca ABC que conté els tres gens *mg517/galU/plsC*. Es comparen les soques Abc, ABc, AbC i ABC (Taula 11) i es fan créixer en medi definit complementat amb els tres antibiòtics.

**Taula 11: Soques emprades en la coexpressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC.**

Soques	Gens		
	mg517	galU	plsC
abc	-	-	-
abC	-	-	+
Abc	+	-	-
AbC	+	-	+

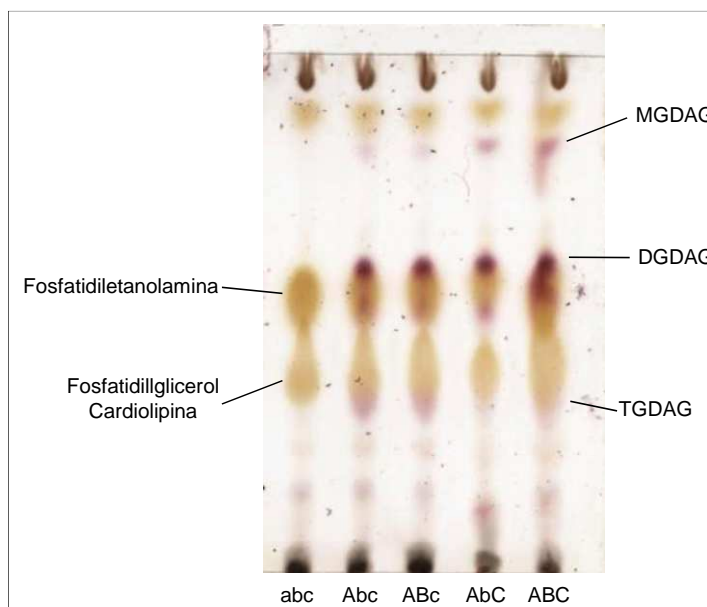
Es preparen els extractes cel·lulars per analitzar la sobreexpressió de les proteïnes GalU i PlsC. En la Figura 35 es mostren els gels de proteïnes de les fraccions solubles i insolubles de les cinc soques després d'induir-ne l'expressió. En els gels s'observa que la soca ABC sobreexpressa les proteïnes GalU i PlsC, la primera majoritàriament en la

fracció soluble i la segona, en la insoluble com és d'esperar ja que és una proteïna de membrana.



**Figura 35: Electroforesi en gel d'acrilamida SDS-PAGE de les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC.** De cada cultiu s'han analitzat les fraccions soluble i insoluble després d'induir l'expressió de les proteïnes. S'ha senyalat amb una fletxeta la sobreexpressió de les proteïnes GalU d'uns 32KDa i PlsC de 27KDa.

Amb la cromatografia de capa fina de la Figura 36 s'analitzen el glicoglicerolípid presents en l'extracte lipídic. Amb l'excepció de abc, totes les soques han produït glicolípid, la qual cosa significa que en la soca ABC també s'expressa la proteïna MG517, conjuntament amb la GalU i la PlsC.



**Figura 36: Cromatografia de capa fina dels extractes lipídics de les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC.** En la soca abc només s'observen els fosfolípids d'*E.coli*, en canvi, en afegir la proteïna MG517 s'observen els glicoglicerolípid.

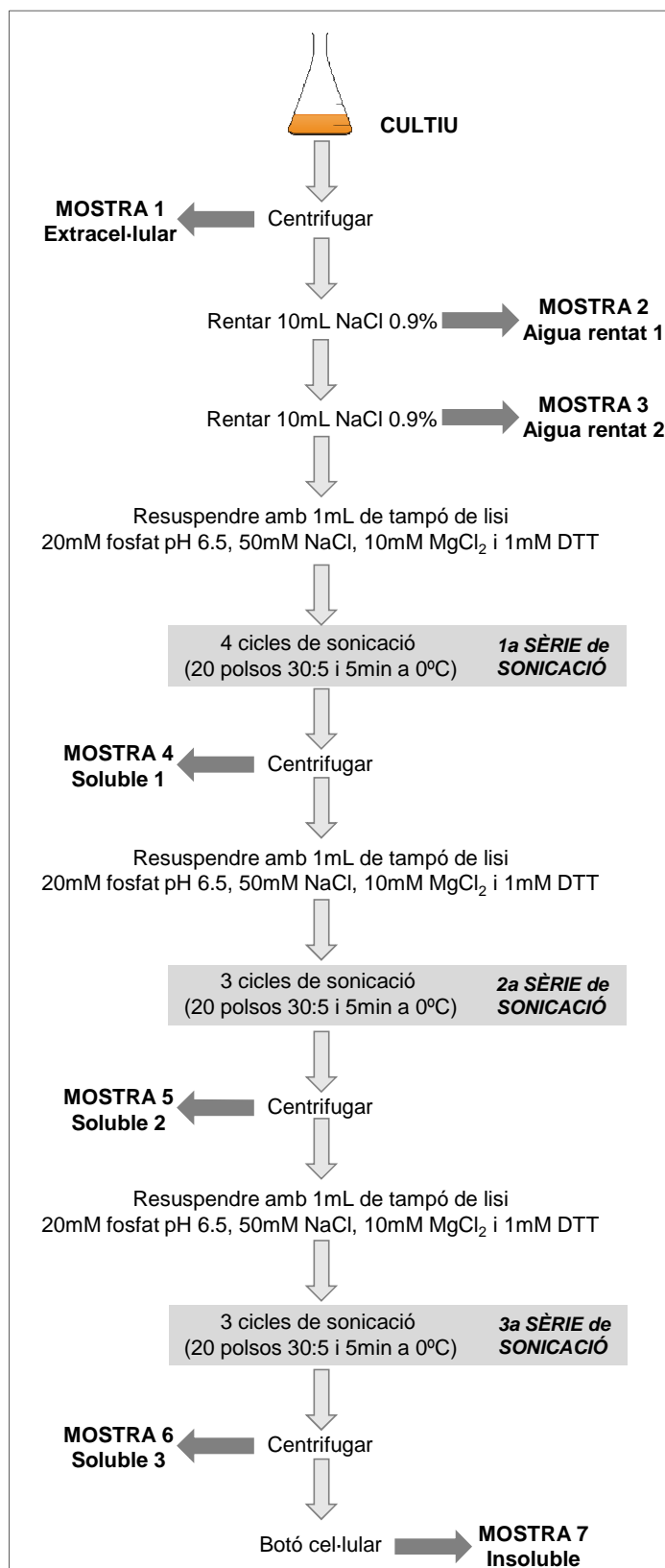
En resum, es conclou que qualitativament les condicions de creixement seleccionades permeten tant la sobreexpressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC com l'obtenció de glicoglicerolípid en realitzar qualsevol coexpressió.

### **2.3 ESTUDI DE LA LISI CEL·LULAR**

Fins ara, s'ha comprovat que les cèl·lules creixen sota les condicions de treball seleccionades i que produeixen no només els glicolípid d'interès sinó també les proteïnes sobreexpressades en cada cas. A continuació, és necessari assegurar que la lisi cel·lular per l'obtenció dels extractes cel·lulars és suficient per extreure el màxim de proteïna soluble possible i poder analitzar les activitats específiques dels enzims de les diferents soques correctament (Capítol 3).

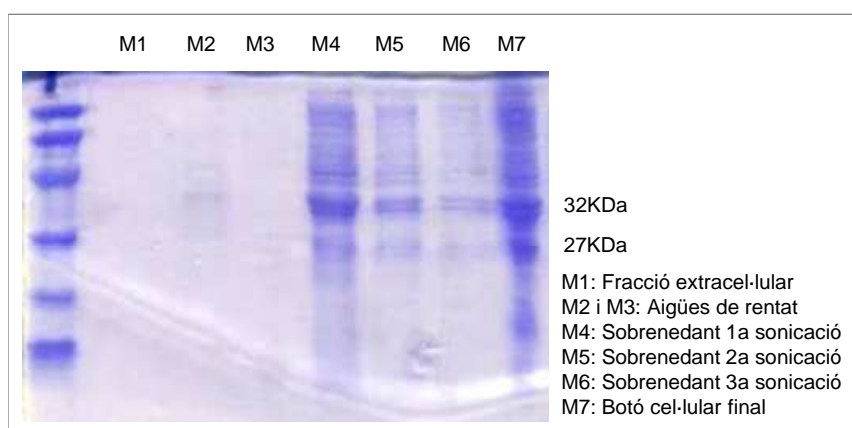
Tal i com s'ha comentat anteriorment, la lisi cel·lular es realitza per sonicació. Així doncs, s'estableixen unes condicions de sonicació en les que s'asseguri l'extracció de la major part de les proteïnes presents en les cèl·lules.

Es fan dos creixements, un amb la soca abc i l'altre amb la ABC, en 50 mL de medi definit a 37 °C i una inducció de 5h amb IPTG. Un cop finalitzat el creixement, se segueix l'esquema mostrat en la Figura 37. En primer lloc se sedimenta el botó cel·lular i es pren mostra del sobrenedant, és a dir, del medi extracel·lular (Mostra 1). Es renta el botó dues vegades amb una dissolució de NaCl al 0.9% obtenint els sobrenedants (Mostres 2 i 3). Es resuspèn amb tampó de lisi i es procedeix a la ruptura cel·lular amb 3 sèries de sonicació, cada una amb diferents cicles. Les Mostres 4, 5 i 6 corresponen als sobrenedants de cada sèrie amb les proteïnes solubles que s'han alliberat. Finalment, la Mostra 7 correspon a la resta insoluble.



**Figura 37: Esquema de l'estudi de sonicació.** El cultiu cel·lular se centrifuga, es guarda una mostra del medi extracel·lular i es continua amb el botó cel·lular. Aquest es renta dues vegades i posteriorment es resuspèn en tampó de lisi i s'apliquen diferents sèries de sonicacions.

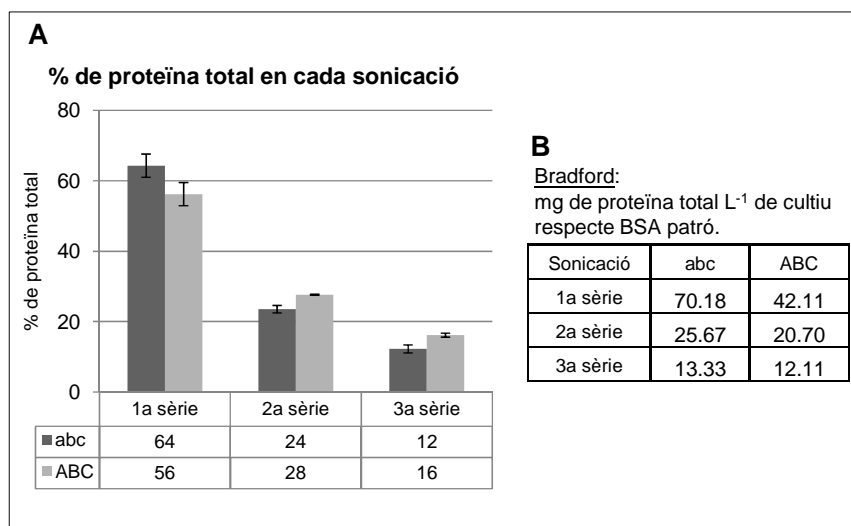
Les mostres de la soca ABC obtingudes després d'aquest procés de lisi s'analitzen per SDS-PAGE. En la Figura 38 es presenten les proteïnes de cada mostra on no s'aprecia proteïna ni a la Mostra 1 que pertany a la fracció extracel·lular, ni a les Mostres 2 i 3 que corresponen als rentats amb NaCl. En canvi, la Mostra 4 corresponent a la primera sèrie de sonicació allibera una bona part de proteïnes on s'identifiquen clarament la GalU i la PlsC sobreexpressades de 32KDa i 27KDa respectivament. En la segona sèrie de sonicació, Mostra 5, encara es recupera una petita part de proteïna soluble mentre que en la Mostra 6, és a dir, la tercera sèrie de sonicació està pràcticament lliure de proteïna. Tot i així, al botó cel·lular (Mostra 7) encara conserva força proteïna, la qual cosa pot ser deguda a la formació de cossos d'inclusió o simplement a la dificultat de solubilitzar proteïnes de membrana.



**Figura 38: Electroforesis en gel d'acrilamida SDS-PAGE de les mostres obtingudes en l'estudi de la sonicació de la soca ABC.** Es detallen els pesos moleculars de les proteïnes GalU (32KDa) i PlsC (27KDa).

El procés es repeteix per la soca abc que no conté cap gen i es confirma que la lisi és significativa amb les dues primeres sèries de sonicació.

Paral·lelament a l' SDS-PAGE, es quantifica la proteïna total de les Mostres 4, 5 i 6, tant de la soca abc com de la ABC, emprant el mètode de Bradford. Per això, s'utilitza com a proteïna patró una dissolució 2mg/ mL de BSA. En la Figura 39 s'observa que per les dues soques entre la primera i la segona sonicació s'ha extret pràcticament la totalitat de la proteïna ja que en la tercera només s'extreu aproximadament un 15% del total.



**Figura 39: A: Percentatge de proteïna total obtinguda en cada sèrie de sonicacions i B: mg de proteïna total L<sup>-1</sup> de cultiu per abc i ABC, per les dues soques.** La quantificació de proteïna total s'ha realitzat pel mètode de Bradford emprant BSA patró com a referència.

Malgrat la conclusió seria realitzar dos cicles de sonicació emprant les condicions assenyalades, s'opta per un compromís entre temps de manipulació i proteïna extreta. Per tant, es determina que el procés de sonicació es realitzarà aplicant un total de 7 cicles de sonicació, cada una amb 20 polsos de 30:5 i deixant reposar 5min a 0 °C entre sèries.

## 2.4 SEGUIMENT DEL CREIXEMENT AL LLARG DEL TEMPS

Les soques modificades per enginyeria metabòlica estan transformades amb tres plasmidis, la qual cosa pot influir en la velocitat de creixement respecte cèl·lules d'*E.coli* sense transformar. Aquesta modificació pot ser deguda a diferents aspectes com és la presència de tres antibiòtics al medi de cultiu per assegurar una bona selecció cel·lular o l'esforç metabòlic extra que suposa per la cèl·lula replicar l'ADN addicional. A més a més, la inducció amb IPTG de les tres proteïnes al mateix moment també pot provocar algun tipus d'afectació cel·lular.

Amb la finalitat de caracteritzar el creixement d'aquestes soques, es realitzen cultius de la soca d'*E.coli* BL21(DE3) *star* sense cap plasmidi introduït, la soca abc, amb els tres plasmidis de treball sense cap gen inserit, i la ABC, amb els tres plasmidis i els tres gens *mg517*, *galU* i *plsC*. Les condicions de creixement emprades són 50 mL de medi definit complementat amb els antibiòtics necessaris en cada cas, és a dir, ampicil·lina, kanamicina i estreptomina per les soques abc i ABC i, cap tipus d'antibiòtic per la BL21(DE3) *star*. Tots els cultius es mantenen a 37 °C i es va mesurant l'OD<sub>600</sub> al llarg del temps.



En la Figura 40 es mostra (gràfic A) l'evolució d'un cultiu de la soca *E.coli* BL21(DE3) *star*, dos de l'abc i dos cultius de l'ABC i (gràfic B) el càlcul de la velocitat màxima de creixement ( $\mu_{\max}$ ) per aquests cultius. Tal com s'observa, les cèl·lules sense transformar tenen una  $\mu_{\max}$  de  $0.53 \pm 0.01h^{-1}$ . En canvi, les soques modificades per enginyeria metabòlica crescudes sota les mateixes condicions presenten una velocitat de creixement més reduïda de  $0.39 \pm 0.01h^{-1}$  tant per abc com per ABC. Aquesta diferència entre soques *E.coli* BL21(DE3) *star* transformades i no transformades és raonable ja sigui per la presència d'antibiòtics en el medi de cultiu i/o la necessitat de replicar tot l'ADN addicionat en la transformació cel·lular. De totes maneres, comparant les soques abc i ABC, la presència o no dels gens en cada un dels plasmidis no afecta al creixement cel·lular, almenys abans d'induir l'expressió de les proteïnes.

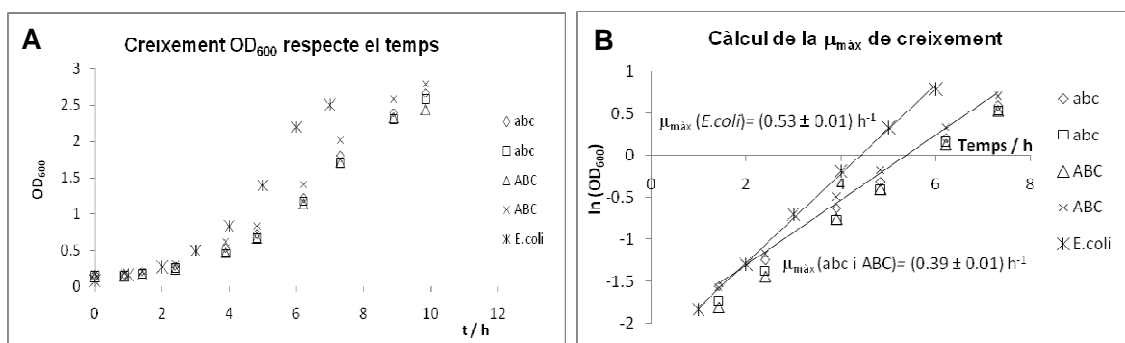


Figura 40: Gràfic A: seguiment del creixement cel·lular al llarg del temps a partir de la densitat òptica a 600nm. Gràfic B: càlcul de la  $\mu_{\max}$ .

Un cop s'han deixat créixer els cultius durant 16h s'indueix un cultiu de la soca abc i un altre de la soca ABC i s'incuba a 37 °C. La Figura 41 mostra l'OD<sub>600</sub> mesurada al llarg del temps després d'addicionar l'IPTG en dos dels quatre cultius. En el gràfic s'observa que tots els cultius excepte l'ABC induït mantenen la seva densitat òptica al llarg del temps o inclús presenten un cert creixement, en canvi, en el cas del cultiu ABC induït, al cap d'unes quatre hores la densitat òptica disminueix considerablement.

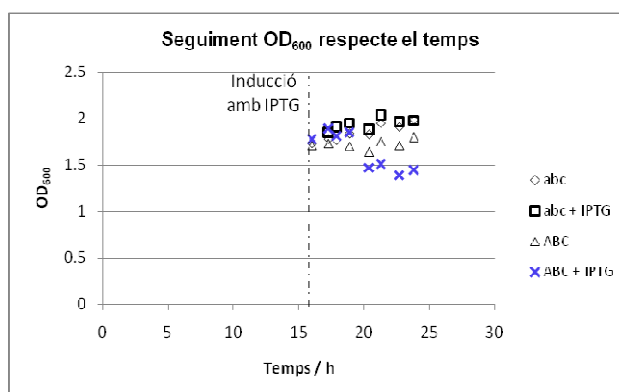
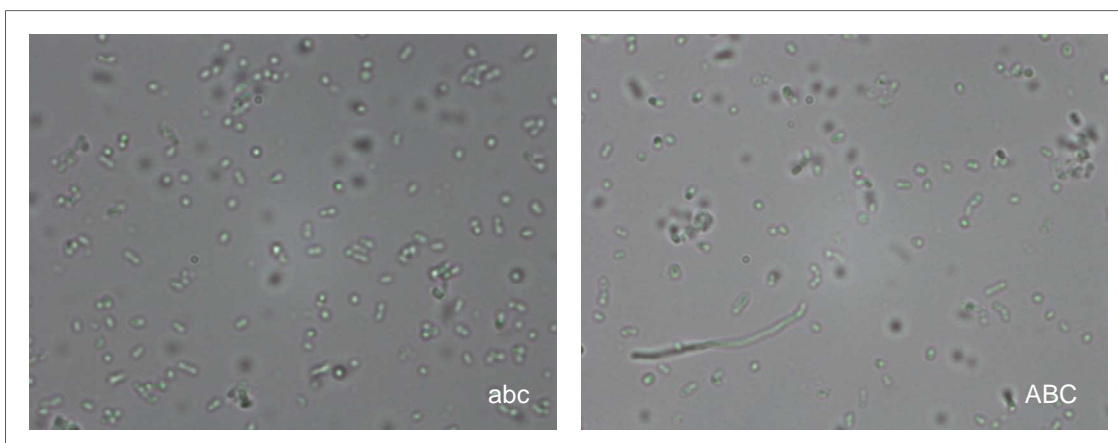


Figura 41: Seguiment de la densitat òptica a 600nm respecte el temps després de créixer durant 16h a 37 °C i induir amb IPTG dos dels cultius, un de la soca abc ressaltat en negre i un de la soca ABC (blau).

Aquesta disminució en la densitat òptica pot ser deguda a diferents factors tal i com es descriu en la bibliografia. D'una banda, a què les cèl·lules destinen bona part de la seva energia a l'expressió de les proteïnes MG517, GalU i PlsC. D'altra banda, a què la sobreexpressió de proteïnes de membrana, MG517 i PlsC, afecta la seva integritat i, per tant, la viabilitat de la cèl·lula, fet que provoca un creixement reduït i dificulta la seva divisió cel·lular (Wagner *et al.*, 2007). A part de tot això, en aquest cas la producció i acumulació dels glicoglicerolípid a la membrana cel·lular també pot influir.

Per veure els efectes, s'observen les cèl·lules al microscopi òptic i es compara l'aspecte de les cèl·lules de la soca abc i la ABC després d'induir. En la Figura 42 es mostren dues fotografies. En la primera, les cèl·lules abc presenten l'aspecte típic d'*E.coli* i totes són aproximadament de la mateixa mida. En la segona fotografia, s'observa la soca ABC on certes cèl·lules han augmentat considerablement la mida i formant un tipus de filament.



**Figura 42: Imatges al microscopi òptic amb 100x de les soques abc i ABC un cop realitzada la inducció.**

La longitud de la cèl·lula és una indicació de la divisió cel·lular i, per tant, la sobreexpressió d'algunes de les proteïnes d'interès MG517, GalU i PlsC i/o la producció de glicoglicerolípid han pertorbat el procés de divisió cel·lular. Aquest fet també succeeix en els estudis de Wieslander i col·laboradors (Wikström *et al.*, 2004 i Wikström *et al.*, 2009) que analitzen la viabilitat de les cèl·lules d'*E.coli* AD93 que és una soca deficient de fosfatidiletanolamina, un dels principals fosfolípids d'*E.coli* pel l'eliminació del gen *pssA*. En aquesta soca mutada sobreexpressen les glucosiltransferases de *A. laidlawii* (GlcDAG i GlcGlcDAG sintases) i les galactosiltransferases de *A. thaliana* (GalDAG i GalGalDAG sintases). Aquestes glicosiltransferases són del mateix tipus que la MG517 i sintetitzen glicoglicerolípid de glucosa i galactosa, respectivament. Totes aquestes modificacions resulten en cèl·lules amb creixement i membranes cel·lulars també afectades. Mentre que *E.coli* presenta una mida de 1  $\mu$ M, el mutant AD93 és la que presenta el procés de divisió

cel·lular més pertubat formant cèl·lules de 7  $\mu$ M mentre que les altres són de 3  $\mu$ M. A més, tots aquests mutants pateixen més estrès osmòtic i més permeabilitat de membrana. Per tant, com en les soques que presenten la proteïna MG517, la producció de glicoglicerolípid afecta la fluïdesa de la membrana i les seves propietats d'empaquetament global.

## 2.5 ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS PLASMIDIS

Fins ara, s'ha comprovat que les cèl·lules modificades per enginyeria metabòlica creixen sota les condicions de treball seleccionades i que produeixen els glicolípid d'interès i, també, les proteïnes sobreexpressades en cada cas. De totes maneres, cal assegurar que al llarg del creixement els plasmidis no pateixin cap tipus de exclusió, és a dir, que al final del cultiu encara es troben presents tots els vectors tot i que l'antibiòtic hagi perdut el seu efecte.

L'estudi de l'estabilitat dels plasmidis es realitza amb un mateix creixement de la soca ABC en 50 mL de cultiu en medi definit complementat amb els antibiòtics ampil·lina, kanamicina i estreptomina. Un cop realitzat el creixement a 37 °C ON, s'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i posterior incubació a 37 °C durant 5h. Al final d'aquest procés, es preparen dues dilucions del cultiu, una 1:100 i una altra 1:1000. S'escampen 100  $\mu$ L de cada dissolució en cinc plaques Petri amb medi sòlid LB cada una complementada amb els antibiòtics de la Taula 12.

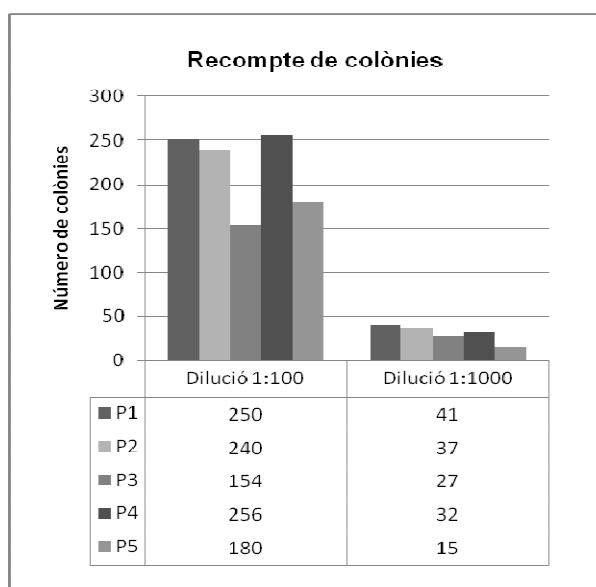
**Taula 12: Antibiòtics que complementen el medi sòlid LB en l'anàlisi de l'estabilitat de plasmidis.**

Placa	Antibiòtics		
	Ampicil·lina	Kanamicina	Streptomina
P1	+	+	+
P2	+	-	-
P3	-	+	-
P4	-	-	+
P5	-	-	-

La placa 1 (P1) conté la presència de tots els antibiòtics i, per tant, només podran créixer en ella les cèl·lules que continguin els tres plasmidis. En canvi, la placa 2 (P2) només està complementada amb ampil·lina, la qual cosa permet el creixement de les cèl·lules que mantinguin el plasmidi pET44b(+)-mg517 encara que hagin perdut els altres dos plasmidis. El mateix passa amb les plaques 3 i 4 (P3 i P4) amb els plasmidis pRSF - plsC i

pCDF – galU, respectivament. Finalment, en la placa 5 (P5) sense antibiòtics hi creixeran totes les cèl·lules presents en el cultiu tinguin o no plasmidi.

D'aquesta manera, si el número de colònies que creixin en la P1 és el mateix que en la P5, voldrà dir que totes les cèl·lules mantenen els plasmidis introduïts inicialment. En canvi, si algun vector fos inestable i s'hagués perdut al llarg del procés, apareixerien colònies en la P5 que no serien capaces de créixer ni a la P1 ni a la placa que presenta l'antibiòtic al qual és resistent aquest plasmidi. Per tant, si el número de colònies crescudes en cada placa és similar, significarà que no hi ha hagut cap exclusió de plasmidis al llarg de tot el creixement i inducció de l'expressió de les proteïnes. I, com a conseqüència es podrà afirmar que els plasmidis són estables sota aquestes condicions de treball.



**Figura 43: Recompte de colònies de cada una de les plaques i dilucions.**

Totes les plaques amb els diferents antibiòtics presenten colònies. En la Figura 43 es mostra el recompte de colònies de cada placa per cada dilució. La dilució 1:100 dóna un nombre de colònies molt elevat. La dilució 1:1000 permet veure que el número de colònies crescudes sense antibiòtic en la P5 és de l'ordre a la resta de plaques. Per tant, es considera que els tres plasmidis són estables després d'aquest cultiu.

## Capítol 3: Anàlisi del fenotip de les soques modificades

Un cop introduïts els gens a les soques i seleccionades les condicions de creixement, inducció i posterior sonicació i extracció, s'estudia el fenotip de les soques d'*E.coli* modificades per enginyeria metabòlica. Aquest estudi es realitza tant a nivell de les activitats específiques dels enzims sobreexpressats com dels lípids, és a dir, els glicoglicerolípid i els fosfolípids d'*E.coli* sintetitzats i els àcids grassos que els formen.

### 3.1 ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES DELS EXTRACTES CEL·LULARS

Se sap que les soques modificades per enginyeria metabòlica sobreexpressen les tres proteïnes desitjades. Per conèixer en més detall aquestes soques, es pretén determinar l'activitat enzimàtica de cadascun d'aquests enzims presents en els extractes cel·lulars de proteïna soluble dels cultius. Per això, es desenvolupen tres assaigs que permetin determinar l'activitat uridiltransferasa del GalU, aciltransferasa del PlsC i glicosiltransferasa del MG517. El detall del desenvolupament d'aquests assaigs enzimàtics es descriuen en l'Annex 2.

#### 3.1.1 Activitat UDP-glucosa pirofosforilasa

L'enzim UDP-Glc pirofosforilasa o GalU d'*E.coli* transforma la glucosa 1-fosfat a UDP-Glc convertint el nucleòtid UTP a pirofosfat (PPi). Tal com s'observa a la Figura 44 aquesta reacció es pot donar en els dos sentits, és a dir, formant l'UDP-Glc o, al contrari, passant d'UDP-Glc a glucosa 1-fosfat (Lai *et al.*, 2008).

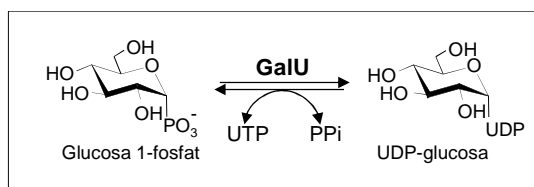
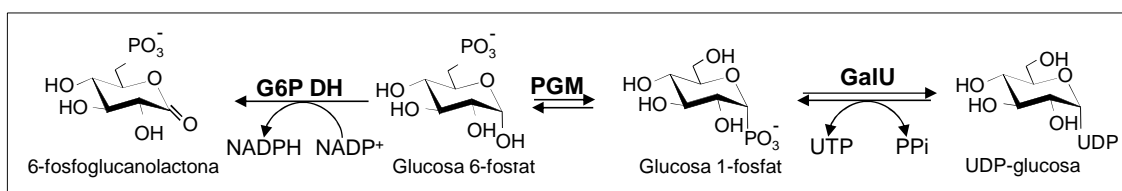


Figura 44: Reacció de l'enzim UDP-Glc pirofosforilasa o GalU

Donat que la conversió de reactius a productes no presenta cap canvi associat d'absorbància o fluorescència, no es pot fer un seguiment de la reacció de forma directa. Així doncs, per determinar l'activitat enzimàtica d'aquesta proteïna s'ha desenvolupat l'assaig acoblat espectrofotomètric mostrat en la Figura 45 on, en presència de UDP-Glc i

PPI, l'enzim GalU formarà glucosa 1-fosfat. Aquesta passarà a glucosa 6-fosfat gràcies a l'acció de l'enzim fosfoglucomutasa o PGM i, finalment, l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa o G6P DH duu a terme la reacció indicadora en què el sucre glucosa 6-fosfat és oxidat a 6-fosfogluconolactona i l' $\text{NADP}^+$  és reduït a NADPH. L'augment en la concentració de NADPH al medi al llarg del temps es pot seguir en continu a 340 nm (Looijesteijn *et al.*, 1999 i Boels *et al.*, 2001).



**Figura 45: Reacció de l'assaig acoblat dissenyat per a la quantificació de l'activitat enzimàtica de l'enzim GalU.** A l'activitat uridiltransferasa o GalU s'acobla l'enzim fosfoglucomutasa (PGM) i l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH).

En l'apartat 4.1 es detalla tot el desenvolupament d'aquest assaig acoblat i les condicions de treball seleccionades per tal d'assegurar que l'enzim GalU sigui el limitant de les reaccions i, per tant, la quantitat d' $\text{NADPH}$  permeti la quantificació de l'activitat enzimàtica d'aquest enzim en els extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica. Així, s'ha establert un volum de reacció de  $200\mu\text{L}$  on els enzims G6PDH i PGM seran presents en 0.5 i 1.6 U comercials, respectivament.

Es determina l'activitat enzimàtica de la proteïna GalU dels extractes cel·lulars de les soques aBc i ABC, en les que s'ha introduït el gen *galU*, i la soca abc com a control (Taula 13).

**Taula 13: Soques emprades per determinar les activitats enzimàtiques de la proteïna GalU.**

Soques	Gens		
	<i>mg517</i>	<i>galU</i>	<i>plsC</i>
abc	-	-	-
aBc	-	+	-
ABC	+	+	+

Així, es realitzen creixements de les tres soques en 50 mL de medi definit, s'indueix la sobreexpressió de les proteïnes i al cap de 5h es lisen les cèl·lules segons el procediment posat a punt. Es prepara l'extracte cel·lular i es quantifica la proteïna total pel mètode de Bradford usant BSA com a patró. En estudis realitzats anteriorment s'ha descrit que l'enzim GalU és bastant inestable (a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  perd més d'un 20% de la seva activitat en 24 h un cop

purificat) (Bernstein and Robbins, 1965). Per tant, és de summa importància treballar amb l'extracte acabat de preparar.

L'activitat GalU s'analitza a partir de diverses alíquotes d'extracte en presència de UDP-Glc 0.1 mM, àcid pirofosfòric 4 mM, NADP<sup>+</sup> 0.3 mM, PGM 1.6 U, G6P DH 0.5 U i MgCl<sub>2</sub> 14 mM que actua com a cofactor dels enzims PGM i GalU. El tampó de reacció emprat és Tris a pH 7.8, la reacció es manté a 30 °C i se segueix la formació d'NADPH al llarg del temps mesurant l'absorbància a 340 nm cada minut durant mitja hora. De cada soca s'analitza com a mínim l'extracte de dos cultius. Les activitats específiques obtingudes expressades com a μmol d'NADPH format per min per mg de proteïna total es resumeixen a la Taula 14 i es representen gràficament en la Figura 46.

**Taula 14: Activitats específiques de l'enzim GalU expressades en μmol d'NADPH format min<sup>-1</sup> mg de proteïna total<sup>-1</sup>.** Les condicions de treball són: Tris – HCl 50 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, NADP<sup>+</sup> 0.3 mM, UDP-Glc 0.1 mM, G6P DH 0.5 U, PGM 1.6 U i GalU de l'extracte.

Soca	Activitat Específica μmols min <sup>-1</sup> mg proteïna total <sup>-1</sup>	
	Experiments	Mitjana
abc	0.003	0.002 ± 0.0008
	0.001	
aBc	0.416	0.35 ± 0.06
	0.313	
	0.326	
ABC	0.350	0.44 ± 0.08
	0.487	
	0.485	

En la soca abc, tot i no sobreexpressar-se la proteïna, s'observa una certa activitat corresponent a l'activitat basal d'*E.coli*, ja que aquest gen és present en el genoma bacterià. En sobreexpressar GalU en les soques aBc i ABC, la seva activitat específica augmenta entre 180 i 220 vegades respecte l'expressió genòmica tant si se sobreexpressa sol com coexpressat amb les altres dues proteïnes.

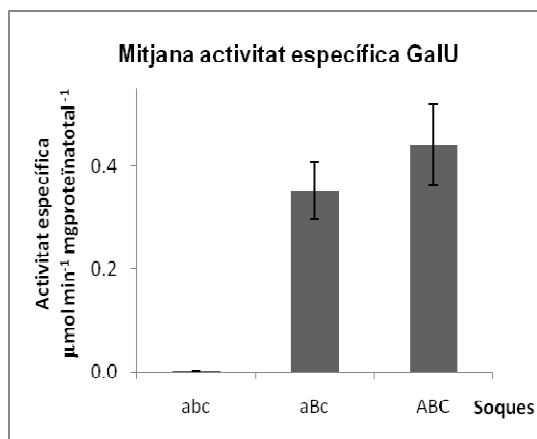


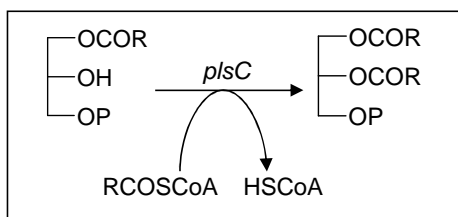
Figura 46: Mitjanes de les activitats específiques de GalU i les seves desviacions estàndard.

Un altre exemple d'enginyeria metabòlica en què se sobreexpressa aquest enzim és l'estudi de Boels i col·laboradors (Boels *et al.*, 2001) on introdueixen el gen *galU* a una soca de *Lactococcus lactis* per tal d'estudiar la seva relació amb la biosíntesi d'UDP-Glc i UDP-galactosa, precursors dels exopolisacàrids produïts per aquests bacteris. En el seu cas, la sobreexpressió de GalU resultà en un augment d'unes 20 vegades l'activitat específica del control la qual cosa incrementà 8 vegades la concentració cel·lular dels nucleòtids UDP-Glc i UDP-galactosa. Tot i la relació directa amb la biosíntesi dels nucleòtids, no es presentà un efecte significatiu en la producció dels exopolisacàrids produïts per aquests bacteris. En aquest cas, la producció de glicoglicerolípids s'avaluarà més endavant.

### 3.1.2 Activitat 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfat aciltransferasa

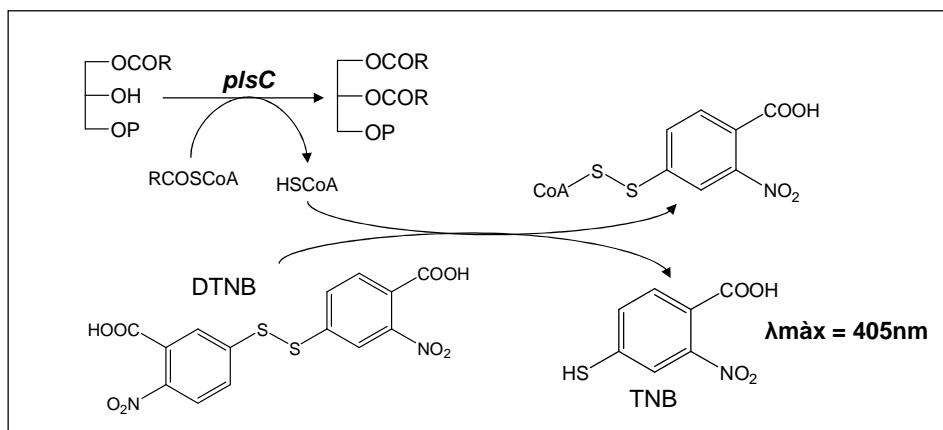
L'enzim 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfat aciltransferasa o PlsC catalitza preferentment la transferència d'àcids grassos insaturats a la segona posició del glicerol per la síntesi de fosfolípids (Figura 47). L'àcid gras activat amb coenzim A (RCOSCoA) condensa amb l'1-acilglicerol 3-fosfat o monoacilglicerol fosfat donant lloc al diacilglicerol fosfat i alliberant una molècula de coenzim A (HSCoA) (Coleman, 1990 i Coleman, 1992). Generalment, l'activitat d'aquest tipus de reaccions s'analitza mitjançant un assaig acoblat amb citrat sintasa. Tot i així, en el present treball s'ha plantejat un nou mètode continu indirecte per mesurar aquesta activitat enzimàtica fent reaccionar el HSCoA amb el reactiu d'Ellman emprat en la determinació de sulfhidrils lliures (Ellman, 1959).





**Figura 47: Reacció de l'enzim 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfat aciltransferasa o PlsC.**

El reactiu d'Ellman o àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) (DTNB) reacciona amb els grups tiols intercanviant l'enllaç disulfur i donant com a producte reduït el 2-nitro-5-tiobenzoat o TNB que en medi neutre o bàsic és de color groc. D'aquesta manera, tal com es veu en la Figura 48, l'augment de l'absorbància a 405 nm indicadora de TNB permet detectar la formació de l'HSCoA i, per tant, l'activitat de l'enzim PlsC d'interès.



**Figura 48: Assaig per determinar l'activitat de l'enzim PlsC acoblant la reacció de l'àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) o DTNB amb l'HSCoA.**

En l'Annex 2 es detalla la posada a punt d'aquest assaig en el que s'utilitza l'1-oleoil-glicerol 3-fosfat i l'oleoilSCoA com a reactius de l'enzim PlsC. A més, es mostren les condicions de treball seleccionades per tal d'assegurar la linealitat en els marges de formació d'HSCoA per l'enzim PlsC i, per tant, permetin la quantificació de la seva activitat en els extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica.

Un cop desenvolupat el mètode, es fan créixer les soques abC, aBC, AbC, ABC, que sobreexpressen la proteïna PlsC, i l'abc, com a control (Taula 15), en 50 mL de medi definit a 37 °C durant tota la nit. Posteriorment, s'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba durant 5h. Finalment, es prepara l'extracte cel·lular i es mesura la proteïna total mitjançant Bradford fent ús de la proteïna BSA com a patró.

**Taula 15: Soques emprades per determinar les activitats enzimàtiques de la proteïna PlsC.**

Soques	Gens		
	<i>mg517</i>	<i>galU</i>	<i>plsC</i>
abc	-	-	-
abC	-	-	+
aBC	-	+	+
AbC	+	-	+
ABC	+	+	+

A continuació, es preparen les reaccions enzimàtiques amb tampó Tris HCl 0.1 M a pH 9.0, BSA 1 mg/ mL i MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM els quals ajuden a l'estabilització de les proteïnes, oleoilSCoA 50 mg/L i 1-oleoilglicerol 3-fosfat 50 mg/L que són els substrats del PlsC i DTNB 0.1mM. A cada reacció s'addicionen diferents alíquotes d'extracte cel·lular i es mantenen a 30 °C. Es mesura l'absorbància a 405nm per la formació del TNB durant 10 min cada 30 s. Els valors obtinguts expressats com a μmol de HSCoA format min<sup>-1</sup> mg de proteïna total<sup>-1</sup> es mostren a la Taula 16 i es representen gràficament a la Figura 49.

**Taula 16: Activitats específiques de l'enzim PlsC expressades en μmol de HSCoA format min<sup>-1</sup> mg de proteïna total<sup>-1</sup>**

Soca	Activitat Específica μmols min <sup>-1</sup> mg proteïna <sup>-1</sup>	
	Experiments	Mitjana
abc	0.042	0.06 ± 0.03
	0.077	
abC	4.063	5.0 ± 1.1
	3.545	
	5.824	
	5.219	
	6.466	
	4.886	
aBC	3.922	3.9 ± 0.6
AbC	5.013	5.0 ± 0.1
ABC	6.980	5.0 ± 1.5
	3.066	
	6.421	
	3.875	
	4.388	
	5.021	

En la soca abc, tot i no sobreexpressar-se la proteïna, s'observa una certa activitat corresponent a l'activitat basal d'*E.coli*, ja que aquest gen és present en el genoma bacterià. En sobreexpressar el PlsC en les soques modificades la seva activitat específica augmenta unes 80 vegades respecte l'expressió genòmica.

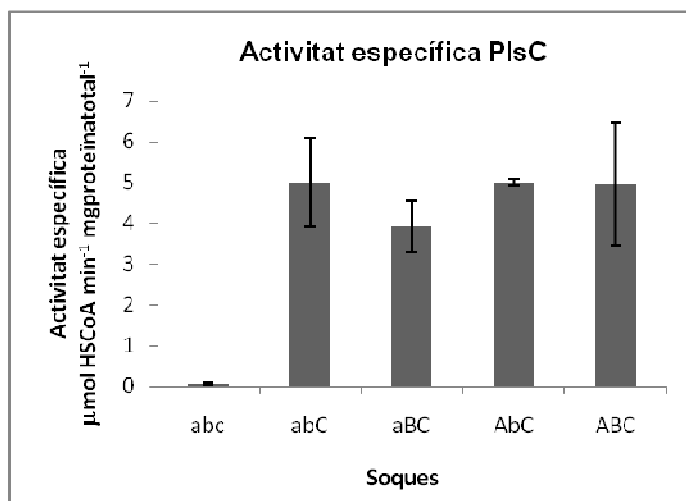


Figura 49: Mitjanes de les activitats específiques de PlsC i les seves desviacions estàndard.

Tant si se sobreexpressa sol com és el cas de la soca abC com si es coexpressa amb l'enzim GalU o inclús en el cas de la soca ABC on se sobreexpressen els tres gens, l'augment d'activitat específica és significatiu i similar.

### 3.1.3 Activitat glicosiltransferasa MG517

La reacció enzimàtica que catalitza la glicosiltransferasa MG517 permet la síntesi dels glicoglicerolípidis MGDAG i DGDAG a partir del diacilglicerol (DAG) i l'UDP-Glc. Al laboratori, s'ha desenvolupat un assaig radiomètric discontinuo per determinar l'activitat glicosiltransferasa MG517 (Andrés *et al.*, 2011). Per similitud a la reacció, s'utilitza el donador UDP – galactosa (UDP-Gal) marcat radioactivament amb <sup>14</sup>C en tots els seus carbonis i l'acceptor 1,2-dioleoilglicerol (DOG). Les condicions de reacció són <sup>14</sup>C<sub>6</sub> UDP-Gal 1 mM amb una relació 1/200 calent/fred, DOG 1.25 mM, DOPG 12.5 mM, com a activador, i MgCl<sub>2</sub> 20 mM, com a cofactor, utilitzant com a detergent CHAPS 20 mM i com a tampó HEPES 20mM a pH 8 condicions en què l'enzim, proteïna associada a la membrana, és estable i funcional. Al llarg de la reacció es treuen alíquotes, s'extreuen els glicoglicerolípidis i s'hi afegeix el líquid de centelleig.

En l'apartat 4.3 es detalla l'adaptació del mètode desenvolupat i les condicions de treball seleccionades per tal de determinar l'activitat enzimàtica de la glicosiltransferasa MG517 en els extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica.

Es determina aquesta activitat en les soques que sobreexpressen l'enzim MG517. Es fan créixer les soques Abc, ABc, AbC i ABC i la soca abc com a blanc i com a control en l'extracció lipídica de l'assaig radiomètric (Taula 17).

**Taula 17: Soques emprades per determinar les activitats enzimàtiques de la proteïna MG517.**

Soques	Gens		
	mg517	galU	plsC
abc	-	-	-
Abc	+	-	-
ABc	+	+	-
AbC	+	-	+
ABC	+	+	+

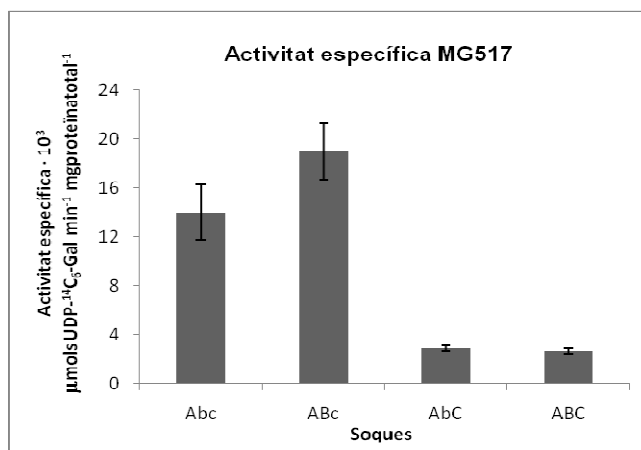
Així, es preparen creixements en 50 mL de medi definit i es manté durant tota la nit a 37 °C. Posteriorment, s'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició de l'IPTG i es manté 5h a 37 °C. Finalment, es prepara l'extracte cel·lular emprant el tampó de lisi per a l'extracció d'aquesta proteïna de membrana que conté 22 mM CHAPS, 20 mM HEPES (pH 8), 500 mM NaCl i 10% glicerol. Es quantifica la proteïna total per l'assaig del BCA emprant com a patró la proteïna BSA. En aquest cas no s'utilitza Bradford com en els altres casos ja que la presència de detergent interfereix. Es duu a terme la reacció amb diferents alíquotes de l'enzim MG517 i s'addiciona la UDP-Gal 1 mM marcada amb una relació 1/200 i el dioleoilglicerol 1.25 mM. Un cop iniciada la reacció, cada minut s'extreu una alíquota que es mescla amb 0.5 mL d'acetat d'etil. Aquest, a part de parar la reacció enzimàtica, permet l'extracció dels glicoglicerolípid.

La soca abc no presenta cap tipus d'activitat enzimàtica ja que no conté el gen *mg517* i s'utilitza com a blanc. La Taula 18 i la Figura 50 mostren les activitats de diversos cultius de cada soca on totes les soques presenten activitat enzimàtica tot i que aquesta presenta una diferència notable depenent de cada soca.

**Taula 18: Activitats específiques de l'enzim MG517 expressades en  $\mu\text{mol d'UDP-Gal incorporada min}^{-1} \text{ mg de proteïna total}^{-1}$ . Les condicions de reacció són:  $^{14}\text{C}_6$  UDP-Gal 1 mM amb una relació 1/200 calent/fred, DOG 1.25 mM, DOPG 12.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, CHAPS 20 mM i HEPES 20 mM a pH 8.**

Soca	Activitat específica $\mu\text{mols min}^{-1} \text{ mg proteïna}^{-1}$	
	Experiments	Mitjana
Abc	0.0124	0.014 $\pm$ 0.002
	0.0156	
ABc	0.0173	0.019 $\pm$ 0.002
	0.0206	
AbC	0.003	0.003 $\pm$ 0.0002
	0.0027	
ABC	0.0025	0.003 $\pm$ 0.0002
	0.0028	

La soca que només sobreexpressa l'enzim MG517 presenta una activitat específica de  $0.014 \mu\text{mol d'UDP-Gal min}^{-1} \text{ mg de proteïna total}^{-1}$ . En sobreexpressar conjuntament les proteïnes GalU i MG517, l'activitat d'aquesta última és del mateix ordre ( $0.019 \mu\text{mol d'UDP-Gal min}^{-1} \text{ mg de proteïna total}^{-1}$ ). En canvi, en sobreexpressar de forma conjunta els enzims PlsC i MG517, soques AbC i ABC, l'activitat és de  $0.003 \mu\text{mol d'UDP-Gal min}^{-1} \text{ mg de proteïna total}^{-1}$ , sent una cinquena part de l'activitat de MG517 quan aquesta és la única que se sobreexpressa.



**Figura 50: Mitjanes de les activitats específiques de MG517 i les seves desviacions estàndard**

El fet que l'activitat de MG517 sigui inferior quan se sobreexpressa la PlsC tant en la soca AbC com en la ABC, pot ser degut a que per algun tipus de regulació de la cèl·lula, o bé la quantitat de MG517 és menor i, per tant, també la seva activitat enzimàtica, o bé, és menys activa. Es coneix que la proteïna PlsC és integral de membrana (Coleman, 1992 i Zhang i Rock, 2008) mentre que la MG517 es troba com a proteïna associada a la membrana (Canal, 2010). En general, la sobreexpressió de proteïnes de membrana o associades a la membrana en bacteris com *E.coli* fa que aquestes s'acumulin a la membrana de les cèl·lules hostes, la qual cosa, és generalment tòxic per l'organisme provocant baixos rendiments en la seva expressió. S'assumeix que la sobreexpressió de proteïnes de membrana afecta la seva integritat i, per tant, la viabilitat de la cèl·lula que dificulta la divisió cel·lular i condueix a la reducció del seu creixement (Wagner *et al.*, 2007). En el cas de la MG517, per una banda, les cèl·lules s'allarguen considerablement tal i com s'ha observat en les fotografies realitzades al microscopi i, per altra banda, disminueix el creixement cel·lular fet que es fa palès en mesurar la densitat òptica de cada cultiu. Aquests efectes es mostren en les soques modificades quan se sobreexpressa MG517, mentre que en la sobreexpressió de la PlsC de forma individual no es veu cap canvi respecte *E.coli*.

A mode d'exemple, en la Taula 19 es mostren valors de densitat òptica obtinguda en creixements en medi definit i després de les 5h d'inducció de les quatre soques que sobreexpressen la proteïna MG517, ja sigui coexpressada amb PlsC o no, i la soca que únicament sobreexpressa la PlsC. Tal i com s'observa, a les soques que sobreexpressen conjuntament les proteïnes MG517 i PlsC, és a dir, les soques AbC i ABC, la seva densitat òptica és menor sent la diferència fins a un 30% del creixement obtingut en les altres soques.

**Taula 19: Valors de densitat òptica a 600nm obtinguda en creixements en medi definit per les diferents soques modificades.**

Soca	OD <sub>600</sub>
abC	1.67
Abc	1.66
ABc	1.66
AbC	1.19
ABC	1.18

També cal tenir en compte que l'activitat específica es mesura després de les 5h d'inducció i, per tant, no es pot generalitzar aquesta activitat al llarg de tot el temps d'inducció. En l'actualitat es té relativament poca informació sobre l'estabilitat, control de qualitat i degradació de les proteïnes de membrana. Està documentat que les proteïnes de membrana sobreexpressades es degradin ràpidament per proteases endògenes localitzades al citosol (Wagner *et al.*, 2007). En aquestes soques en les que s'ha vist disminuïda l'activitat MG517, es realitza la sobreexpressió de les dues proteïnes de membrana: la MG517 i la PlsC, la qual cosa podria donar lloc a aquesta situació. En canvi, la coexpressió amb la proteïna GalU no afecta.

De totes maneres, cal destacar que la sobreexpressió de la proteïna PlsC no presenta cap efecte en la seva activitat sent aquesta igual tant si es coexpressa amb la proteïna MG517 com si no. De totes maneres, tot i la disminució de l'activitat específica, caldrà veure si aquest efecte també es tradueix en una menor producció de glicoglicerolípid.

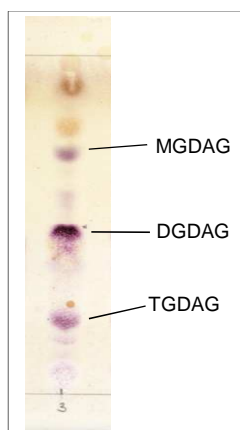
## 3.2 ELS GLICOGLICEROLÍPIDS DE LES SOQUES MODIFICADES

### 3.2.1 Identificació dels glicoglicerolípid

Se sap que la glicosiltransferasa MG517 de *Micoplasma genitalium* sintetitza a partir d'UDP-Glc i DAG, els glicoglicerolípid MGDAG i DGDAG els quals s'han aïllat i se'n coneix la seva estructura. En treballs anteriors al laboratori en el que s'estudiava la síntesi *in vitro*

d'aquests lípids, es va veure que en primer lloc se sintetitzava el MGDAG, després el DGDAG i a temps llargs de reacció apareixia un tercer glicoglicerolípid (Andrés *et al.*, 2011).

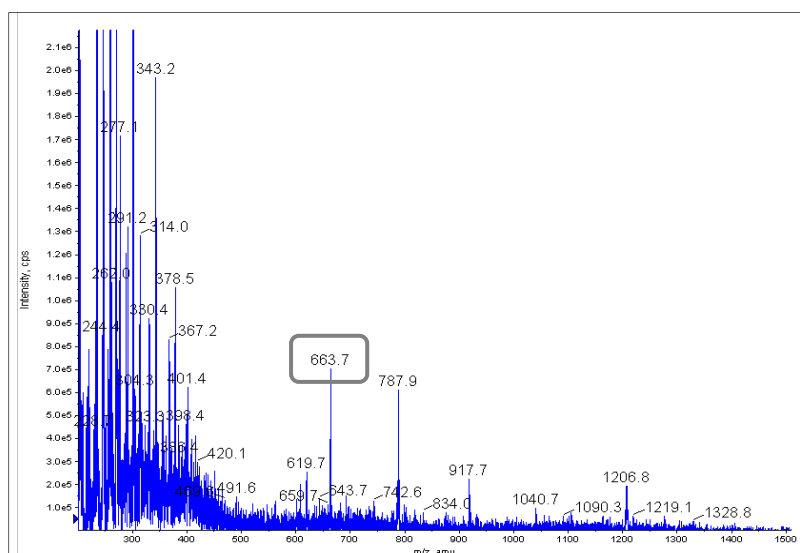
El creixement de la soca *E.coli* BL21(DE3) *star* transformada amb el plasmidi pET38b(+) – mg517 en medi definit també produeix els tres glicoglicerolípid. A partir del seu extracte lipídic, s'ha realitzat una cromatografia de capa fina que s'ha revelat amb  $\alpha$ -naftol on els glicolípid es mostren de color lila. En la Figura 51 s'observa el MGDAG, el DGDAG i un altre glicoglicerolípid. En treballs anteriors, es van identificar per RMN que el monosacàrid de MGDAG és una glucosa i el disacàrid del DGDAG és una gentibiosa, Glc $\beta$ 1,6Glc (Andrés *et al.*, 2011). El tercer glicolípid assenyalat com a TGDAG, presenta un factor de retenció d'un glicoglicerolípid amb un trisacàrid i s'obtidria per una nova transferència de nucleòtid que podria ser UDP-Glc sobre el DGDAG.



**Figura 51: Cromatografia de capa fina revelada amb  $\alpha$ -naftol de l'extracte lipídic d'una soca d'*E.coli* transformada amb el plasmidi pET38b(+) – mg517.**

Els tres glicolípid també s'observen en les diferents soques modificades per enginyeria metabòlica. Per això, es pretén confirmar si aquest glicolípid encara sense identificar conté un trisacàrid. Es realitzen 10 cultius de 50 mL de la soca Abc en medi definit a 37 °C durant tota la nit, s'indueix amb IPTG i s'incuba 5h a 37 °C. A continuació, se centrifuguen tots els cultius i, del botó cel·lular, s'extreuen els lípids de les membranes amb cloroform / metanol (2:1). Amb aquest extracte lipídic es realitza en primer lloc una metanòlisi dels àcids grassos dels lípids i, tot seguit, una acetilació del glicoglicerol amb anhídrid acètic i piridina (Protocol 4.1). El producte resultant s'analitza per FIA – MS en triple quadrupol amb font de APCI (polaritat positiva) i elució amb metanol / tetrahidrofurà / acetat d'etil (9:1:1). L'espectre de masses es mostra en la Figura 52 on s'observen diferents pics. El pic de massa 663.7 concorda amb un trisacàrid on el glicerol es troba acetilat. Aquest compost correspondria al resultat de la transesterificació dels àcids grassos del TGDAG del glicerol

per acetils. El pic de massa 1040.7 correspon transesterificació dels àcids grassos del TGDAG on 9 alcohols del trisacàrid també han estat substituïts per acetils. El pic de 1206.8 pot correspondre a la transesterificació d'un dels àcids grassos del TGDAG mentre l'altre àcid gras, el 17:0 $\Delta$ , queda intacte. Al cromatograma s'observen més pic, la qual cosa ja és d'esperar donat que es tracta d'una mostra complexa de lípids.



**Figura 52: Espectre de masses FIA – MS en triple quadrupol amb font de APCI (polaritat positiva) i elució amb metanol / tetrahidrofurà / acetat d'etil (9:1:1).**

A part d'això, més endavant es veurà que en l'anàlisi de l'UPLC – ES+/TOFMS es detecta la presència d'aquest tercer glicolípid juntament amb el MGDAG i el DGDAG amb un pes de glúcid corresponent a un trisacàrid.

### **3.2.2 Anàlisi dels glicoglicerolípid per UPLC – ES+/TOFMS**

L'objectiu del present treball és modificar genèticament *E.coli* per sobreproduir glicoglicerolípid, per tant, és de suma importància comptar amb un assaig que permeti la quantificació d'aquests lípids. La cromatografia líquida d'alta resolució o *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* és una de les tècniques més comunes per l'anàlisi dels diferents tipus de lípids. De totes maneres, la quantificació d'aquestes molècules s'ha reconegut com a complicada ja que es troben en quantitats petites d'entre 12 i 600mg per cada 100g de mostra en plantes i, a més, presenten variabilitat d'àcids grassos en les seves cadenes. Bibliogràficament es descriu l'ús de detectors com ultraviolat (UV), índex de refracció (RI) i fluorescència en el qual prèviament s'ha derivatitzat amb un fluoròfor (Sugawara, *et al.*, 1999 i Picchioni *et al.*, 1996). També s'ha utilitzat el detector *Evaporative Light Scattering (ELS)* que sovint s'assimila a un detector de masses ja que la resposta, teòricament, és proporcional a la massa del solut (Moreau,



2006). Totes aquestes tècniques generalment necessiten etapes prèvies de purificació o derivatització per facilitar-ne el treball.

En la Taula 20 es mostra un resum de les tècniques d'extracció, purificació i condicions d'HPLC emprades per la separació i quantificació de glicoglicerolípids de diverses fonts descrites a la bibliografia.

**Taula 20: Resum bibliogràfic de les condicions d'HPLC emprades per la separació i quantificació de glicolípid.** S'indica font, tipus de molècules que s'analitzen, tipus d'extracció i posterior purificació, condicions d'HPLC (columna, fase mòbil i detector), si es quantifica i la referència. Q: Quantificació; ELS: *Evaporative Light Scattering*; C: cloroform; A: acetona; M: metanol; H: aigua;

Mostra	Molècules	Extracció	Purificació	Columna HPLC	Fase mòbil	Detector	Q	Referència
Plantes	Tots els lípids incloent MGaDAG i DGaDAG	2-propanol	Mètode Folch (Folch <i>et al.</i> , 1957)	Spherisorb S3CN (fase de cinanopropil)	Mescles complexes de dissolvents amb gradient.	ELS	Sí	(Christie i Urwin, 1995)
				YMC PVa-Sil Polivinil alcohol dimeritzat				
Pomes Pastanaga	Tots els lípids incloent MGaDAG i DGaDAG	C/M (2:1)	Mètode Folch (Folch <i>et al.</i> , 1957) i columna	ChromSep LiChrosorb Si 60	2-propanol / hexà / H	ELS	Sí	(Picchioni <i>et al.</i> , 1996)
Peix Marisc Cerps marines	Esfingolípid neutres	Bligh Dyer	Columna sílice C/A/M	Aquasil-SS	2-propanol / n-hexà / H (gradient)	UV	Sí	(Lim <i>et al.</i> , 1999)
	Glicoglicerolípid			C8 – fase reversa	M / H (96:4)	UV i IR		
Plantes	Tots els lípids incloent MGaDAG, DGaDAG i TGaDAG	C/M (2:1)	Mètode Folch (Folch <i>et al.</i> , 1957)	LiChrosorb Si 60	C i M / H (95:5) gradient	ELS	Sí	(Sugawara i Miyazawa, 1999)
					C i M / H (5mM NH <sub>4</sub> AcO (95:5) gradient	ES+/TOFMS	No	
Clau Pebre vermell Nou moscada	Esfingolípid neutres	Bligh Dyer	Columna sílice C/A/M	Aquasil-SS	2-propanol / n-hexà / H (gradient)	UV	Sí	(Suzuki <i>et al.</i> , 2000)
	Glicoglicerolípid			C8 – fase reversa	M / H (96:4)			
Espuma d'aigua de riu	Saponins MGaDAG DGaDAG	C/M (1:1) i butanol saturat H	Columna sílice C/M (98:2) i C/M/H (80:20:2) i (60:40:10)	LiChospher 100 RP	M / NH <sub>4</sub> AcO 0.01N (96:4)	MS-ES(+/-)	Sí	(Wegner i Hamburguer, 2002)
Comí negre Coriandre	Glicoglicerolípid	Soxhlet C/M (2:1)	Columna sílice C/A	Zorbax-Sil	Isooctà / 2-propanol (1:1)	UV	Sí	(Ramadan i Mörsel, 2003)
Plantes	Lípids incloent MGDAG i DGDAG	Microones C/M (2:1)	Intercanvi aniònic C/M i C/M/0.1M NH <sub>4</sub> AcO	Fase normal	Gradient C i M/A/H/HAcO (30:60:9:1)	ELS	Sí	(Yunoki <i>et al.</i> , 2009)

Tal com s'observa en la Taula 20, els primers passos sempre són l'extracció dels lípids i la purificació d'aquests. Existeixen diferents mètodes per obtenir els lípids més o menys purs en funció de l'anàlisi a realitzar però en tots aquests ha estat necessari un pas de purificació després de l'extracció. Algunes purificacions es basen en extraccions mitjançant dissolvents com seria el mètode Folch (Folch *et al.*, 1957), mentre en d'altres es realitzen columnes cromatogràfiques on s'elueixen els lípids de forma diferent en funció de la polaritat. Però, el que tenen en comú aquestes purificacions és que dificulten la manipulació i encareixen els costos de les tècniques.

Un cop es tenen les fraccions més o menys pures, les tècniques d'HPLC emprades són molt diverses. Alguns exemples són: l'ús d'una columna amb fase normal ja sigui amb un detector UV (Ramadan *et al.*, 2003) o amb un *ELS* (Sugawara i Miyazawa, 1999, Picchioni *et al.*, 1996 i Yunoki *et al.*, 2009); l'ús de fases reverses amb detector d'UV (Suzuki *et al.*, 2000) o amb detector de masses (Wegner i Hamburguer, 2002); o, fins i tot, l'ús de fases estacionàries modificades químicament com seria l'alcohol de polivinil polimeritzat en sílice o l'ús d'una fase de cianopropil (Christie, *et al.*, 1995). Pel que fa a la separació, en la majoria dels casos, els glicoglicerolípid que presenten la mateixa part sacarídica elueixen de forma conjunta dificultant la detecció de les diferents combinacions d'àcids grassos que componen aquestes molècules.

Al laboratori s'han estudiat diferents mètodes d'HPLC per quantificar els glicoglicerolípid (Julve, *Comunicació Personal*). Finalment, s'opta per l'assaig UPLC-ES+/TOFMS amb el que no és necessari realitzar la purificació dels glicoglicerolípid un cop extrets. El terme UPLC es refereix a la tècnica HPLC millorada en què la fase estacionària suporta pressions molt més altes permetent d'aquesta forma disminuir la mida de partícula de la columna i, per tant, disminuir el temps de retenció de les partícules al mateix temps que se n'augmenta la seva resolució. La detecció es basa primer en ionitzar les partícules per electroesprai i, posteriorment, mesurar el temps de vol de cada partícula, la qual cosa va relacionada amb la relació càrrega – massa (TOFMS). En l'apartat 5.1 es detalla la posada a punt i la validació del mètode per quantificar els glicoglicerolípid procedents de les soques modificades.

Donat que la identificació serà per masses, és necessari determinar la composició i abundància dels àcids grassos que formen els glicoglicerolípid sintetitzats en *E.coli*. A continuació es presenta la seva identificació.

### 3.2.2.1 Determinació d'àcids grassos per cromatografia de gasos

En la bibliografia es descriuen els diferents àcids grassos que formen part dels lípids de la membrana d'*E.coli*. Aquest bacteri es pot adaptar a una gran varietat de condicions de creixement com poden ser canvis de temperatura, modificacions del medi de cultiu i canvis de pH, entre altres. A més, aquestes modificacions poden condicionar la composició dels àcids grassos dels lípids de la seva membrana (Ivancic *et al.*, 2009; Katsui *et al.*; 1981 i Sullivan *et al.*, 1979), sent els enzims de la síntesi dels àcids grassos el punt més important de la regulació de la composició d'aquests (Ingram, 1977 i Ingram, 1982).

Es pretén conèixer la composició d'àcids grassos dels glicolípidis presents en les cèl·lules modificades per enginyeria metabòlica. Per això, es purifiquen els glicoglicerolípidis MGDAG i DGDAG de la soca ABC i s'analitzen la composició dels seus àcids grassos. Com que no se sap si els àcids grassos d'aquests lípidis són els mateixos que els àcids grassos del fosfolípid, s'identifiquen els àcids de tot l'extracte lipídic de les cèl·lules de la mateixa soca ABC. A més a més, també s'analitzen els extractes dels lípidis de les soques abc, Abc, ABC i AbC per veure si la sobreexpressió dels diferents enzims provoca diferències. L'anàlisi s'efectua per cromatografia de gasos prèvia hidròlisi dels ésters i derivatització dels àcids grassos a ésters metílics.

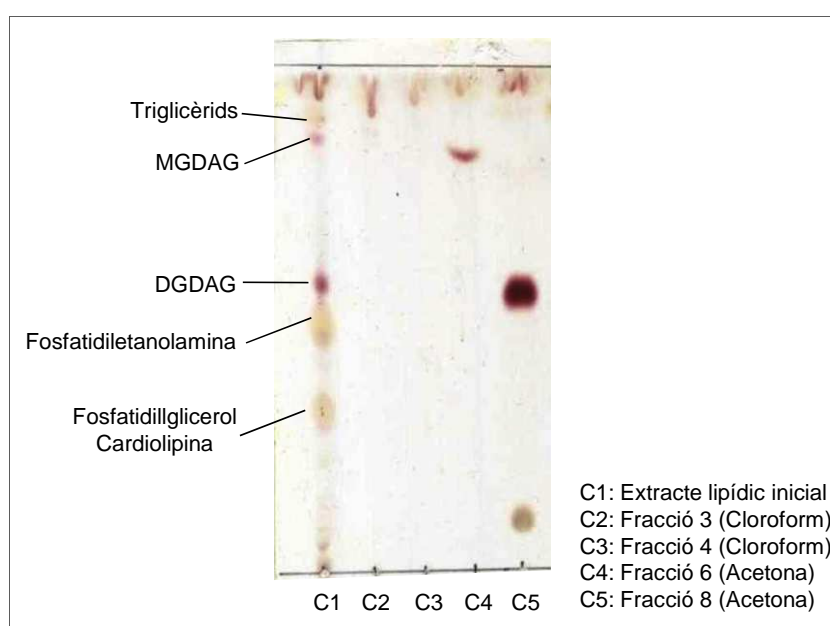
#### 3.2.2.1.1 Determinació dels àcids grassos de MGDAG i DGDAG purificats

En primer lloc es determinen els àcids grassos que es troben continguts en els glicoglicerolípidis MGDAG i DGDAG que s'aïllen de la soca ABC. Per fer-ho, es fan 20 creixements en paral·lel de la soca ABC, que conté els tres gens d'interès introduïts, en 50 mL de medi definit a 37 °C. S'indueix la sobreexpressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba durant 5h a 37 °C. Tot seguit, se sedimenten i es renta el botó cel·lular amb NaCl 0.9%. Es resuspèn en 33 mL de metanol i es manté durant 20min a l'ultrasons per extreure els lípidis de les membranes cel·lulars. El sobrenedant es porta a sequedat.

A continuació, es purifiquen els glicoglicerolípidis MGDAG i DGDAG de l'extracte lipídic mitjançant cromatografia d'adsorció amb una columna de sílice flash 60. En aquesta fase estacionària, la separació de mesclades de lípidis es dona en concordança a la polaritat relativa de cada lípid, la qual ve determinada bàsicament pel nombre i tipus de grups polars. En primer lloc, s'utilitza com a fase mòbil cloroform que permet l'elució dels lípidis neutres, en segon lloc, s'elueix amb acetona, la qual cosa permet obtenir les fraccions de

glicolípid i, finalment, en tercer lloc, s'elueix amb metanol per extreure'n els fosfolípids (Kates, 1972).

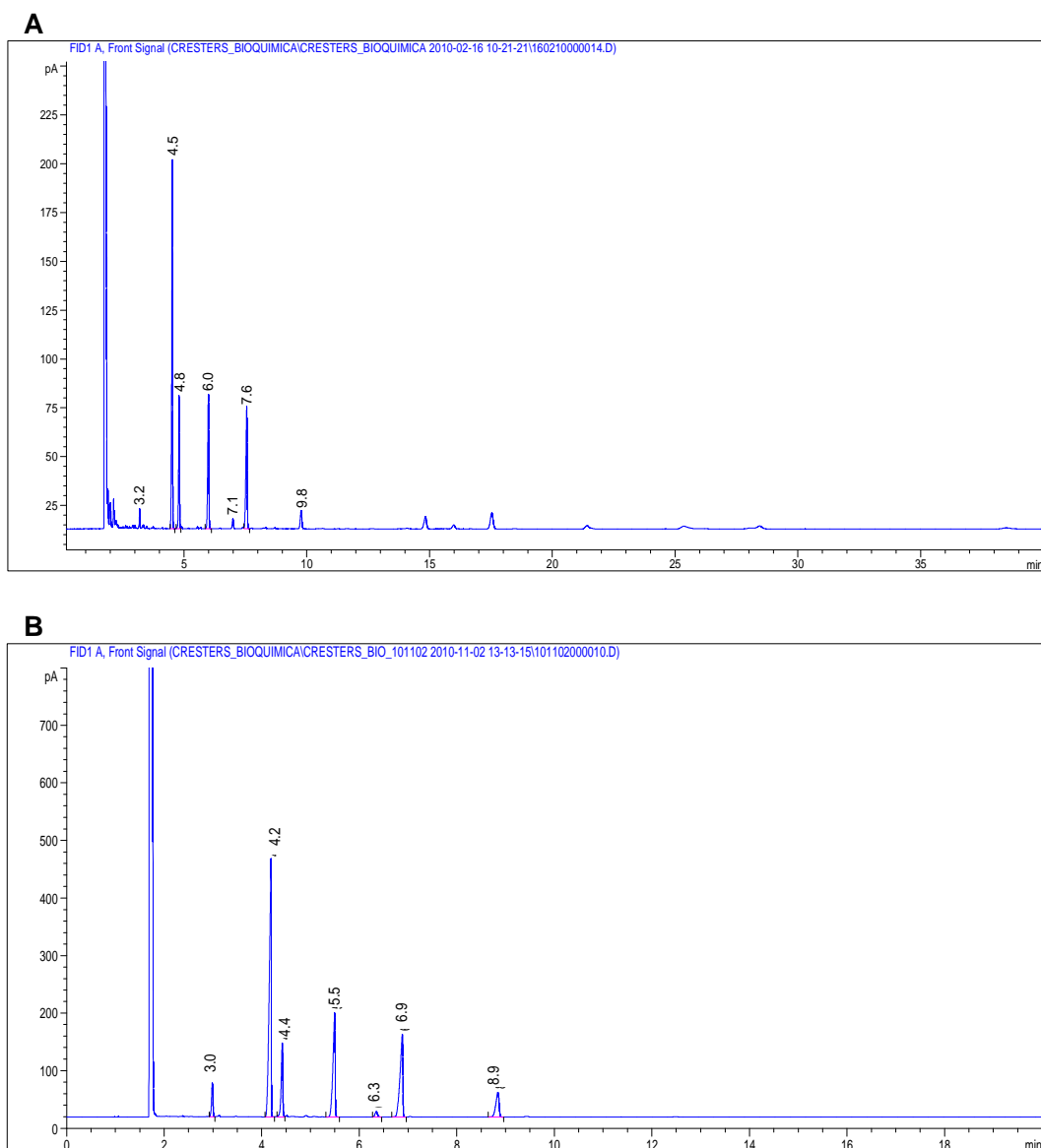
El seguiment de la purificació es realitza per cromatografia de capa fina amb sílice com a fase estacionària, cloroform / metanol / aigua (65:25:4) com a fase mòbil i una dissolució de revelat d'àcid sulfúric / metanol / aigua (45:45:10). La Figura 53 mostra les fraccions més significatives de la columna on es veu que en l'elució amb acetona s'obté el MGDAG totalment pur (C4) i una fracció de DGDAG que conté una impuresa (C5). Tot i la impuresa, donat que no es tracta de cap dels lípids coneguts i la mostra es troba molt concentrada en DGDAG, se segueix amb l'anàlisi.



**Figura 53: Cromatografia de capa fina amb fase mòbil cloroform / metanol / aigua (65:25:4) de les fraccions obtingudes en purificar l'extracte lipídic de la soca ABC mitjançant una cromatografia flash de cloroform, acetona i metanol.**

Les diverses fraccions es dissolen en hexà i es derivatitzen a ésters metílics en medi bàsic amb KOH en metanol. S'injecten les mostres al cromatògraf de gasos connectat a un detector d'ionització de flama (FID), emprant una columna WaxOmega tal com es detalla al Protocol 4.3.

S'utilitza com a blanc la fracció de cloroform de la columna en què no hi ha present cap dels glicoglicerolípid i no presenta cap pic destacable a part del propi dissolvent. En les mostres de MGDAG i DGDAG (Figura 54 A i B), destaquen 4 pics majoritaris i 3 minoritaris, comuns en temps de retenció en els dos glicoglicerolípid. Per tant, sembla que la impuresa no interfereix en el cromatograma d'àcids grassos.



**Figura 54: Cromatogrames de gasos de les mostres derivatitzades a ésters metílics de la soca ABC. A: MGDAG i B: DGDAG**

La majoria d'aquests pics es poden atribuir directament a àcids grassos coneguts gràcies a diferents patrons. S'identifica el pic a temps de retenció 4.5 min que correspon a l'éster metílic de l'àcid palmític i el pic, 4.8 min, que correspon a l'àcid palmitoleic. Amb el patró *Supelco® 37 component FRAME MIX* que presenta 37 ésters d'àcid gras entre 14 i 22 carbonis, s'ha vist que el primer pic de 3.2 min correspon a l'àcid mirístic, el de 7.1 a l'àcid esteàric i el de 7.6 min a l'éster de l'àcid oleic. De totes maneres, resten dos pics sense identificar a temps de 6.0 i 9.8 min. Per aquest motiu, la mostra DGDAG s'analitza per cromatografia de gasos amb espectrometria de masses.

Aquesta anàlisi ha permès determinar tots els ésters metílics dels àcids grassos majoritaris. Els dos que restaven s'identifiquen sent el de temps de retenció de 6.0 min el

corresponent a l'àcid 2-hexilciclopropanoic (17:0 $\Delta$ ) i el de 9.8 min l'àcid 2-octilciclopropanoic (19:0 $\Delta$ ). En la Figura 55 es mostra l'estructura química d'aquests dos àcids grassos.

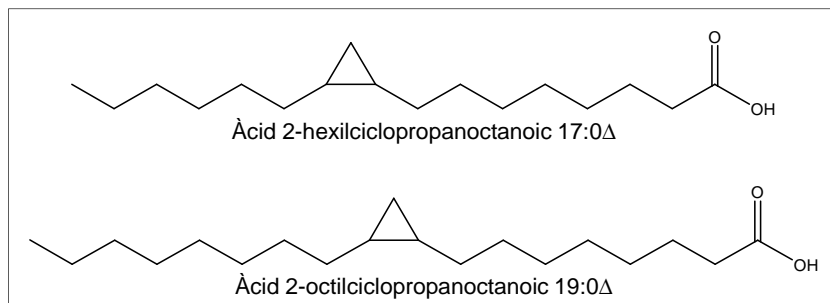


Figura 55: Estructura química dels àcids grassos 17:0 $\Delta$  i 19:0 $\Delta$ .

En la Figura 56 es mostren els àcids grassos i la seva abundància en percentatges presents en la mostra DGDAG. Tal com s'observa, l'àcid gras majoritari és el palmític (16:0) amb un 46% d'abundància respecte el total dels àcids detectats. A continuació, per ordre d'abundància hi ha els àcids 2-hexilciclopropanoic (17:0 $\Delta$ ), oleic (18:1) i palmitoleic (16:1) que tenen un percentatge del 18, el 16 i el 15% respectivament. I, finalment, els menys abundants són els àcids mirístic (14:0) i 2-octilciclopropanoic (19:0 $\Delta$ ) amb un 2% i l'esteàric (18:0) amb un 1%.

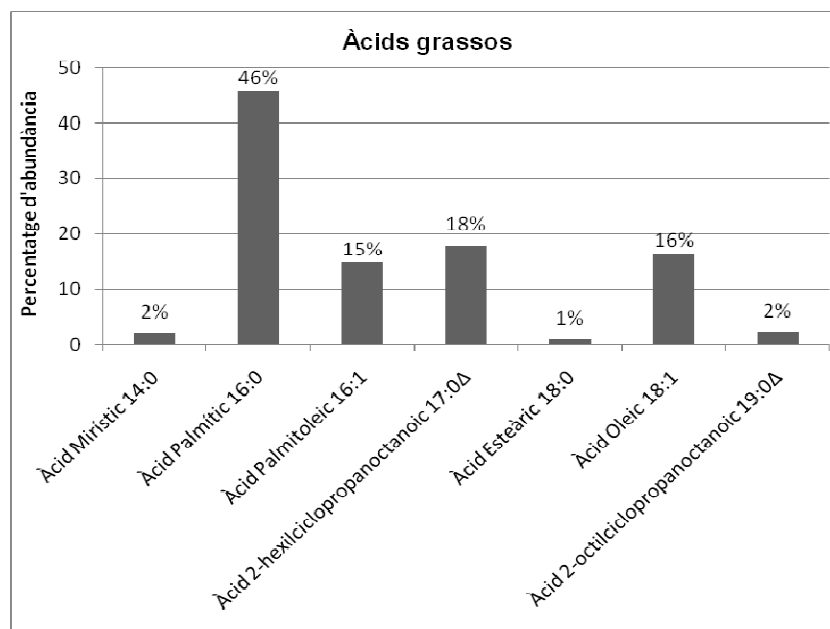


Figura 56: Abundància relativa dels àcids grassos presents en la mostra DGDAG i determinat per cromatografia de gasos amb espectrometria de masses.

Tots aquests àcids grassos, incloent els 17:1 $\Delta$  i 19:0 $\Delta$ , s'han descrit en *E.coli* prèviament amb abundàncies variables en funció de les condicions de creixement emprades en cada

cas (Oursel *et al.*, 2007; Sakurada *et al.*, 1999; Katsui *et al.*, 1981; Sullivan *et al.*, 1979 i Kaneshiro i Marr, 1961).

### 3.2.2.1.2 Determinació dels àcids grassos totals de les soques modificades

En aquest cas, es realitza l'anàlisi dels àcids grassos presents en tot l'extracte lipídic de la soca ABC per veure si aquests àcids són els mateixos o no que els presents en els glicoglicerolípid. De forma paral·lela, també es duu a terme l'anàlisi de les soques abc, Abc, ABc i AbC. Així, es pot veure si existeix alguna modificació pel que fa a la regulació de la síntesi dels àcids grassos degut a la sobreexpressió de les diferents proteïnes. Inclús, si a l'hora de sintetitzar el DGDAG sota les condicions de treball emprades, hi ha algun tipus de predilecció per l'àcid gras o simplement aquests són els mateixos que els emprats en la síntesi dels fosfolípids d'*E.coli*.

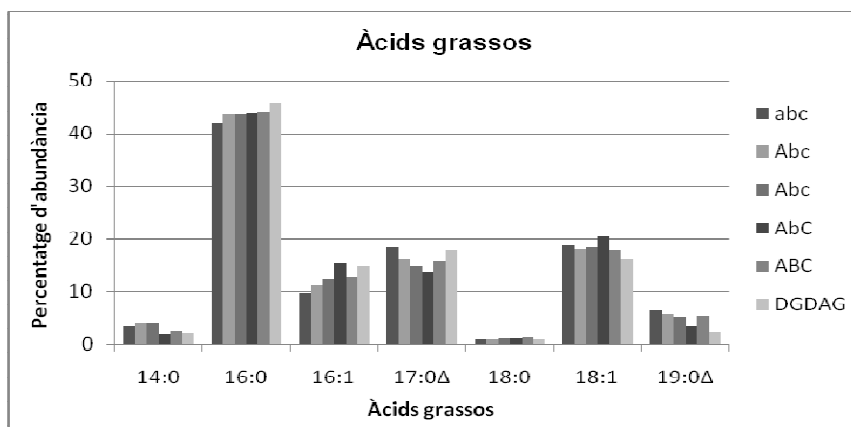
Les cinc soques (abc, Abc, ABc, AbC i ABC), totes productores de glicoglicerolípid excepte la primera, es fan créixer en medi definit. Per això, es preparen 10 cultius en paral·lel per cada una de les soques amb 50 mL de medi definit i es mantenen a 37 °C ON. S'indueix la sobreexpressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba durant 5h a 37 °C. A continuació, s'obté l'extracte lipídic com abans s'ha descrit i es procedeix a la derivatització dels àcids grassos presents en els diferents lípids a èsters metílics en medi bàsic. S'injecten les mostres al cromatògraf de gasos connectat a un detector d'ionització de flama (FID).

En la Taula 21 i la Figura 57 es mostren les abundàncies dels àcids grassos relatives obtingudes per cada una de les soques juntament amb les de la mostra DGDAG.

**Taula 21: Anàlisi d'àcids grassos dels extracte lipídics les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC i del DGDAG purificat per GC – FID amb el percentatge d'abundància relativa obtinguda en cada cas.**

Àcid gras	abc	Abc	ABc	AbC	ABC	DGDAG
14:0	4	4	4	2	3	2
16:0	42	44	44	44	44	46
16:1	10	11	13	15	13	15
17:0Δ	19	16	15	14	16	18
18:0	1	1	1	1	1	1
18:1	19	18	18	20	18	16
19:0Δ	6	6	5	3	5	2





**Figura 57: Abundància relativa dels àcids grassos presents en els extractes lipídics de les soques abc, Abc, ABC, AbC i ABC i la mostra DGDAG determinada per cromatografia de gasos amb detector FID.**

Tal com s'observa, tant entre els extractes de les diferents cèl·lules com entre aquests i el DGDAG purificat, els àcids grassos que s'identifiquen són els mateixos i amb el mateix percentatge aproximadament, sent el majoritari l'àcid palmític (16:0) amb un 44% d'abundància respecte el total dels àcids detectats. A continuació, per ordre d'abundància hi ha els àcids oleic (18:1), 2-hexilciclopropanoic (17:0Δ) i palmitoleic (16:1) presents amb un percentatge mitjà del 19, 16 i 13% respectivament. I, finalment, els menys abundants són els àcids mirístic (14:0) i 2-octilciclopropanoic (19:0Δ) amb un 5% i l'esteàric (18:0) amb un 1%. Així, es confirma que el DGDAG té els mateixos àcids grassos que tota la fracció lipídica i, per tant, sembla no haver cap tipus d'exclusió d'àcid gras en la síntesi dels glicoglicerolípids per part dels diferents gens involucrats. A més a més, la síntesi d'àcids grassos per part del bacteri *E.coli* no presenta grans modificacions encara que se sobreexpressin les tres proteïnes GalU, PlsC i MG517, ja sigui de forma individual o conjunta, i se sintetitzin els glicoglicerolípids MGDAG, DGDAG i TGDAG.

### 3.2.2.2 Quantificació de glicoglicerolípids per UPLC - ES+/TOFMS

S'ha posat a punt el mètode UPLC – ES+/TOFMS utilitzant una columna de fase reversa C-18 i metanol / aigua (98:2) com a fase mòbil. En la detecció, es fa un escorbrat de masses d'entre 50 i 1500Da que engloba els tres glicoglicerolípids i el DAG tal com es veurà a continuació. En l'annex 3 es detalla el provés de validació utilitzant el patró comercial MGalDEG en que les dues cadenes d'àcid gras són d'esteàric i el sucre una galactosa. De forma resumida, el límit de quantificació és de 0.03 μM i per sobre d'aquest valor, el coeficient de variació és menor al 7%. En la Figura 58 i la Figura 59 es mostren els ajustos realitzats a diferents concentracions de patró.

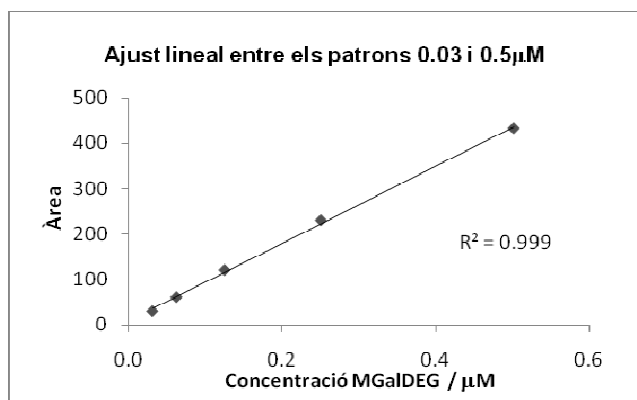


Figura 58: Ajust lineal ( $y = 851.8 x + 9.8$ ) realitzat entre les concentracions 0.03 i 0.5 μM de patró comercial MGalDEG.

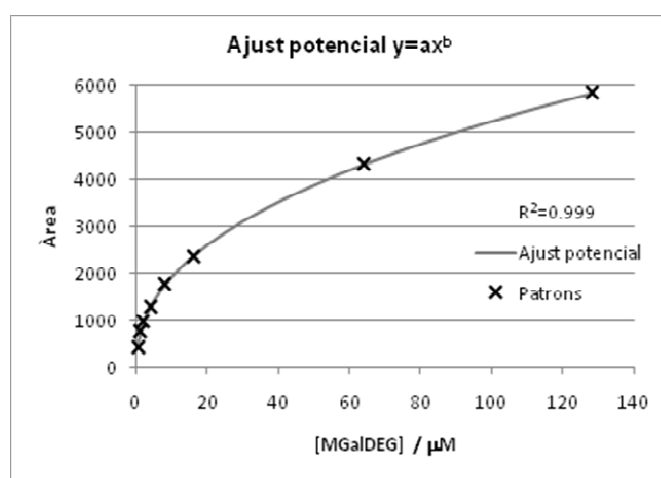


Figura 59: Ajust potencial ( $y = 713 x^{0.433}$ ) realitzat entre les concentracions 0.5 μM i 128 μM de patró comercial MGalDEG.

Tal com s'observa, la relació entre l'àrea i la concentració és lineal entre 0.03 μM i 0.5 μM amb una relació  $y = 851.8 x + 9.8$  i entre 0.5 μM i 128 μM el millor ajust és potencial sent l'equació  $y = 713 x^{0.433}$ . A més a més, vàries dissolucions de patró en un extracte lipídic absent de glicoglicerolípid han mostrat que no existeix efecte matriu.

Aquest assaig presenta dos avantatges respecte els mètodes comentats anteriorment trobats en la bibliografia. D'una banda, no és necessari realitzar cap pas de purificació un cop extrets els glicoglicerolípid de les cèl·lules, la qual cosa simplifica el procés de quantificació des del creixement cel·lular fins a l'anàlisi d'UPLC. D'altra banda, en tractar-se d'una columna en fase reversa i detector de masses és possible determinar no només la part sacarídica del glicoglicerolípid, sinó també, identificar les diferents combinacions d'àcids grassos que formen aquests lípids.

A partir d'aquí, s'analitzen els glicoglicerolípidis produïts per les soques modificades per enginyeria metabòlica: abc, Abc, ABc, AbC i ABC, és a dir, la soca que no porta cap gen inserit i totes les que produeixen glicoglicerolípidis. En primer lloc, es realitzen els creixements cel·lulars en 50 mL de medi definit i es mantenen a 37 °C. S'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba 5h a 37 °C. En segon lloc, es preparen els extractes lipídics amb una dissolució cloroform / metanol (2:1) i directament la fase cloroform extreta s'injecta a l'UPLC – ES+/TOFMS.

Per realitzar l'anàlisi del cromatograma és necessari tenir les masses de cada un dels glicoglicerolípidis presents en la mostra. Donat que es tracta de mostres sintetitzades *in vivo*, els glicoglicerolípidis presenten els diversos àcids grassos analitzats anteriorment per GC-FID on s'ha detectat la presència de 7 àcids grassos: 14:0, 16:0, 16:1, 17:0Δ, 18:0, 18:1 i 19:0Δ. A continuació, es proposen les combinacions que poden presentar els glicoglicerolípidis MGDAG, DGDAG i TGDAG i el DAG a partir dels àcids grassos més abundants i es calcula la seva massa amb l'adducte amb sodi que es forma en ionitzar la mostra per ES+. En aquest procés s'han descartat els àcids que presenten un percentatge d'abundància menor al 10% i, per tant, es miren les combinacions entre l'àcid palmític (16:0), el palmitoleic (16:1), el 2-hexilciclopropanoic (17:0Δ) i l'oleic (18:1). Així doncs, les diverses combinacions d'àcids grassos i variant el sucre de mono a tri, dona lloc als diferents DAG, MGDAG, DGDAG i TGDAG que es resumeixen en la Taula 22 juntament amb les masses amb l'adducte amb sodi.

**Taula 22: Combinacions d'àcids grassos per les molècules DAG, MGDAG, DGDAG i TGDAG.** Les masses especificades corresponen a l'adducte amb sodi

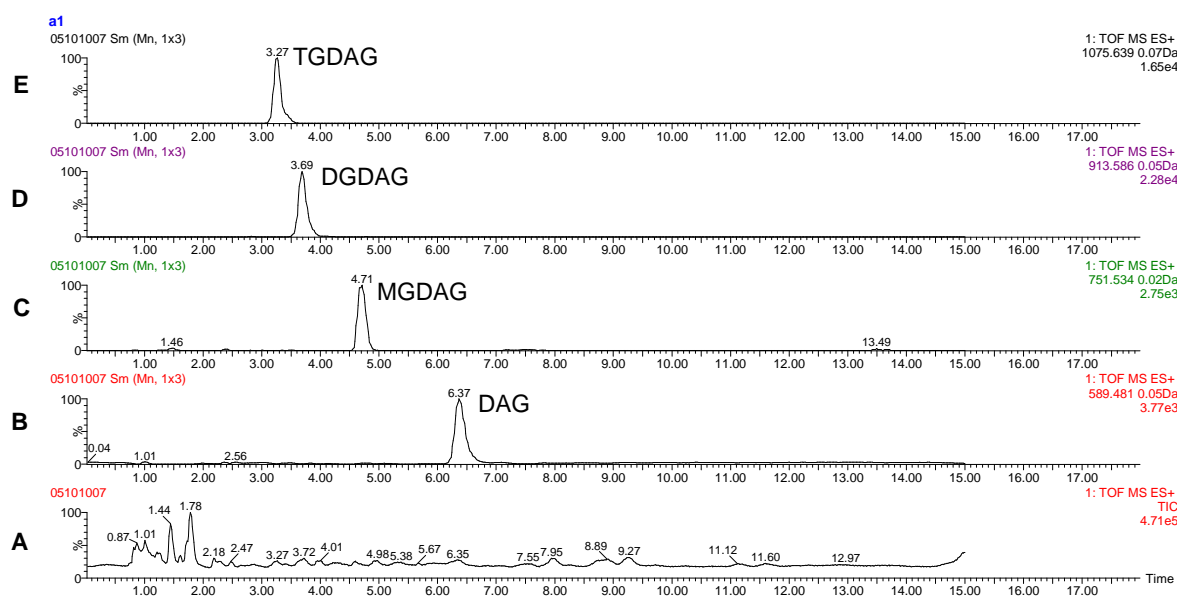
Combinacions d'àcids grassos	Masses (adducte amb sodi) / Da			
	DAG	MGDAG	DGDAG	TGDAG
16:0 / 16:0	591.496	753.549	915.602	1077.655
16:0 / 16:1	589.481	751.534	913.586	1075.639
16:0 / 17:0Δ	603.496	765.549	927.602	1089.655
16:0 / 18:1	617.512	779.565	941.618	1103.671
16:1 / 16:1	587.465	749.518	911.571	1073.624
16:1 / 17:0Δ	601.481	763.534	925.586	1087.639
16:1 / 18:1	615.496	777.549	939.602	1101.655
17:0Δ / 17:0Δ				
17:0Δ / 18:1	629.512	791.565	953.618	1115.671
18:1 / 18:1	643.528	805.581	967.633	1129.686

Tal com es veu es tenen en compte 10 possibles combinacions per cada un dels glicoglicerolípidis, sent les masses compreses entre 587 i 1130.

3.2.2.2.1 Anàlisi dels cromatogrames

Un cop injectats diferents extractes lipídics de les soques per duplicat, s'analitzen els cromatogrames. En la Figura 60 es mostren els cromatogrames obtinguts per la soca Abc i la combinació d'àcids grassos 16:0 / 16:1. L'A mostra el cromatograma general a partir del qual s'analitzen les diferents masses. Per la combinació en estudi 16:0 / 16:1, s'obtenen els cromatogrames B, C, D i E, sent respectivament el DAG de massa 589.481, el MGDAG de massa 751.534, el DGDAG de massa 913.586 i el TGDAG de massa 1075.639.

En cada un dels cromatogrames B, C, D i E, per la soca Abc i la combinació 16:0 / 16:1, apareix un sol pic. Fent la mateixa anàlisi per la soca abc, que no sintetitza glicoglicerolípids, només s'observa un pic corresponent al DAG. Per tant, els pics de C, D i E corresponen als glicoglicerolípids sintetitzats, és a dir, MGDAG, DGDAG i TGDAG, respectivament.

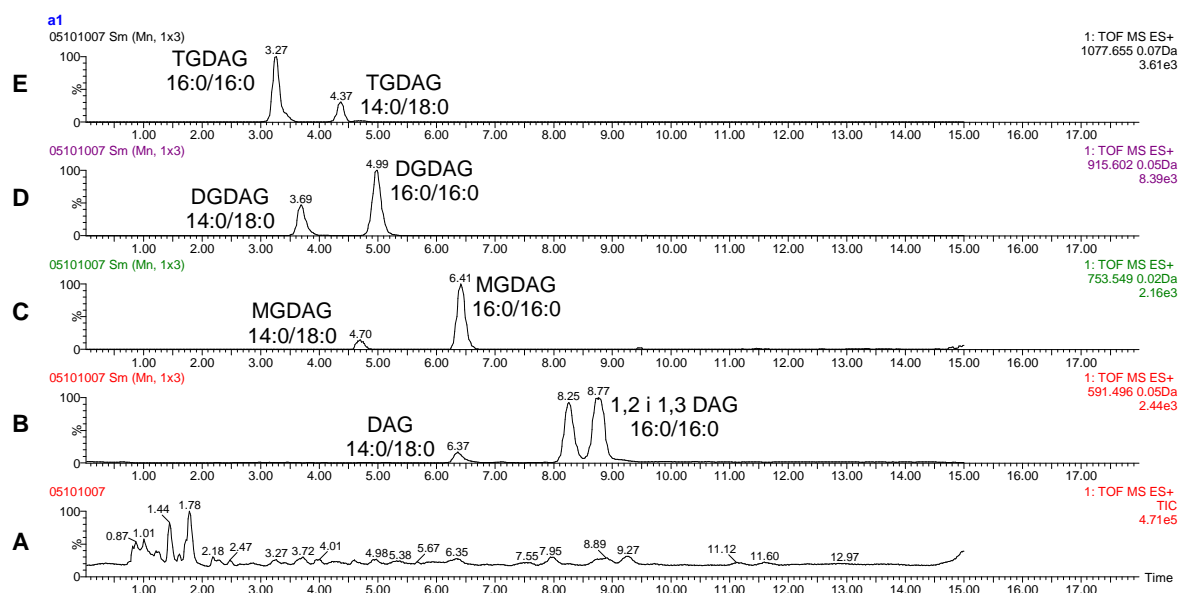


**Figura 60: Cromatogrames obtinguts per la soca Abc analitzant les masses de la combinació d'àcids grassos 16:0 / 16:1. A: Cromatograma general; B: DAG massa 589.481; C: MGDAG massa 751.534; D: DGDAG massa 913.586 i E: TGDAG massa 1075.639. Totes les masses corresponen als adductes amb sodi.**

Tal com s'observa en la Figura 60, els temps de retenció canvia en funció de l'espècie química. En tractar-se d'una columna de fase reversa, en general se separa per cadena d'àcid gras i, per tant, els glicolípids que tenen cadenes més llargues tenen un temps de retenció més gran que els de cadena més curta. Però quan tenen les mateixes cadenes, com seria el cas del cromatograma analitzat, com més glucoses té el glicoglicerolípíd més ràpid s'elueix ja que més polar és la molècula. Per tant, en primer lloc s'elueix el TGDAG

( $t_R$  3.27), en segon lloc el DGDAG ( $t_R$  3.69), en tercer lloc el MGDAG ( $t_R$  4.71) i finalment el DAG ( $t_R$  6.37).

En alguns casos, com el de la Figura 61 on s'analitzen els cromatogrames per la soca Abc amb la combinació d'àcids grassos 16:0 / 16:0, apareix més d'un pic en cada cromatograma. Aquest fet és degut a què hi ha dos compostos que presenten la mateixa massa, és a dir, glicoglicerolípid amb dues combinacions d'àcids grassos presents en la cèl·lula d'*E.coli*. Així doncs, una combinació és la 16:0 / 16:0 que en el cas del MGDAG (C) té un temps de retenció de 6.41min i l'altra combinació possible, tenint en compte els àcids minoritaris, és la 14:0 / 18:0 amb un temps de 4.7min pel MGDAG. Per tant, a l'hora d'interpretar els resultats caldrà tenir en compte a part de les 10 combinacions calculades, les possibles combinacions amb els àcids grassos minoritaris, àcid mirístic (14:0), 2-octilciclopropanoic (19:0 $\Delta$ ) i esteàric (18:0), que coincideixin en massa amb una de les combinacions proposades dels àcids grassos majoritaris (Taula 22).



**Figura 61: Cromatogrames obtinguts per la soca Abc analitzant les masses de la combinació d'àcids grassos 16:0 / 16:0 i 14:0 / 18:0. A: Cromatograma directe; B: DAG; C: MGDAG; D: DGDAG i E: TGDAG. Totes les masses analitzades corresponen als adductes amb sodi.**

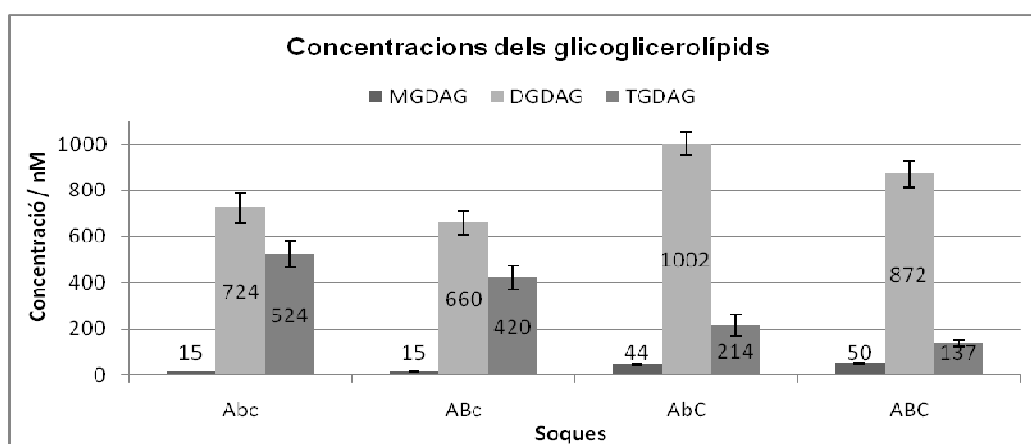
A més, del cromatograma anterior cal destacar que en el cas del DAG, el desdoblament de pics també és degut a la commutació de 1,2 – diacilglicerol a 1,3 – diacilglicerol, ja que ambdues molècules presenten temps de retenció diferents tal i com s'ha comprovat amb el patró comercial DOG sent el més ràpid en eluir l'1,3 – diacilglicerol.

Es determina l'àrea a la que correspon cada combinació d'àcids grassos per DAG, MGDAG, DGDAG i TGDAG en cada cromatograma. Amb les àrees, es calcula la

concentració en nM que correspon a cada combinació mitjançant l'ajust de la recta i potencial especificat en l'apartat 5.1.

### 3.2.2.2.2 Quantificació dels glicoglicerolípids

A continuació, en la Figura 62 es presenten les concentracions dels tres glicoglicerolípids, MGDAG, DGDAG i TGDAG, en nmols per litre de cultiu obtingudes en les diferents soques modificades per enginyeria metabòlica Abc, ABc, AbC i ABC.



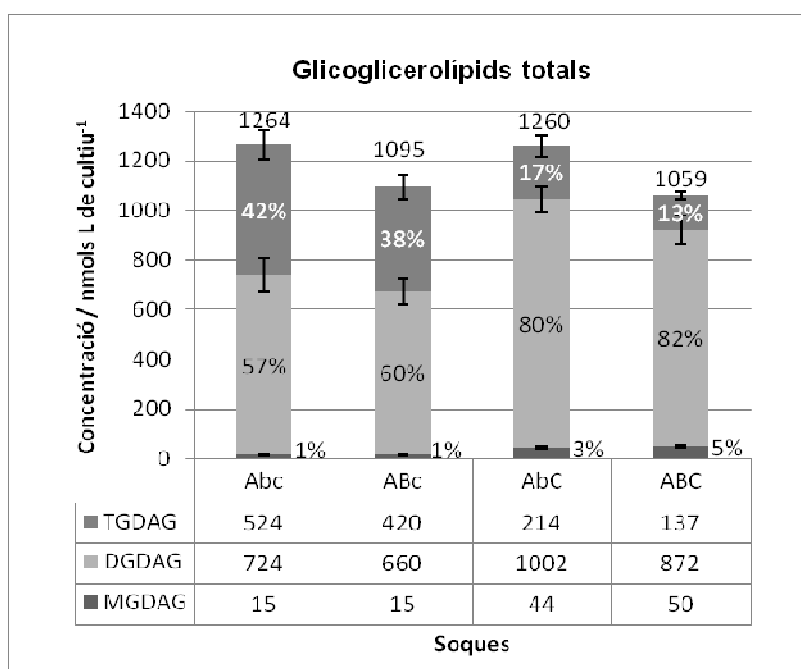
**Figura 62: Concentracions del glicoglicerolípide MGDAG en les soques Abc, ABc, AbC i ABC expressades en nM.**

Tal i com es mostra, el glicoglicerolípide MGDAG és el minoritari en totes les soques. La seva concentració és de 15 nM en les soques Abc i ABc en les que se sobreexpressa la glicosiltransferasa MG517 de forma individual o juntament amb la uridiltransferasa GalU. En canvi, en sobreexpressar l'aciltransferasa PlsC, ja sigui coexpressada únicament amb la MG517 o també amb la GalU, sent les soques AbC i ABC respectivament, la concentració d'aquest glicoglicerolípide es triplica donant unes concentracions de 44 i 50 nM. Per tant, la sobreexpressió de la proteïna PlsC involucrada en la síntesi del DAG provoca un augment en la producció del primer glicoglicerolípide, el MGDAG.

El segon glicoglicerolípide, el DGDAG és el producte majoritari en totes les soques. La soca que en produeix més és la que sobreexpressa les proteïnes MG517 i PlsC produint 1002 nM. A continuació, la soca que coexpressa les tres proteïnes, ABC, produeix 872 nM, la soca Abc, només amb la MG517 en fa 724 nM i la menys productora és la ABc, que sobreexpressa les proteïnes MG517 i GalU, obtenint una concentració de 660nM. Així doncs, igual que pel MGDAG, les soques que més DGDAG produeixen són les que sobreexpressen la proteïna PlsC, ja sigui només coexpressada amb la glicosiltransferasa MG517 o també amb la GalU.

La producció del tercer glicoglicerolípide, el TGDAG té una tendència oposada a la producció de MGDAG. En aquest cas, les soques que més TGDAG produeixen són la que sobreexpressa únicament la proteïna MG517 i la que coexpressa aquesta proteïna amb la GalU. En aquestes soques resulta significativa la transferència d'una molècula de sucre als acceptors MGDAG i DGDAG abans que al DAG. En canvi, les soques que sobreexpressen l'aciltransferasa PlsC són les que menys TGDAG produeixen.

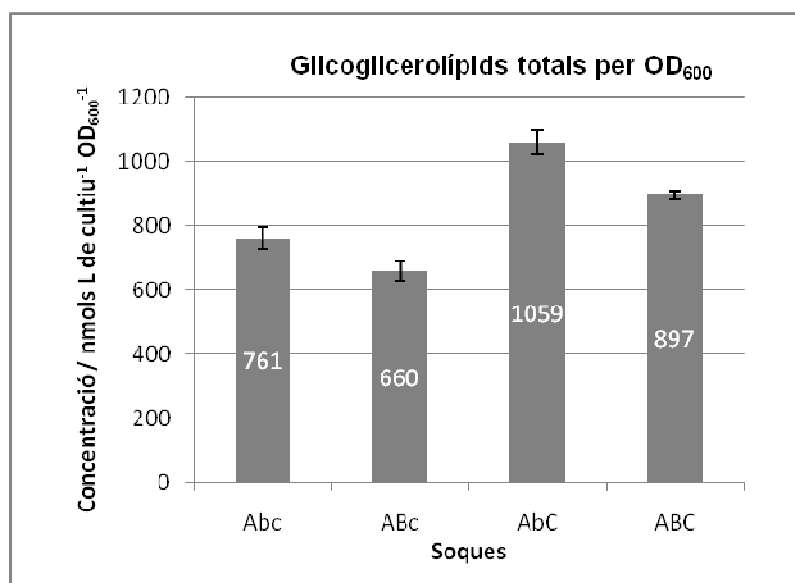
En la Figura 63 es mostra el rendiment de les diferents soques modificades expressada en nmols de glicoglicerolípids per litre de cultiu i els percentatges dels diferents glicolípids.



**Figura 63: Concentracions totals dels glicoglicerolípids en les soques Abc, ABc, AbC i ABC expressades en nmols per litre de cultiu.** A sobre cada barra es mostra la suma total de glicoglicerolípids; a la taula es detallen les concentracions per cada glicolípide MGDAG, DGDAG i TGDAG; dins de la barra el percentatge de cadascun respecte el total produït per la soca.

Tal i com s'observa, la totalitat de glicoglicerolípids produïts en nmols per litre de cultiu per les soques Abc, ABc, AbC i ABC, és bastant similar. Per tant, sembla que els cultius en aquestes condicions de creixement i inducció arribin a aquest valor límit de producció d'uns 1260 nM. La concentració màxima correspon a les soques Abc, que només té introduït el gen *mg517* que codifica per la glicosiltransferasa que permet la síntesi d'aquests lípids, i AbC que, a més, sobreexpressa l'aciltransferasa PlsC. El rendiment en aquests casos és un 15% major que la de les altres dues soques ABc i ABC, ambdues sobreproductores d'UDP-Glc.

Tot i així, en la Figura 64 s'ha calculat la quantitat de glicolípid formats en cada soca respecte la densitat òptica final després del creixement i inducció. Tal com es veu el perfil de productivitat és lleugerament diferent que el de rendiment de la Figura 63, sent les soques AbC i ABC les més productives per unitat de biomassa.



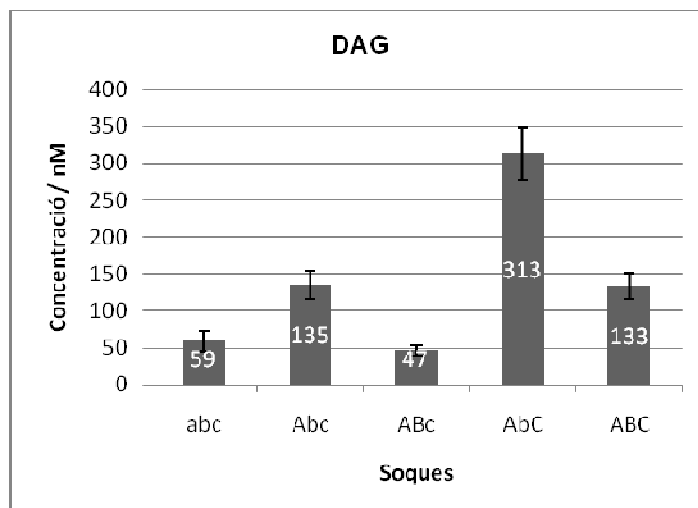
**Figura 64** Concentracions totals dels glicoglicerolípid en nM per OD<sub>600</sub> en les soques Abc, ABc, AbC i ABC expressades.

Per tant, obtenint aproximadament la mateixa quantitat en totes les soques, en referir-ho a la biomassa, les cèl·lules que més glicoglicerolípid produeixen són les de la soca AbC. Seguidament, la soca ABC que produeix un 15% menys, la soca Abc, sent un 30% menys productora i, finalment, la ABc amb una producció del 62% la AbC.

Mirant l'efecte de la sobreexpressió dels precursors, l'enzim GalU, que en sobreexpressar-lo en les soques ABc i ABC ha suposat un augment de la seva activitat específica d'unes 200 vegades l'activitat basal d'*E.coli*, i que permet la sobreproducció del precursor UDP-Glc, no ha implicat cap augment substancial ni pel que fa a la producció total de glicoglicerolípid ni a la individual de MGDAG, DGDAG i TGDAG, respecte les soques que no el sobreexpressen. Per tant, es dedueix en aquest punt que el nucleòtid UDP – glucosa, substrat donador de la reacció amb la glicosiltransferasa MG517, no és limitant en cap de les soques.

Pel que fa a l'altre precursor, el substrat acceptor DAG, utilitzant el mètode UPLC – ES+/TOFMS s'ha quantificat la seva concentració al final del creixement i inducció de les diferents soques. En la Figura 65 es mostren les concentracions d'aquest precursor en els cultius de les soques Abc, ABc, AbC i ABC expressades en nM.





**Figura 65: Concentracions de DAG en les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC expressades en nM.**

Tal com s'observa, en totes les soques es detecta la presència d'aquest precursor, com a mínim a una concentració similar a la de la soca abc, és a dir, al nivell basal d'*E.coli*. A més, en la soca Abc la concentració de DAG s'ha vist augmentada, la qual cosa es pot relacionar amb la introducció de la glicosiltransferasa MG517 que pot desplaçar la biosíntesi d'aquest precursor. Aquest augment es veu compensat en sobreexpressar conjuntament la proteïna GalU que produeix UDP-Glc. En canvi, en sobreexpressar l'enzim PlsC, relacionat amb la síntesi del DAG, i que ha suposat un augment de la seva activitat específica d'un 80 vegades l'activitat basal d'*E.coli*, la concentració d'aquest precursor és més alta que el nivell basal d'*E.coli*. Sobretot en el cas de la soca AbC on s'arriba a una concentració de 313nM sent més de 5 vegades superior a la concentració obtinguda en la soca abc on no se sobreexpressa cap proteïna.

Relacionant la concentració de DAG respecte la producció de glicoglicerolípids per densitat cel·lular, sembla que en les soques Abc i ABc, tot i detectar certa quantitat de DAG, aquest sigui limitant. Així, en afegir la sobreexpressió de l'enzim PlsC i sobreproduir el DAG, és a dir, les soques AbC i ABC, la producció cel·lular de glicolípids augmenta.

A part de l'augment en la producció de glicolípids per cèl·lula, la sobreexpressió de l'enzim PlsC ha comportat canvis en la composició de glicoglicerolípids. Tal com s'observa en la Figura 63, mentre en les soques AbC i ABC el 80% dels glicoglicerolípids correspon al DG DAG, en les soques Abc i ABc, aquest segueix sent el majoritari però representa només un 60% del total. En canvi, en aquestes soques, s'observa major quantitat de TG DAG representant el 40% dels glicolípids, respecte el 15% de les soques AbC i ABC. Per tant, en les soques AbC i ABC, on se sobreexpressa l'enzim PlsC i es sobreproduïx el precursor DAG, s'afavoreix la reacció enzimàtica sobre aquest substrat donador donant

lloc a glicoglicerolípid amb menor contingut de sucre, principalment DGDAG. En canvi, en la soca Abc on únicament se sobreexpressa la glicosiltransferasa i, per tant, hi ha nivells menors de DAG, s'afavoreix l'ús de MGDAG i DGDAG com a substrats acceptors de la proteïna MG517 per el formar TGDAG, resultant en una concentració major dels glicoglicerolípid amb més contingut de sucre. De totes maneres, el glicoglicerolípid DGDAG segueix sent el majoritari en tots els casos.

Relacionant la producció de glicoglicerolípid per cèl·lula amb els resultats de l'activitat enzimàtica de la glicosiltransferasa MG517, destaca que les soques que més produeixen per cèl·lula, AbC i ABC, són les que presenten menys activitat glicosiltransferasa (Figura 50). Així, l'activitat enzimàtica de la proteïna MG517 després de 5h d'inducció és de 0.014 U per mg de proteïna total en el cas de la soca Abc, i de 0.003 U per mg de proteïna total quan aquesta proteïna se sobreexpressa conjuntament amb la PlsC, soques AbC i ABC. Cal comentar que l'activitat específica s'ha determinat respecte mg de proteïna total, la qual s'ha comprovat que va directament relacionada amb la densitat òptica del cultiu. Aquesta activitat pot no haver estat la mateixa durant les 5h d'inducció però al final, ja sigui per regulació o per degradació, en realitzar la coexpressió amb l'enzim PlsC, l'activitat MG517 és menor. Tot i la baixa activitat MG517 en les soques AbC i ABC, la sobreexpressió permet la síntesi dels glicoglicerolípid per cèl·lula a uns nivells superiors al de les soques que presenten una activitat més elevada, arribant a obtenir 6 mg de glicoglicerolípid per gram de biomassa liofilitzada amb la soca AbC crescuda en bioreactor.

Aquest fet, corrobora que el precursor DAG és limitant en les soques Abc i AbC ja que tot i tenir més activitat MG517 i, inclús, sobreproduir l'UDP-Glc, la producció cel·lular és menor. A més, també es demostra que en enginyeria metabòlica no es busca la màxima expressió de les proteïnes sinó un equilibri cel·lular entre el creixement, la concentració dels precursors i l'expressió de les proteïnes involucrades en la síntesi dels productes d'interès.

#### 3.2.2.2.3 Quantificació dels àcids grassos dels glicolípid per UPLC – ES(+)/TOF

A partir de les dades obtingudes amb l'anàlisi UPLC – ES+/TOFMS s'han quantificat les combinacions dels àcids grassos presents en els glicoglicerolípid i el precursor DAG per les soques modificades per enginyeria metabòlica. En la Figura 66 es mostren els percentatges de les combinacions dels àcids grassos obtingudes pel que fa al DAG.

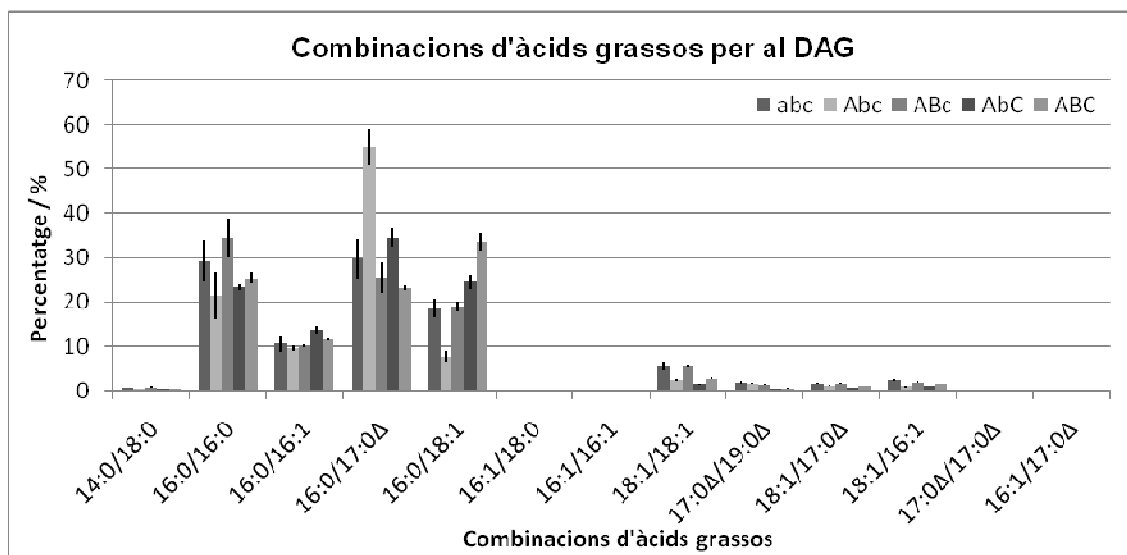


Figura 66: Percentatges de les combinacions d'àcids grassos per al DAG en les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC.

Tal i com s'observa, la majoria de combinacions porten un àcid palmític (16:0) i en cas de no ser així, contenen un àcid oleic (18:1). La síntesi del DAG s'inicia a partir del glicerol 3-fosfat al que s'introdueixen de forma consecutiva dues cadenes d'àcid gras degut a l'actuació dels enzims PlsB i PlsC d'*E.coli* (Figura 67). El PlsC s'expressa de forma universal en els bacteris i completa la síntesi de l'àcid fosfatídic transferint un àcid gras en la segona posició de l'àcid lisofosfatídic (LPA). No s'han realitzat estudis detallats sobre l'especificitat en el substrat d'aquest enzim però sembla no tenir predilecció per àcids grassos saturats o insaturats, sinó que és en funció de la seva abundància (Zhang i Rock, 2008).

En canvi, l'enzim PlsB, que és la primera aciltransferasa de glicerolfosfat, realitza l'acilació de la primera posició del glicerol 3-fosfat formant el LPA tal com es representa en la Figura 67. Al contrari que el PlsC, el PlsB és responsable de la selecció dels àcids grassos incorporats en els fosfolípids de la membrana i és un punt clau de regulació. En bacteris hi ha una marcada asimetria posicional en la incorporació de les cadenes d'àcid gras en les posicions 1 i 2 del glicerol 3-fosfat. Es coneix que la primera posició és ocupada pels àcids grassos 16:0 i 18:1 i s'exclou en tot cas el 16:1. En canvi, en la segona posició predominen els 16:1 i 18:1 tot i que com ja s'ha comentat no hi ha una elevada especificitat en aquesta posició (Zhang i Rock, 2008).

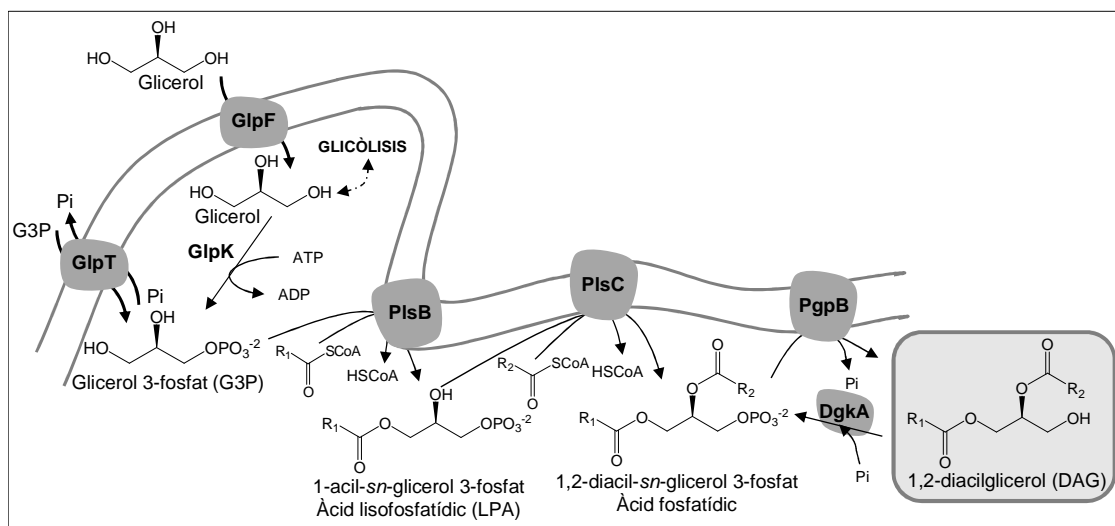


Figura 67: Ruta metabòlica per la formació del DAG.

Aquesta tendència es manté també en la síntesi dels glicoglicerolípid. En la Figura 68 es mostren els percentatges de les combinacions d'àcids grassos pel DGDAG per les soques Abc, ABc, AbC i ABC i, tot i que els percentatges són diferents que els del DAG, la majoria de combinacions porten un àcid palmític (16:0) i de forma minoritària, un àcid oleic (18:1).

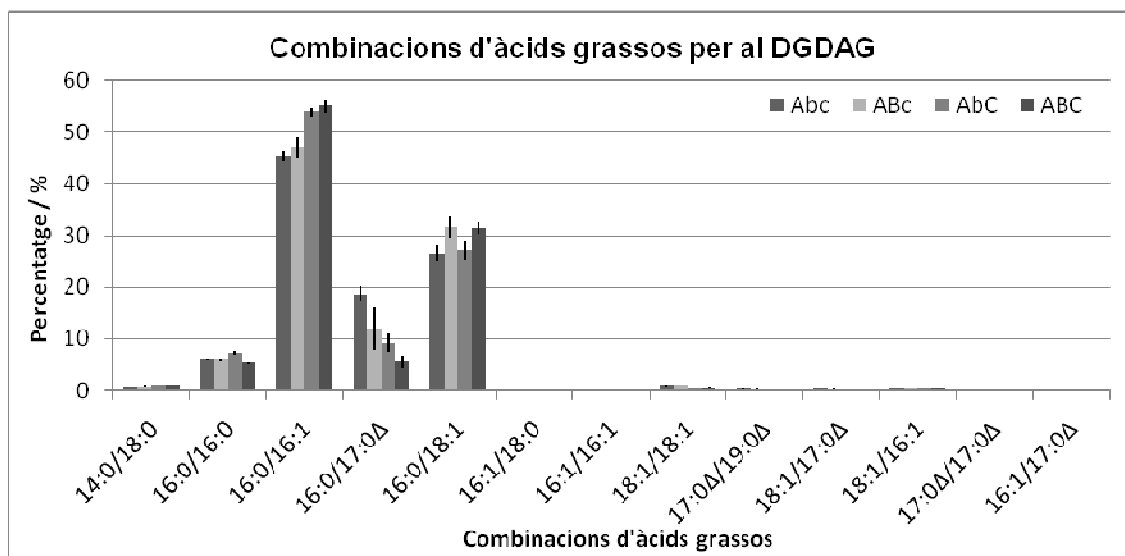


Figura 68: Percentatges de les combinacions d'àcids grassos per al DGDAG en les soques Abc, ABc, AbC i ABC.

En la Figura 69 es mostren els percentatges de les combinacions d'àcids grassos per MGDAG, DGDAG i TGDAG en el cas de les soques Abc (A) i AbC (B).

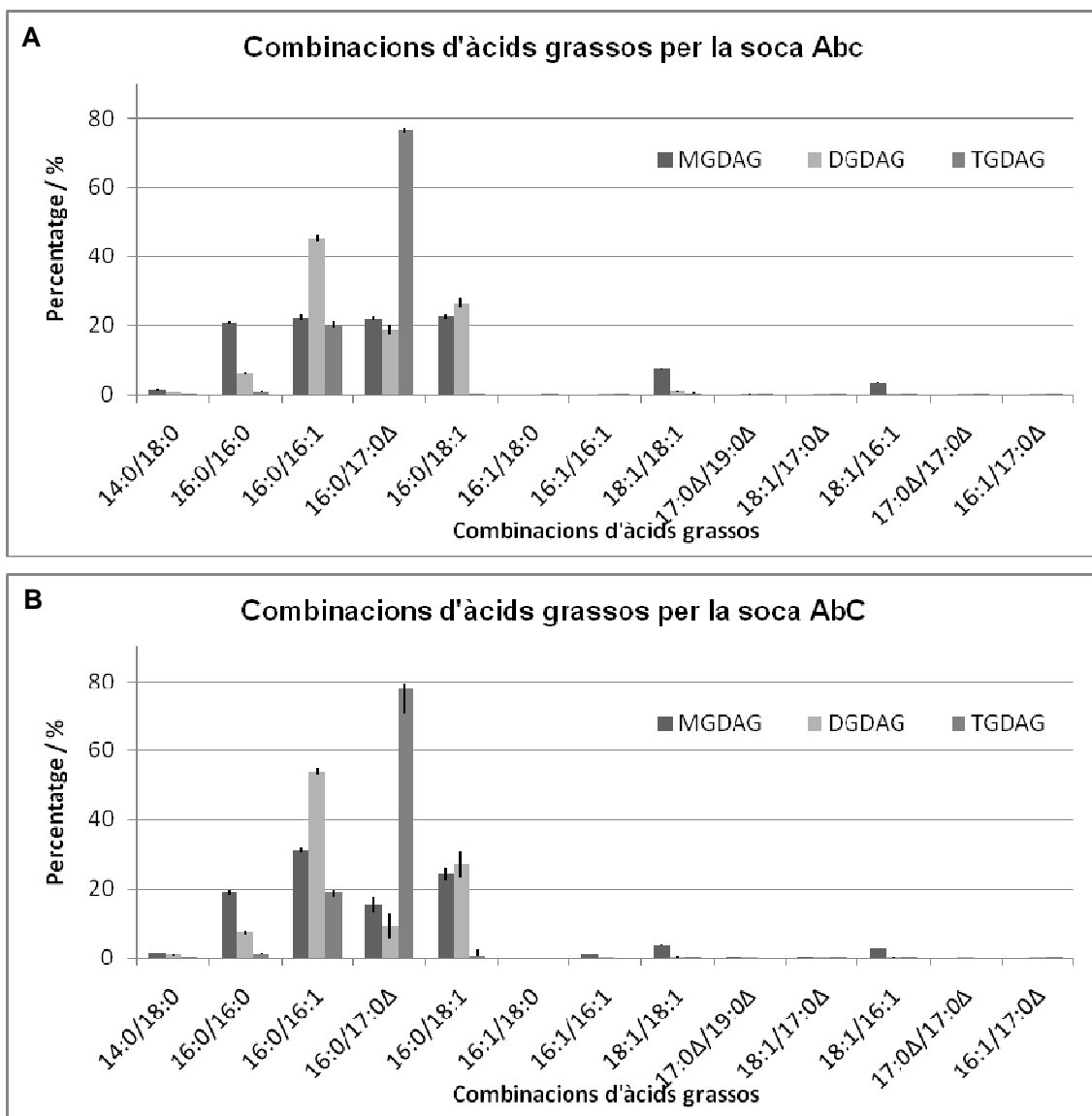


Figura 69: Percentatges de les combinacions d'àcids grassos per MGDAG, DGDAG i TGDAG en les soques A: Abc i B: AbC.

Tal i com s'observa la tendència general en les dues soques és la mateixa, és a dir, que les combinacions majoritàries presenten l'àcid palmític i en cas que no hi sigui hi ha l'àcid oleic, segurament els dos ocupant la primera posició degut a la selectivitat de l'enzim PlsB. Del gràfic es destaca que la proporció de les diferents combinacions d'àcids grassos no és la mateixa en els glicoglicerolípid tot i partir del mateix precursor DAG. Curiosament, el TGDAG amb les cadenes 16:0 / 17:0Δ és el majoritari mentre que tant el MGDAG com el DGDAG presenten més variació. Aquest fet no només pot ser degut a la regulació de la membrana al llarg del creixement sinó també podria ser que la glicosiltransferasa pugui tenir alguna especificitat pel que fa al substrat acceptor la qual cosa encara no s'ha estudiat. Aquesta especificitat pel substrat acceptor només s'ha analitzat per la glicosiltransferasa de *Micoplasma pneumoniae* MPN483 però no fa referència als àcids

grassos, sinó només al tipus de substrat que pot ser tipus DAG o ceramida (Klement *et al.*, 2007).

Tot i les possibles variacions de cadenes, els àcids grassos dels glicoglicerolípid corresponen als àcids dels lípids totals de les soques tal i com s'ha vist anteriorment per cromatografia de gasos. En la Figura 70, es representen els percentatges de cada àcid gras obtinguts en les diferents soques. En gris fosc es mostren els calculats a partir de l'UPLC-ES+/TOFMS, que fan referència als glicoglicerolípid i al DAG, i en gris clar els obtinguts en l'anàlisi dels extractes lipídics de cada soca mitjançant cromatografia de gasos.

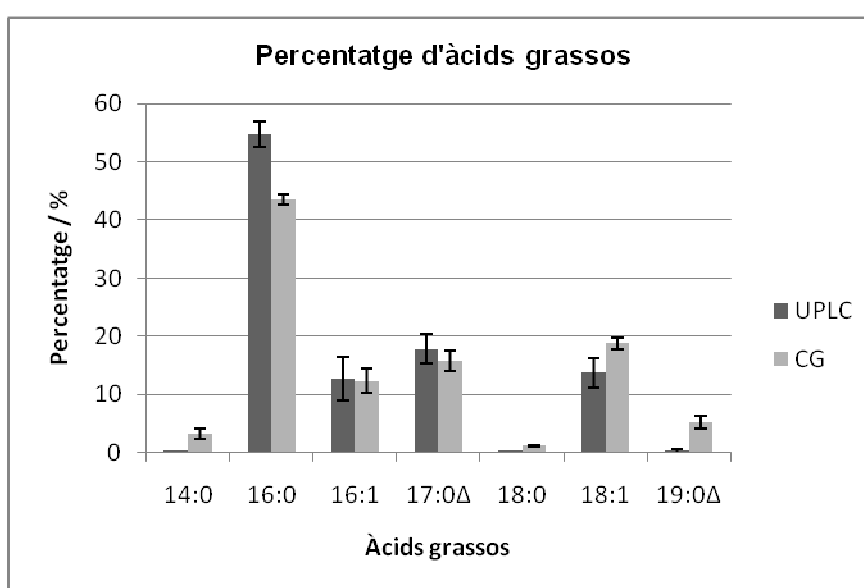


Figura 70: Representació gràfica dels percentatges de cada àcid gras calculat a partir de les mostres d'UPLC (gris fosc) i a partir del mètode de cromatografia de gasos dels ésters metílics dels àcids grassos.

Tot i observar-ne certes diferències, el percentatge d'àcids grassos en la totalitat de l'extracte lipídic (CG) o en les molècules DAG, MGDAG, DGDAG i TGDAG de forma conjunta és bastant similar. Per tant, no existeix exclusió molecular en la síntesi d'aquestes molècules encara que hi hagi algun tipus de predilecció pel que fa a cada glicoglicerolípid per separat.

### 3.3 ANÀLISI DELS LÍPIDS D'*E.coli* EN PRESENCIA DE GLICOLICEROLÍPIDS

En general, els glicoglicerolípid se situen a les membranes de les cèl·lules degut a la seva naturalesa lipídica. La bicapa lipídica de les membranes biològiques actua com barrera permeable la qual cosa permet el manteniment dels gradients essencials d'ions i l'ambient

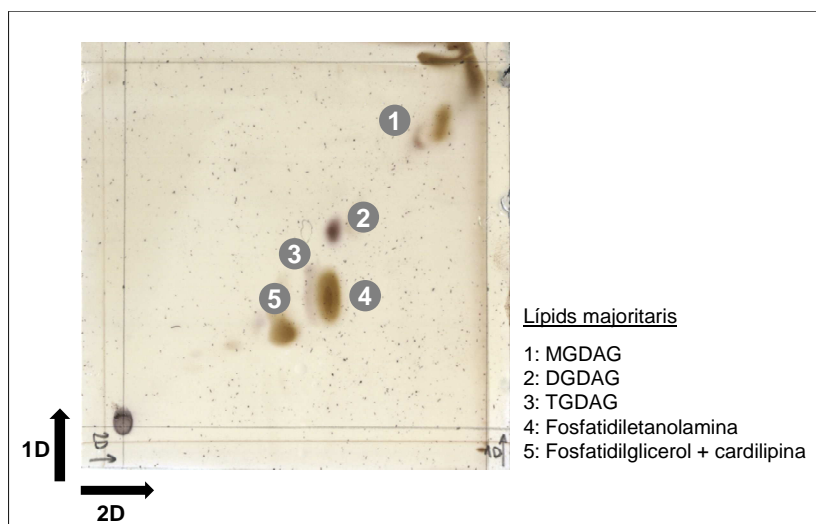
adequat per les proteïnes de membrana. La majoria dels lípids de membrana són zwitteriònics o neutres i una petita fracció està constituïda per lípids aniònics. El manteniment de l'estat líquid i una certa densitat de càrrega aniònica en la superfície dels lípids és important i extensament regulada en la majoria de tipus de cèl·lules.

En el bacteri *Escherichia coli* el lípid zwitteriònic fosfatidiletanolamina és el majoritari i suposa aproximadament un 75% del contingut total de fosfolípids de les membranes tot i que les proporcions poden variar en funció de les condicions de creixement. La resta de fosfolípids són majoritàriament el fosfatidilglicerol (20%) i la cardiolipina (5%) que són aniònics (Wikström *et al.*, 2004 i Wikström *et al.*, 2009). En les cèl·lules modificades per enginyeria metabòlica, a part d'aquests lípids, també se sintetitzen els glicoglicerolípid, tots polars neutres. Amb la finalitat de veure si la producció de glicoglicerolípid té alguna influència sobre la resta de lípids, s'ha dissenyat un assaig radiomètric per cromatografia de capa fina basat en els estudis realitzats per en Wieslander i els seus col·laboradors (Wikström, *et al.*, 2004, Klement, *et al.*, 2007 i Wikström, *et al.*, 2009).

Es coneix que la biosíntesi d'àcids grassos es realitza a partir de la introducció de molècules d'acetat (KEGG). Per tant, es pretén introduir acetat radioactiu al medi de cultiu per tal que la pròpia cèl·lula sintetitzi els àcids grassos marcats radioactivament. Com a conseqüència, se senyalitzaran de forma radioactiva els lípids formats a partir d'aquests, és a dir, els fosfolípids: fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) i cardiolipina (CL) i els glicoglicerolípid: MGDAG, DGDAG i TGDAG.

El creixement cel·lular es realitza en 50 mL de medi definit complementat amb acetat sòdic [1,2-<sup>14</sup>C] 0.2µCi/ mL durant tota la nit a 37 °C. S'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició de l'IPTG i es manté a 37 °C durant 5h. A continuació s'extreuen els lípids amb una dissolució de cloroform / metanol (2:1). Amb la fase orgànica es realitza una cromatografia de capa fina en dues dimensions i mitjançant autoradiografia s'observen els lípids marcats. Els detalls del desenvolupament del mètode es mostren en l'Annex 3 on s'ha posat a punt, en primer lloc, les fases mòbils d'elució i, en segon lloc, la concentració d'extracte i condicions d'autoradiografia.

En la Figura 71 es mostra l'elució en 2D d'un extracte lipídic de la soca ABC eluïda en una primera dimensió amb acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9) i en una segona dimensió amb cloroform / metanol / aigua (65:25:4). El revelat es realitza amb àcid sulfúric / metanol / aigua (45:45:10).



**Figura 71: Cromatografia de capa fina en dues dimensions.** La primera dimensió amb la fase mòbil acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9) i la segona dimensió amb cloroform / metanol / aigua (65:25:4).

Tal com es veu es poden identificar els principals glicoglicerolípid MGDAG, DGDAG i TGDAG, (1), (2), i (3), respectivament, i els principals fosfolípids: la fosfatidiletanolamina en (4) i el fosfatidilglicerol i la cardiolipina de forma conjunta en (5).

Amb la finalitat d'analitzar la proporció dels lípids sintetitzats per les cèl·lules modificades, es fan créixer totes les soques que sobreexpressen l'enzim MG517 i, per tant, sintetitzen glicoglicerolípid, és a dir, Abc, ABc, AbC i ABC, i, abc, com a soca control, que només presenta els lípids propis d'*E.coli*.

Es realitza la cromatografia de capa fina amb els extractes de lípids marcats radioactivament i s'exposa durant 16h per posteriorment poder quantificar. En la Figura 72 es mostren les capes fines dels extractes de les soques abc i AbC, la més productora pel que fa a glicolípid per cèl·lula. Tal com s'espera, en el cas de la soca abc, només s'observen els lípids corresponents a fosfatidiletanolamina (4) i fosfatidilglicerol més cardiolipina (5). En canvi, en el cas de la soca AbC a més a més, es veuen els glicoglicerolípid MGDAG (1), DGDAG (2) i TGDAG (3).



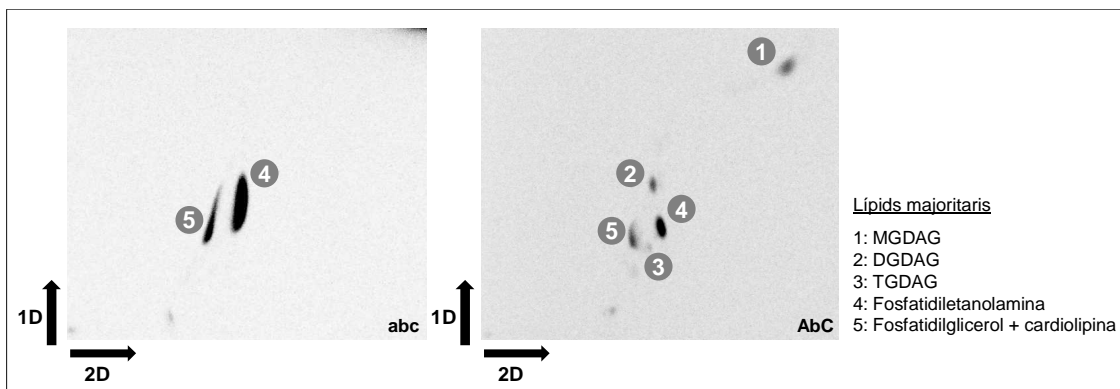


Figura 72: Autoradiografies de capa fina dels extractes de les soques abc i AbC.

A partir de les quantificacions de cada autoradiografia, es calcula el percentatge de fosfolípids i glicolípid presents en cada soca tal com es mostra en la Figura 73. S'observa que les soques modificades i que sintetitzen glicolípid contenen una fracció significat d'aquests lípids amb una abundància aproximada del 18% dels lípids totals, sent les soques AbC i ABC les que obtenen un percentatge més elevat. Pel que fa a la fracció de lípids aniònics PG i CL, aquesta no es veu massa alterada, independentment de la síntesi de glicoglicerolípid, mostrant un percentatge mitjà del 17%. En canvi, el lípid PE presenta una davallada i passa de ser el 81% dels lípids totals en la soca abc a ser el 66% en les soques productores de glicolípid. Un fet similar s'observà en l'estudi de la glicosiltransferasa de *Acholeplasma laidlawii* sobreexpressada en *E.coli* on la síntesi del glicoglicerolípid MGDAG representà un 10% dels lípids totals i provocà la disminució d'aquest 10% de PE respecte les cèl·lules *E.coli* sense modificar (Berg *et al.*, 2001).

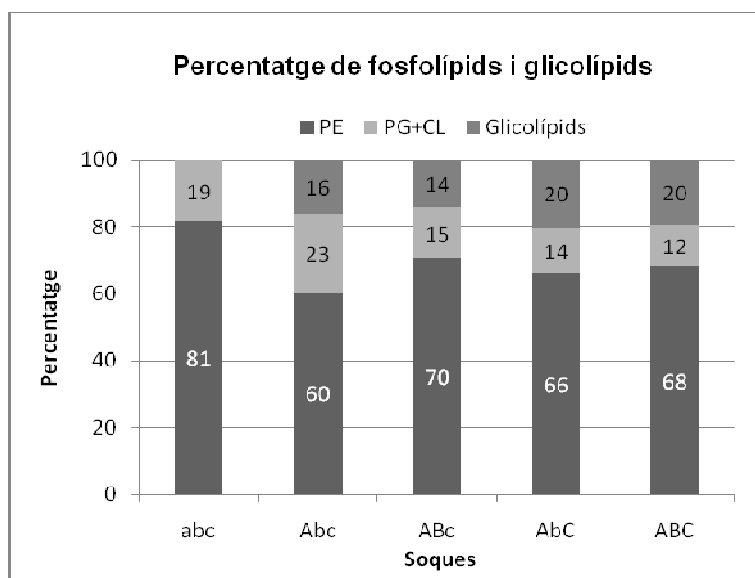
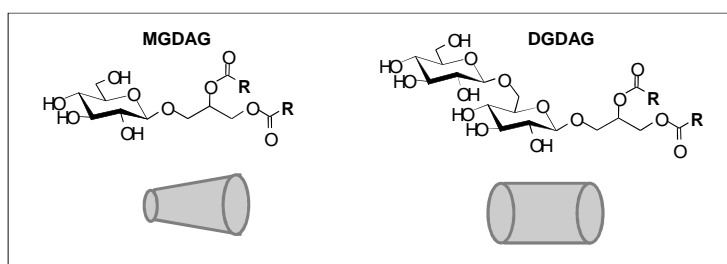


Figura 73: Percentatges de fosfolípids i glicoglicerolípid de les soques abc, Abc, ABc, AbC i ABC.

Aquests canvis es poden explicar en base a les característiques de cadascun dels lípids. L'estructura de les membranes es regula per la presència dels lípids que la componen que aporten certa polaritat segons siguin zwitteriònics, aniónics o neutres, i, a més, la seva capacitat de formar monocapa o bicapa. Mentre el PG forma bicapa lipídica, la PE i la CL són formadores de monocapa tot i que la funció principal de la CL és aportar càrrega negativa juntament amb el PG. En el cas dels glicoglicerolípid, en funció de la mida dels carbohidrats són capaços de formar mono o bicapa lipídica. En la Figura 74 es mostren les estructures del MGDAG i el DGDAG sintetitzats per la MG517.



**Figura 74: Estructura química dels glicoglicerolípid MGDAG i DGDAG.**

Tal com s'observa, el MGDAG en tenir una sola unitat de glucosa presenta una estructura que es pot assimilar geomètricament a un con truncat la qual cosa permet un bon apilament de les molècules donant lloc a estructures més cristal·lines. Així doncs, es tracta d'un lípid que no forma bicapa igual que la PE. En canvi, l'estructura del DGDAG i el TGDAG, per tenir més d'una unitat glucosídica, es pot assimilar a un cilindre el qual no permet un empaquetament tan bo i resulta en la formació de bicapes com el PG (Klement *et al.*, 2007).

Degut a la gran similitud en la forma entre la PE i el MGDAG, s'ha descrit que aquest últim pot substituir de forma funcional la presència de la PE, i per tant, aquesta pot ser una de les causes en la disminució d'aquest lípid (Hözl i Dörmann, 2007). Tot i així, en totes les soques modificades en el present treball, la formació de MGDAG és minoritària. Per tant, es proposa que la naturalesa polar neutra dels glicolípid pot compensar la disminució del lípid zwitteriònic PE, suggerint una dilució de la càrrega de la superfície cel·lular per part dels glicolípid DGDAG i TGDAG, ambdós formadors de bicapa. D'aquesta manera, els lípid aniónics PG i CL es mantenen tot i que el PG també sigui formador de bicapa. A més, se sap que les sintases de glicolípid necessiten la presència de lípid activadors aniónics com PG i CL tal com s'ha demostrat en la determinació de l'activitat enzimàtica de la glicosiltransferasa MPN483 de *Micoplasma pneumoniae* (Berg *et al.*, 2001 i Klement *et al.*, 2007).

En resum, les soques modificades per enginyeria metabòlica, tot i la presència dels fosfolípids d'*E.coli*, són capaces de sintetitzar els glicoglicerolípid d'interès. La productivitat màxima d'aquests compostos s'ha obtingut en les soques AbC i ABC amb una concentració màxima de 1059 nmols per litre de cultiu sota les condicions de creixement i inducció seleccionades.

El següent pas d'enginyeria metabòlica a realitzar és la optimització del creixement de la soca AbC per augmentar-ne encara més la seva productivitat. Amb aquesta finalitat, s'ha dut a terme un creixement amb bioreactor d'aquesta soca amb l'objectiu d'augmentar la biomassa produïda i, per tant, superar les limitacions de creixement observades. Després d'una primera aproximació, s'han obtingut 6 mg de glicoglicerolípid per gram de biomassa liofilitzada tan amb cultius tipus *batch* com tipus *fed-batch*. Aquest valor és força significatiu comparat amb els 0.6mg de glicolípid per gram de biomassa liofilitzada obtinguts en un estudi de quantificació de glicolípid i fosfolípids en fruits i plantes (Picchioni *et al.*, 1996). A més, és comparable a la quantitat de DGDAG sintetitzat de forma natural per la soca marina *Bacillus pumilus* AAS3 crescuda en aigua marina suplementada amb glucosa i extracte de llevat (Ramm *et al.* 2004).

Finalment, amb les soques d'*E.coli* modificades per enginyeria metabòlica s'obté una bona plataforma per generar una gran varietat de glicoglicerolípid amb diferent regió i estereoselectivitat en funció de les glicosiltransferases emprades.



#### 4. CONCLUSIONS



- La clonació dels gens *galU* i *plsC* a partir del genoma bacterià d'*E.coli* JM109 i del gen de *Mycoplasma genitalium mg517* als plasmidis pCDF-1b, pRSF-1b i pET44-b(+) s'ha realitzat amb èxit, tal com ho confirmen les seqüenciacions realitzades.
- La introducció d'aquests plasmidis per a la coexpressió de les proteïnes d'interès a la soca d'*E.coli* BL21(DE3) *star* ha permès la construcció de 8 soques diferents modificades per enginyeria metabòlica.
- Amb la finalitat d'observar les diferències en el fenotip de les noves soques, es ressalta que:
  - S'ha posat a punt un nou mètode de detecció de l'activitat PlsC.
  - S'ha desenvolupat i validat un nou mètode per la quantificació dels glicoglicerolípidis per UPLC-ES(+)/TOFMS. Aquest assaig permet la identificació i quantificació dels tres glicoglicerolípidis i el diacilglicerol per cada una de les seves combinacions d'àcids grassos directament dels extractes cel·lulars.
- Les activitats específiques de les proteïnes GalU i PlsC després de 5h d'inducció en les soques que se sobreexpressen, la seva activitat enzimàtica augmenta unes 200 i 80 vegades, respectivament, comparat amb el nivell basal d'*E.coli*. L'activitat extrínseca MG517 presenta un valor màxim en les soques que expressen aquesta proteïna individualment o coexpressada amb GalU. Aquesta activitat disminueix unes 10 vegades quan es coexpressa amb l'enzim PlsC.
- En les soques modificades s'han identificat tres glicoglicerolípidis: el MGDAG i el DGDAG d'estructura prèviament determinada, i el TGDAG del que s'ha determinat que la seva unitat sacarídica correspon a un trisacàrid.
- La identificació de les cadenes d'àcid gras tant de la fracció lipídica de les soques com dels glicoglicerolípidis ha mostrat que aquestes són les mateixes en els dos casos tant en tipus com en abundància. Així, els àcids grassos majoritaris són l'àcid palmític (46%), l'àcid 2-hexilciclopropanoic (18%), l'àcid oleic (16%) i l'àcid palmitoleic (15%).
- La productivitat màxima de glicoglicerolípidis s'ha obtingut en la soca AbC, que coexpressa PlsC i MG517, arribant a obtenir 6 mg de glicolípidis per g de biomassa liofilitzada en el creixement en bioreactor, ja sigui en *batch* com en *fed-batch*.

- Les soques Abc, que només sobreexpressa la proteïna MG517, i AbC, que coexpressa tant la MG517 com la PlsC, tot i tenir uns rendiments similars sintetitzen diferent perfil de glicolípid. Així, el DGDAG sempre és el majoritari sent el 57% dels glicolípid en Abc i el 80%, en AbC.
- Els glicoglicerolípid corresponen al 20% del total de lípid en totes les soques. Els fosfolípid aniónics PG i CL no es veuen alterats mentre que la PE disminueix un 20%.



## 5. PART EXPERIMENTAL



## Part 1: Biologia molecular

En la Taula 23 s'especifiquen les concentracions dels components del medi ric Luria-Bertani o LB emprat en diferents protocols tant en medi líquid com sòlid. Les dissolucions s'esterilitzen amb l'autoclau a 120 °C durant 20min.

**Taula 23: Concentracions dels components del medi ric Luria Bertani o LB emprat en diferents protocols tant per medi líquid com sòlid.**

	LB líquid	LB sòlid
Triptona	10g/L	
Extracte de llevat	5g/L	
NaCl	5g/L	
Agar-agar	-	15g/L

En la Taula 24 es mostren les concentracions dels antibiòtics utilitzats en els diferents protocols. La concentració en medi líquid fa referència a la concentració final al medi mentre que en el medi sòlid s'especifiquen els mg per placa. Les dissolucions s'esterilitzen per filtració amb filtres de 0.22µm.

**Taula 24: Concentracions dels antibiòtics emprats.** S'especifica la concentració de la dissolució estoc, la concentració final en cultius líquids i els mg per placa en creixements en medi sòlid.

	Ampicil·lina	Kanamicina	Estreptomicina
Dissolució estoc / mg·mL <sup>-1</sup>	50	10	50
Medi líquid / mg·L <sup>-1</sup> medi	50	50	25
Medi sòlid / mg per placa	5	2	1

### Protocol 1.1: Revifament de la soca comercial *E.coli* JM109.

La soca *E.coli* JM109 prové de l'ATCC i es manté a -80 °C fins el mateix moment de revifar-la. En aquest moment es deixa descongelar lentament en gel. Un cop descongelat es fan créixer les cèl·lules de dos formes diferents per tal d'assegurar-ne l'èxit.

- Creixement en medi sòlid: Es realitza un pas de placa en medi LB fresc i es manté ON a 37 °C.

- **Creixement en medi líquid:** Es preparen dos matrassos Erlenmeyer amb 15 mL de medi LB fresc. En cada un s'introdueixen 60uL de les cèl·lules provinents del glicerinat. Es manté ON a 37 °C i 250rpm.

Com que en el creixement en medi sòlid s'obtenen colònies úniques, s'opta per fer un creixement en 5 mL de medi LB fresc a partir d'una colònia única. Aquest creixement es deixa ON a 250rpm i 37 °C. Posteriorment es realitza un glicerinat al 16% de glicerol. (200uL de glicerol de biologia molecular al 80% per 800uL de cultiu). S'aliquota en fraccions més petites i es manté a -80 °C.

A partir d'aquest estoc de glicerol es preparen glicerينات en boles comercials pensades pel manteniment de soques. Per això, és necessari preparar dos plaques molt concentrades que es deixen créixer ON a 37 °C. Un cop crescudes se segueixen els següents passos:

1. Introduir totes les cèl·lules de les plaques a l'Eppendorf comercial que conté les boles poroses.
2. Es ressuspèn bé en el líquid comercial.
3. Es deixa durant uns 10min perquè les cèl·lules s'adhereixin a les boles.
4. S'extreu tot el líquid possible.
5. Es congela a -80 °C deixant el tub horitzontal per facilitar la posterior extracció de les boles de forma individual.

### **Protocol 1.2: Extracció i purificació d'ADN genòmic.**

L'extracció i purificació d'ADN genòmic es realitza amb el *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (NA2100 – Sigma Aldrich)*. Aquest *kit* està preparat per l'extracció de l'ADN genòmic tant de bacteris *gram +* com *gram -*. El mètode usat ha estat una modificació d'aquest últim per tractar-se de la purificació de l'ADN genòmic d'una soca d'*E.coli*, concretament la JM109.

1. Obtenció de cèl·lules: A partir dels glicerينات obtinguts en el Protocol 1.1, es fa un pas de placa i es fa créixer una colònia única en 5 mL de medi LB a 37 °C, ON i 250rpm. 1.5 mL d'aquest cultiu se centrifuguen durant 2min a 13.000rpm. Es descarta el sobrenedant.
2. Ressuspensió de cèl·lules: Es ressuspèn el botó cel·lular en 180uL de solució de lisis i s'afegeixen 20uL de tractament d'ARNasa. Es mescla bé i es deixa a temperatura ambient durant 2min.

3. Preparació per la lisi cel·lular: S'afageixen 20uL d'una dissolució de proteïnasa. Es mescla i s'incuba durant 30min a 55 °C.
4. Lisi cel·lular: Afegir 200uL de la solució de lisi C, vortexar intensament durant uns 15s i incubar a 55 °C durant 10min.
5. Preparació de la columna: Afegir 500uL de la solució de preparació de la columna per cada una de les columnes emprades. Cada columna s'introdueix en un Eppendorf de 2 mL. Centrifugar durant 1min a 13.000rpm. Es descarta l'eluït.
6. Preparació per la unió: Afegir 200uL d'etanol (95-100%) al lisat i mesclar fortament amb un vortex durant uns 5-10s. La mescla ha de quedar totalment homogènia.
7. Carregament del lisat: Transferir tot el contingut del tub dins la columna d'unió. Centrifugar a 6.500rpm durant 1min. Descartar l'eluït.
8. Primera rentada: Afegir 500uL de solució de rentat 1 a la columna i centrifugar durant 1min a 6.500rpm. Descartar l'eluït.
9. Assecar la columna: Tornar a centrifugar la columna durant 1min a màxima velocitat per assegurar que no hi hagi etanol residual juntament amb l'ADN.
10. Eluïció de l'ADN: Afegir 200uL de la solució d'eluïció directament al centre de la columna. Deixar uns 5min a temperatura ambient i centrifugar durant 1min a 6.500rpm per eluir l'ADN.

Per conservar l'ADN genòmic durant períodes de temps curts, es recomana posar-lo entre 2 i 4 °C. En canvi, per períodes de temps llargs, millor mantenir-lo a -20 °C.

### **Protocol 1.3: Quantificació d'ADN genòmic i plasmídic**

La concentració i qualitat de l'ADN tant genòmic com plasmídic es pot determinar mitjançant un anàlisi espectrofotomètric o per electroforesis en gel d'agarosa. En aquest cas es realitza per espectrofotometria. Així doncs, es dilueix l'ADN amb tampó TE (10mM Tris – HCl, 1mM EDTA a pH 8 – 8.5) o aigua miliQ estèril i es mesura l'absorbància a 260nm, 280nm i 320nm utilitzant una microcubeta de quars de 300uL. El valor d'absorbància a 320nm s'usa per corregir el nivell basal.

### **Protocol 1.4: Reacció de polimerització en cadena o PCR**

La realització de les reaccions de PCR s'ha dut a terme en un Termociclador MJ Research, mod. PTC – 200. Els reactius necessaris han estat els mostrats en la Taula 25.

**Taula 25: Reactius usats en la reacció de PCR. Es detallen la concentració estoc i la de la reacció.**

La polimerasa d'ADN és la *Hot start Turbo* de NEBiolabs i els dNTPs de Roche

	Estoc	Reacció
Polimerasa d'ADN <i>Hot start Turbo</i>	2.5U/uL	0.125U/uL
Tampó de la polimerasa	10x	1x
Bases nitrogenades o dNTPs	10mM dATP 10mM dCTP 10mM dGTP 10mM dTTP	300uM
Encebadors subministrats per Thermo	5uM	0.25uM
ADN genòmic	Experimental	~ 150ng

El procediment a seguir per fer la reacció és el següent:

1. Mesclar tots els reactius de la Taula 25 per la reacció de PCR en un Eppendorf de 0.2 mL prèviament autoclavat.
2. Programar el Termociclador segons el programa de cicles de la Taula 26. Generalment, la temperatura d'hibridació es calcula entre 3 i 5 °C per sota la temperatura de fusió ( $T_m$ ) dels encebadors usats en cada reacció. Tot i això, en el cas d'amplificació d'ADN genòmic, degut a la llargada dels encebadors, s'escull una temperatura més baixa respecte la  $T_m$ . En cada experiment s'especifica la temperatura d'hibridació seleccionada.

**Taula 26: Programa de cicles per la reacció de PCR.** En cada experiment s'especifica la temperatura d'hibridació que és funció de la temperatura de fusió dels encebadors.

<b>Desnaturalització inicial</b>		5min	94 °C
<b>Cicle x30</b>	Desnaturalització	1min	94 °C
	Hibridació	1min 30s	Experiment
	Elongació	1min	72 °C
<b>Extensió final</b>		4min	72 °C
<b>Conservació</b>		∞	4 °C

3. Comprovar el resultat de la PCR mitjançant electroforesis en gel d'agarosa, el qual es prepara i s'elueix segons el Protocol 1.5.
4. En els casos de PCR preparativa, un cop visualitzat el resultat es realitza la purificació de l'ADN seguint el Protocol 1.6.

**Protocol 1.5: Electroforesis en gel d'agarosa de l'1%**

La realització d'electroforesis en gel d'agarosa a l'1% s'ha dut a terme en un muntatge de BIO-RAD, mod. PTC – 200. Els reactius necessaris són els mostrats en la Taula 27.

**Taula 27: Reactius usats en la realització d'una electroforesis en gel d'agarosa a l'1%.**

<b>Gel</b>	Agarosa standard low m <sub>r</sub> Biorad laboratories	0.25g
	Aigua miliQ	25 mL
	Tampó TAE 50x 242g L <sup>-1</sup> Tris base / 57.1 mL L <sup>-1</sup> HAcO / 100 mL L <sup>-1</sup> EDTA 0.5M pH8	0.5 mL
<b>Tampó</b>	Aigua miliQ	294 mL
	Tampó TAE 50x 242g L <sup>-1</sup> Tris base / 57.1 mL L <sup>-1</sup> HAcO / 100 mL L <sup>-1</sup> EDTA 0.5M pH8	6 mL
<b>Mostres</b>	Tampó de càrrega 500 mg mL <sup>-1</sup> glicerina / 200uL mL <sup>-1</sup> EDTA 0.5M pH 8 / 100uL mL <sup>-1</sup> SDS 10% / 200uL mL <sup>-1</sup> Blau de bromofenol / 200uL mL <sup>-1</sup> xilencianol	5uL
	DNA Molecular Weight Marker III 0.12 – 21.2Kbp Roche Diagnostics	4uL
	ADN	Variació

En primer lloc, es mesclen els components del gel i s'escalfen fins a dissolució total de l'agarosa. Es deixa gelificar i s'introdueix el gel en el suport juntament amb el tampó. Finalment es posen el marcador i les mostres d'interès prèviament mesclades amb el tampó de càrrega en cada pouet.

El gel se sotmet a un voltatge constant de 110V durant 75min. Un cop acabada la electroforesis el gel se submergeix en una dissolució de bromur d'etidi i es deixa agitant durant 15min. El resultat es visualitza sota llum UV i es fa una fotografia amb un aparell d'imatge Polaroid.

**Protocol 1.6: Purificació d'ADN a partir d'una electroforesi en gel d'agarosa.**

Un cop feta l'electroforesis en gel d'agarosa Protocol 1.5, en el cas de tractar-se d'un procés de purificació, s'extreuen els fragments d'interès. Per això, es talla la banda d'ADN necessària i s'introdueix en un Eppendorf de 1.5 mL prèviament tarat. A partir d'aquest

punt se segueixen les instruccions del *kit* d'extracció *DNA QIAquick®* de QIAGEN segons el protocol subministrat pel fabricant.

### Protocol 1.7: Transformació de cèl·lules

#### Preparació de cèl·lules competents.

La preparació de cèl·lules competents s'ha realitzat amb els reactius especificats a la Taula 28.

**Taula 28: Reactius emprats per a la preparació de cèl·lules competents.** Els antibiòtics només s'introdueixen en el cas en que la soca que es vol transformar ja tingui algun plasmidi introduït anteriorment.

Components		Concentració
Medi	LB	1x
Antibiòtics (si és necessari)	Ampicil·lna	1uL/ mL
	Kanamicina	5uL/ mL
	Estrptomicina	0.5uL/ mL
CaCl <sub>2</sub>		50mM
Glicerol		20%

Els passos a seguir per preparar les cèl·lules competents són els següents:

1. Creixement en 3 mL de medi líquid LB a partir d'una colònia única. Si es parteix d'alguna soca que ja té algun plasmidi incorporat s'introduirà al medi l'antibiòtic necessari. El cultiu es deixa ON a 37 °C i 250rpm.
2. S'inoculen 30 mL de medi líquid continguts en un matràs Erlenmeyer estèril de 100 mL amb 300uL del cultiu crescut ON. S'incuba a 37 °C i 250rpm fins arribar a una densitat òptica a 600nm de 0.3 (aproximadament 2h).
3. Es transfereix asèpticament el cultiu a un tub de centrifuga estèril de 50 mL. Es manté 20min a 0 °C.
4. Se centrifuga a 9000rpm i 4 °C durant 10min.
5. Es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn suaument per pipeteig el botó cel·lular en ½ del volum inicial (15 mL) de CaCl<sub>2</sub> 50mM estèril i fred. Es manté 15min a 0 °C.
6. Se centrifuga a 9000rpm i 4 °C durant 10min.
7. Es decanta asèpticament el sobrenedant i es resuspèn suaument per pipeteig el botó cel·lular en 1/10 del volum inicial amb CaCl<sub>2</sub> 50mM estèril i fred i 20% glicerol (2.4 mL CaCl<sub>2</sub> 50mM i 600uL glicerol 20%)



8. El volum resultant es reparteix en alíquotes de 100uL i es manté a -80 °C.

### **Transformació tèrmica de les cèl·lules**

Un cop es tenen les cèl·lules competents mitjançant el protocol anterior, la transformació es realitza seguint els següents passos:

1. A un tub Eppendorf que conté 100uL de cèl·lules competents, s'afageixen 2uL d'ADN i es mescla suaument.
2. S'incuba durant 5min a 0 °C.
3. Es deixa durant exactament 2min a 42 °C.
4. Es transfereix ràpidament en gel i es manté durant 5min.
5. S'afageixen 300uL de medi líquid LB i s'homogeneïtza per inversió del tub.
6. S'incuba a 37 °C i 250rpm durant 45min per expressió del fenotip.
7. Es preparen les plaques Petri amb medi sòlid LB i els antibiòtics necessaris.
8. Es sembren per extensió amb l'espàtula Drigalski 200uL del cultiu i s'incuba ON a 37 °C.

Sempre s'han de realitzar controls en els que es comprovi l'eficàcia de transformació de les cèl·lules i la selectivitat de l'antibiòtic.

### **Protocol 1.8: Purificació d'ADN plasmídic amb el *Gene Elute™ HP Plasmid Midiprep kit***

Abans de començar amb la purificació de l'ADN plasmídic, és necessari fer créixer les cèl·lules DH5 $\alpha$  prèviament transformades amb el vector necessari. Per això, es prepara un preinòcul amb 2 mL de medi líquid LB complementat amb els antibiòtics necessaris. Un cop crescut s'inocula 1 mL d'aquest preinòcul a 50 mL de medi líquid LB. Aquest es deixa créixer ON a 250rpm i 37 °C.

El cultiu se centrifuga i amb el botó cel·lular se segueix el protocol del Gene Elute™ HP Plasmid Midiprep kit (NA0200-1KT Sigma). Un cop obtingut l'ADN es quantifica segons el Protocol 1.3.

### Protocol 1.9: Purificació d'ADN plasmídic amb el *Gene Elute™ Plasmid Miniprep kit*

Abans de començar amb la purificació de l'ADN plasmídic, és necessari fer créixer les cèl·lules DH5 $\alpha$  prèviament transformades amb el vector necessari. Per això, es prepara un cultiu de 5 mL de medi líquid LB complementat amb els antibiòtics necessaris i s'inocula amb una colònia única. Les cèl·lules es deixen créixer ON a 250rpm i 37 °C.

El cultiu se centrifuga i amb el botó cel·lular se segueix el protocol del Gene Elute™ Plasmid Miniprep kit (PLN350-1KT Sigma). Un cop obtingut l'ADN es quantifica segons el Protocol 1.3.

### Protocol 1.10: Digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *NcoI*.

Per la digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *NcoI*, tant pel que fa a plasmidis com a fragments d'ADN amplificats per PCR, es mesclen els components de la Taula 29 en un tub Eppendorf.

**Taula 29: Components per la digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *NcoI*.** Aquestes condicions són útils tant pel que fa a plasmidis com a fragments d'ADN amplificats per PCR.

		Estoc	Quantitat final mostra
Enzim de restricció NEBiolabs	<i>NcoI</i>	10U/uL	1U
Tampó de reacció 3 (10x) NEBiolabs	Tris-HCl	50mM (pH 7.9)	1x
	NaCl	100mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10mM	
	DTT	1mM	
ADN		Experimental	3 – 6ug
Aigua miliQ estèril		-	Fins volum total

Un cop mesclats els components es manté durant 16h a 37 °C. A continuació, s'inactiva l'enzim *NcoI* mantenint la mescla durant 20min a 65 °C. Aquest pas és important ja que aquest enzim de restricció presenta activitat *star*. A continuació es visualitza el resultat amb una electroforesis en gel d'agarosa a l'1% seguint el Protocol 1.5. Les bandes d'interès es purifiquen segons el Protocol 1.6.

**Protocol 1.11: Digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *AvrII***

Per la digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *AvrII*, tant pel que fa a plasmidis com a fragments d'ADN amplificats per PCR, es mesclen els components de la Taula 30 en un tub Eppendorf.

**Taula 30: Components per la digestió d'ADN amb l'enzim de restricció *AvrII*.** Aquestes condicions són útils tant pel que fa a plasmidis com a fragments d'ADN amplificats per PCR.

		Estoc	Quantitat final mostra
Enzim de restricció NEBiolabs	<i>AvrII</i>	4U/uL	4U
Tampó de reacció 2 10x NEBiolabs	Tris-HCl	10mM (pH 7.9)	1x
	NaCl	50mM	
	MgCl <sub>2</sub>	10mM	
	DTT	1mM	
ADN		Experimental	3 – 6ug
Aigua miliQ estèril		-	Fins volum total

Un cop mesclats els components es manté durant 16h a 37 °C. A continuació, s'inactiva l'enzim *NcoI* mantenint la mescla durant 20min a 65 °C. El resultat es visualitza amb una electroforesis en gel d'agarosa a l'1% seguint el Protocol 1.5. Les bandes d'interès es purifiquen segons el Protocol 1.6.

**Protocol 1.12: Doble digestió d'ADN amb els enzims de restricció *NdeI* i *AvrII***

Per la doble digestió d'ADN amb els enzims de restricció *NdeI* i *AvrII*, es mesclen els components de la Taula 31 en un tub Eppendorf. En aquest cas la quantitat d'ADN necessària és menor que en les digestions dels protocols anteriors ja que es tracta d'una doble digestió i, per tant, al llarg de tot el procés les pèrdues d'ADN són menors.

**Taula 31: Components per la doble digestió d'ADN amb els enzims de restricció *NdeI* i *AvrII*.** La quantitat d'ADN necessària és menor que en les altres digestions ja que es tracta d'una digestió doble.

		Estoc	Quantitat final mostra
Enzims de restricció NEBiolabs	<i>NdeI</i>	20U/uL	4U
	<i>AvrII</i>	4U/uL	4U
Tampó de reacció 4 10x NEBiolabs	Tris-acetat	20mM (pH 7.9)	1x
	KAcO	50mM	
	MgAcO <sub>2</sub>	10mM	
	DTT	1mM	
ADN		Experimental	2ug
Aigua miliQ estèril		-	Fins volum total

Un cop mesclats els components es manté durant 16h a 37 °C. A continuació, s'inactiva l'enzim *NdeI* mantenint la mescla durant 20min a 65 °C. A continuació es visualitza el resultat amb una electroforesis en gel d'agarosa a l'1% seguint el Protocol 1.5. Les bandes d'interès es purifiquen segons el Protocol 1.6.

### Protocol 1.13: Lligació de gen i vector

Per la realització de la lligació entre gen i vector, s'empren els reactius mostrats en la Taula 32.

**Taula 32: Reactius usats per a la reacció de lligació amb les concentracions d'estoc i les quantitats finals de la mostra.**

		Estoc	Quantitat final mostra
Enzim T4 ADN Lligasa Invitrogen		5U/uL	1U
Tampó de reacció 5x Invitrogen	ATP	5mM	1x
	Tris-HCl	250mM (pH 7.6)	
	MgCl <sub>2</sub>	5mM	
	DDT	5mM	
	Polietilenglicol – 8000	25% (p/v)	
Insert:vector		Experimental	3:1
Aigua miliQ estèril		-	Fins volum total

Abans d'iniciar el procés és molt important descongelar i vortexar vigorosament el tampó de reacció per assegurar una bona mescla amb el polietilenglicol. El protocol a seguir és el següent:

1. Es mesclen bé els components necessaris per a la reacció de lligació en un tub Eppendorf de 0.5 mL. Es recomana realitzar sempre un blanc on només s'introdueixi vector per tal d'assegurar que el vector no es torna a lligar amb ell mateix.
2. Les reaccions s'incuben a 16 °C durant 10h.
3. S'utilitzen 4µL de producte de lligació i es transformen cèl·lules competents DH5α segons el Protocol 1.7.

### Protocol 1.14: Anàlisi de seqüenciació

L'anàlisi de seqüenciació es realitza amb l'ADN en que s'ha comprovat, ja sigui per PCR o per digestió, que el plasmidi conté el gen d'interès i que, per tant, la reacció de lligació ha estat satisfactòria.

Aquesta anàlisi mitjançant el mètode *BigDye Terminator v3.1* de Perkin-Elmer Biosystems, es basa en la realització d'una PCR on l'ADN motlle és el plasmidi creat, només s'utilitza un encebador per reacció i els dNTPs es troben marcats amb un fluoròfor. Els reactius necessaris per dur a terme aquesta reacció es mostren en la Taula 33.

**Taula 33: Components de la reacció de PCR per l'anàlisi de seqüenciació segons el mètode *BigDye Terminator v3.1*.**

	Estoc	Quantitat final mostra
DMSO	50% (20x)	1x
Tampó BigDye	5x	1x
ADN motlle	Experimental	150 – 300ng
Encebador	5uM	0.375uM
Mescla de reacció	10x	1x
Aigua miliQ estèril	-	Fins volum total 20uL

En un tub Eppendorf estèril de 0.2 mL es mesclen els components de la reacció excepte la Mescla de reacció que conté la polimerasa. S'introdueix el tub al termociclador i es manté a 98 °C durant 5min. Es deixa refredar fins a 4 °C i ràpidament s'addiciona el volum necessari de la Mescla de reacció. Seguidament es retornen els tubs al termociclador prèviament escalfat a 96 °C i s'inicia la PCR amb el programa de cicles que s'especifica a la Taula 34.

**Taula 34: Programa de cicles de la PCR per l'anàlisi de seqüenciació segons el mètode *BigDye Terminator v3.1*.**

<b>Desnaturalització inicial</b>		1min	96 °C
<b>Cicle x25</b>	Desnaturalització	10s	96 °C
	Hibridació	5s	50 °C
	Elongació	4min	60 °C
<b>Conservació</b>		∞	4 °C

Un cop acabada la reacció s'envia al servei de seqüenciació dels serveis científicotècnics de la Universitat de Barcelona al Parc Científic de Barcelona.

## Part 2: Creixement cel·lular i anàlisi qualitatiu

### Protocol 2.1: Creixement cel·lular en medi definit

#### Pas de placa

Directament a partir de les cèl·lules mantingudes a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en estoc de glicerol es realitza un pas de placa en medi sòlid LB i els antibiòtics necessaris. La placa es manté a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ON.

#### Preinòcul

En un tub de 10 mL estèril s'introdueixen 2 mL de medi LB juntament amb els antibiòtics necessaris. S'inocula una colònia única del pas de placa i es deixa créixer durant 6h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 250rpm.

#### Creixement en matràs Erlenmeyer

En primer lloc es preparen les dissolucions estoc de la Taula 35 estèrils. Les dissolucions de  $\text{FeCl}_3$  i tiamina és preferible preparar-les just abans d'utilitzar. L'acetat sòdic marcat amb  $^{14}\text{C}$  només s'introdueix en el cas de cultius en que es vulguin marcar els lípids radioactivament.

**Taula 35: Dissolucions estoc per la preparació del medi definit de creixement.** S'especifica la dissolució i la concentració juntament amb el procés d'esterilització. Les dissolucions de  $\text{FeCl}_3$  i tiamina és preferible preparar-les sempre just abans de l'ús.

Dissolució	Concentració estoc		Procés esterilització
Glucosa	20%		Autoclau: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20min
$\text{MgSO}_4$	0.2M		Autoclau: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20min
$\text{FeCl}_3$	30mM		Filtració: 0.22um
Tiamina	1mg/ mL		Filtració: 0.22um
TES	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.04\text{ g L}^{-1}$	La dissolució s'acidifica a pH2 amb HCl diluït.  Autoclau: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20min
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.16\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	$0.01\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$0.01\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0.87\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$1.55\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1.42\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{NaMoO}_4$	$0.02\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1.44\text{ g L}^{-1}$	
MES	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$25.39\text{ g L}^{-1}$	Autoclau: $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20min
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	$5.51\text{ g L}^{-1}$	
	$\text{NaCl}$	$2.4\text{ g L}^{-1}$	
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$4.82\text{ g L}^{-1}$	
Acetat sòdic [ $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ ]	$0.1\text{mCi mL}^{-1}$		-

A més a més, s'esterilitza tot el material necessari per a la preparació del medi i creixement del cultiu. En la Taula 36 es mostren les quantitats emprades per a la preparació d'un cultiu de 50 mL de medi crescut en un matràs Erlenmeyer de 250 mL. Es mesclen totes les dissolucions juntament amb els antibiòtics i s'inicia el creixement. L'acetat sòdic [1,2-<sup>14</sup>C] només s'introdueix en els creixements en que es vulguin marcar els lípids radioactivament amb <sup>14</sup>C.

**Taula 36: Quantitats emprades per un creixement de 50 mL en medi definit.** En cas necessari s'introduiran els antibiòtics necessaris i/o altres components. L'acetat sòdic només s'introdueix en cultius en que es vulguin marcar els lípids radioactivament.

Dissolució	Volum / mL
MES	42.5
Glucosa	6.25
MgSO <sub>4</sub>	0.5
FeCl <sub>3</sub>	0.2
Tiamina	0.5
TES	0.143
Preinòcul	1
Acetat sòdic [1,2- <sup>14</sup> C]	0.1 (3.8μM)

Un cop preparat el medi de cultiu i inoculades les cèl·lules es manté el matràs Erlenmeyer a 37 °C i 250rpm ON. En alguns experiments s'han modificat les condicions de creixement, la qual cosa s'ha especificat degudament.

### Creixement en bioreactor

El creixement en bioreactor es realitza també en el medi definit especificat anteriorment i consta de dues fases. Els paràmetres a controlar en ambdues fases es resumeixen en la Taula 37.

**Taula 37: Paràmetres controlats, set-points, tipus de control i actuacions realitzades en cada cas.**

Paràmetre	Set-point	Actuació
pH	7 ± 0.3	Addició de dissolució àcida H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2M o bàsica NH <sub>3</sub> 4M.
Temperatura	37 °C	Escalfar o refredar resistència.
Nivell	Segons sonda	Addicionar antiescumant.
Oxígen (pO <sub>2</sub> )	30% ± 10%	Obrir o tancar la vàlvula de l'aire comprimit.

### Etapa batch

Es preparen 5 preinòculs de 2 mL realitzat en medi LB. A continuació, cada un d'aquests preinòculs es fan créixer en 50 mL de medi definit i matràs Erlenmeyer durant 5-6h. Els 5



cultius se centrifuguen i el botó cel·lular es resuspèn en 50 mL de medi definit fresc. Aquest és l'inòcul del bioreactor d'un litre de medi definit en la fase batch. Es manté el creixement durant unes 8h fins que la glucosa disminueix considerablement. En aquest punt, on generalment s'obté una OD<sub>600</sub> de 36, es passa a la fase fed-batch.

#### Etapa fed-batch

Es prepara una dissolució de 0.3L de medi definit complementat amb glucosa tenint una concentració final de 500mg/ mL. Aquesta dissolució es va addicionant constantment al bioreactor durant unes 11h. La inducció de l'expressió de les proteïnes es realitza 1.5h després de l'inici del fed-batch.

#### **Inducció**

En els casos en que es vulguin expressar les proteïnes d'interès, un cop realitzat el creixement cel·lular, s'indueix aquesta expressió amb l'addició d'una dissolució 100x d'IPTG estoc 100mM. Aquesta dissolució s'esterilitza per filtració amb filtres de 0.22µm. Un cop induït, el cultiu es manté a 37 °C i 250rpm durant 5h. En alguns experiments s'han modificat les condicions d'inducció la qual cosa s'ha especificat degudament.

#### **Protocol 2.2: Extracte lipídic**

A partir de 10 mL (en cas que no s'especifiqui) de cultiu (Protocol 2.1) se segueixen els següents passos:

1. Centrifugar a màxima velocitat durant 10min a 4 °C.
2. Rentar el botó cel·lular amb 1 mL de NaCl 0.9% a 4 °C.
3. Centrifugar a 4500rpm durant 10min a 4 °C.
4. Resuspendre el botó cel·lular en 500µL de metanol o cloroform:metanol (2:1) segons experiment.
5. Vortexar i deixar durant 10min a l'ultrasons.
6. S'extreu la fase orgànica (en el cas del metanol tot el sobrenedant) i s'evapora a sequedat.

#### **Protocol 2.3: Cromatografia de capa fina**

L'extracte lipídic obtingut en el Protocol 2.2 es resuspèn en 20µL de cloroform sec (en cas que no s'especifiqui), es vortexa i se centrifuga per recuperar la totalitat del volum. Aquest

cloroform es punxa a una fase estacionària de sílice preparada per realitzar una cromatografia de capa fina.

La fase mòbil és una dissolució cloroform/metanol/aigua 65:25:4 a no ser que s'especifiqui en l'experiment en qüestió.

El revelat, en general, es fa directament submergint la capa fina en una dissolució d'àcid sulfúric/metanol/aigua 45:45:10, s'asseca i s'escalfa durant uns 10min fins a l'aparició de les diferents taques. Aquestes presenten diferents colors en funció de la naturalesa de la molècula. Així, els glicolípidis apareixen de color lila mentre els triglicèrids i resta de fosfolípids d'*E.coli* presenten un color groc-marró. En alguns casos la tinció es realitza més específica per glicolípidis amb una dissolució 0.5% d' $\alpha$ -naftol amb metanol abans de submergir la capa fina a l'àcid sulfúric.

En el cas de capes fines radioactives, el revelat es realitza per autoradiografia electrònica mitjançant l'equip de BioRad Imagers.

#### Protocol 2.4: Preparació dels extractes cel·lulars

Per la preparació dels extractes cel·lulars se segueix el següent protocol:

1. Els 50 mL de cultiu obtinguts seguint el Protocol 2.1 se centrifuguen a 16000g i 4 °C durant 10min.
2. El rentat el botó cel·lular amb NaCl 0.9% dues vegades consecutives.
3. Es resuspen el botó cel·lular en 1 mL de tampó de lisi. Aquest tampó és diferent en funció de la proteïna d'interès. En la Taula 38 es resumeixen els dos tampons emprats.

**Taula 38: Tampons de lisi per l'extracció de les proteïnes GalU, PlsC i MG517.** S'especifiquen dos tampons diferents: un per les proteïnes GalU i PlsC i l'altres per la MG517.

	Tampó fosfat	20mM (pH 6.5)
Tampó de lisi <b>GalU i PlsC</b>	NaCl	50mM
	MgCl <sub>2</sub>	10mM
	DTT	1mM
Tampó de lisi <b>MG517</b>	CHAPS	22mM
	HEPES	20mM (pH 8)
	NaCl	500mM
	Glicerol	10%

4. Sonicar 7 cicles de 20 polsos 30:5 i 5 min a 0 °C.
5. Centrifugar a 16000g i 4 °C durant 10min. El sobrenedant és l'extracte cel·lular.

### **Protocol 2.5: Electroforesis en gel d'acrilamida SDS-PAGE**

L'electroforesis en gel d'acrilamida es realitza per visualitzar les proteïnes en estudi. A partir de l'extracte i el botó cel·lulars obtinguts segons el Protocol 2.4, es preparen les mostres seguint els següents passos:

1. Fracció soluble. Es mesclen 18uL d'extracte cel·lular i 2uL de tampó de càrrega SDS-PAGE.
2. Fracció insoluble. Es resuspen el botó cel·lular en 100uL d'aigua miliQ i 100uL de tampó de càrrega SDS-PAGE.
3. Marcador de pesos moleculars. Es mesclen 2uL de marcador, 5uL de tampó de càrrega i 13uL d'aigua miliQ.
4. Es bullen les dissolucions resultants dels punts 1, 2 i 3 durant 10min per desnaturalitzar les proteïnes.
5. Mesclar 10uL de la fracció insoluble un cop bullida amb 10uL d'aigua miliQ.

Les mostres es punxen al gel d'acrilamida prèviament polimeritzat i s'elueixen primer a 85V fins que el Coomassie de tampó de càrrega passa el gel d'apilament. Aleshores, s'augmenta el voltatge fins a 200V.

La preparació del gel i la posterior tinció es realitzen segons el Protocol d'Electroforesi de proteïnes en condicions desnaturalitzants del Laboratori de Bioquímica.

### **Protocol 2.6: Digestió trípica de la proteïna PlsC**

La digestió trípica es realitza a partir de la banda de la proteïna sobreexpressada observada en un gel d'acrilamida.

#### **Rentada de la banda del gel**

1. Es posa el gel d'acrilamida en una superfície de vidre neta i es retalla la banda d'interès del gel. Es fan trossets d'entre 1 i 2mm i es posen en un tub Eppendorf de 0.5 mL.

2. S'afegeixen 100µL de 25 mM de tampó de bicarbonate ammonic i s'incuba durant 5min.
3. Es treu la solució i s'afegeix 25mM de tampó bicarbonat amònic / 50% acetonitril i es manté durant 15min.
4. Es repeteix el pas anterior.

### **Reducció i alcalinació dels residus cisteïnes**

1. Es treu la solució i s'afegeixen de 25mM tampó bicarbonat amònic / 50% etanol i s'incuba durant 10 min.
2. Es treu la solució i s'afegeixen 100 µL d'etanol per deshidratar el gel i s'incuba durant 5min.
3. Es treu l'etanol i s'assequen les peces del gel amb l'aire durant 5min.
4. S'afegeixen 200 µL de 10 mM DTT en 50 mM bicarbonat amònic. S'incuba durant 30 min a 56 °C.
5. Es treu la dissolució de DTT i d'afegeixen 200 µL de 55mM iodoacetamida en 50 mM bicarbonat amònic. S'incuba durant 30 min a temperatura ambient.
6. Es treu la dissolució i d'afegeixen 200 µL de 50 mM de bicarbonat amònic. S'incuba durant 10min.
7. Es repeteix aquest últim pas.

### **Digestió**

1. Es treu la solució i s'afegeixen 100 µL de 25 mM tampó bicarbonat amònic / 50% acetonitril. S'incuba durant 15 min.
2. Es treu la solució i s'afegeixen 100 µL de 100% acetonitril per deshidratar el gel. S'incuba durant 5 min.
3. Es treu l'acetonitril i es deixen les peces del gen a l'aire per assecar-se durant 5min.
4. Es prepara la quantitat necessària de solució de tripsina fent una dilució de l'estoc (0.2 µg tripsina / µL en HCl 1mM) en 25 mM bicarbonat amònic fred, emprant 1 µL de solució estoc per 30 µL de tampó bicarbonat. La solució es manté en gel.
5. S'afegeixen 30µL de la dissolució de tripsina en 25 mM bicarbonat amònic per deshidratar les peces de gel . S'incuba durant tota la nit a 37 °C.

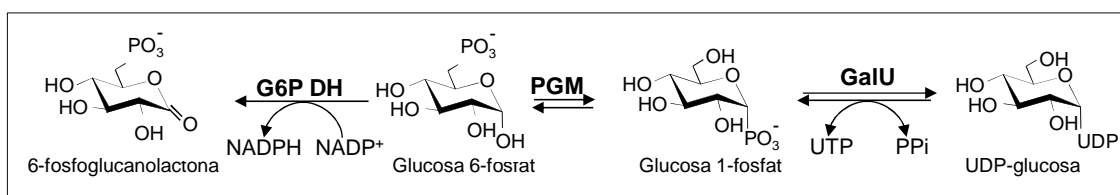
### **Extracció dels pèptids i anàlisi**

1. S'afegeixen 10  $\mu$ L d'acetonitril a la dissolució de tripsina restant i s'incuba durant 10min a 37 °C.
2. S'afegeixen 40 $\mu$ L de 0.1% àcid trifluoroacètic (TFA) en aigua. S'incuba furant 15min a temperatura ambient.
3. Es transfereix la solució de pèptid a un tub Eppendorf net. Es pot mantenir a -20 °C fins a l'anàlisi de massa.
4. L'espectre es processa amb el software Flex Analysis i s'envia a BioTools.

## Part 3: Activitats enzimàtiques

### Protocol 3.1: Assaig acoblat per mesurar l'activitat específica de la proteïna GalU

Tal i com es comenta en els Resultats i discussió (Capítol 3), per determinar l'activitat enzimàtica de la proteïna GalU es desenvolupa l'assaig acoblat espectrofotomètric basat en la reacció que es mostra en la Figura 75 (Looijesteijn, *et al.*, 1999) i (Boels, *et al.*, 2001) que permet mesurar l'augment d'absorbància a 340nm al llarg del temps.



**Figura 75: Reacció de l'assaig acoblat dissenyat per a la quantificació de l'activitat enzimàtica de l'enzim GalU.** A l'activitat uridiltransferasa s'acobla l'enzim fosfoglucomutasa (PGM) on s'acobla la reacció indicadora que redueix l' $\text{NADP}^+$  gràcies a l'acció de la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH).

### Desenvolupament del mètode: G6PDH, PGM i GalU comercial

Per desenvolupar el mètode, primer es caracteritza l'enzim G6PDH, després el PGM i finalment la proteïna GalU comercial. A la Taula 39 es mostren les concentracions estoc i les emprades en cada experiment.

**Taula 39: Concentracions emprades en el desenvolupament de l'assaig acoblat per determinar l'activitat específica de la proteïna GalU.**

Component	Concentració Estoc	G6P DH	PGM	GalU
Tris – HCl pH 7.8	500mM	50mM	50mM	50mM
MgCl <sub>2</sub>	140mM	14mM	14mM	14mM
NADP <sup>+</sup>	3mM	0.3mM	0.3mM	0.3mM
Glucosa 6-fosfat	10mM	0.1mM	-	-
G6PDH	Comercial	0.5 – 5mU	0.5U	0.5U
Glucosa 1-fosfat	1mM	-	0.1mM	-
PGM	Comercial	-	10 – 100mU	14U
UDP-Glc	1mM	-	-	0.1mM
Àcid pirofosfòric	40mM	-	-	4mM
GalU	Comercial	-	-	0.6 – 50mU

En cada experiment es realitzen diferents reaccions de 200 $\mu$ L en paral·lel emprant una placa de 96 pouets apte per la mesura d'absorbància a 340nm. Aquestes plaques es mantenen durant el temps de reacció (30min) a 30 °C i la lectura es realitza cada minut.

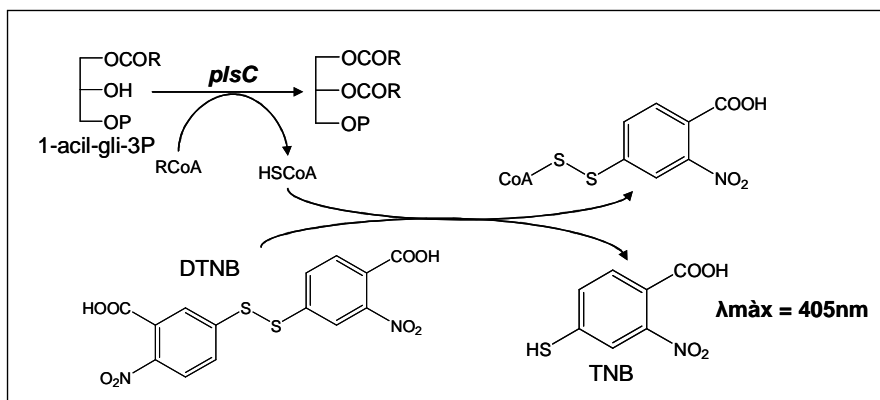
Els experiments en els que s'estudia la velocitat inicial, la reacció s'inicia just abans de començar a llegir amb el lector de plaques addicionant un dels reactius que permeten l'inici de la reacció en estudi. Abans d'aquest moment s'assegura que la dissolució sigui totalment homogènia.

### **Determinació de l'activitat específica de l'enzim GalU obtingut experimentalment**

La determinació de l'activitat específica de l'enzim GalU dels extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica es realitza seguint el mateix assaig que en el GalU comercial comentat anteriorment. En aquest cas, però, s'usa l'extracte cel·lular obtingut després de tot el procés de creixement, inducció i posterior sonicació tal i com es comenta en la Part 2. La quantitat de proteïna total present en l'extracte cel·lular es mesura per Bradford emprant com a patró la proteïna BSA. La quantitat d'extracte addicionat en cada reacció és funció de l'experiment i s'ha d'ajustar en cada cas dins el marge lineal d'activitat específica.

### **Protocol 3.2: Assaig PlsC**

Tal i com es comenta en els Resultats i discussió (Capítol 3), per determinar l'activitat enzimàtica de la proteïna PlsC es desenvolupa l'assaig contínuo en que es detecta la formació de HSCoA mitjançant el reactiu d'Ellman, és a dir, l'àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) o DTNB. Aquest àcid reacciona amb els grups tiols intercanviant l'enllaç disulfur i donant com a producte reduït el 2-nitro-5-tiobenzoat o TNB que en medi neutre o bàsic és de color groc. D'aquesta manera, l'augment de la mesura espectrofotomètrica a 405nm indicadora de TNB permet detectar la formació de l'HSCoA i, per tant, l'activitat de l'enzim PlsC d'interès (Figura 76).



**Figura 76:** Assaig per determinar l'activitat de l'enzim PlsC acoblant la reacció de l'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) o DTNB amb l'HSCoA. Aquest àcid reacciona amb els grups tiols trencant l'enllaç disulfur donant com a producte el 2-nitro-5-tiobenzoat o TNB que en medi neutre o bàsic absorbeix a 405nm.

### Desenvolupament del mètode

En primer lloc es posa apunt la recta patró amb HSCoA pur comercial. Aquesta es duu terme sota les condicions de treball especificades en la Taula 40.

**Taula 40:** Concentracions emprades en el desenvolupament de l'assaig per determinar l'activitat específica de la proteïna PlsC. \*dissolt en tampó Tris – HCl pH 9.0

Component	Concentració Estoc	Recta patró	Activitat
Tris – HCl pH 9.0	1M	0.1M	0.1M
MgCl <sub>2</sub>	140mM	0.5mM	0.5mM
HSCoA	1mM	0 – 0.1mM	-
BSA	10mg/ mL	1mg/ mL	1mg/ mL
DTNB	2mM	0.1mM	0.1mM
OleoilSCoA	0.5mg/ mL*	50mg/L	50mg/L
Àcid oleoilisofosfatídic	1mg/ mL*	-	50mg/L
Extracte cel·lular	Experimental	-	Marge experimental

En cada experiment es realitzen diferents reaccions en paral·lel emprant una placa de 96 pouets apte per la mesura d'absorbència a 405nm. Aquestes plaques es mantenen durant el temps de reacció (10min) a 30 °C. El volum total de reacció és de 200µL de volum total.

L'extracte cel·lular de les soques modificades per enginyeria metabòlica per la determinació de l'activitat específica de l'enzim PlsC s'obté després de tot el procés de creixement, inducció i posterior sonicació tal i com es comenta en la Part 2. La quantitat de proteïna total present en l'extracte cel·lular es mesura per Bradford emprant com a patró la



proteïna BSA. La quantitat d'extracte addicionat en cada reacció és funció de l'experiment i s'ha d'ajustar en cada cas dins el marge lineal d'activitat específica.

### Protocol 3.3: Assaig mg517

Les condicions sota les quals té lloc la reacció per tal de determinar l'activitat glicosiltransferasa de MG517 són les descrites en la Taula 41.

**Taula 41: Condicions de reacció estàndard de l'assaig radiomètric**

Compost	Concentració estoc	Concentració en reacció
HEPES pH 8	200 mM	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	200 mM	20 mM
CHAPS	100 mM	20 mM
DOG	-	1.25 mM
DOPG	-	12.5 mM
UDP- <sup>14</sup> C-Gal	10 mM	1 mM
Extracte cel·lular	-	Variable
T <sub>reacció</sub>	-	35 °C

La preparació de les mostres consta de dos passos diferenciats. En primer lloc s'obté una mescla que conté els compostos de naturalesa lipídica, el que s'anomena extracte lipídic i consta de micel·les mixtes d'un detergent, l'acceptor i altres lípids. En segon lloc s'addiciona a aquest extracte l'enzim, el qual també s'incorpora a les esmentades micel·les. I, finalment, s'afegeix el donador marcat radioactivament. El volum habitual de reacció és de 110 µL.

#### 1. Preparació de l'extracte lipídic

En primer lloc es prepara l'extracte lipídic tal i com s'especifica a continuació. En la Taula 42 es mostren els components necessaris en aquest pas. Cal remarcar que les concentracions especificades no són les finals de reacció sinó les de l'extracte ja que posteriorment d'addicionarà l'enzim i el substrat donador i diluiran aquestes concentracions.

**Taula 42: Components per la preparació de l'extracte lipídic de l'assaig d'activitat de la proteïna MG517.**

Compost	Concentració
HEPES pH 8	36.7 mM
MgCl <sub>2</sub>	36.7 mM
CHAPS	36.7 mM
DOG	1.81 mM
DOPG	18.1mM

1. El DOG i el DOPG es dissolen en cloroform i s'addiciona a un vial de vidre la quantitat necessària segons la concentració final en reacció.
2. El cloroform s'evapora mitjançant un corrent de nitrogen. Per tal d'assegurar que s'elimina completament, el vial es manté al buit durant 1 hora.
3. S'addicionen 11 µL del tampó 200 mM HEPES pH 8, 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 22 µL de la solució 100 mM CHAPS i 27 µL d'aigua mQ.
4. El conjunt es vortexa vigorosament i es manté en un bany d'ultrasons durant 10 min per afavorir la formació de micel·les. Un cop aquestes s'han constituït (la dissolució es fa transparent), el conjunt es traspassa a un tub Eppendorf.

## 2. Addició de l'enzim

Un cop es disposa de l'extracte lipídic, s'hi addicionen 10uL de l'enzim en forma d'extracte proteic i 29uL d'aigua miliQ. El conjunt s'incuba un mínim de 30 min. en gel per tal de permetre la incorporació de la proteïna a les micel·les.

## 3. Reacció de glicosilació

La reacció s'inicia amb l'addició de 10 µL d'una dissolució estoc de donador marcat. A continuació es van traient alíquotes de 20 µL cada 2 minuts durant 10 minuts, obtenint mostres als 2, 4, 6, 8 i 10 min. Cada una d'aquestes alíquotes s'addiciona sobre 500uL d'acetat d'etil i el conjunt es vortexa lleugerament per assegurar que la reacció es pari.

## 4. Quantificació de les mostres

Amb cada una de les mostres de reacció se segueix el següent procediment:

1. Es renta la fase orgànica amb 250 µL de NaCl 0.45 %.
2. Per tal de separar les fases correctament, la mostra se centrifuga durant 5 min a 2500 rpm.

3. S'extreuen 350  $\mu\text{L}$  de la fase orgànica mitjançant una xeringa Hamilton de 500  $\mu\text{L}$  de volum
4. Aquesta fase orgànica s'addiciona sobre 500  $\mu\text{L}$  de MeOH i 4 mL de líquid de centelleig.
5. La solució resultant es mescla i s'introdueix al comptador de centelleig, on la radioactivitat emesa es compta durant 2 min.

Cal dir que el blanc de les reaccions s'obté a partir d'una mescla de reacció en la qual no s'addiciona enzim, però sí donador marcat. L'extracció d'una alíquota de 20 $\mu\text{L}$  d'aquesta mescla i el seu tractament proporciona el valor de radioactivitat corresponent al moment inicial de les reaccions.

## Part 4: Anàlisi de lípids

### Protocol 4.1: Determinació del TGDAG

A partir del botó cel·lular de 3 cultius de 50 mL de medi definit crescuts en matràs Erlenmeyer i un cop realitzada la inducció durant 5h, es realitza l'extracció dels lípids amb cloroform / metanol (2:1). Aquesta extracció es realitza tres vegades consecutives. S'evapora a sequedat la fracció orgànica i es procedeix amb les reaccions de metanòlisis i acetilació.

### Metanòlisis alcalina

A l'extracte lipídic obtingut se li realitzen els següents passos:

1. Afegir 0.2 mL de cloroform, 0.3 mL de metanol i 0.5 mL de NaOH 0.2N en metanol.
2. Agitar durant 2h a temperatura ambient.
3. Realitzar una TLC per assegurar que no queden glicolípid.
4. Afegir 0.2 mL de cloroform, 0.8 mL de metanol i 0.9 mL d'aigua.
5. Separar les fases per centrifugació.
6. La fase aquosa s'agita amb Amberlite IR-160 prèviament decolorada amb metanol.
7. Es comprova el pH de la fase aquosa i es treu totalment la resina emprada.
8. Es liofilitza el contingut del baló.

### Acetilació i purificació

El sucre liofilitzat obtingut en la reacció de metanòlisis se li realitzen els següents passos:

1. Es dissol amb 1 mL de la mescla anhídrid acètic / piridina (1:1).
2. Afegir una punta d'espàtula de dimetilaminopiridina o DMAP.
3. Incubar a temperatura ambient durant tota la nit.
4. S'afegeix a poc a poc el mateix volum de la reacció en pes de gel amb agitació constant.
5. Es manté agitant durant 1h.
6. La mescla es passa a un embut de decantació i es fan 3 extraccions consecutives amb 200 mL de cloroform.

7. La fase cloroform es renta 3 vegades amb una dissolució saturada de bicarbonat sòdic en aigua.
8. La fase cloroform s'asseca amb sulfat magnèsic i es rotoevapora en presència de toluè per extreure la piridina residual.

El resultat es porta a analitzar als serveis científicotècnics del Parc científic.

#### **Protocol 4.2: Purificació de glicoglicerolípid**

La purificació de glicoglicerolípid es realitza tal i com es comenta en els resultats i discussió a partir de l'extracte lipídic del botó cel·lular mitjançant cromatografia d'adsorció. La columna de sílice flash s'elueix en primer lloc amb cloroform, en segon lloc amb acetona fins que s'extreuen els glicoglicerolípid i, en tercer lloc, amb metanol per acabar d'arrossegant tots els components.

#### **Protocol 4.3: Determinació d'àcids grassos**

Es dissol la totalitat de cada una de les mostres en 2.5 mL d'hexà i s'afegeixen 25µL d'una dissolució 2N de KOH en metanol. Es vortexen vigorosament les reaccions durant 30s i es transfereix una part del sobrenedant a un vial de vidre de 1 mL. Les condicions cromatogràfiques emprades són les mostrades en la Taula 43 i Taula 44 ja sigui amb detector FID o MS, respectivament.

**Taula 43: Condicions cromatogràfiques utilitzades en la cromatografia de gasos acoblada a un detector FID.**

Cromatògraf	Agilent 7890 GC
Injector	Automàtic d'Agilent
Fase estacionària	100% polietilenglicol Columna: WaxOmega (30m*0.25mm*0.25µm)
Programa de temperatura	Isotèrmic 200 °C
Temps total	55min
Volum d'injecció	2µL
Temperatura de l'injector	250 °C
Pressió	20psi
Flux	1 mL/min (constant)
Split ratio	24:1
Detector	FID
Temperatura del detector	260 °C

**Taula 44: Condicions cromatogràfiques utilitzades en la cromatografia de gasos espectrometria de masses.**

Cromatògraf	GC 6000 series
Mode injecció	Splitless
Temps d'splitless	1 min
Columna	BPX-70 30m*0.25mm*0.25µm
Programa de temperatura	80 °C (1min) @ 4 °C/min fins 240 °C (5min)
Temperatura de l'injector	270 °C
Flux	1 mL/min
Flux split	60 mL/min
Detector	MD 800 Thermo Scientific treballant en ionització electrònica
Temperatura del detector	270 °C
Scan	50 a 550 uma

**Protocol 4.4: Assaig UPLC-ES+/TOFMS**

En primer lloc, es realitzen els creixements cel·lulars en 50 mL de medi definit i es mantenen a 37 °C. S'indueix l'expressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba 5h a 37 °C. A continuació, es prenen mostres de 10 mL de cada cultiu i es renten amb NaCl 0.9% a 4 °C. Els botons cel·lulars es resuspenen en 500µL d'una mescla cloroform/metanol (2:1) i es deixen durant 10min a l'ultrasons. Després de centrifugar per separar les dues fases formades, s'extreuen 250µL de la fase orgànica i s'evaporen a sequedat amb una corrent de nitrogen. Cada mostra es dissolt en 50µL de metanol i es punxa a l'UPLC sota les condicions de treball comentades en l'Annex 3.

## 6. BIBLIOGRAFIA





Aiba, S., & Matsuoka, M. (1979). Identification of metabolic model: Citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering* , 21, 1373-1386.

de Almeida, A., Nikel, P. I., Giordano, A. M., & Pettinari, M. J. (2007). Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* , 73 (24), 7912-7916.

Anastas, P. T., & Kirchoff, M. M. (2002). Origins, current status and future challenges of green chemistry. *Accounts of Chemical Research (ACS Publications)* , 35 (9), 686-694.

Andrés, E., Martínez, N., & Planas, A. (2011). *Paper Submitted*.

Antoine, T., Priem, B., Heyraud, A., Greffe, L., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., y otros. (2003). Large-scale in vivo synthesis of the carbohydrate moieties of gangliosides GM1 and GM2 by metabolically engineered *Escherichia coli*. *ChemBioChem* , 4, 406-412.

Bachmann, B. J., & Low, K. B. (1980). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 6. *Microbiological Reviews* , 44 (1), 1-56.

Bailey, J. E., Sburlati, A., Hatzimanikatis, V., Lee, K., Renner, W. A., & Tsai, P. S. (1996). Inverse metabolic engineering: A strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering* , 52 (1), 109-121.

Barghini, P., Gioia, D. D., Fava, F., & Ruzzi, M. (2007). Vainillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. *Microbial Cell Factories* , 6 (13).

Berg, S., Edman, M., Li, L., Wikstrom, M., & Wieslander, A. (2001). Sequence properties of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* membranes. *The Journal of Biological Chemistry* , 276 (25), 22056-22063.

Bergqvist, M. H. (1996). Chromatographic resolution of partially perdeuterated diglucosyldiacylglycerols from *Acholeplasma laidlawii*. *Journal of Chromatography A* , 736, 83-89.

Bernstein, R. L., & Robbins, P. W. (1965). Control aspects of uridine 5'-diphosphate glucose and thymidine 5'-diphosphate glucose synthesis by microbial enzymes. *The Journal of Biological Chemistry* , 240 (1), 391-397.

Boels, I. C., Ramos, A., Kleerebezem, M., & Vos, W. M. (2001). Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* , 67 (7), 3033-3040.

Canal, M. (2010). Treball Fi de Carrera (TFC):. *Universitat Ramon Llull (IQS)* .

Carlson, R., & Srienc, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: creation of overall flux states. *Biotechnology and Bioengineering* , 86 (2), 149-162.

Chang, H.-Y., Huang, H.-C., Lee, J.-H., & Peng, H.-L. (1999). Characterization of a putative *Pseudomonas* UDPglucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Science Council ROC (B)* , 23 (2), 74-84.

Christie, W. W., & Urwin, R. A. (1995). Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. *Journal of High Resolution Chromatography* , 18, 97-100.

Coleman, J. (1990). Characterization of *Escherichia coli* cells deficient in 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *The Journal of Biological Chemistry* , 265 (28), 17215-17221.

Coleman, J. (1992). Characterization of the *Escherichia coli* gene for 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC). *Molecular and General Genetics* , 232, 295-303.

Cottaz, S., & Samain, E. (2005). Genetic engineering of *Escherichia coli* for the production of NI-NII-diacetylchitobiose (chitinbiose) and its utilization as a primer for the synthesis of complex carbohydrates. *Metabolic Engineering* , 7, 311-317.

Couvreur, P., & Vauthier, C. (2006). Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical research* , 23 (7), 1417-1450.

Danner, H., & Braun, R. (1999). Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass. *Chemical Society Reviews* , 28, 395-405.

D'Auria, S., Varriale, A., Gonnelli, M., Saviano, M., Staiano, M., Rossi, M., y otros. (2007). Tryptophan phosphorescence studies of the D-galactose / D-glucose-binding protein from *Escherichia coli* provide a molecular portrait with structural and dynamics features of the protein. *Journal of proteome research* , 6 (4), 1306-1312.

Dayem, L. C., Carney, J. R., Santi, D. V., Pfeifer, B. A., Khosla, C., & Kealey, J. T. (2002). Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *41*, 5193-5201.

DeChavigny, A., Heacock, P. N., & Dowhan, W. (1991). Sequence and inactivation of the pss gene of *Escherichia coli*. Phosphatidylethanolamine may not be essential for cell viability. *The Journal of Biological Chemistry*, *266* (8), 5323-5332.

Dharmadi, Y., Murarka, A., & González, R. (2006). Anaerobic fermentation fo glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, *94* (5), 821-829.

Du, W., Kulkarni, S. S., & Gervay-Hague, J. (2007). Efficient, one-pot synthesis of biologically active  $\alpha$ -linked glycolipids. *Chemical Communications*, 2336-2338.

Durany Türk, O. (2003). Tesi doctoral: Producció de Fuc-1PA recombinant en *E.coli*. *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *82*, 70-77.

Faivre, V., & Rosilio, V. (2010). Interest of glycolipids in drug delivery: from physicochemical properties to drug targeting. *Expert Opinion Drug Delivery*, *7* (9), 1031-1048.

Farmer, W. R., & Liao, J. C. (2000). Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nature Biotechnology*, *18*, 533-537.

Fay, J. P., & Farias, R. N. (1975). The inhibitory action of fatty acids on the growth of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, *91*, 233-240.

Fierfort, N., & Samain, E. (2008). Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *Journal of Biotechnology*, *134*, 261-265.

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stnaley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*, 497-509.

Fort, S., Birikaki, L., Dubois, M.-P., Antoine, T., Samain, E., & Driguez, H. (2005). Biosynthesis of conjugatable saccharidic moieties of GM2 and GM3 gangliosides by engineered *E.coli*. *Chemical communications*, 2558-2560.

Geerlof, A., Brown, J., Coutard, B., Egloff, M. P., Enguita, F. J., Fogg, M. J., y otros. (2006). The impact of protein characterization in structural proteomics. *Acta Crystallographica Section D* , 62 (10), 1125-1136.

Gerigk, M. R., Maass, D., Kreutzer, A., Sprenger, G., Bongaerts, J., Wubbolts, M., y otros. (2002). Enhanced pilot-scale fed-batch L-phenylalanine production with recombinant *Escherichia coli* by fully integrated reactive extraction. *Bioprocess and Biosystems Engineering* , 25 (1), 43-52.

Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* , 13 (2), 247-261.

Gregoriadis, G., Wills, E. J., Swain, C. P., & Tavill, A. S. (1974). Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet* , 1, 1313-1316.

Heller, K. B., Lin, E. C., & Wilson, T. H. (1980). Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 144 (1), 274-278.

Hölzl, G., & Dörmann, P. (2007). Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* , 46, 225-243.

Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfer, U., Kujau, M., Wenderoth, R., y otros. (1996). High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 46, 524-532.

Hossain, S. A., Tanizawa, K., Kazuta, Y., & Fukui, T. (1994). Overproduction and characterization of recombinant UDP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biochemistry* , 115, 965-972.

Icho, T., & Raetz, C. R. (1983). Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *Journal of Bacteriology* , 153 (2), 722-730.

Ikeda, M., Ohnishi, J., Hayashi, M., & Mitsuhashi, S. (2006). A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* , 33 (7), 610-615.

Ingram, L. O. (1977). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Applied and Environmental Microbiology* , 1233-1236.

Ingram, L. O. (1982). Regulation of fatty acid composition in *Escherichia coli*: A proposed common mechanism for changes induced by ethanol, chaotropic agents and a reduction of growth temperature. *Journal of Bacteriology* , 166-172.

Ivancic, T., Vodovnik, M., Marinsek-Logar, R., & Stopar, D. (2009). Conditioning of the membrane fatty acid profile of *Escherichia coli* during periodic temperature cycling. *Microbiology* , 155, 3461-3463.

Julve, O. (Comunicació Personal).

Kamogawa, A., & Kurahashi, K. (1965). Purification and properties of uridinediphosphate glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli* K12. *The Journal of Biochemistry* , 57 (6), 758-765.

Kaneshiro, T., & Marr, A. G. (1961). Cis-9,10-methylene hexadecanoic acid from the phospholipids of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* , 236 (10), 2615-2619.

Kates, M. (1972). *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. New York: American Elsevier Publishing.

Katsui, N., Tsuchido, T., Takano, M., & Shibasaki, I. (1981). Effect of preincubation temperature on the heat resistance of *Escherichia coli* having different fatty acid compositions. *Journal of General Microbiology* , 122, 357-361.

Kennedy, J., Murli, S., & Kealey, J. T. (2003). 6-Deoxyerythronolide B analogue production in *Escherichia coli* through metabolic pathway engineering. *Biochemistry* , 42, 14342-14348.

Kim, K. J., Kim, H. E., Lee, K. H., Han, W., Yi, M. J., Jeong, J., y otros. (2004). Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. *Protein Science* , 13, 1698-1703.

Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R.-E.-I., y otros. (2006). Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens form pathogenic bacteria. *Nature immunology* , 7 (9), 978-986.

Klement, M. L., Öjemyr, L., Tagscherer, K. E., Widmalm, G., & Wieslander, A. (2007). A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae* involvement in host immune response. *Molecular Microbiology* , 65 (6), 1444-1457.

Koffas, M. A., Jung, G. Y., & Stephanopoulos, G. (2003). Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metabolic Engineering* , 5, 32-41.

Koffas, M. A., Jung, G. Y., Aon, J. C., & Stephanopoulos, G. (2002). Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology* , 68, 5422-5428.

Lai, X., Wu, J., Chen, S., Zhang, X., & Wang, H. (2008). Expression, purification and characterization of functionally active *Mycobacterium tuberculosis* UDP-glucose pyrophosphorylase. *Protein expression and Purification* , 61, 50-56.

Larsen, E., Kharazmi, A., Christensen, L. P., & Christensen, S. B. (2003). An antiinflammatory galactolipid from Rose Hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. *Journal of Natural Products* , 64 (7), 994-995.

Larson, T. J., Lightner, V. A., Green, P. R., Modrich, P., & Bell, R. M. (1980). Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Identification of the sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase polypeptide as the *plsB* gene product. *The Journal of Biological Chemistry* , 255 (19), 9421-9426.

Lemieux, M. J., Huang, Y., & Wang, D.-N. (2004). Glycerol 3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation. *Research in Microbiology* 155 , 623-629.

Leonard, E., Yan, Y., & Koffas, M. A. (2006). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* , 8, 172-181.

Li, C. X., Li, Y. X., Yu, L. B., Zhang, H., Chu, S. D., & Guan, H. S. (2003). The synthesis of glycolipids. *Chinese Chemical Letters* , 14 (8), 776-778.

Liao, J. C., Hou, S. Y., & Chao, Y. P. (1996a). Pathway analysis, engineering, and physiological considerations for redirecting central metabolism. *Biotechnology and Bioengineering* , 52, 129-140.

Lightner, V. A., Larson, T. J., Tailleux, P., Kantor, G. D., Raetz, C. R., Bell, R. M., y otros. (1980). Membrane phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Cloning of a structural gene (*plsB*) of the sn-glycerol 3-phosphate acyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* , 255 (19), 9413-9420.

Lim, S.-Y., Park, W.-K., & Suzuki, H. (1999). Analyses of glycolipids from fish, shellfish and sea snake lipids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47 (3), 960-963.

Looijesteijn, P. J., Boels, I. C., Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (1999). Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied and Environmental Microbiology* , 65 (11), 5003-5008.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (1988). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vols. 1,2 i 3). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Máñez, S., Recio, M. d., Gil, I., Gómez, C., Giner, R.-M., Waterman, P. G., y otros. (1999). A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products* , 62 (4), 601-604.

Mao, Z., & Chen, R. R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Progress* , 23, 1038-1042.

Mao, Z., Shin, H.-D., & Chen, R. R. (2006). Engineering the *E.coli* UDP-glucose synthesis pathway for oligosaccharide synthesis. *Biotechnology Progress* , 22, 369-374.

Martínez, N. (Comunicació personal). Tesi Doctoral en curs. *Universitat Ramon Llull (IQS)* .

Mey, M. D., Maertens, J., Boogmans, S., Soetaert, W. K., Vandamme, E. J., Cunin, R., y otros. (2010). Promoter Knock-in: a novel rational method for the fine tuning of genes. *BMC Biotechnology* , 10 (26).

Mey, M. D., Maertens, J., Lequeux, G. J., Soetaert, W. K., & Vandamme, E. J. (2007). Construction and model-based analysis of a promoter library for *E.coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *BMC Biotechnology* , 7 (34).

Mizanur, R. M., & Pohl, N. L. (2008). A thermostable promiscuous glucose-1-phosphate uridylyltransferase from *Helicobacter pylori* for the synthesis of nucleotide sugars. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , 50, 13-19.

Moon, T. S., Yoon, S.-H., Lanza, A. M., Roy-Mayhew, J. D., & Jones Prather, K. L. (2009). Production of glucaric acid from synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* , 75 (3), 589-595.

Moreau, R. A. (2006). The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector. *Lipids* , 41 (7), 727-734.

Morimoto, T., Nagatsu, A., Murakami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., y otros. (1995). Anti-tumour-promoting glycerolglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Pytochemistry* , 40 (5), 1433-1437.

Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., & Ohigashi, H. (1995). Glycerolglycolipids from *Citrus hystrix*, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 43 (10), 2779-2783.

Nakamura, C. E., & Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propandiol. *Current Opinion in Biotechnology* , 14, 454-459.

Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 72 (3), 379-412.

Nieto, J. (2010). Tesi Doctoral.: *Universitat Ramon Llull (IQS)* .

Ohta, K., Beall, D., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (1991). Metabolic engineering of *Kebsiella-Oxytoca* M5a1 for ethanol production form xylose, glucose. *Applied and Environmental Microbiology* , 57, 2810-2815.

Otero, J. M., & Nielsen, J. (2010). Industrial Systems Biology. *Biotechnology and Bioengineering* , 105 (3), 439-460.

Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V., & Lange, C. M. (2007). Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Comunications in Mass Spectrometry* , 21, 3229-3233.

Park, J. H., Lee, S. Y., Kim, T. Y., & Kim, H. U. (2008). Application of systems biology for bioprocess development. *Trends in Biotechnology* , 26 (8), 404-412.

Park, S. J., Choi, J.-i., & Lee, S. Y. (2005). Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme and Microbial Technology* , 36, 579-588.

Patnaik, R. (2008). Engineering complex phenotypes in industrial strains. *Biotechnology Progress* , 24 (1), 38-47.



Pettigrew, D. W., Ma, D.-P., Conrad, C. A., & Johnson, J. R. (1988). Escherichia coli glycerol kinasa. Cloning and sequencing of the glpK gene and the primary structure of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* , 263 (1), 135-139.

Picchioni, G. A., Watada, A. E., & Whitaker, B. D. (1996). Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of plant phospholipids and glycolipids using light-scattering detection. *Lipids* , 31 (2), 217-221.

Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Heyraud, A., & Samain, E. (2002). A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* , 12 (4), 235-240.

Raab, R. M., Tyo, K., & Stephanopoulos, G. (2005). Metabolic engineering. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* , 100, 1-17.

Ramadan, M. F., & Mörsel, J.-T. (2003). Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.) coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) oilseeds. *Food Chemistry* , 80, 197-204.

Randriantsoa, M., Drouillard, S., Breton, C., & Samain, E. (2007). Synthesis of globopentaose using novel b1,3-galactosyltransferasa activity of the Haemophilus influenzae b1,3-N-acetylgalactosaminyltransferasa LgtD. *FEBS Letters* , 581, 2652-2656.

Romier, C., Jelloul, M. B., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P. H., y otros. (2006). Co-expression of protein complexes in prokariotic and eukariotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallography Section D* , 62, 1232-1242.

Roy, R. K. (1990). *A primer on the Taguchi method*. Dearborn, Michigan, EEUU: Society of Manufacturing Engineers.

Ruffing, A. M., & Chen, R. R. (2010). Metabolic engineering of Agrobacterium sp. strain ATCC 31749 for production of an a-Gal epítop. *Microbial Cell Factories* , 9 (1).

Sakurada, K., Iwasw, H., Takatori, T., Nagao, M., Nakajima, M., Nijima, H., y otros. (1999). Identification of cis-9,10-methylenehexadecanoic acid in submitochondrial particles of bovine heart. *Biochimica et Biophysica Acta* , 214-222.

Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H., & Geremia, R. A. (1997). Gram-scale synthesis of recombinant chitoooligosaccharides in *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research* , 302, 35-42.

Savage, D. F., Anderson, C. L., Robles - Colmenares, Y., Newby, Z. E., & Stroud, R. M. (2007). Cell-free complements in vivo expression of the *E.coli* membrane proteome. *Protein Science* , 16, 966-976.

Sellabona, R. (2009). Treball Fi de Carrera: *Universitat Ramon Llull (IQS)* .

Selzer, G., Som, T., Itoh, T., & Tomizawa, J.-i. (1983). The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell* , 32, 119-129.

Shao, J., Hayashi, T., & Wang, P. G. (2003). Enhanced production of  $\alpha$ -galactosyl epitopes by metabolically engineered *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* , 69 (9), 5238-5242.

Sheich, C., Kümmel, D., Soumailakakis, D., Heinemann, U., & Büsow, K. (2007). Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acid Research* , 1-7.

Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E.coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* , 23, 345-357.

Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Foglia, T. A., & Marmer, W. N. (2006). Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology* , 71 (6), 783-789.

Stafford, D., Yanagimachi, K., & Stephanopoulos, G. (2001). Metabolic engineering of indene bioconversion in *Rhodococcus sp.* . *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* , 73, 85-101.

Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering* , 1, 1-11.

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* , 41 (1), 207-234.

Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* , 189, 113-130.

Sugawara, T., & Miyazawa, T. (1999). Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids* , 34 (11), 1231-1237.

Sullivan, K. H., Hegeman, G. D., & Cordes, E. H. (1979). Alteration of the fatty acid composition of *Escherichia coli* by growth in the presence of normal alcohols. *Journal of Bacteriology* , 138 (1), 133-138.

Suzuki, H., Park, W.-K., & Lim, S.-Y. (2000). Analysis of glycolipids in clove, red pepper and nutmeg by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science: food chemistry and toxicology* , 65 (6), 931-933.

van Maris, A. J., Konings, W. N., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2004). Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metabolic Engineering* , 6, 245-255.

Veltkamp, E., van de Pol, H., Stuitje, A. R., van den Elzen, P. J., & Nijkamp, H. J. (1979). Replication and gene functions of the bacteriocinogenic plasmid CloDF13. *Contributions to Microbiology and Immunology* , 6, 111-121.

Vives, J., Juanola, S., Cairo, J. J., & Godia, F. (2003). Metabolic engineering of apoptosis in cultured animal cells: implications for the biotechnology industry. *Metabolic engineering* , 5, 124-132.

Wagner, S., Baars, L., Ytterberg, A. J., Klussmeier, A., Wagner, C. S., Nord, O., y otros. (2007). Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics* 6.9 , 1527-1550.

Walsh, G. (2003). Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 55, 3-10.

Wang, J., & Hewick, R. (1999). Proteomics in drug discovery. *Drug Discovery Today* , 4, 129-133.

Wegner, C., & Hamburguer, M. (2002). Occurrence of stable foam in the upper Rhine river caused by plant-derived surfactants. *Environmental science and technology* , 36 (15), 3250-3256.

Weissborn, A. C., Liu, Q., Rumley, M. K., & Kennedy, E. P. (1994). UTP:a-D-glucosa-1-phosphate uridyltransferasa of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the galU gene and purification of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 176 (9), 2611-2618.

Widner, B., Behr, R., von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., y otros. (2005). Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), 3747-3752.

Wikström, M., Kelly, A. A., Georgiev, A., Eriksson, H. M., Klement, M. R., Bogdanov, M., y otros. (2009). Lipid-engineered *Escherichia coli* membranes reveal critical lipid headgroup size for protein function. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (2), 954-965.

Wikström, M., Xie, J., Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., Heacock, P., Wieslander, A., y otros. (2004). Monoglucosyldiacylglycerol, a foreign lipid, can substitute for phosphatidylethanolamine in essential membrane-associated functions in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (11), 10484-10493.

Wilms, B., Hauch, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., y otros. (2001). High-cell density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rha BAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 73, 95-103.

Winter, J., Neubauer, P., Glockshuber, R., & Rudolph, R. (2000). Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal of Biotechnology*, 84, 175-185.

Wu, D., Xing, G.-W., Poles, M. A., Horowitz, A., Kinjo, Y., Sullivan, B., y otros. (2005). Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *PNAS Proceedings of the National Academy of Science*, 102 (5), 1351-1356.

Yang, Y.-T., Bennett, G. N., & San, K.-Y. (1998). Genetic and metabolic engineering. *EJB - Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (3), 134-141.

Yee, L., & Blanch, H. W. (1993). Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (2), 221-230.

Yoshimura, M., Oshima, T., & Ogasawara, N. (2007). Involvement of the YneS/YgiH and PlsX proteins in phospholipid biosynthesis in both *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*.

Yunoki, K., Sato, M., Seki, K., Ohkubo, T., Tanaka, Y., & Ohnishi, M. (2009). Simultaneous quantification of plant glycoacylglycerolipids including sulfoquinovosyldiacylglycerol by HPLC-ELSD with binary gradient elution. *Lipids* , 44, 77-83.

Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2008). Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis. *Journal of Lipid Research* , 49, 1867-1874.

Zwaig, N., Kistler, W. S., & Lin, E. C. (1970). Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* , 102 (3), 753-759.



7. ANNEXES





## Annex 1: Seqüenciacions d'ADN

A continuació es mostren els resultats obtinguts en les seqüenciacions dels diferents plasmidis emprant el mètode *BigDye terminator v3.1* i els encebadors especificats en cada cas. Es troben les següents marques:

- En cursiva i subratllat: els encebadors emprats
- **En negreta i subratllat**: les dianes de restricció
- **Ressaltat en gris**: bases comprovades amb l'espectroferograma o amb la seqüència reversa.

En les seqüències, la primera és la teòrica i la segona la obtinguda experimentalment.

### Seqüències del plasmidi pCDF-galU

#### T7 promotor

```

                10         20         30         40         50         60
CG 111 TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTT
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 G-----TTGCGNAATT-----CCCTGTG--AATA-TTT
                10                                 20

                70         80         90         100        110        120
CG 111 TGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGCTGCCATTAATACGAAAGTCAAAAAAGCC
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 TGTTTA-CTTTAATAAGGAGATATACCATGGCTGCCATTCCNCTTAANGTCAAAAAAGCC
                30         40         50         60         70         80

                130        140        150        160        170        180
CG 111 GTTATCCCCGTTGCGGGATTAGGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCCGAAA
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 GTTATCCCCGTTGCGGGATTAGGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCCGAAA
                90         100        110        120        130        140

                190        200        210        220        230        240
CG 111 GAGATGCTGCCACTTGTGCGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCG
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 GAGATGCTGCCACTTGTGCGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCG
                150        160        170        180        190        200

                250        260        270        280        290        300
CG 111 GCTGGCATTACTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAAACTCTATTGAAAACCAC
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 GCTGGCATTACTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAAACTCTATTGAAAACCAC
                210        220        230        240        250        260

```

ANNEX 1: SEQÜENCIACIONS

	310	320	330	340	350	360
CG 111	TTTGATACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAAACGTGTAAAACGTCAACTGCTT					
	::					
tp2517	TTTGATACCAGTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAAACGTGTAAAACGTCAACTGCTT					
	270	280	290	300	310	320
	370	380	390	400	410	420
CG 111	GATGAAGTGCAGTCTATTTGTCCACCGCACGTGACTATTATGCAAGTTCGTCAGGGTCTG					
	::					
tp2517	GATGAAGTGCAGTCTATTTGTCCACCGCACGTGACTATTATGCAAGTTCGTCAGGGTCTG					
	330	340	350	360	370	380
	430	440	450	460	470	480
CG 111	GCGAAAGGCCTGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGTGATGAACCGGTA					
	::					
tp2517	GCGAAAGGCCTGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGTGATGAACCGGTA					
	390	400	410	420	430	440
	490	500	510	520	530	540
CG 111	GCTGTTATTTTGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCGATTTGTCACAGGATAAC					
	::					
tp2517	GCTGTTATTTTGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCGATTTGTCACAGGATAAC					
	450	460	470	480	490	500
	550	560	570	580	590	600
CG 111	CTGGCAGAGATGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTCATAGCCAGATCATGGTTGAACCG					
	::					
tp2517	CTGGCAGAGATGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTCATAGCCAGATCATGGTTGAACCG					
	510	520	530	540	550	560
	610	620	630	640	650	660
CG 111	GTTGCTGATGTGACCGCATATGGCGTTGTGGATTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGT					
	::					
tp2517	GTTGCTGATGTGACCGCATATGGCGTTGTGGATTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGT					
	570	580	590	600	610	620
	670	680	690	700	710	720
CG 111	GAAAGCGTACCGATGGTTGGTGTGGTAGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAAT					
	::					
tp2517	GAAAGCGTACCGATGGTTGGTGTGGTAGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAAT					
	630	640	650	660	670	680
	730	740	750	760	770	780
CG 111	CTCGCTATTGTGGGTCGTTACGTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACC					
	::					
tp2517	CTCGCTATTGTGGGTCGTTACGTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACC					
	690	700	710	720	730	740
	790	800	810	820	830	840
CG 111	CCTCCGGGAGCTGGTGTGATAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAA					
	::					
tp2517	CCTCCGGGAGCTGGTGTGATAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAA					
	750	760	770	780	790	800
	850	860	870	880	890	900
CG 111	GAAACGGTGGAAAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAATTAGGT					
	::					
tp2517	GAAACGGTGGAAAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAATTAGGT					
	810	820	830	840	850	860

ANNEXES

```

          910          920          930          940          950
CG 111 TACATGCAGGCCTTCGTTGAATACGGTATTCGTCATAACACCC-TTGGCACGG-AATTTA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
tp2517 TACATGCAGGCCTTCGTTGAATACGGTATTCGTCATAACACCCCTTGGCACGGNAATTTA
      870      880      890      900      910      920

          960          970          980          990          1000          1010
CG 111 AAG-CCTGGCTTGAAGAAGAGATGGG-CATTAAGAAGTAACATCCCTAGGCTGCTGCCAC
      ::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
tp2517 AAGCCTGGCTTGAAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGTAACATCCCTAGGCTGCTGCCAC
      930      940      950      960      970      980

          1020          1030          1040          1050          1060          1070
CG 111 CGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGG-CCTCTAAA-CGGGTCTTGAGGGGTTTT
      :::::: ::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::::::::: ::::::::::::::
tp2517 CGCTGANCAATAACTAGCATAACCCNTGGGGCCTCTAAAANGGTCTTGAGGGGTTTT
      990      1000      1010      1020      1030      1040

          1080          1090          1100          1110
CG 111 TTGCTGAAA-CCTCAGGCATTTG--AGAAGCACACGGTC-----
      :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2517 TTGCTGAAAACCTCAGGCATTTNGAAAANGCANCCGGTCNCCCTGCTTCCGGGAGTCAAT
      1050      1060      1070      1080      1090      1100

```

**T7 terminador**

```

          10          20          30          40          50          60
CG 112 -CTCG-ACGCTCTCCC-TTATGCGA-CTCCTGCATTAGGAAA-TTAATACGACTCACTAT
      :: : : :::::::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 TNTCGNACNCTCTCCCTTATGCGAACTCCTNCATTANGAAANTTAATACGACTCACTAT
      310      320      330      340      350      360

          70          80          90          100          110
CG 112 AGGGGAA-TTGTGAGCGGATAAC-AATTCCCCTGTAGAAATAATTTT-GTTTAACTTTAA
      :::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 AGGGGAAATTGTGAGCGGATAACCAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAA
      370      380      390      400      410      420

          120          130          140          150          160          170
CG 112 TAA-GGAGATATACCATGGCTGCCATTAATACGAAA-GTCAAAAAAGCCGTTATCCCC-G
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 TAAAGGAGATATACCATGGCTGCCATTAATACGAAAAGTCAAAAAAGCCGTTATCCCCCG
      430      440      450      460      470      480

          180          190          200          210          220          230
CG 112 TTGCGGGATTAGGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCAGAAAGAGATGCTGC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
tp2518 TTGCGGGATTAGGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATCCCAGAAAGAGATGCTGC
      490      500      510      520      530      540

          240          250          260          270          280          290
CG 112 CACTTGTGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCGGCTGGCATTAA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
tp2518 CACTTGTGATAAGCCATTAATTCAATACGTCGTGAATGAATGTATTGCGGCTGGCATTAA
      550      560      570      580      590      600

```

ANNEX 1: SEQÜENCIACIONS

```

300      310      320      330      340      350
CG 112 CTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAAACTCTATTGAAAACCACCTTTGATACCA
:
tp2518 CTGAAATTGTGCTGGTTACACACTCATCTAAAAACTCTATTGAAAACCACCTTTGATACCA
      610      620      630      640      650      660

360      370      380      390      400      410
CG 112 GTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAAACGTGTA AACGTCAACTGCTTGATGAAGTGC
:
tp2518 GTTTTGAACTGGAAGCAATGCTGGAAAAACGTGTA AACGTCAACTGCTTGATGAAGTGC
      670      680      690      700      710      720

420      430      440      450      460      470
CG 112 AGTCTATTTGTCCACCGCACGTGACTATTATGCAAGTTCGTCAGGGTCTGGCGAAAGGCC
:
tp2518 AGTCTATTTGTCCACCGCACGTGACTATTATGCAAGTTCGTCAGGGTCTGGCGAAAGGCC
      730      740      750      760      770      780

480      490      500      510      520      530
CG 112 TGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGTGATGAACCGGTAGCTGTTATTT
:
tp2518 TGGGACACGCGGTATTGTGTGCTCACCCGGTAGTGGGTGATGAACCGGTAGCTGTTATTT
      790      800      810      820      830      840

540      550      560      570      580      590
CG 112 TGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCGATTTGTCACAGGATAACCTGGCAGAGA
:
tp2518 TGCCTGATGTTATTCTGGATGAATATGAATCCGATTTGTCACAGGATAACCTGGCAGAGA
      850      860      870      880      890      900

600      610      620      630      640      650
CG 112 TGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTCATAGCCAGATCATGGTTGAACCGGTTGCTGATG
:
tp2518 TGATCCGCCGCTTTGATGAAACGGGTCATAGCCAGATCATGGTTGAACCGGTTGCTGATG
      910      920      930      940      950      960

660      670      680      690      700      710
CG 112 TGACCGCATATGGCGTTGTGGATTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGTGAAAGCGTAC
:
tp2518 TGACCGCATATGGCGTTGTGGATTGCAAAGGCGTTGAATTAGCGCCGGGTGAAAGCGTAC
      970      980      990      1000      1010      1020

720      730      740      750      760      770
CG 112 CGATGGTTGGTGTGGTAGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAATCTCGCTATTG
:
tp2518 CGATGGTTGGTGTGGTAGAAAAACCGAAAGCGGATGTTGCGCCGTCTAATCTCGCTATTG
      1030      1040      1050      1060      1070      1080

780      790      800      810      820      830
CG 112 TGGGTCGTTACGTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACCCCTCCGGGAG
:
tp2518 TGGGTCGTTACGTACTTAGCGCGGATATTTGGCCGTTGCTGGCAAAAACCCCTCCGGGAG
      1090      1100      1110      1120      1130      1140

840      850      860      870      880      890
CG 112 CTGGTGATGAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAAGAAACGGTGG
:
tp2518 CTGGTGATGAAATTCAGCTCACCGACGCAATTGATATGCTGATCGAAAAAGAAACGGTGG
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

```

ANNEXES

```
          900          910          920          930          940          950
CG 112 AAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAAATTAGGTTACATGCAGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 AAGCCTATCATATGAAAGGGAAGAGCCATGACTGCGGTAATAAAATTAGGTTACATGCAGG
      1210      1220      1230      1240      1250      1260

          960          970          980          990          1000         1010
CG 112 CCTTCGTTGAATACGGTATTCGTCATAACACCCTTGGCACGGAATTTAAAGCCTGGCTTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 CCTTCGTTGAATACCCTAANNNGNCATAACACCCTTGGCACGGAATTTAAAGCCTGGCT-G
      1270      1280      1290      1300      1310

          1020         1030         1040         1050         1060         1070
CG 112 AAGAAGAGATGGGCATTAAGAAGTAACATCCCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp2518 AAGAAGAGATGGCANAGAANA-----CTCCTG-----
      1320      1330      1340

          1080         1090         1100         1110         1120
CG 112 TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
      :
tp2518 -----G
```

**Seqüències del plasmidi pRSF-plsC**

**T7 promotor**

```
          10          20          30          40          50          60
RP 902 TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCGCCGTAGAAATAATTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp261 T-----GGGAA-----ATTCCCTGNTAGAAT--ATTT
      10          20

          70          80          90          100         110         120
RP 902 TGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGTATATATCTTTTCGTCTTATTATTACCGTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp261 TGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGTATATATCTTTTCGTCTTATTATTACCGTG
      30          40          50          60          70          80

          130         140         150         160         170         180
RP 902 ATTTACAGCATCTTAGTCTGTGTATTCGGCTCCATTTACTGCCTTTTCAGCCCGCGTAAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp261 ATTTACAGCATCTTAGTCTGTGTATTCGGCTCCATTTACTGCCTTTTCAGCCCGCGTAAC
      90          100         110         120         130         140

          190         200         210         220         230         240
RP 902 CCGAAACATGTGGCCACCTTTGGGCATATGTTTGGCCGTCTTGCGCCGCTGTTTGGCCCTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp261 CCGAAACATGTGGCCACCTTTGGGCATATGTTTGGCCGTCTTGCGCCGCTGTTTGGCCCTG
      150         160         170         180         190         200

          250         260         270         280         290         300
RP 902 AAAGTTGAGTGCCGTAAACCTACAGACGCTGAAAGCTACGGCAATGCTATCTATATCGCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
tp261 AAAGTTGAGTGCCGTAAACCTACAGACGCTGAAAGCTACGGCAATGCTATCTATATCGCT
      210         220         230         240         250         260
```

## ANNEX 1: SEQÜENCIACIONS

---

	310	320	330	340	350	360
RP 902	AACCACCAGAACA	ACTATGACATGGT	GACAGCATCGAAC	ATCGTGCAACC	CGCCGACGGTG	
	::::::::::::::::::::					
tp261	AACCACCAGAACA	ACTATGACATGGT	GACAGCATCGAAC	ATCGTGCAACC	CGCCGACGGTG	
	270	280	290	300	310	320
	370	380	390	400	410	420
RP 902	ACGGTAGGTAAAA	AAGAGCTTGCTGT	GGATCCCCCTTCT	TCGGGCAGTTGT	ACTGGTTAACC	
	::::::::::::::::::::					
tp261	ACGGTAGGTAAAA	AAGAGCTTGCTGT	GGATCCCCCTTCT	TCGGGCAGTTGT	ACTGGTTAACC	
	330	340	350	360	370	380
	430	440	450	460	470	480
RP 902	GGCAACTTATTGAT	CGACAGAAACAAT	CGCACTAAAGCTC	ACGGCACCATTG	CGGAAGTA	
	::::::::::::::::::::					
tp261	GGCAACTTATTGAT	CGACAGAAACAAT	CGCACTAAAGCTC	ACGGCACCATTG	CGGAAGTA	
	390	400	410	420	430	440
	490	500	510	520	530	540
RP 902	GTGAATCACTTCA	AAAAACGCCGTAT	TTCATCTGGATGT	TCCC	GGAAGGAACCC	GCAGC
	::::::::::::::::::::					
tp261	GTGAATCACTTCA	AAAAACGCCGTAT	TTCATCTGGATGT	TCCC	GGAAGGAACCC	GCAGC
	450	460	470	480	490	500
	550	560	570	580	590	600
RP 902	CGTGGTCGCGCCT	GTACCGTTCAAG	ACTGGAGCATTT	CACGCGCAATT	TGCGCGGGC	
	::::::::::::::::::::					
tp261	CGTGGTCGCGCCT	GTACCGTTCAAG	ACTGGAGCATTT	CACGCGCAATT	TGCGCGGGC	
	510	520	530	540	550	560
	610	620	630	640	650	660
RP 902	GTCCCGATTATTC	CCCGTGTGCGTCT	CTACAACCTT	CGAATAAGATTA	ATCTTAATCGACTG	
	::::::::::::::::::::					
tp261	GTCCCGATTATTC	CCCGTGTGCGTCT	CTACAACCTT	CGAATAAGATTA	ATCTTAATCGACTG	
	570	580	590	600	610	620
	670	680	690	700	710	720
RP 902	CACAACGGTCTGG	TGATTGTTCGAA	ATGCTGCCGCA	AATTGACGTCAG	TATGGCAA	
	::::::::::::::::::::					
tp261	CACAACGGTCTGG	TGATTGTTCGAA	ATGCTGCCGCA	AATTGACGTCAG	TATGGCAA	
	630	640	650	660	670	680
	730	740	750	760	770	780
RP 902	GATCAGGTTTCGT	GAGCTGGCTGCC	CATTGTCGTT	CGATAATGGAAC	AAAAAATCGCCGAG	
	::::::::::::::::::::					
tp261	GATCAGGTTTCGT	GAGCTGGCTGCC	CATTGTCGTT	CGATAATGGAAC	AAAAAATCGCCGAG	
	690	700	710	720	730	740
	790	800	810	820	830	840
RP 902	CTCGATAAAGAAG	TCGCAGAACGCG	AAGCCGCCGAAA	AGTTTAA <b>CCTAGG</b>	CTGCTGCCA	
	::::::::::::::::::::					
tp261	CTCGATAAAGAAG	TCGCAGAACGCG	AAGCCGCCGAAA	AGTTTAA <b>CCTAGG</b>	CTGCTGCCA	
	750	760	770	780	790	800
	850	860	870	880	890	900
RP 902	CCGCTGAGCAATA	ACTAGCATAACCC	CTTGGGGCCTCT	AAACGGGTCTT	GAGGGTTTTT	
	::::::::::::::::::::					
tp261	CCGCTGAGCAATA	ACTAGCATAACCC	CTTGGGGCCTCT	AAACGGGTCTT	GAGGGTTTTT	
	810	820	830	840	850	860

---

**T7 terminador**

```

                                     10
RP 902 -----TAATACGACTCACTA
                                     ::::::::::::::
tp265  CGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAATTAATACGACTCACTA
          370      380      390      400      410      420

          20      30      40      50      60      70
RP 902 TAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATA
          ::::::::::::::
tp265  TAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATA
          430      440      450      460      470      480

          80      90      100     110     120     130
RP 902 AGGAGATATACCATGGTTATATATCTTTTCGTCTTATTATTACCGTGATTTACAGCATCTTA
          ::::::::::::::
tp265  AGGAGATATAACCATGGTATATATCTTTTCGTCTTATTATTACCGTGATTTACAGCATCTTA
          490      500      510      520      530      540

          140     150     160     170     180     190
RP 902 GTCTGTGATTCGGCTCCATTTACTGCCTTTTCAGCCCGCGTAACCCGAAACATGTGGCC
          ::::::::::::::
tp265  GTCTGTGATTCGGCTCCATTTACTGCCTTTTCAGCCCGCGTAACCCGAAACATGTGGCC
          550      560      570      580      590      600

          200     210     220     230     240     250
RP 902 ACCTTTGGGCATATGTTTGGCCGCTCTTGCGCCGCTGTTTGGCCTGAAAGTTGAGTGCCGT
          ::::::::::::::
tp265  ACCTTTGGGCATATGTTTGGCCGCTCTTGCGCCGCTGTTTGGCCTGAAAGTTGAGTGCCGT
          610      620      630      640      650      660

          260     270     280     290     300     310
RP 902 AAACCTACAGACGCTGAAAGCTACGGCAATGCTATCTATATCGCTAACCACCAGAACAAC
          ::::::::::::::
tp265  AAACCTACAGACGCTGAAAGCTACGGCAATGCTATCTATATCGCTAACCACCAGAACAAC
          670      680      690      700      710      720

          320     330     340     350     360     370
RP 902 TATGACATGGTGACAGCATCGAACATCGTGCAACCGCCGACGGTGACGGTAGGTA AAAAAG
          ::::::::::::::
tp265  TATGACATGGTGACAGCATCGAACATCGTGCAACCGCCGACGGTGACGGTAGGTA AAAAAG
          730      740      750      760      770      780

          380     390     400     410     420     430
RP 902 AGCTTGCTGTGGATCCCCTTCTTCGGGCAGTTGTACTGGTTAACCGGCAACTTATTGATC
          ::::::::::::::
tp265  AGCTTGCTGTGGATCCCCTTCTTCGGGCAGTTGTACTGGTTAACCGGCAACTTATTGATC
          790      800      810      820      830      840

          440     450     460     470     480     490
RP 902 GACAGAAACAATCGCACTAAAGCTCACGGCACCATTGCGGAAGTAGTGAATCACTTCAAA
          ::::::::::::::
tp265  GACAGAAACAATCGCACTAAAGCTCACGGCACCATTGCGGAAGTAGTGAATCACTTCAAA
          850      860      870      880      890      900

          500     510     520     530     540     550
RP 902 AAACGCCGTATTTCCATCTGGATGTTCCCGGAAGGAACCCGCAGCCGTGGTCGCGGCCCTG
          ::::::::::::::
tp265  AAACGCCGTATTTCCATCTGGATGTTCCCGGAAGGAACCCGCAGCCGTGGTCGCGGCCCTG
          910      920      930      940      950      960

```

ANNEX 1: SEQÜENCIACIONS

```

    560      570      580      590      600      610
RP 902 CTACCGTTCAAGACTGGAGCATTTTCACGCGGCAATTGCGGCGGGCGTCCCATTATTCCC
      :
      :
      :
tp265 CTACCGTTCAAGACTGGAGCATTTTCACGCGGCAATTGCGGCGGGCGTCCCATTATTCCC
      970      980      990      1000     1010     1020

    620      630      640      650      660      670
RP 902 GTGTGCGTCTCTACAACCTCGAATAAGATTAATCTTAATCGACTGCACAACGGTCTGGTG
      :
      :
      :
tp265 GTGTGCGTCTCTACAACCTCGAATAAGATTAATCTTAATCGACTGCACAACGGTCTGGTG
      1030     1040     1050     1060     1070     1080

    680      690      700      710      720      730
RP 902 ATTGTCGAAATGCTGCCGCCAATTGACGTCAGTCAGTATGGCAAAGATCAGGTTCTGTGAG
      :
      :
      :
tp265 ATTGTCGAAATGCTGCCGCCAATTGACGTCAGTCAGTATGGCAAAGATCAGGTTCTGTGAG
      1090     1100     1110     1120     1130     1140

    740      750      760      770      780      790
RP 902 CTGGCTGCCCATTTGTCGTTTCGATAATGGAACAAAAAATCGCCGAGCTCGATAAAGAAGTC
      :
      :
      :
tp265 CTGGCTGCCCATTTGTCGTTTCGATAATGGAACAAAAAATCGCCGAGCTCGATAAAGAAGTC
      1150     1160     1170     1180     1190     1200

    800      810      820      830      840      850
RP 902 GCAGAACCGGAAGCCCGCCGAAAAGTTTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC
      :
      :
      :
tp265 GCAGAACCGGA-GCCGCCG-AAAAGTN-----CNGGGN-----
      1210     1220                                     1230

    860      870      880      890      900
RP 902 TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGTTTTTTTG
tp265 -----

```

**Seqüències del plasmidi pET44b(+)-mg517**

**T7 promotor**

```

    70      80      90      100     110
mg 517 AGGCAAATTCTGTTTTATCAGCCTAGGCCGGGGATCC-TTA-GTTA-TCTGA--TTTAG-
      :
      :
      :
tp231c TTTTTTATTTCNGNCCNA--NGGCCCGG--GGGGATCCCTTANGTTANTCTGGATTTTAGN
      40      50      60      70      80

    120     130     140     150     160
mg 517 ATTCC---AAAACATGTTTAAAA-TATTTT-AGTC--GCTGTACCC--AAATATAG-TAA
      :
      :
      :
tp231c ATTCCCAAAAACCANGTTTAAAAATATTTTNGNCCGGCGGNACCCNAAAAATAGGNAA
      90     100     110     120     130     140

    170     180     190     200     210
mg 517 ATACC--TTGATTTTTTG-TTTG--AAAAACACGTTT-ATAAA-CTCC-ATTTTTTTTCCA
      :
      :
      :
tp231c ATACCCNINCATTTTTTGTTTGGAAAAANCCCGNTCCATAAANCTCCCATTTTTTTNCCA
      150     160     170     180     190     200

```





ANNEX 1: SEQÜENCIACIONS

```

      810      820      830      840      850      860
mg 517 TTTTATGACATTTTGTGTTAAAAACAATCATCAGGATCGATAAAAATAAAAATAAGGTGT
      :
tp231c TTTTATGACATTTTGTGTTAAAAACAATCATCAGGATCGATAAAAATAAAAATAAGGTGT
      810      820      830      840      850      860

      870      880      890      900      910      920
mg 517 TGTTACTAGATTCAGTCTTATCACGCACCTTTCCAATACCTTCATTCTGTTTGTGACA
      :
tp231c TGTTACTAGATTCAGTCTTATCACGCACCTTTCCAATACCTTCATTCTGTTTGTGACA
      870      880      890      900      910      920

      930      940      950      960      970      980
mg 517 ATAGACTTCAATTGCTAAGTTATTGTGTTCTTTTTTGAATTTTTTGCAAAACTTCATAGGT
      :
tp231c ATAGACTTCAATTGCTAAGTTATTGTGTTCTTTTTTGAATTTTTTGCAAAACTTCATAGGT
      930      940      950      960      970      980

      990      1000      1010      1020      1030      1040
mg 517 TTCATCAGCAACATTGTCATTGAAAAAATAATTTTAGCTTGATTAAGATCTTGCTTTAA
      :
tp231c TTCATCAGCAACATTGTCATTGAAAAAATAATTTTAGCTTGATTAAGATCTTGCTTTAA
      990      1000      1010      1020      1030      1040

      1050      1060      1070      1080      1090      1100
mg 517 AAGTGAATTAAAAAACGTTTTAAAAAAGGTTTTGATTTGTAACAAGGAACATAATATACT
      :
tp231c AAGTGAATTAAAAAACGTTTTAAAAAAGGTTTTGATTTGTAACAAGGAACATAATATACT
      1050      1060      1070      1080      1090      1100

      1110      1120      1130      1140      1150      1160
mg 517 AACCAAGTTTATCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGG
      :
tp231c AACCAAGTTTATCCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATA--TTC-AGAGGG
      1110      1120      1130      1140      1150      1160

      1170      1180      1190      1200      1210
mg 517 GAATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATT
      :
tp231c AA--TGT-----CCCC-----ANCN
      1170

```

**Mg335.2 W197α**

```

      610      620      630      640      650      660
mg517 CGCTACTGCCGCCAGGCAAATTCGTGTTTTATCAGCCTAGGCCGGGGATCCTTAGTTATCT
      :
tp233 CGCTACTGCCGCCAGGCAAATTCGTGTTTTATCAGCCTAGGCCGGGGATCCTTAGTTATCT
      310      320      330      340      350      360

      670      680      690      700      710      720
mg517 GATTTAGATTCCAAAACATGTTTAAAAATATTTTAGTCGCTGTACCCAAATATAGTAAATA
      :
tp233 GATTTAGATTCCAAAACATGTTTAAAAATATTTTAGTCGCTGTACCCAAATATAGTAAATA
      370      380      390      400      410      420

```

ANNEXES

---

	730	740	750	760	770	780
mg517	CCTTGATTTTTTTGTTTGAAAAACACGTTTCATAAACTCCATTTTTTTTCCAAAAAACAAAT					
	::					
tp233	CCTTGATTTTTTTGTTTGAAAAACACGTTTCATAAACTCCATTTTTTTTCCAAAAAACAAAT					
	430	440	450	460	470	480
	790	800	810	820	830	840
mg517	AGTTTTTCAAGAATTTTTTTTGATTCAGAAAAATTTTTCTTAAAGTATTCAAAGCTGAAA					
	::					
tp233	AGTTTTTCAAGAATTTTTTTTGATTCAGAAAAATTTTTCTTAAAGTNTTCAAAGCTGANA					
	490	500	510	520	530	540
	850	860	870	880	890	900
mg517	AGTGCAAACCAAACAAACATTTGCCTTCTCCAAAACCTAGCTTCAATCTTATGATTTGGA					
	::: :::::::::::::::::::::::::: ::					
tp233	AGTNCAAACCAAACAAACATTTNGCCTTCTCCAAAACCTAGCTTCAATCTTATGATTTGGA					
	550	560	570	580	590	600
	910	920	930	940	950	960
mg517	TCAATAAAAACCTTGCAAGAGAACCATTTTGGCTGAGATTTACATATAGCTTTTCATAACAT					
	::					
tp233	TCAATAAAAACCTTGCAAGAGAACCATTTTGGCTGAGATTTACATATAGCTTTTCATAACAT					
	610	620	630	640	650	660
	970	980	990	1000	1010	1020
mg517	TGGATTAAATTTAAGTAGCGTGGAGCACTAATAGTAGTTGATAAACTATCATTACGAATA					
	::					
tp233	TGGATTAAATTTAAGTAGCGTGGAGCACTAATAGTAGTTGATAAANGGTCATTACGAATA					
	670	680	690	700	710	720
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
mg517	AAATAATTTGTTCCCTATCACATCAATAAAAAACAATTTTTTTGTGATGAAAAAACATCGGA...					
	::					
tp233	AAATAATTTGTTCCCTATCACATCAATAAAAAACAATTTT-----					
	730	740	750	760		

---



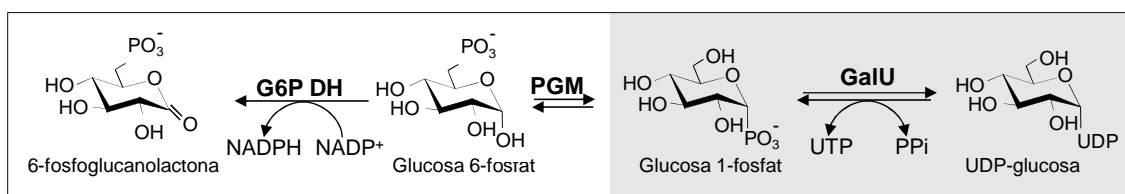
## Annex 2: Desenvolupament dels assaigs d'activitat

Tal com s'indica en el Capítol 3, s'han posat a punt tres assaigs que permeten determinar l'activitat uridiltransferasa de l'enzim GalU, aciltransferasa del PlsC i glicosiltransferasa del MG517 dels extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica. A continuació se'n detallen els passos realitzats i les característiques de cada un.

### A2.1 ASSAIG D'ACTIVITAT PER L'ENZIM GALU

Tal com ja s'ha comentat, l'enzim UDP-Glc pirofosforilasa o GalU d'*E.coli* transforma la glucosa 1-fosfat a UDP-Glc convertint el nucleòtid UTP a pirofosfat (PPi). A la Figura 77 s'observa que aquesta reacció es pot donar en els dos sentits, és a dir, formant l'UDP-Glc o, al contrari, passant d'UDP-Glc a glucosa 1-fosfat (Lai *et al.*, 2008).

Per determinar l'activitat enzimàtica d'aquesta proteïna s'ha desenvolupat l'assaig acoblat espectrofotomètric següent. La Figura 77 mostra que en presència de UDP-Glc i PPi, l'enzim GalU formarà glucosa 1-fosfat. Aquesta passarà a glucosa 6-fosfat gràcies a la presència de l'enzim fosfoglucomutasa o PGM i, finalment, l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa o G6P DH duu a terme la reacció indicadora en què el sucre és oxidat a 6-fosfogluconolactona i l' $\text{NADP}^+$  es redueix a NADPH. L'augment en la concentració d'NADPH al medi al llarg del temps es pot seguir en continu a 340nm. (Looijesteijn *et al.*, 1999 i Boels *et al.*, 2001).



**Figura 77: Reacció de l'assaig acoblat dissenyat per a la quantificació de l'activitat enzimàtica de l'enzim GalU.** A l'activitat uridiltransferasa o GalU s'acobla l'enzim fosfoglucomutasa (PGM) i l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH).

#### A2.1.1 Desenvolupament del mètode

Per tal que l'assaig acoblat representi la reacció d'interès, implica que les reaccions acoblades no han de ser limitants. D'aquesta forma, s'assegura que la formació en aquest

cas d'NADPH tingui concordança amb l'activitat enzimàtica del GalU. És per aquest motiu que el desenvolupament del mètode consta de diferents etapes. En primer lloc es caracteritzen cadascun dels enzims acoblats que participen en l'assaig i se'n determina la concentració necessària per assegurar que la seva reacció no sigui limitant. En segon lloc, es caracteritza la reacció amb l'enzim GalU purificat comercial. I, finalment, es determina l'activitat enzimàtica del GalU present en els extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica.

Totes les reaccions es duen a terme amb tampó Tris-HCl a pH 7.8 i 30 °C en presència de  $MgCl_2$  que actua com a cofactor tant de l'enzim fosfoglucomutasa com de l'UDP-Glc pirofosforilasa (Kamogawa i Kurahashi, 1965). Aquestes reaccions se segueixen en un lector de microplaques i la formació d'NADPH es mesura a 340nm cada minut durant mitja hora. Els valors d'absorbància s'interpolen a una recta patró d'NADPH com la que es mostra en la Figura 78.

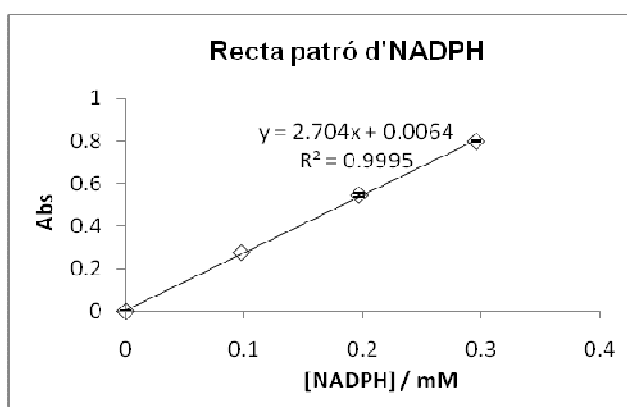
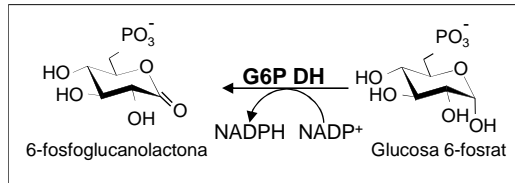


Figura 78: Recta patró d'NADPH per l'assaig acoblat.

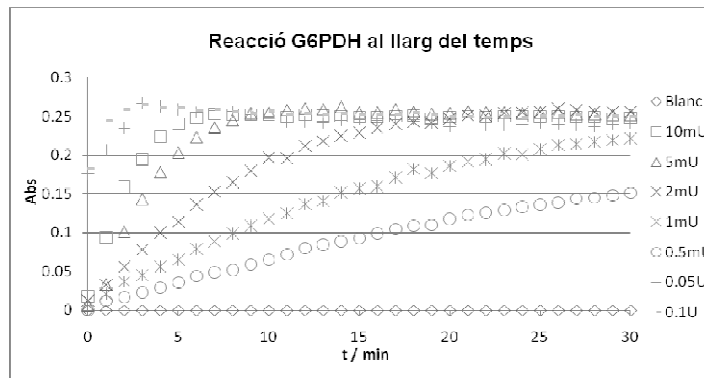
#### A2.1.1.1 Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH)

La reacció indicadora de l'assaig acoblat es basa en la reducció de l'NADP<sup>+</sup> catalitzada per la glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH) (Figura 79). Aquesta reacció es duu a terme a diferents concentracions de l'enzim G6P DH comercial en presència de glucosa 6-fosfat 0.1mM, NADP<sup>+</sup> 0.3mM sota les condicions de treball comentades anteriorment a pH 7.8 i 30 °C. L'evolució de les reaccions se segueix amb el lector de microplaques cada minut durant mitja hora.



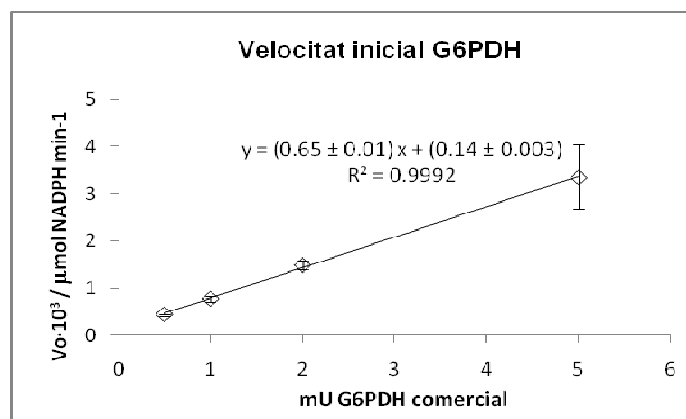
**Figura 79: Reacció de l'enzim glucosa 6-fosfat deshidrogenasa (G6P DH), reacció indicadora de l'assaig acoblat.**

La Figura 80 mostra les corbes de progrés a diferents concentracions de G6P DH comercial.



**Figura 80: Corbes de progrés de l'activitat enzimàtica de G6P DH.**

A la Figura 81 es mostra la velocitat de reacció per les concentracions 0.5, 1, 2 i 5 mU nominals de l'enzim comercial. Tal com s'observa, la relació entre la velocitat de formació d'NADPH i la quantitat d'enzim emprat és lineal, comportament típic de reacció enzimàtica, i presenta una activitat específica de  $6.47 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol d'NADPH min}^{-1} \text{mU}^{-1}$ .



**Figura 81: Velocitat inicial respecte la quantitat d'enzim G6P DH (expressada en unitats nominals d'enzim comercial) a 30 °C.** Les condicions de treball són: Tris – HCl 50 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, NADP<sup>+</sup> 0.3 mM, glucosa 6-fosfat 0.1 mM i G6P DH entre 0.5 i 5 mU.

Tot i que a 0.1U d'enzim comercial, la reacció és immediata, s'escull la concentració de 0.5U per l'assaig acoblat per assegurar que la reacció no sigui limitant. En cada experiment es comprova aquesta condició.

### A2.1.1.2 Fosfoglucomutasa (PGM)

Un cop determinada la quantitat necessària de G6P DH per tal que la reacció enzimàtica sigui instantània, s'acobla la reacció catalitzada per la fosfoglucomutasa (PGM) Figura 82. D'aquesta forma es pretén trobar la concentració d'enzim PGM en que es doni la conversió de glucosa 1-fosfat a glucosa 6-fosfat i alhora aquesta passi a 6-fosfoglucanolactona de forma immediata per l'acció de la G6P DH. Per això es duen a terme aquestes reaccions a diferents concentracions de PGM, en presència de l'enzim G6P DH a 0.5U, glucosa 1-fosfat 0.1mM com a reactiu inicial,  $\text{NADP}^+$  0.3 mM,  $\text{MgCl}_2$  14 mM que actua com a cofactor de l'enzim PGM a pH 7.8 i 30 °C.

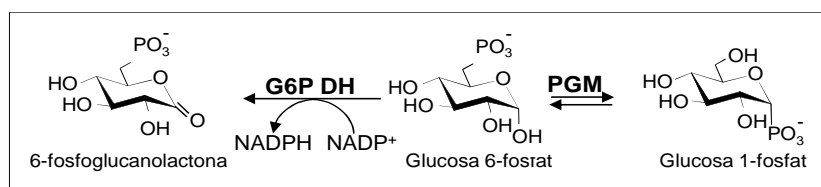


Figura 82: Reaccions dels enzims fosfoglucomutasa (PGM) i G6P DH.

La Figura 83 mostra que les velocitats de reacció de formació d' $\text{NADPH}$  a concentracions entre 10 i 100 mU de PGM comercial segueix la linealitat amb una activitat específica de  $1.35 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mU}^{-1}$  de PGM comercial. Per tant, la formació d' $\text{NADPH}$  respon a la reacció de glucosa 1-fosfat a glucosa 6-fosfat de l'enzim PGM, confirmant que la reacció de G6P DH en aquestes condicions és immediata.

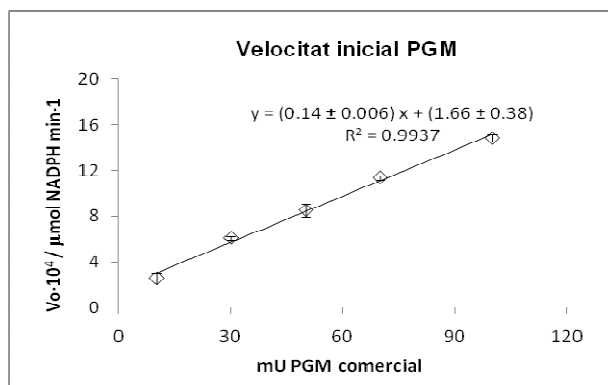


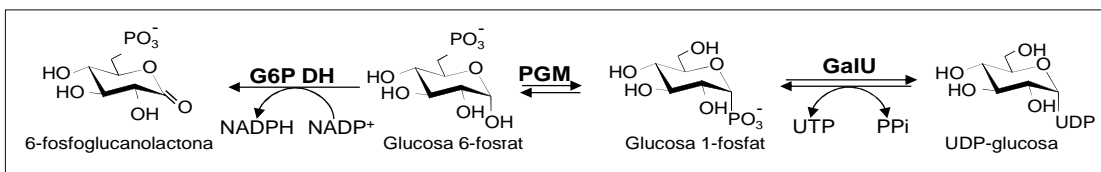
Figura 83: Velocitat inicial respecte la quantitat d'enzim PGM (expressada en unitats nominals d'enzim comercial) a 30 °C. Les condicions de treball són: Tris – HCl 50 mM pH 7.8,  $\text{MgCl}_2$  14 mM,  $\text{NADP}^+$  0.3 mM, glucosa 1-fosfat 0.1 mM, G6P DH 0.5U i PGM entre 10 i 100 mU.



L'enzim PGM es troba en suspensió de sulfat amònic la qual cosa suposa una variabilitat en la concentració d'enzim i també a l'assaig. De totes maneres, donat que en les condicions en que es treballarà es troba en gran excés, aquest aspecte no és un problema. La quantitat d'enzim PGM que es defineix per emprar en l'assaig acoblat és de 1.6U per reacció. Tal i com es veurà més endavant, sota aquestes condicions, el pas de glucosa 1-fosfat a glucosa 6-fosfat és instantani. Aquest fet també es comprova en cada experiment de l'assaig acoblat.

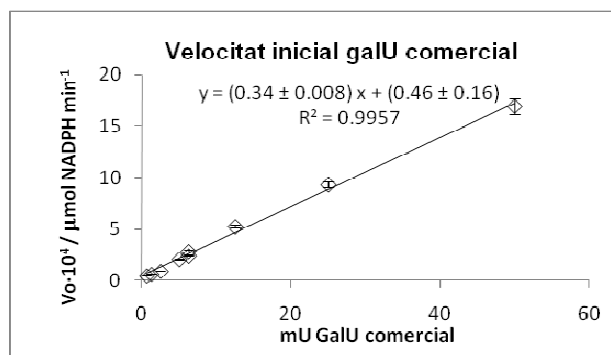
### A2.1.1.3 UDP – glucosa pirofosforilasa

Finalment, abans d'analitzar l'activitat de GalU dels extractes cel·lulars de cada una de les soques, s'ha estudiat el comportament de l'enzim GalU comercial. Per això, es duu a terme tota la reacció de l'assaig acoblat, tenint com a reactius UDP – glucosa, àcid pirofosfòric i NADP<sup>+</sup> i alliberant com a productes la 6-fosfogluconolactona i l'NADPH (Figura 84). Els enzims emprats en la reacció són la G6P DH, la PGM i l'enzim GalU comercials.



**Figura 84: Reaccions de l'assaig acoblat amb GalU, PGM i G6P DH comercials.**

Es treballa en un marge de concentracions de GalU entre 0.6 i 50 mU expressat en unitats nominals d'enzim comercial, en 0.1 mM d'UDP – glucosa, 4 mM d'àcid pirofosfòric i 0.3 mM d'NADP<sup>+</sup>, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U G6P DH i 1.6U PGM a pH 7.8 i 30 °C. L'absorbància es mesura cada minut durant mitja hora.



**Figura 85: Velocitat inicial respecte la quantitat d'enzim GalU comercial (expressat en unitats nominals d'enzim comercial) a 30 °C.** Les condicions de treball són: Tris – HCl 50 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 14 mM, NADP<sup>+</sup> 0.3 mM, UDP-Glc 0.1 mM, G6P DH 0.5 U, PGM 1.6 U i GalU comercial entre 0.6 i 50 mU.

En la Figura 85 es representa la velocitat de reacció obtinguda seguint el procés de reducció d' $\text{NADP}^+$  respecte les mU d'enzim GalU. S'observa que en augmentar la concentració d'enzim GalU, la velocitat augmenta de forma lineal entre 0 i 50 mU nominals d'enzim comercial donant una activitat específica de  $3.36 \cdot 10^{-5} \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mU}^{-1}$ . El comportament lineal amb la concentració de GalU implica que les dues reaccions acoblades són instantànies i, per tant, la reacció GalU és la limitant.

A partir d'aquí, es determinen les activitats enzimàtiques de l'enzim GalU present en els extractes cel·lulars de les soques modificades. Per això, es realitzen cultius de les soques abc, que no sobreexpressa la proteïna GalU, i aBc que sí que la sobreexpressa. Així, es compara l'activitat basal provinent de l'expressió del genoma bacterià amb l'activitat en sobreexpressar l'enzim.

Es fan créixer les dues soques en 50 mL de medi definit i es mantenen a 37 °C durant tota la nit. A continuació, s'indueixen i es mantenen durant 5h a la mateixa temperatura. Després d'aquest temps es lisen les cèl·lules per sonicació i s'obté l'extracte cel·lular. La proteïna total de cada un d'ells es mesura pel mètode de Bradford emprant BSA com a patró. Un cop realitzades les reaccions a diferents concentracions d'extracte, es calculen les activitats específiques, els valors de les quals es mostra en la Taula 45 juntament amb la desviació estàndard.

**Taula 45: Activitat específica per l'enzim GalU de les soques abc i aBc.**

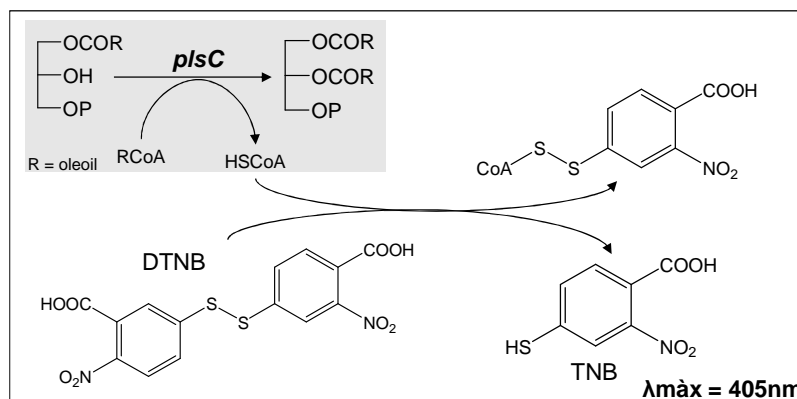
Soca	$V_o / U \text{ mg}^{-1} \text{ proteïna total}$	Error
abc	0.002	0.0008
aBc	0.35	0.06

Tal com ja s'ha comentat en el Capítol 3, en sobreexpressar l'enzim GalU es produeix un augment de la seva activitat d'unes 180 vegades.

## A2.2 ASSAIG D'ACTIVITAT PER L'ENZIM PLSC

L'enzim PlsC té com a reactius l'àcid gras activat amb coenzim A (RCoA) i l'1-acilglicerol 3-fosfat o monoacilglicerolfosfat. S'ha dissenyat un mètode continu directe per mesurar aquesta reacció en el que es fa reaccionar el HSCoA amb el reactiu d'Ellman emprat en la determinació de sulfhidrils lliures (Ellman, 1959). Aquest reactiu d'Ellman, és a dir, l'àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) o DTNB reacciona amb els grups tiols intercanviant l'enllaç disulfur i donant com a producte reduït el 2-nitro-5-tiobenzoat o TNB que, en medi neutre o bàsic, és de color groc. D'aquesta manera, l'augment de la mesura espectrofotomètrica a

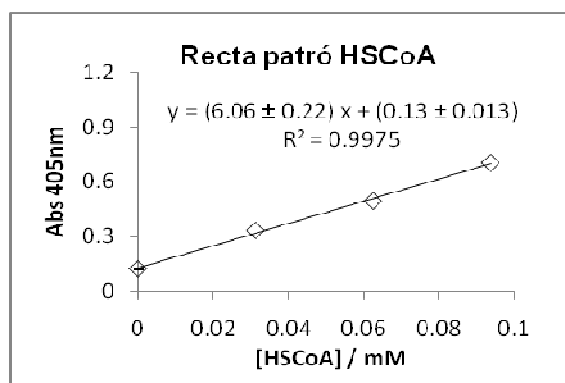
405nm indicadora de TNB permet detectar la formació de l'HSCoA i, per tant, l'activitat de l'enzim PlsC d'interès.



**Figura 86:** Assaig per determinar l'activitat de l'enzim PlsC acoblant la reacció de l'àcid 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoic) o DTNB amb l'HSCoA.

### A2.2.1 Desenvolupament del mètode

Per tal de desenvolupar el mètode, en primer lloc es posa a punt la reacció entre HSCoA i el DTNB per definir la zona en què la reacció té una resposta lineal. Es treballa a concentracions de DTNB de 0.1 mM, en la que no es troba saturat, i HSCoA entre 0 i 0.1 mM en presència de tampó Tris – HCl 0.1 M a pH 9.0, BSA 1 mg/ mL i MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM que faciliten l'estabilització de les proteïnes. Aquestes concentracions són les òptimes per la posterior reacció enzimàtica del PlsC. Les reaccions se segueixen a 405 nm cada mig minut durant deu minuts. En la Figura 87 es mostra com a concentracions entre 0 i 0.1 mM de HSCoA el TNB format a partir del DTNB i el HSCoA presenta una resposta lineal.

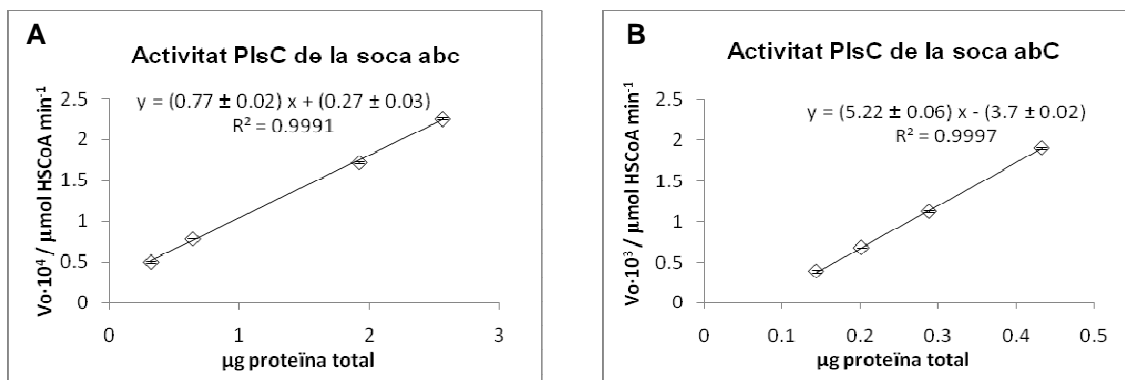


**Figura 87:** Recta patró de l'HSCoA. Les condicions de treball emprades són: Tris – HCl 0.1 M a pH 9.0, DTNB 0.1 mM, HSCoA entre 0 i 0.1 mM, BSA 1 mg/ mL, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM i OleoilSCoA 50 mg/L.

Posteriorment, s'acobla la reacció d'interès amb l'enzim PlsC. Degut a què no existeix l'enzim comercial d'*E.coli*, el desenvolupament del mètode es realitza directament a partir dels extractes cel·lulars de les soques abc que no conté l'enzim PlsC sobreexpressat i la abC que sí que el sobreexpressa. Per tant, es compara la soca abc que presenta l'activitat PlsC basal d'*E.coli* que ve codificada pel seu ADN genòmic i la soca abC en la que, a més a més, s'ha introduït el gen.

Després de fer créixer les dues soques en 50 mL de medi definit a 37 °C, induir amb l'addició d'IPTG i incubar durant 5h, es procedeix a la lisi cel·lular proposada en el capítol anterior. Així doncs, després de varies sonicacions, es recupera l'extracte cel·lular amb les proteïnes solubles. Per una banda, es mesura la proteïna total mitjançant Bradford i, per altra banda, es procedeix a la mesura de l'activitat del PlsC. Per això, s'utilitza com a font de RCoA l'OleoilSCoA a 50 mg/L i 1-oleoilglicerol 3-fosfat 50 mg/L dissolts en tampó Tris – HCl 0.1 M a pH 9.0, DTNB 0.1 mM com a reactius i BSA 1 mg/ mL i MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM per establir les proteïnes. Es preparen diferents reaccions, cada una amb diferents alíquotes d'extracte cel·lular i, per tant, amb concentracions variants de proteïna total. Posteriorment, s'incuba a 30 °C durant 10 min i es llegeix a 405 nm cada mig minut.

La Figura 88 i la Taula 46 mostren els μmols d'HSCoA formats per min<sup>-1</sup> respecte la quantitat de proteïna pel que fa les soques abc i abC que només difereixen en la sobreexpressió de la proteïna PlsC. Així doncs, en el gràfic A, s'observa l'activitat enzimàtica basal d'*E.coli* de l'extracte cel·lular entre 0 i 3 μg de proteïna total, mentre en el B es mostra l'activitat de l'enzim de l'extracte cel·lular en ser sobreexpressat. Tal i com es veu la resposta és lineal en tots dos casos. Per tant, la formació d'HSCoA respon a l'activitat enzimàtica PlsC. Aquesta activitat passa de 0.077 U mg<sup>-1</sup> proteïna total a 5.22 U mg<sup>-1</sup> proteïna total en sobreexpressar l'enzim, és a dir, l'activitat enzimàtica en aquest últim augmenta unes 70 vegades l'activitat basal d'*E.coli*.



**Figura 88: Velocitats inicials de l'activitat PlsC de les soques abc i abC.** Les condicions de treball emprades són: Tris – HCl 0.1 M a pH 9.0, DTNB 0.1 mM, BSA 1 mg/ mL, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, OleoilSCoA 50 mg/L i 1-oleoilglicerol 3-fosfat 50 mg/L.

Taula 46: Activitat específica per l'enzim PlsC de les soques abc i abC.

Soca	Vo / U mg <sup>-1</sup> proteïna total	Error
abc	0.077	0.002
abC	5.22	0.06

Per tant, l'activitat enzimàtica del PlsC es pot mesurar a partir de la quantitat del seu producte HSCoA mitjançant la reacció amb DTNB sota les condicions de treball seleccionades. Així, es procedeix a determinar les activitats enzimàtiques de les soques modificades per enginyeria metabòlica presentades anteriorment en el Capítol 3.

### A2.3 ASSAIG D'ACTIVITAT PER L'ENZIM MG517

La reacció enzimàtica per determinar l'activitat glicosiltransferasa MG517 utilitza el donador UDP-galactosa i l'acceptor DOG tal com es mostra a la Figura 89.

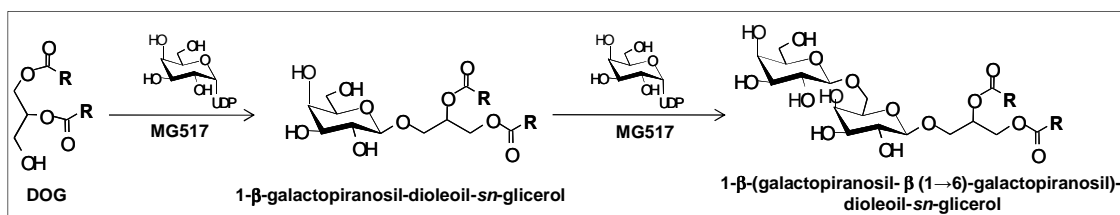


Figura 89: Reaccions catalitzades per l'enzim MG517 a partir de DOG i UDP-galactosa.

Al laboratori, s'ha desenvolupat un assaig radiomètric discontinuo per determinar l'activitat glicosiltransferasa MG517 (Andrés *et al.*, 2011). En aquest assaig s'utilitza el donador UDP-galactosa marcat radioactivament amb <sup>14</sup>C en tots els seus carbonis i l'acceptor 1,2-dioleoilglicerol (DOG). Les condicions de reacció són <sup>14</sup>C<sub>6</sub> UDP-Gal 1 mM amb una relació 1/200 calent/fred, DOG 1.25 mM, DOPG 12.5 mM, CHAPS 20 mM, HEPES 20 mM i MgCl<sub>2</sub> 20 mM a pH 8 en què l'enzim, proteïna associada a la membrana, és estable i funcional. Al llarg de la reacció es van traient alíquotes i, després d'un procés d'extracció dels glicoglicerolípids marcats radioactivament, s'afegeix el líquid de centelleig. La lectura al comptador dona les cpm referents a la formació dels glicoglicerolípids radioactius.

#### A2.3.1 Adaptació del mètode desenvolupat

En primer lloc, es comprova la viabilitat del mètode per mesurar l'activitat enzimàtica de MG517 en els extractes cel·lulars de les soques modificades per enginyeria metabòlica. Es fan créixer les soques abc i Abc, la primera sense cap gen i la segona amb el gen *mg517*. El creixement es realitza en 50 mL de medi definit a 37 °C, a continuació s'indueix amb

l'addició d'IPTG 1 mM i s'incuba durant 5h. Les cèl·lules obtingudes es resuspenen en tampó de lisi 22 mM CHAPS; 20 mM HEPES a pH 8, 500 mM NaCl i 10% glicerol, dissenyat per una extracció millor d'aquesta proteïna. Un cop aplicades totes les sèries de sonicació, es mesura la quantitat de proteïna total dels extractes cel·lulars pel mètode de BCA ja que la presència de detergents interfereix en l'assaig de Bradford.

La reacció entre l'UDP-Gal i el DOG es prepara seguint el Protocol 3.3 esquematitzat en la Figura 90. En primer lloc es prepara l'extracte lipídic, és a dir, les micel·les que contenen l'acceptor DOG i l'activador DOPG necessari per l'enzim. Per fer-ho, s'addicionen aquests dos lípids dissolts en cloroform i s'evapora a sequedat mitjançant un corrent de nitrogen. Aquests lípids es dissolen en CHAPS, HEPES i  $MgCl_2$  i es facilita la formació de micel·les amb l'ajut de l'ultrasons. A continuació, s'addiciona una concentració d'extracte cel·lular i s'inicia la reacció amb la  $^{14}C_6$  UDP-Gal 1mM amb una relació 1/200.

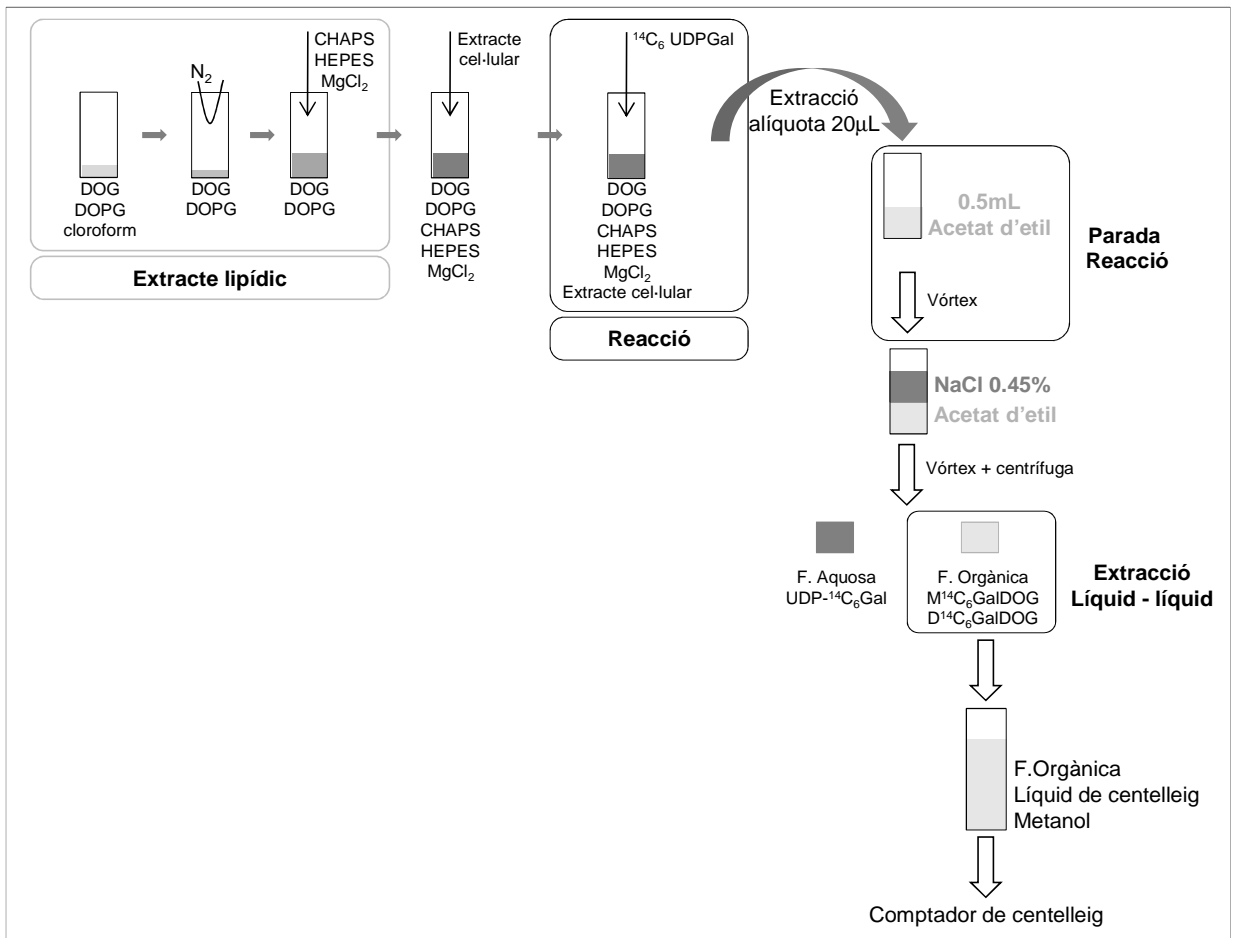
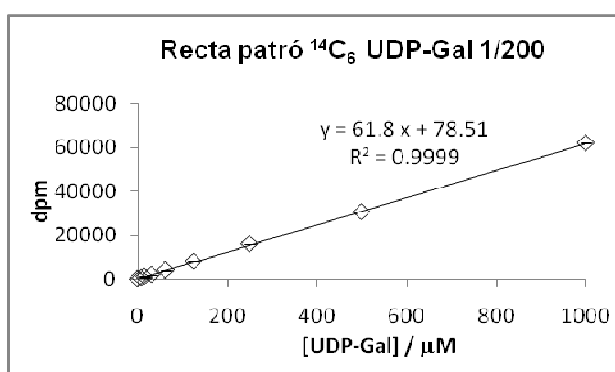


Figura 90: Esquema del procés realitzat en l'assaig radiomètric de l'activitat MG517.

En tractar-se d'un mètode discontinuo, un cop iniciada la reacció es van traient al·lquotes al llarg del temps i s'addicionen a 0.5 mL d'acetat d'etil, la qual cosa fa parar instantàniament la reacció enzimàtica. Amb la finalitat de separar l'excés de substrat donador dels

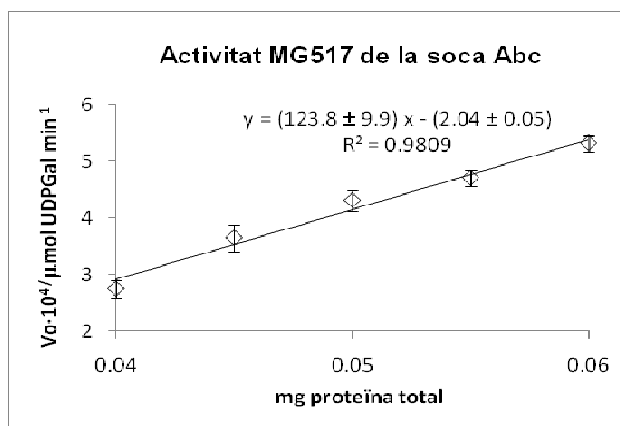
glicolípidis formats, tots ells radioactius, s'aprofita la naturalesa hidrofòbica d'aquests últims i es fa una extracció líquid – líquid afegint una dissolució de NaCl al 0.45% en aigua. D'aquesta forma, l'UDP-Gal passa a la fase aquosa mentre els glicolípidis sintetitzats resten a la fase orgànica d'acetat d'etil. Aquesta s'afegeix a 4 mL de líquid de centelleig i es comptabilitza la seva radioactivitat mitjançant un comptador de centelleig. D'aquesta manera, es quantifica la radioactivitat incorporada a la fracció lipídica, la qual cosa implica la totalitat dels glicoglicerolípidis formats ja siguin MGDAG, DGDAG o TGDAG.

La recta patró es realitza a partir de diferents dilucions de  $^{14}\text{C}_6$  UDP-Gal que s'addicionen al líquid de centelleig (Figura 91).



**Figura 91: Recta patró per l'assaig radiomètric.** Dilucions de  $^{14}\text{C}_6$  UDP-Gal en una relació 1/200 en aigua.

Per la determinació de les activitats específiques de la proteïna MG517 dels extractes cel·lulars, s'utilitza com a blanc la soca abc que no presenta aquesta proteïna. La Figura 92 mostra les diferents velocitats variant la concentració d'extracte cel·lular per la soca Abc amb una activitat específica de  $1.2 \cdot 10^{-2} \text{ U mg}^{-1}$  de proteïna total.



**Figura 92: Gràfic de l'activitat específica de l'enzim MG517 a partir de l'extracte lipídic de la soca Abc.**

Així doncs, les condicions de treball emprades permeten la quantificació de l'activitat enzimàtica de l'MG517 a partir dels extractes cel·lulars obtinguts del creixement en medi definit.



### Annex 3: Desenvolupament dels assaig dels lípids.

Tal com s'ha comentat al Capítol 3, ha estat necessari comptar amb un assaig que permeti la quantificació dels lípids de les soques modificades. A continuació es presenta la validació del mètode UPLC-ES+/TOFMS per quantificar glicoglicerolípid i també la posada a punt de l'assaig radiomètric pels diferents lípids de membrana.

#### A3.1 ANÀLISI UPLC-ES+/TOFMS PER QUANTIFICAR GLICOLICEROLÍPIDS

A partir dels diversos anàlisis desenvolupats en el grup (Julve, *Comunicació personal*), s'escull l'assaig UPLC-ES+/TOFMS per quantificar glicoglicerolípid.

##### A3.1.1 Validació del mètode

La validació del mètode s'ha realitzat a partir d'un patró comercial MGalDEG en què els dos àcids grassos són esteàrics i el sucre és una galactosa tal com es mostra a la Figura 93.

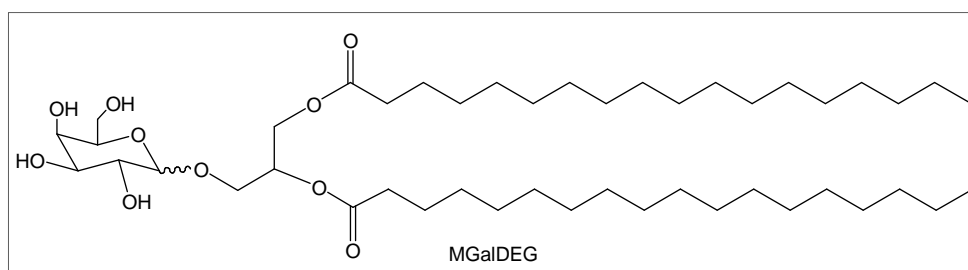


Figura 93: Estructura química del patró MGalDEG.

S'han preparat 21 dissolucions d'aquest patró amb concentracions entre 0.1nM i 128µM en metanol. Aquestes dissolucions es preparen a partir de 1.010mg de MGalDEG dissolt primer en la mínima quantitat de cloroform degut a la seva dificultat de dissolució, i metanol fins a 10 mL.

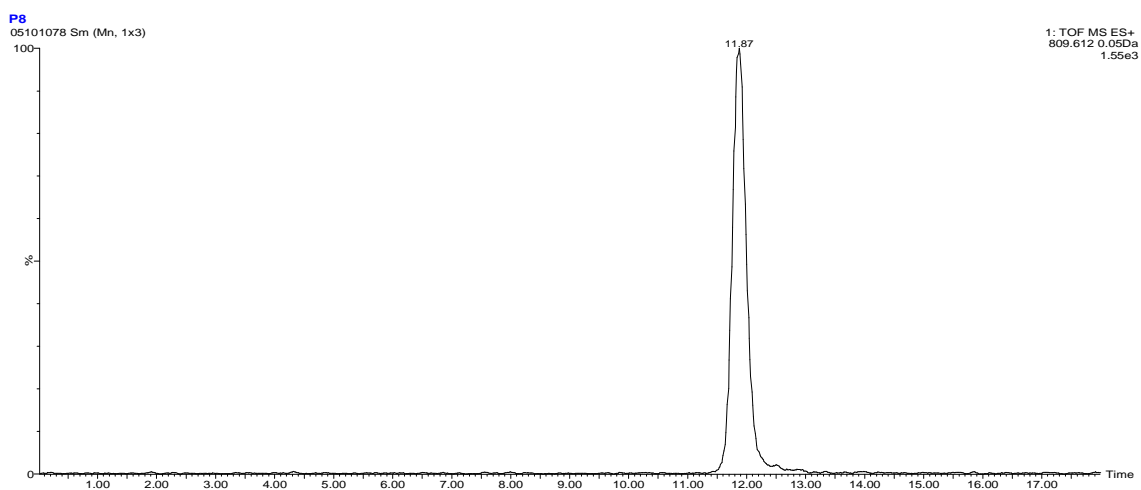
Les condicions cromatogràfiques de l'UPLC – ES+/TOFMS seleccionades per la detecció i quantificació dels glicoglicerolípid es recullen a la Taula 47. Es destaca l'ús d'una columna reversa C-18 i una fase mòbil metanol / aigua (98:2). És important mantenir les

mostres a 8 °C per evitar qualsevol tipus d'evaporació. La leu-encefalina s'injecta constantment en paral·lel a la mostra per tal de tenir en tot moment la massa de referència.

**Taula 47: Condicions cromatogràfiques per l'anàlisi UPLC-ES+/TOFMS**

Cromatògraf	Acquity UPLC TOF Waters
Injector	Automàtic
Temperatura de l'injector	8 °C
Volum d'injecció	5µL
Columna	Acquity UPLC BEH C18 1.7µm*2.1mm*100mm
Fase mòbil	Metanol / Aigua (98:2)
Flux	0.3 mL min <sup>-1</sup>
Temps total	18min
Detector	LCT PremierXE (MicromassMS technologies)
Referència Massa	Leu-encefalina
Scan Mass	50 – 1500 ES+
Scan Time	0.3s
Voltatge referència Cone	50

Un cop injectada la mostra, s'analitza el cromatograma mirant la massa del patró corresponent a l'adducte amb sodi [MGalDEG·Na<sup>+</sup>] de 809.61 ± 0.05 Da . El pic surt a un temps de retenció promig de 11.8 ± 0.09 min. En la Figura 94 es mostra un cromatograma del patró a concentració 0.5 µM.



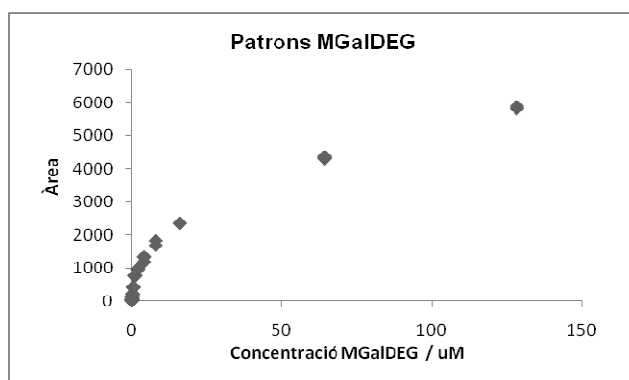
**Figura 94: Cromatograma del patró a 0.5µM de MGalDEG amb massa 809.61. El temps de retenció és de 11.87min.**

En la Taula 48, es presenten la mitjana de les àrees, la desviació estàndard i el coeficient de variació després d'injectar tres mostres de cada concentració de patró.

**Taula 48: Concentracions i respostes del patró MGalDEG.** Es mostra l'àrea mitjana de les tres punxades, la desviació estàndard entre elles i el coeficient de variació (CV) per cada una de les dissolucions.

Dissolucions	[MGalDEG] / $\mu\text{M}$	Àrea mitjana	Desviació estàndard	CV (%)
P0	128	5845.7	38.0	0.6
P1	64	4329.8	29.0	0.7
P3	16	2360.5	5.4	0.2
P4	8	1786.6	84.5	4.7
P5	4	1291.3	85.4	6.6
P6	2	977.3	0.9	0.1
P7	1	766.9	9.0	1.2
P8	0.5	432.7	3.6	0.8
P9	0.2	230.4	2.1	0.9
P10	0.1	121.3	1.0	0.8
P11	$6 \cdot 10^{-2}$	61.7	1.0	1.6
P12	$3 \cdot 10^{-2}$	30.4	2.5	8.3
P13	$2 \cdot 10^{-2}$	25.7	3.3	12.7
P14	$7 \cdot 10^{-3}$	26.5	2.8	10.4
P15	$4 \cdot 10^{-3}$	25.1	0.6	2.4
P16	$2 \cdot 10^{-3}$	26.6	1.6	5.8
P17	$1 \cdot 10^{-3}$	26.1	2.3	8.6
P18	$4 \cdot 10^{-4}$	25.0	2.0	8.3
P19	$2 \cdot 10^{-4}$	24.1	1.2	5.0
P20	$1 \cdot 10^{-4}$	23.9	1.7	7.3

La Figura 95 mostra les àrees respecte la concentració, on a trets generals destaca la tendència no lineal.



**Figura 95: Àrees del cromatograma obtingudes en les tres injeccions de cada dissolució patró respecte la concentració.**

Tot i la tendència mostrada anteriorment, els patrons més diluïts, fins a  $0.5 \mu\text{M}$ , sí que presenten una tendència lineal tal i com es mostra en la Figura 96 A. En la Figura 96 B, es

representen els factors de resposta respecte la concentració d'aquests patrons. Aplicant un marge d'error del 15%, la zona lineal es troba entre els patrons de concentració entre 0.03 i 0.5  $\mu\text{M}$ . Per sota d'aquesta concentració, no és possible observar una relació entre l'àrea detectada i la concentració de la mostra i, per tant, es determina que el límit de quantificació és de 0.03  $\mu\text{M}$ .

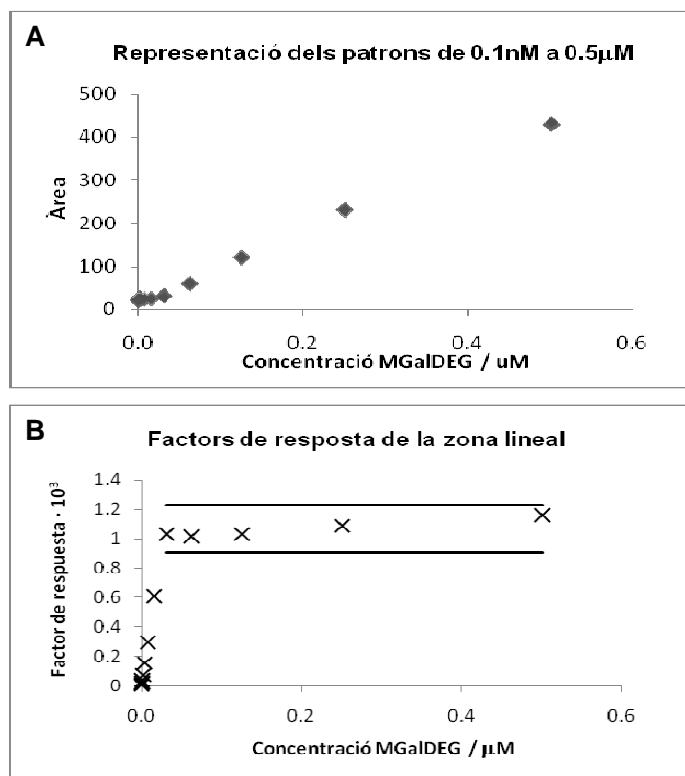


Figura 96: A: Àrees dels patrons entre 0.1nM i 0.5 $\mu\text{M}$ . B: Factors de resposta.

A la Taula 48 s'observa que la repetibilitat per sobre el límit de quantificació, és a dir, els patrons entre 0.03 i 128  $\mu\text{M}$ , presenten una variació menor al 7%. Amb aquests patrons de concentracions entre 0.03 i 128  $\mu\text{M}$ , es busca el millor ajust. Mitjançant el programa GraphPad Prism 4.00, es realitzen diferents ajusts i el que representa millor les dades és l'ajust d'una recta fins a una concentració de 0.5  $\mu\text{M}$  i per concentracions superiors, l'equació potencial corresponent a  $y=ax^b$ . A la Taula 49 es mostren els valors de les constants  $a$  i  $b$  i les de la recta amb les seves desviacions estàndard.

Taula 49: Coeficients dels ajustos recta i potencial  $y=ax^b$  i la seva desviació estàndard.

Ajust	Constant	Valor	Desviació estàndard
Recta $y=mx+c$	m	851.8	17.2
	c	9.8	4.4
Potencial $y=ax^b$	a	713	11.9
	b	0.433	0.004

A la Figura 97 i Figura 98 es mostren l'ajust lineal i el potencial amb els seus residualls emprant les equacions ajustades.

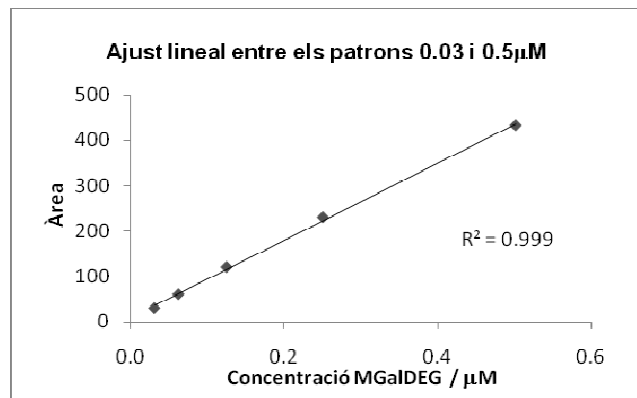


Figura 97: Ajust lineal realitzat entre les concentracions 0.03 i 0.5 μM.

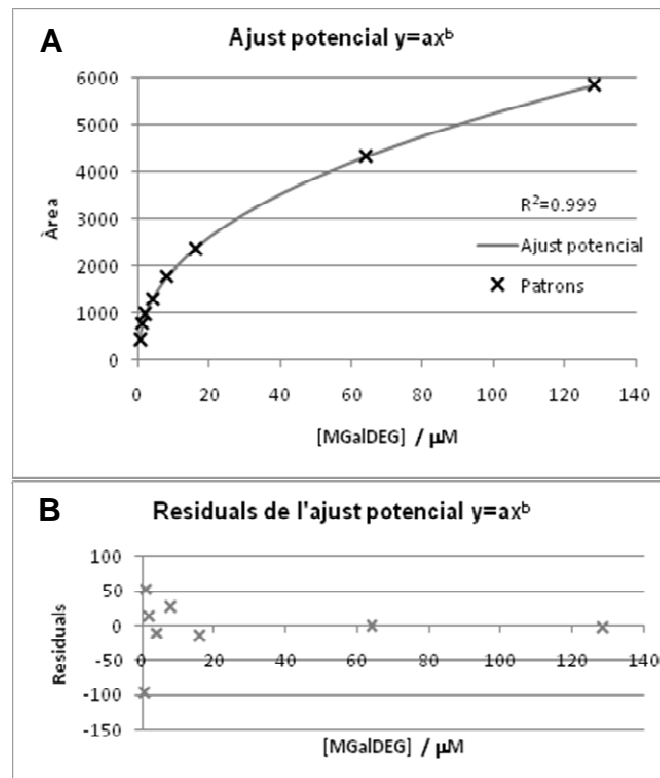


Figura 98: A: Ajust potencial realitzat; B: Residualls per cada concentració.

### A3.1.2 Efecte matriu

L'objectiu d'aquest assaig és quantificar glicoglicerolípids en l'extracte lipídic directament extret amb cloroform / metanol dels botons cel·lulars dels cultius de les cèl·lules d'*E.coli* modificades. Per tant, s'ha d'observar si hi ha algun tipus d'efecte matriu en tenir els glicoglicerolípids en el conjunt d'aquest extracte lipídic. Per això, es preparen mostres en

que es dissol el patró MGalDEG en l'extracte dels lípids obtinguts de la soca abc, és a dir, la soca control que no conté el gen *mg517*.

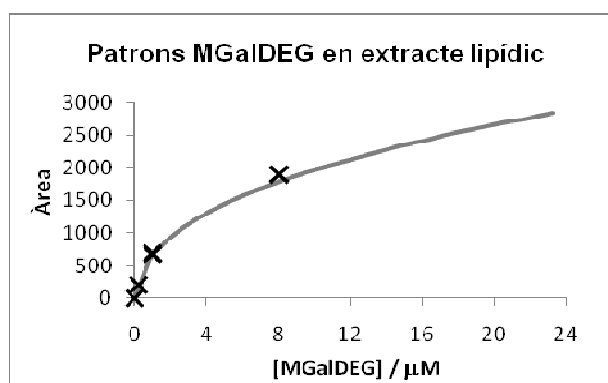
Així, es realitza un creixement de 50 mL de medi definit amb la soca abc i es manté a 37 °C durant tota la nit. Com que la soca conté plasmidis encara que no tinguin els gens introduïts, igualment s'indueix amb d'IPTG i s'incuba 5h a 37 °C. A continuació, es prenen 4 mostres de 10 mL de cultiu, se centrifuguen i es renten amb NaCl 0.9% a 4 °C. Els botons cel·lulars es resuspenen en 500 µL d'una mescla cloroform/metanol (2:1) i es deixen durant 10 min a l'ultrasons. Després de centrifugar per separar les dues fases formades, s'extreuen 250 µL de la fase orgànica i s'evaporen a sequedat amb un corrent de nitrogen. Aquests extractes contenen els diferents lípids d'*E.coli* com són els fosfolípids però no glicoglicerolípid.

Un cop preparats els extractes lipídics de la soca abc, aquests es dissolen amb diferents concentracions de patró MGalDEG amb un volum total de 50 µL de metanol. Un cop injectades les mostres per duplicat a l'UPLC – ES+/TOFMS emprant les condicions de treball comentades anteriorment, s'obtenen les dades de la Taula 50.

**Taula 50: Àrea mitjana, desviació estàndard i coeficient de variació (CV) de MGalDEG amb extracte lipídic.**

Mostra	[MGalDEG] / µM	Àrea mitjana	Desviació estàndard	CV (%)
abc 1	8	1896.8	5.8	0.3
abc 2	1	682.5	18.0	2.6
abc 3	0.3	199.5	1.0	0.5
abc 4	0	0	0	-

En la Figura 99, es representen els valors obtinguts per cada una de les mostres amb extracte injectades, juntament amb l'ajust realitzat en l'apartat anterior.



**Figura 99: Àrees dels patrons dissolts en l'extracte cel·lular de la soca abc i la corba potencial de patrons ajustada.**

En la Taula 51 es mostra la concentració del patró MGalDEG dissolt en l'extracte lipídic, les mitjanes de les àrees obtingudes després d'integrar els cromatogrames i l'àrea calculada a partir de la concentració i l'ajust obtingut en l'apartat anterior. Es calcula l'error entre aquestes dues àrees i el seu CV. Tal i com es pot veure el CV es troba dins el 7% de la repetició i, per tant, no existeix efecte matriu pel que fa a la dissolució dels glicoglicerolípidis en l'extracte lipídic obtingut a partir de cèl·lules d'*E.coli*.

**Taula 51: Concentració del patró MGalDEG dissolt en l'extracte lipídic, mitjana de les àrees d'integració als cromatogrames, àrea calculada a partir de la concentració i l'ajust obtingut en l'apartat anterior, error i CV entre aquestes dues àrees.**

Concentració	Mitjana àrea integrada	Àrea calculada ajust	Error	CV (%)
8	1896.7	1758.2	98.0	5.4
1	682.5	713.8	22.2	3.2
0.3	199.5	223.3	16.9	8.0

Per tant, no és necessari purificar els extractes lipídics i la quantificació dels glicoglicerolípidis es pot realitzar directament per UPLC-ES+/TOFMS.

### **A3.2 AUTORADIOGRAFIA DE CAPA FINA PER DETERMINAR ELS DIFERENTS LÍPIDS DE MEMBRANA**

En el Capítol 3 s'analitzen els lípids de les soques modificades utilitzant un assaig radiomètric per cromatografia de capa fina basat en els estudis realitzats per en Wieslander i els seus col·laboradors (Wikström, *et al.*, 2004), (Klement, *et al.*, 2007) i (Wikström, *et al.*, 2009). A continuació es detalla la posada a punt del mètode. La idea és introduir acetat marcat radioactivament al medi de cultiu per tal que la pròpia cèl·lula sintetitzi els àcids grassos marcats radioactivament. A partir d'aquí es marquen conseqüentment els lípids formats a partir d'aquests, és a dir, els fosfolípids: fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol i cardiolipina i els glicoglicerolípidis: MGDAG, DGDAG i TGDAG. Aquests s'elueixen en una capa fina i per autoradiografia es quantifica el percentatge relatiu de cada lípid.

#### **A3.2.1 Desenvolupament del mètode**

Amb la finalitat de desenvolupar l'assaig radiomètric, en primer lloc es determina la fase mòbil per eluir la cromatografia de capa fina en què s'utilitza sílica com a fase estacionària i, en segon lloc, es determinen les condicions de treball per tal de detectar la radiació emesa pels lípids marcats.

**A3.2.1.1 Selecció de la fase mòbil**

La selecció de la fase mòbil es realitza amb cultius no marcats radioactivament per tal de facilitar-ne la manipulació. Existeixen diferents fases mòbils emprades per la separació de lípids. Les més emprades són les resumides a la Taula 52

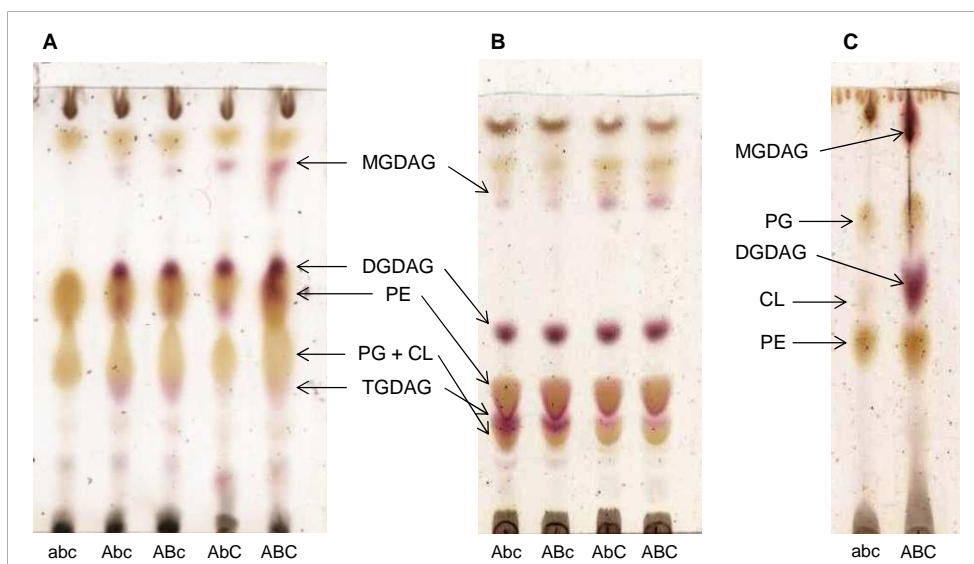
**Taula 52: Fases mòbils més emprades per l'elució de cromatografies de capa fina de glicoglicerolípid.**

Fase mòbil		Lípids separats	Referència
Dissolvents	Proporció		
Cloroform / metanol / aigua	(65:25:4)	MGDAG, DGDAG+PE, TGDAG+PG+CL	Present treball
Cloroform / metanol / àcid acètic	(65:25:10)	MGDAG, CL, PG i PE	Wikström <i>et al.</i> , 2004
Acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua	(25:25:25:11:9)	MGDAG, DGDAG, PG i CL	Present treball basat en Wikström <i>et al.</i> , 2009

Amb la finalitat de seleccionar la fase mòbil que millor separi els components dels extractes lipídics sintetitzats *in vivo* per les soques, es realitzen creixements amb les abc, Abc, ABc, AbC i ABC. Per això, es preparen 5 cultius amb 50 mL de medi definit i es deixen créixer les diferents soques ON a 37 °C. Un cop realitzada la inducció de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i incubat durant 5h més a 37 °C, s'aliqota el cultiu en fraccions de 10 mL i es procedeix a l'obtenció de l'extracte lipídic de cada una de les soques. Per això, se centrifuguen i es renten els botons cel·lulars amb NaCl 0.9% i s'extreuen els lípids amb una mescla cloroform / metanol (2:1). La fase orgànica s'evapora a sequedat i es redissol amb 20 µL de cloroform.

S'elueixen capes fines amb les diferents fases mòbils i es revelen amb una dissolució d'àcid sulfúric / metanol / aigua (45:45:10). En la Figura 100 es mostren els resultats obtinguts per cada una d'aquestes cromatografies.

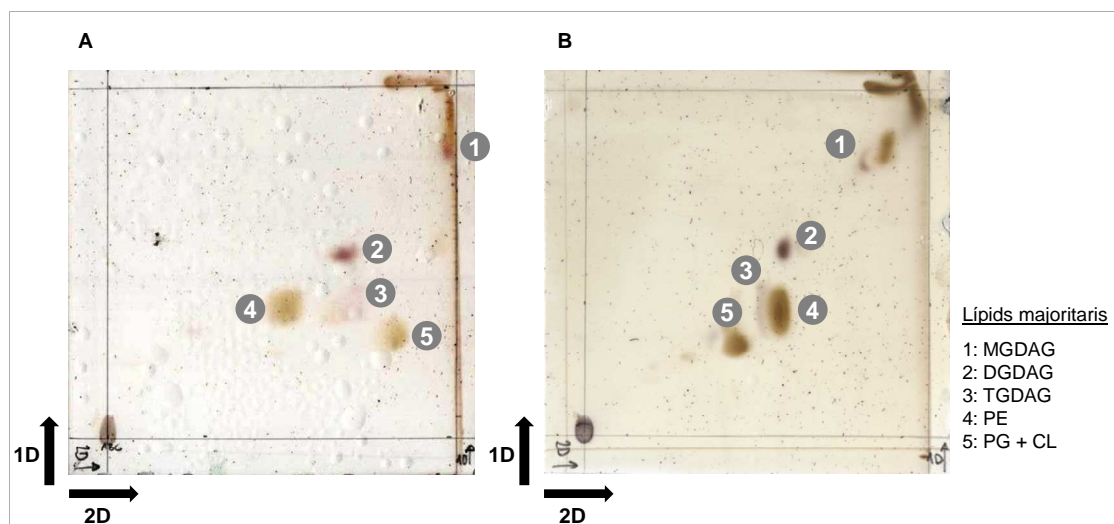




**Figura 100: Cromatografies de capa fina emprant diferents fases mòbils. A: Cloroform / metanol / aigua (65:25:4); B: Acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9) i C: Cloroform / metanol / àcid acètic (65:25:10).** PE: fosfatidiletanolamina; PG: fosfatidilglicerol; CL: cardiolipina.

A les cromatografies de capa fina s'observen els fosfolípids, PE, PG i CL, i els glicoglicerolípids. Tot i així, en tractar-se de mostres molt complexes, provinents de cèl·lules *in vivo*, és difícil aconseguir una bona separació amb una sola elució. Per exemple, en A, se separa bé el MGDAG però no es resol DGDAG i PE. En B, es resol MGDAG i DGDAG però els fosfolípids estan amb el TG DAG. I en C, MGDAG corre amb el front d'elució. Per aquest motiu, s'opta per realitzar una cromatografia de capa fina en dues dimensions fent combinacions de les fases mòbils.

En la Figura 101 es mostren els resultats obtinguts en dues cromatografies en què la primera dimensió s'ha eluït amb la fase mòbil acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9) en tots dos casos i la segona dimensió s'ha fet amb la fase mòbil cloroform / metanol / àcid acètic (65:25:10) en el cas de la A i amb la fase mòbil cloroform / metanol / aigua (65:25:4) en el cas de la B. Tal com s'observa, en la capa fina A se separen tots els components majoritaris, fosfatidiletanolamina (4), fosfatidilglicerol (5) i DGDAG (2) però el MGDAG es desplaça amb el front d'elució. Aquest fet no es dona en el cas de la B, on també se separen tots els components d'interès. Per tant, se seleccionen aquestes condicions d'elució on es realitza una primera dimensió amb la fase mòbil acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9) i una segona elució amb la fase mòbil cloroform / metanol / aigua (65:25:4), eluents emprats en el Capítol 3.



**Figura 101:** Cromatografies de capa fina en dues dimensions. La primera dimensió en els dos casos s'ha fet amb la fase mòbil acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9). La segona dimensió en A: Cloroform / metanol / àcid acètic (65:25:10) i en B: Cloroform / metanol / aigua (65:25:4).

### A3.2.1.2 Condicions de creixement i detecció de radiació

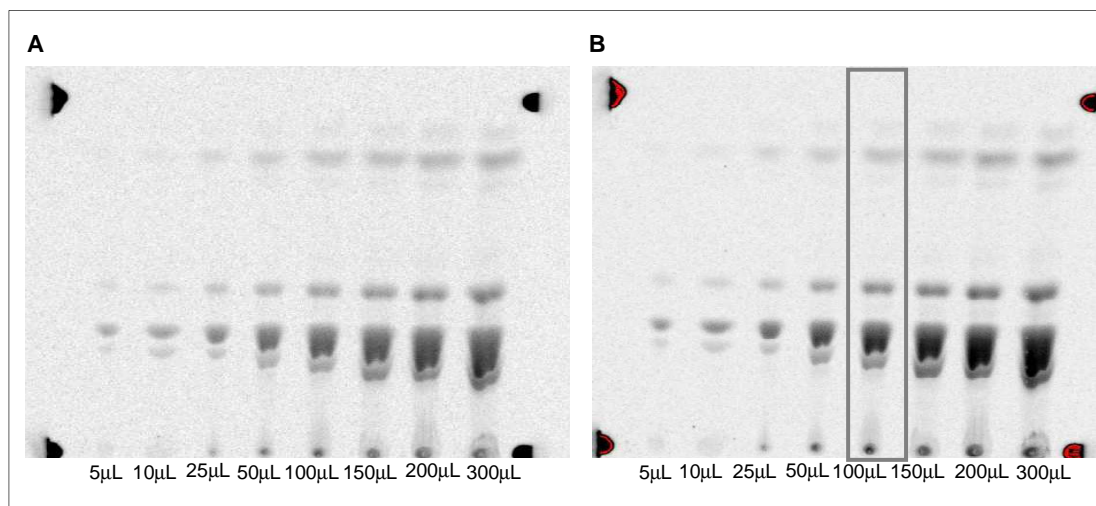
Tal com s'ha comentat, les cèl·lules d'*E.coli* modificades per enginyeria metabòlica es marquen amb acetat sòdic [1,2-<sup>14</sup>C]. Per fer-ho, s'introdueix acetat marcat radioactivament al medi de cultiu per tal que la pròpia cèl·lula sintetitzi els àcids grassos marcats.

Amb la finalitat de determinar la quantitat necessària d'acetat sòdic marcat i el temps d'exposició, es realitza un creixement amb la soca ABC que té tots els gens inserits. Així, es preparen 50 mL de medi definit en el que s'introdueixen 0.2 µCi per mL de cultiu (3.8 µM d'acetat sòdic [1,2-<sup>14</sup>C] 0.1 mCi mL<sup>-1</sup>). Un cop inoculades les cèl·lules es mantenen a 37 °C i 250rpm durant tota la nit. S'indueix la sobreexpressió de les proteïnes amb l'addició d'IPTG i s'incuba durant 5h més sota les mateixes condicions.

Un cop finalitzat el creixement es preparen alíquotes de 5 mL de cultiu. Cada una d'aquestes alíquotes se centrifuguen i el botó cel·lular es renta amb NaCl 0.9%. A continuació, s'introdueixen 500 µL d'una mescla cloroform / metanol (2:1) i es vortexa durant 10min. De la fase cloroform, s'extreuen 300 µL i s'evaporen a sequedat. L'extracte lipídic es redissol en 300 µL i es punxa el volum necessari a la capa fina.

Per poder detectar els lípids fent una autoradiografia electrònica mitjançant BioRad Imagers, cal conèixer quina quantitat d'extracte cel·lular és necessari i el temps d'exposició. Es prepara una cromatografia de capa fina amb només una dimensió i

mostres de diferents concentracions d'extracte lipídic. La fase mòbil escollida és acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9). La Figura 102 mostra la capa fina amb diferents alíquotes de l'extracte lipídic un cop s'ha exposat durant 5h (A) i 16h (B).



**Figura 102: Cromatografies de capa fina radioactives amb diferents temps d'exposició a l'autoradiografia electrònica de BioRad Imagers. A: 5h i B: 16h. S'enquadra la mostra de les condicions seleccionades.**

La resolució en tots els casos no és òptima però es millora amb la capa fina de dues dimensions. De les diferents mostres se selecciona la de 100µL i 16h per ser prou intensa. Per tant, la concentració d'acetat marcat, les condicions de creixement utilitzades, l'elució i l'exposició de la cromatografia de capa fina emprades són les que es resumeixen a la Taula 53.

**Taula 53: Condicions de treball per les cromatografies de capa fina radioactives.**

Medi de cultiu	Definit + 0.2µCi/ mL (3.8µM d'acetat sòdic [1,2- <sup>14</sup> C])
Extracció	500µL Cloroform / metanol (2:1)
Volum mostra	100µL
TLC	Sílíce 2D
Fase mòbil 1D	Acetat d'etil / isopropanol / cloroform / metanol / KCl 0.25% en aigua (25:25:25:11:9)
Fase mòbil 2D	Cloroform / metanol / aigua (65:25:4)
BioRad Imagers	16h