

5. ENGINYERIA METABÒLICA DE CÈL·LULES
D'Escherichia coli

5. ENGINYERIA METABÒLICA DE CÈL·LULES D'*Escherichia coli*

5.1. INTRODUCCIÓ

L'aplicació de les tècniques de DNA recombinant per tal de modificar el metabolisme cel·lular i millorar la producció de metabòlits és, com s'ha exposat en el capítol introductori, un dels objectius de l'enginyeria metabòlica (Bailey, 1991; Stephanopoulos i Vallino, 1991, Stephanopoulos i Sinskey, 1993), i és l'estratègia que es vol explorar, en el present capítol en cèl·lules d'*Escherichia*.

D'entre les mesures proposades anteriorment per tal de reduir la formació d'acetat (pàgines 143-144), en aquest capítol es presenten les que es van escollir des de l'enfoc de l'enginyeria metabòlica com a possibles accions:

- Disminuir la velocitat específica de captació de glucosa a la cèl·lula a través del sistema de transport PTS.

Per tal d'avaluar aquesta estratègia es va obtenir una soca mutant d'*Escherichia* defectiva pel gen *ptsG* que codifica pel component EII^{Glc} del sistema de transport PTS. Aquest component és específic pel transport de glucosa a través d'aquest sistema de transport. La restitució de la capacitat d'incorporar la glucosa per el sistema PTS és possible mitjançant un plasmidi d'expressió induïble per IPTG, que en funció dels nivells d'inducció permet regular la velocitat de captació de glucosa entre el 20 i el 600% dels nivells d'expressió de la soca salvatge. No es va contemplar la possibilitat de realitzar una delecció (Knock-out) en el gen *ptsG*, ja que el que es pretenia era regular la velocitat de captació de glucosa més que no pas eliminar per complet aquest mecanisme de transport.

- Augmentar la capacitat del CAT per sobreexpressió del gen *ppc* que codifica per l'enzim que catalitza la reacció anapleròtica de la fosfoenolpiruvat carboxilasa (PEPC) i que reomple el cicle a nivell de l'oxalacetat.

Per un costat la reacció de la PEPC consumeix un intermediari de la glucòlisi, el fosfoenolpiruvat, i per tant hauria de reduir, en primer lloc, la conversió de fosfoenolpiruvat en piruvat i per tant el colapse metabòlic a nivell de la incorporació de l'acetil-CoA al CAT. En segon lloc al reomplir el cicle a nivell de l'oxalacetat, hauria de permetre operar el cicle a major velocitat i acomodar Acetil-CoA a major velocitat.

Les altres possibles accions proposades com a possibles mesures per reduir la formació d'acetat (pàgines 143-144) es van descartar bé perquè ja s'havien provat prèviament en treballs d'altres autors, o bé, per que no es plantejaven des de l'enfoc de l'Enginyeria Metabòlica que es volia avaluar en aquest capítol.

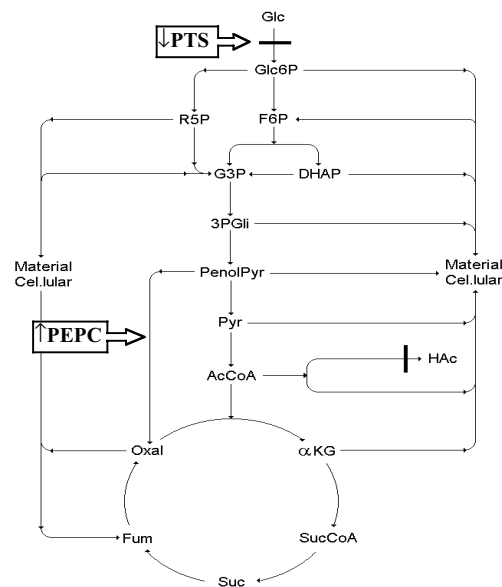


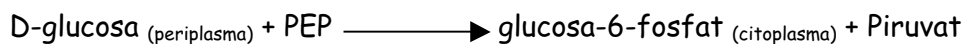
Figura 5.1: Esquema del metabolisme central d'*Escherichia coli* i punts d'actuació escollits en base a l'anàlisi de fluxos metabòlics intracel·lulars. Els punts d'actuació

contemplen el mecanisme d'incorporació de glucosa a la cèl·lula pel sistema PTS de transport de glucosa i la reacció anapleròtica de reompliment del CAT catalitzada per la PEPC.

5.2. CONSEQÜÈNCIES METABÒLIQUES D'UNA MODIFICACIÓ GENÈTICA QUE AFECTA EL FLUX D'ENTRADA DE GLUCOSA A TRAVÉS DEL SISTEMA DE TRANSPORT PTS A *Escherichia coli*

L'entrada de glucosa a la cèl·lula es realitza en nombroses bactèries Gram negatives i Gram positives, a través del sistema de transport de la fosfotransferasa dependent de PEP (PTS). El PTS està involucrat en el transport i fosforilació d'un gran nombre de carbohidrats, a més a més del de la glucosa. A *Escherichia coli* K12 el transport de glucosa es dona majoritàriament per aquest sistema. Des que fou descobert (Kundig *et al.* 1964) s'han publicat nombrosos treballs que han permès caracteritzar la seva estructura, el mecanisme de transport, la regulació i la seva base genètica (Postma, *et al.* 1996).

El PTS catalitza la reacció general:



El PTS està format per varis components, alguns de solubles i altres elements de membrana. Els components solubles, l'enzim I (EI) i la Proteïna H (HPr) són constituents proteics no específics pel substrat. El component EI transfereix el grup fosfat del PEP al component soluble HPr, el qual el transfereix al component de membrana EII (figura 5.2). El component de membrana Enzim II (EII) és específic per cada sucre. El component EII del PTS és en realitat un complex. La configuració més acceptada d'aquest complex és la d'una proteïna o domini soluble (EIIA) i una proteïna transmembrana amb dos dominis (EIICB) (Postma i Lengeler, 1985). En concret, pel cas de la glucosa es parla del component EIICB^{Glc} del PTS.

La fosforilació del carbohidrat està acoblada a la translocació a través de la membrana citoplasmàtica. L'energia per a aquest procés és proveïda per un intermediari de la glucòlisi: el PEP. A la figura 5.2. es mostra un esquema del mecanisme d'actuació d'aquest sistema de transport.

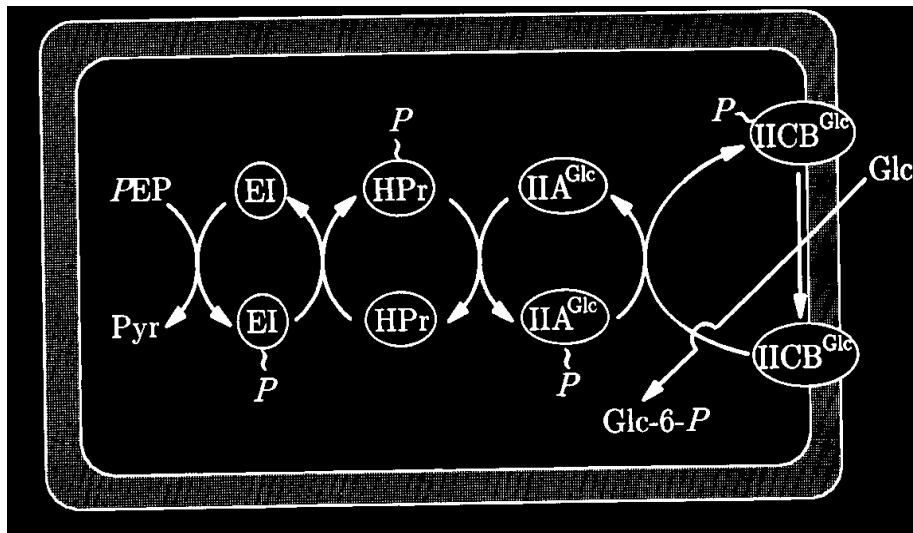


Figura 5.2.: Esquema del sistema de transport de glucosa de la fosfotransferasa dependent de fosfoenolpiruvat (PTS) a *Escherichia coli*.

Hi ha més de 10 components diferents de complexos enzimàtics EII a *E. coli* segons el sucre- substrat que ha de ser captat (Postma *et al.* 1996). Tot i ser específics per cada sucre, la glucosa pot utilitzar, amb diferents afinitats, els enzims EII^{Man} (transportador de la manosa), EII^{Fru} (fructosa), i EII^{Bgl} (β -glucòsids) per entrar a la cèl·lula.

Les proteïnes PTS-HPr i EI junt amb la EIIA^{Glc} són codificades pels gens *ptsH*, *ptsI* i *crr* respectivament. Aquests tres gens estan localitzats en un mateix regió (o cluster) del DNA d'*E. coli*, sota el control d'un mateix operador: l'operó *pts*. El gen que codifica per l'EIICB per la glucosa és el gen *ptsG*, i està localitzat en regions del DNA separades de l'anterior, amb regions reguladores pròpies. L'expressió dels gens de proteïnes solubles és constitutiva, mentre que la dels EIICB és induïble pel propi substrat extern. El gen *ptsG* d' *E. coli* K12 que codifica

per l'EIICB, ha sigut clonat i seqüenciat (Chou *et al.* 1994.). Les regions reguladores i promotores adjacents al gen *ptsG*, que controlen l'expressió d'aquest sistema, encara no han estat identificades. El sistema és induïble per glucosa en soques salvatges d'*E. coli* K12.

La soca utilitzada en aquest estudi fou la soca mutant d'*Escherichia coli* PPA211. Aquesta soca és defectiva per el gen cromosòmic *ptsG* i *ptsM* de manera que no pot captar ni metabolitzar la glucosa a través del sistema PTS-EIICB^{Glc} ni PTS-EIICB^{Man}. Conseqüentment *Escherichia coli* PPA211 no creix en un medi amb glucosa com a font de carboni (Ruyter *et al.* 1991).

El plasmidi d'expressió pTSG11 (cedit pel Dr. Pieter Postma, de l'Slater Institut d'Amsterdam) permet restituir el gen *ptsG* sota el control d'un vector induïble i per tant, permetre el creixement en un medi amb glucosa com a única font de carboni i energia. A la figura 4.3 es pot veure el mapa del plasmidi pTSG11.

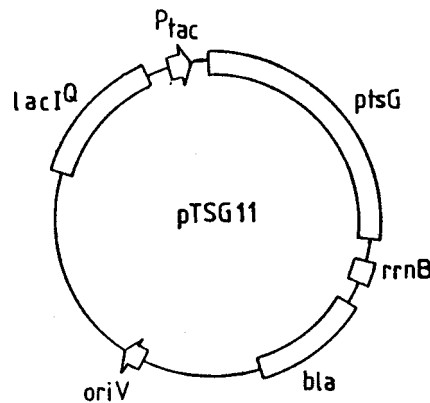


Figura 5.3: plasmidi pTSG11 d'expressió induïble per IPTG del component EII^{Glc} del PTS.

El plasmidi pTSG11 conté el gen estructural per l'EII^{Glc}, *ptsG*, sota el control del promotor *tac* (P_{tac}). Com a resultat de la presència del repressor *lac* (*lacI*^Q), l'expressió del gen *ptsG* pot ser modulada segons la quantitat d'IPTG afegit al medi de cultiu. El vector d'expressió pTSG11 conté, a més a més, el gen de resistència a

l'ampicil·lina (gen *bla*). La regió *rrnB* representa part de l'operó d'*E. coli* que conté el gen per el component 5S del rRNA i els seus dos senyals de finalització de la transcripció. Per evitar la recombinació del gen *ptsG* plasmídic amb el DNA del genòfor bacterià i que es pugui restituir el genotip PTS salvatge, la soca PPA211 és *RecA⁻* (soca mutant defectiva pel sistema de recombinació).

La transformació de la soca d' *Escherichia coli* PPA211 amb el plasmidi pTSG11 restitueix el PTS i permet el creixement en glucosa. Tot i que el gen *ptsG* està sota el control del promotor *tac*, en absència de l'inductor IPTG, el nivell d'expressió basal permet el creixement en glucosa. Concentracions de 0 µM d'IPTG fins a 200 µM d'IPTG indueixen l'expressió del gen *ptsG* a diferents nivells entre el 20 i el 600% respectivament, respecte la soca salvatge (Ruyter *et al.* 1991).

Per estudiar la capacitat de la soca PPA211/pTSG11 de créixer a diferents nivells d'inducció de l'expressió del gen *ptsG*, i així, comprovar l'efecte de la variació de la quantitat d'enzim EII^{Glc} en el metabolisme d' *E. coli*, fonamentalment en relació a la velocitat de captació de glucosa i a la formació de subproductes, es van realitzar una sèrie de cultius en un medi mineral glucosat en condicions aeròbiques en bioreactor (2L-Biostat-B). Les condicions d'operació del bioreactor foren: temperatura 37°C, control de pH amb valor de consigna 7.0 i addició automàtica de NaOH 3.5 M, i pO₂ controlada al 30 % del valor inicial de saturació, mitjançant un llaç de control amb la velocitat d'agitació (300-900 rpm). El cabal d'aire fou d'1 vvm. El medi de cultiu fou el medi mineral salí M9E, amb 10 g/l de glucosa, 100 µg/ml d'ampicil·lina i 20 µg/ml de tiamina. Tots els experiments de cultiu, tant del control (0 µM IPTG) com dels que es va induir l'expressió del gen *ptsG* per addició d'IPTG (100 i 200 µM), es van realitzar, com a mínim, per duplicat. A la figura 5.4 es presenten els perfils de concentració dels cultius realitzats per concentració de biomassa, glucosa i acetat.

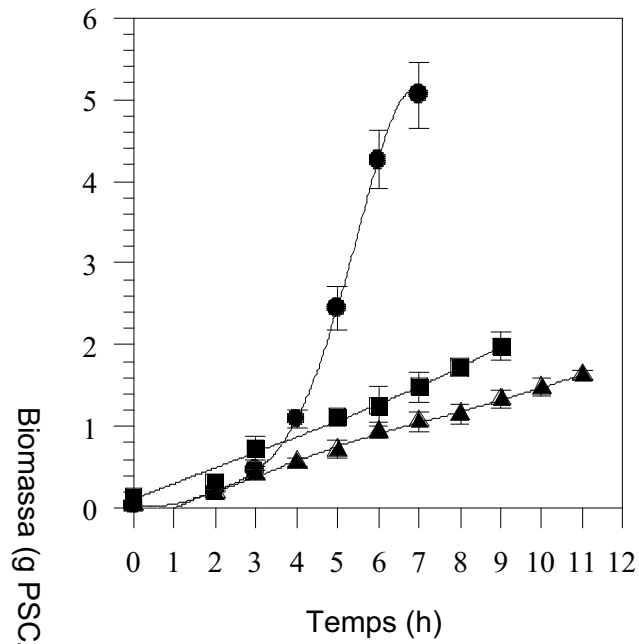


Figura 5.4.A: perfil del creixement per la soca PPA211/pTSG11 a diferents nivells d'inducció: 0 μM IPTG (●), 100 μM IPTG (■) i 200 μM IPTG (▲).

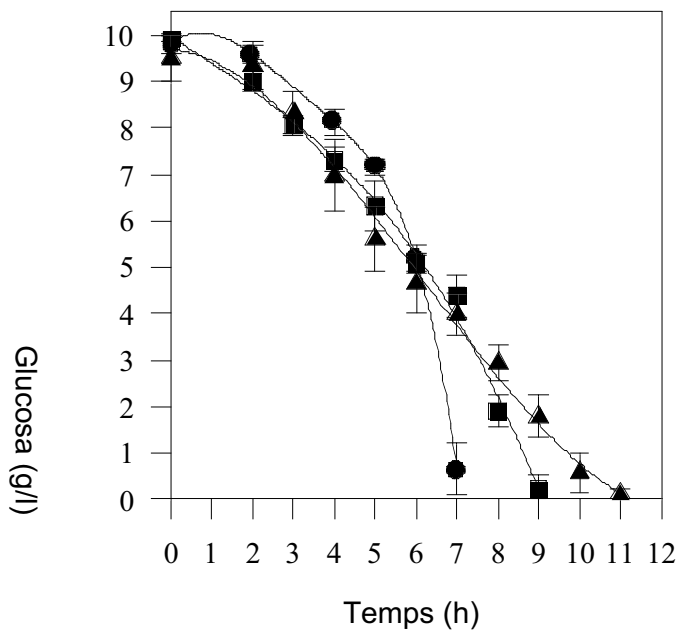


Figura 5.4.B: cinètica consum de glucosa per la soca PPA211/pTSG11 a diferents nivells d'inducció: 0 μM IPTG (●), 100 μM IPTG (■) i 200 μM IPTG (▲).

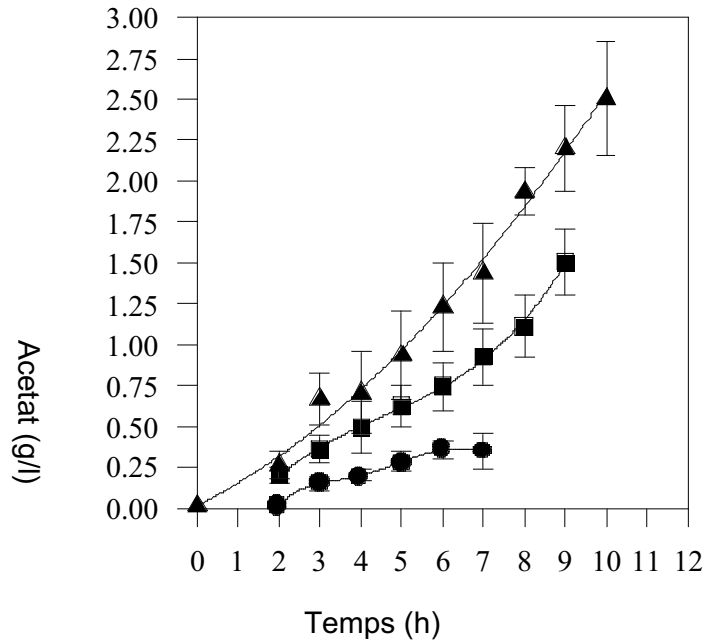


Figura 5.4 C: cinètica producció d'acetat per la soca PPA211/pTSG11 a diferents nivells d'inducció: 0 μM IPTG (●), 100 μM IPTG (■) i 200 μM IPTG (▲).

Es va observar en primer lloc que el cultiu control (no induït amb IPTG) es comportava de manera similar a una soca salvatge pel que fa al creixement. La velocitat específica de creixement, per contra de l'esperat, va assolir valors de fins a 0.80h^{-1} . En principi aquesta soca només pot captar la glucosa a nivells basals del 10-20 % respecte una soca salvatge i, en canvi, per mecanismes que no es coneixen, la cèl·lula era capaç de consumir glucosa quasi a la mateixa velocitat que una soca no defectiva per *ptsG*. Així, en aquest experiment la soca no induïda presentava valors de velocitat de captació de glucosa anàlegs als que s'obtidrien amb nivells d'expressió del 100%, enlloc del 20% com s'havia postulat. Segons està descrit, la sobreexpressió de EI, HPr, o EIIC^{Glc} no incrementa el transport de glucosa o la velocitat de consum (Postma *et al* 1994) mentre que la sobreexpressió de l'enzim EIICB^{Glc} sí comporta una augment de la velocitat de captació de glucosa (Ruijter *et al.* 1991). La variació de la quantitat d'EIIBC^{Glc} no afecta la velocitat de creixement en un medi amb glucosa com a única font de carboni (comunicació personal, Dr. Postma. 1996).

Tot i que la regulació del sistema de transport PTS és complexa i l'expressió de les proteïnes-PTS està regulada pels nutrients presents en el medi (Postma *et al.*, 1993), una possible explicació als fets observats és que els autors del treball a partir del qual es va plantejar aquest experiment (Postma *et al.* 1994) basen els càlculs de velocitat d'incorporació en la determinació de l'activitat enzimàtica de la reacció *in vitro* a concentracions de glucosa molt baixes (2 g/l) i en matrassos agitats com a sistema de cultiu. En base a l'activitat de l'enzim obtenen el rang d'activitats de la reacció que va des del 20 al 600% respecte la soca salvatge. Per tant, s'interpreten els resultats en base a que aquests s'han obtingut en sistemes *in vivo* a una concentració de glucosa en el medi de cultiu més elevada (10 g/l) que la que es va emprar originalment pels autors. Les dades de velocitat d'incorporació de glucosa en funció dels nivells d'inducció del gen *ptsG* que s'han obtingut en cultiu en bioreactor no es corresponen amb les dades d'activitat de la reacció d'incorporació de glucosa obtingudes en sistemes *in vitro*. En base a aquestes consideracions els cultius amb inducció de l'expressió a nivells superiors haurien de correspondre amb un augment de la velocitat d'incorporació de glucosa a la cèl·lula i per tant, en un major col·lapse a nivell del CAT i consegüentment amb una major producció d'acetat.

En els cultius induïts amb 100 i 200 μM d'IPTG, es va observar una clara diferència en el comportament respecte la soca control. Les cèl·lules van créixer més a poc a poc, amb una velocitat específica màxima de creixement d'entre 0.22 i 0.18 h^{-1} respectivament, i al cap de 10-11 hores s'havia assolit tant sols una concentració de biomassa de 1.97 i 1.70 g PSC/l per un i altre nivell d'inducció respectivament. Tot i això, es va exhaurir la glucosa del medi, el que suposava un baix rendiment cel·lular (0.19 i 0.17 g/g respectivament). Al analitzar el brou de cultiu es van trobar concentracions d'acetat superiors a les del cultiu no induït: 1.72 g/l pel cultiu induït amb 100 μM i 2.8 g/l pel cultiu induït amb 200 μM d'IPTG.

Malgrat que els resultats apuntaven en la direcció contrària a la que es pretenia, es va considerar interessant modelitzar les dades experimentals per tal d'intentar comprendre millor els mecanismes que havien operat en aquest sistema. No obstant, no es van tractar les dades experimentals del cultiu induït amb 100 μM per considerar que la informació que podria aportar la modelització d'aquestes no seria massa diferent a la que proveirien les dades del cultiu induït amb 200 μM .

Així, amb les dades obtingudes durant la fase exponencial del creixement de la soca PPA211/pTSG11 no induïda i induïda amb 200 μM d'IPTG es van calcular la velocitat específica de creixement i les velocitats de consum de glucosa i de producció d'acetat per tal de modelitzar el creixement.

PPA211/pTSG11	r_x (g/l·h)	μ (h^{-1})	qGlc(mmols/g·h)	qHAc(mmols/g·h)
IPTG: 0 μM	1.22	0.80	-8.52	1.03
IPTG :200 μM	0.15	0.18	-6.31	6.16

Taula 5.1: Velocitat de producció de biomassa, velocitat específica de creixement, velocitat de consum de glucosa, i velocitat de producció d'acetat per a la soca d'*Escherichia coli* PPA211/pTSG11 induïda amb IPTG a diferents nivells d'expressió del gen *ptsG* del PTS: 0 (control) i 200 μM .

A partir d'aquests valors es van estimar els fluxos metabòlics intracel·lulars, utilitzant el model estequiomètric descrit al capítol 4. Els valors de cadascun dels fluxos resultants es recullen a l'annex 2. Els diagrames de fluxos metabòlics intracel·lulars normalitzats en tants per cent respecte el flux d'entrada de glucosa (en mmols/g·h), es mostren a les figures següents. Figures 5.5 A, pel cultiu no induït i 5.5.B pel cultiu induït a 200 μM .

Una primera observació dels diagrames de fluxos permet apreciar algunes diferències entre el comportament de la soca PPA211/pTSG11 no induïda per l'expressió del gen *ptsG* i induïda amb 200 μM d'IPTG.

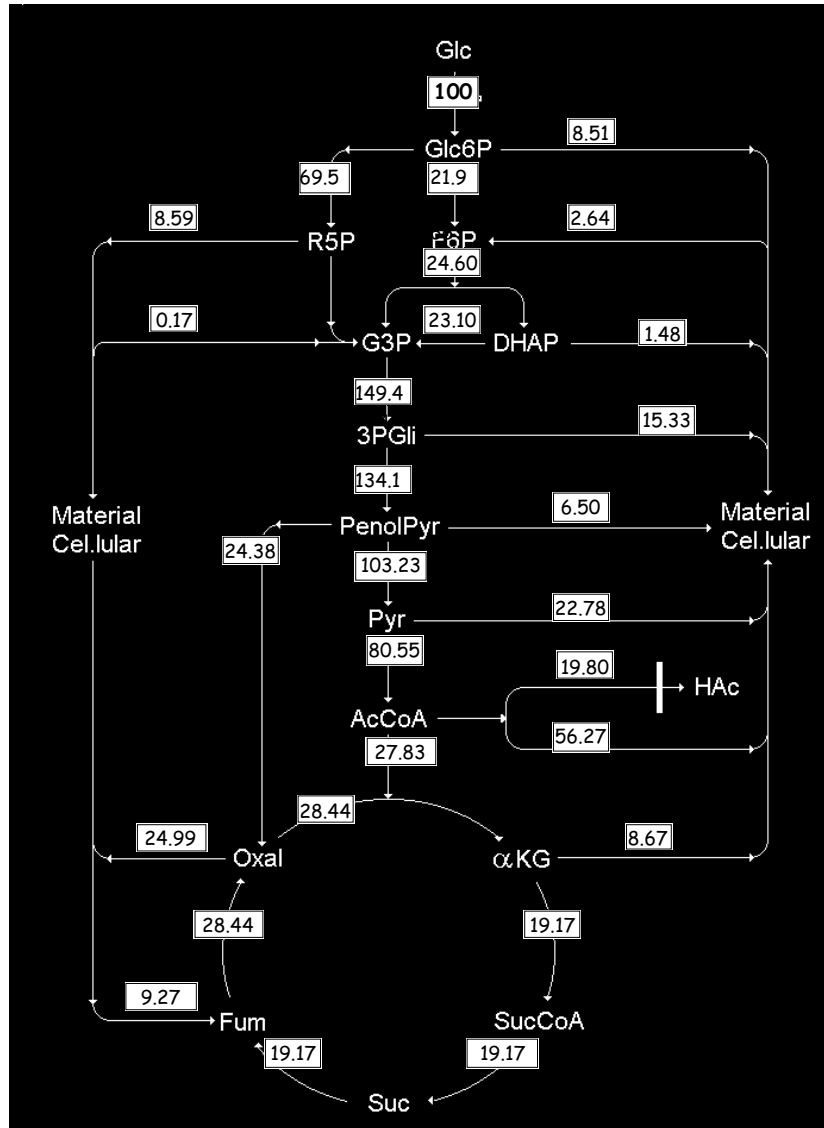


Figura 5.5A: Diagrama de fluxos per la soca PPA211/pTSG11 no induïda per l'expressió del gens *ptsG*. Els valors representen el % en mmols /g·h respecte el valor d'incorporació de glucosa pel sistema de transport PTS.

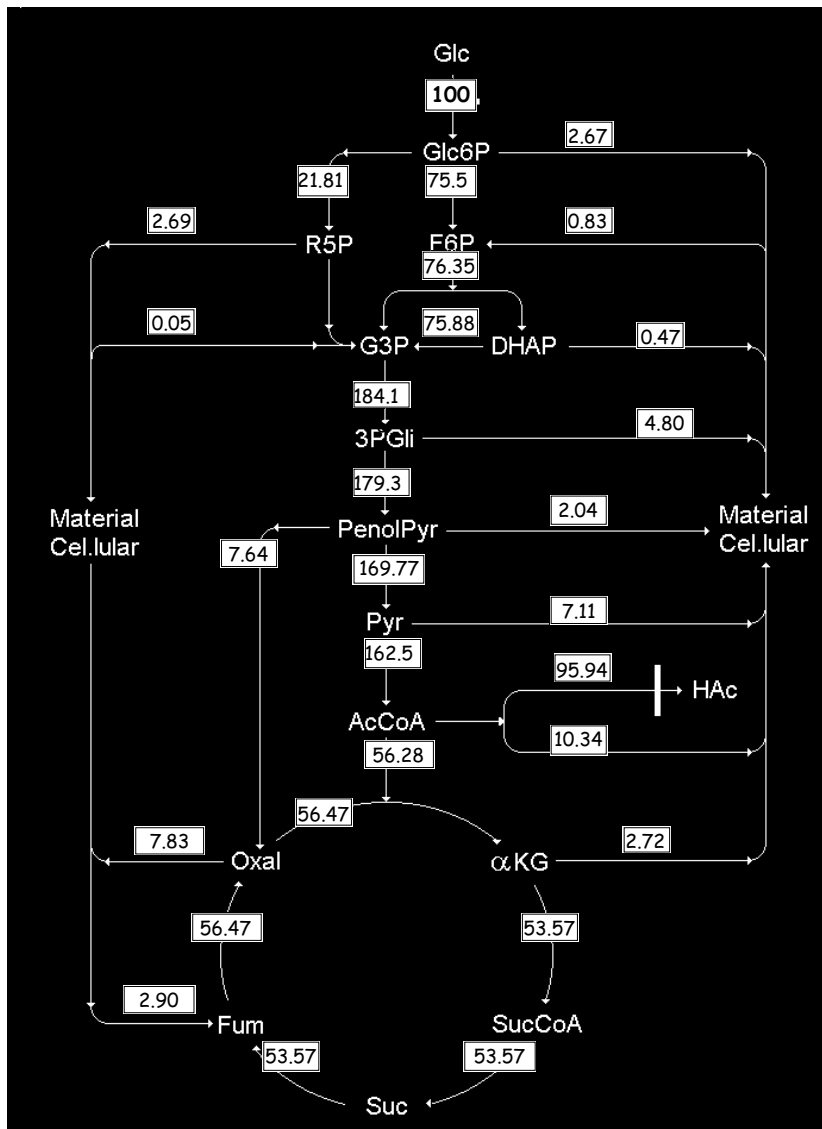


Figura 5.5B: Diagrama de fluxos per la soca PPA211/pTSG11 induïda amb IPTG (200 μ M) per l'expressió del gens *ptsG*. Els valors representen el % en mmols /g·h respecte el valor d'incorporació de glucosa pel sistema de transport PTS.

- El flux de carboni per mol de glucosa captada que entra a la glucòlisi (reacció $\text{Glc6P} \rightarrow \text{F6P}$) és diferent en ambdós casos: és més baix en el control, 21.96 % i augmenta amb el nivell d'inducció fins al 75.52 % en el cultiu induït amb 200 μM d'IPTG. És a dir, que en la soca control hi ha menys flux de carbonis cap a la glucòlisi que en la soca induïda. Aquest fet respon d'entrada a l'efecte inicialment desitjat ja que, a major nivell d'inducció, major quantitat de EII^{Glc} sintetitzat i, per tant major velocitat de captació de glucosa.
- El flux cap al cicle de les Pentoses Fosfat (reacció $\text{G6P} \rightarrow \text{R5P}$), en contraposició, és superior en la soca control, passant del 69.53 % en aquesta al 21.8 % en el cultiu induït. En la soca control predomina aquesta reacció, mentre que en la soca induïda predomina la glucòlisi.
- El flux de carbonis que generen fosfoenolpiruvat (PEP), va augmentant segons augmenta el nivell d'inducció: del 134.1 a 179.36 %. En la soca control, al haver-hi menys flux glucolític també hi ha menys flux cap a PEP.
- Malgrat això, la reacció anapleròtica de reompliment del CAT va disminuint: del 24.38 en la soca control al 7.64 % en la soca induïda.
- Paral·lelament, el piruvat disponible per entrar al CAT en forma d'Acetil-CoA va augmentant des del 80.55 al 162.56 %. Al no desviar tant PEP per la reacció anapleròtica de la PEPC, la soca induïda presenta molt més piruvat al final de la glucòlisi per ser convertit en Acetil-CoA.
- Tot i que el cicle opera més ràpid a més nivell d'inducció, segueix existint un excedent a l'entrada d'aquest cada cop més gran, que fa que la cèl·lula excreti cada cop més acetat: del 19.8 % de la soca no induïda al 95.94 % de la soca induïda amb 200 μM IPTG. La soca induïda presenta un col·lapse superior a nivell del CAT, i per tant, es veu forçada a dissipar molt més piruvat en forma d'acetat.

La discussió, en base a l'anàlisi de fluxos realitzat, no és immediata i admet diferents interpretacions. En principi, com més s'indueix l'expressió del gen *ptsG*, més proteïnes de transport sintetitza la cèl·lula i, per tant, més grups fosfat

necessita per a que aquestes operin a nivell del sistema transportador PTS. Com que el donador d'aquests grups fosfat és el PEP, la cèl·lula sembla que prioritza la seva formació per tal de complir amb la demanda. Això comporta un desajust amb la via de les pentoses fosfat (VPF), que es veu perjudicada en favor de la glucòlisi. Al no poder proveir a la cèl·lula d'energia en forma de NADPH, ni dels precursors necessaris per a la síntesi d'àcids nucleics, la cèl·lula no pot créixer normalment. La reacció de reompliment del CAT també es veu perjudicada i cada cop flueix menys PEP cap a OAA, ja que es té que destinar més PEP cap al sistema transport de glucosa. A nivell del CAT s'observa una major activitat en comparació amb la soca control. No obstant, al no poder proveir de precursors les reaccions anabòliques, per manca de capacitat d'ensamblar-los per formar els monòmers, la cèl·lula acaba destinant un major flux a la formació d'acetat. La disminució de la biosíntesi de nou material (fet que es reflexa en el valors dels fluxos sortints del CAT) fa que cada cop la cèl·lula creixi més poc a poc, i per tant, l'augment de la glucòlisi el que fa és empitjorar la situació, doncs la cèl·lula destina cada cop menys piruvat al CAT i ha d'excretar cada cop més acetat.

D'aquest resultats es pot despendre que no s'ha pogut trobar un nivell d'expressió del *ptsG*, que permeti l'entrada de glucosa a velocitat que no excedeixi la capacitat de les VCM (inferior a la de la soca salvatge o de la soca no induïda) i a la qual la cèl·lula excreti menys acetat. Inclòs el nivell basal d'expressió és massa elevat per el propòsit inicial de reduir l'excreció d'acetat mitjançant la disminució de la velocitat d'entrada de glucosa. La sobreexpressió del gen *ptsG* provoca una cascada de modificacions metabòliques que afecten al conjunt de la xarxa metabòlica. La més significativa potser és la reducció del flux cap al cicle de les pentoses. Aquest fet pot ser degut a algun mecanisme de regulació cel·lular que prioritza la glucòlisi. El gran consum de PEP degut principalment al transport no permet a la cèl·lula completar el seu cicle metabòlic correctament. La cèl·lula redistribueix els fluxos però no aconsegueix balancejar el creixement. Per un altre costat, aquest experiment el que demostra és que, a més consum de glucosa no necessàriament

s'obté més creixement, sinó que al contrari, en aquest cas pitjor creixement i més acumulació d'acetat.

Segons està descrit, la sobreexpressió dels enzims EI, HPr i EIIA^{Glc} no augmenta la velocitat de transport o consum de glucosa (Postma *et al.* 1994), mentre que la sobreexpressió de EIIBC^{Glc} si resulta en un increment de la velocitat d'entrada de glucosa (Ruyter *et al.* 1991). No obstant, les reaccions de transferència de grups fosfat desde el PEP a l'EIICB^{Glc} no són reaccions limitants (Weigel *et al.* 1982). Segons Liao, Hou i Chao (1996) el que afecta el transport de glucosa a través del PTS és la relació PEP/Pir, com han també observat altres autors (Patnaik *et al.* 1992). Si augmenta la relació PEP/Pir a *E.coli* creixent en substrats gluconeogènics com acetat o succinat, possiblement s'incrementa l'afinitat per la glucosa. Els efectes reguladors poden dictar el flux de carboni per simple competició cinètica. Els metabòlits centrals no poden ser considerats com a simples intermediaris passius de les VMC, proveïdors de substrats i energia, sinó que les pertorbacions en la seva concentració o en el seu flux poden afectar adversament tota la fisiologia cel·lular i variar completament la resposta de la cèl·lula ,en un sentit completament inesperat.

Cal comentar també els resultats obtinguts per alguns autors al investigar algunes aproximacions en el sentit de reduir la velocitat d'entrada de glucosa per competència amb un anàleg, com l' α -metilglucòsid (Chou, Bennet i San, 1994 a) han sigut explotades amb èxit en la reducció de l'acumulació d'acetat. Els mateixos autors (Chou, Bennet i San, 1994 b) troben com amb un mutant defectiu pel PTS (sense cap plasmidi que restitueixi la capacitat de captar la glucosa pel PTS), augmenten el rendiment cel·lular, obtenint fins a 20 g PSC/l en un cultiu en discontinu en medi complex amb glucosa, augmentant també el títol de proteïna recombinant respecte la soca salvatge. En aquest cas la glucosa és incapaç d'entrar a la cèl·lula pel sistema de transport PTS i ho fa per altres transportadors amb menys afinitat i per tant, a menor velocitat de captació.

D'aquest experiment es desprèn que no en tots els casos l'augment de la concentració d'un enzim, o la regulació de la seva activitat es correspon amb una única modificació en la xarxa del metabolisme. Això és degut a que la cèl·lula, considerada com un tot, no respon directament a l'augment de la velocitat d'una reacció, sinó que ajusta el flux d'altres reaccions per mantenir un equilibri dels metabòlits. A més a més, s'ha demostrat que es poden produir grans variacions en un flux metabòlic i en la distribució de fluxos tot i trobar-se petites variacions en l'activitat enzimàtica determinada *in vivo* i viceversa (Vrienzen i van Dijken, 1998).

Aquest enfoc global del metabolisme de la cèl·lula ens porta a concloure que els estudis de modulació de l'activitat d'un enzim encara que es puguin correspondre amb l'augment del flux de la via en qüestió, no tenen perquè operar en el sentit desitjat. Els mecanismes de control de fluxos metabòlics s'han de considerar tant o més importants pel que fa a la re-distribució de fluxos.

A partir dels resultats d'aquest darrer experiment es fa palesa la necessitat de disposar d'una construcció plasmídica diferent a la emprada que permeti regular els nivells d'expressió del gen *ptsG* per sota el nivell observat en condicions de no inducció. Caldria veure que passa per sota el aquest nivell basal d'expressió del gen *ptsG* per intentar trobar una situació en que la cèl·lula creixent en condicions aeròbiques i amb excés de glucosa no es vegi forçada a excretar l'excedent en forma d'acetat per adequació de la velocitat de captació/degradació de la glucosa amb la de biosíntesi de material cel·lular.

5.3. MODULACIÓ DEL FLUX GLUCOLÍTIC MITJANÇANT TÈCNIQUES DE RNA ANTISENTIT. EFECTE DE LA DISMINUCIÓ DELS NIVELLS DE EIICB^{Glc} DEL PTS SOBRE LA FORMACIÓ D'ACETAT

Una segona alternativa plantejada a nivell d'Enginyeria Metabòlica per tal de disminuir el flux de glucosa a través del PTS consisteix en la reducció de la

quantitat d'enzim EIICB^{Glc} del PTS, per reducció de la disponibilitat del transcrit de mRNA del gen *ptsG*. S'ha escollit la tècnica de mRNA antisentit per tal de reduir la disponibilitat del component EIICB^{Glc}. Es preten mitjançant aquesta tècnica, reduir el nombre de molècules de l'enzim EIICB^{Glc} disponibles per a la translocació de la glucosa a través del sistema PTS, per tal de limitar la velocitat de captació per la cèl·lula i veure, en aquest cas, l'efecte sobre el metabolisme, en concret sobre la velocitat de captació de glucosa i sobre la formació d'acetat.

El terme Antisentit (AS) defineix qualsevol DNA o RNA que inhibeix l'expressió gènica per mecanismes de complementaritat de parells de bases (nucleòtids aparellats) amb la seqüència gènica diana del DNA genofòric o cromosòmic. L'observació de la interacció de seqüències de nucleòtids complementaris en la natura, per la regulació de les funcions cel·lulars, va introduir el concepte d'antisentit com a mecanisme de regulació biològic. El mecanisme d'inhibició per RNA-AS es dona per hibridació del RNA-AS amb el RNA missatger diana, bloquejant la síntesi de la proteïna que hauria de ser traduïda a partir d'aquest. Sota determinades condicions, una seqüència de RNA-AS pot inhibir completament la síntesi de proteïna. No obstant, la reducció del flux d'una determinada reacció metabòlica pot ser induïda per la introducció d'una seqüència AS que fa disminuir la quantitat d'enzim que catalitza la reacció. És en aquest sentit que es vol utilitzar aquesta tècnica en el sistema PTS d'entrada de glucosa.

El control i regulació de l'expressió gènica per RNA-AS es dona de forma natural en varis sistemes biològics. S'ha trobat sobretot en elements accessoris de DNA com plasmidis i bacteriòfags (virus bacterians). Es va descriure per primer cop als anys 70 com un mecanisme de regulació natural del nombre de còpies plasmídiques a *Escherichia coli* (Wagner i Simons, 1994). Posteriorment es va determinar també el control de l'expressió gènica per DNA o RNA antisentit en cèl·lules eucariotes. L'aplicació de les tècniques de DNA o RNA antisentit artificial pel control de l'expressió de gens en cèl·lules animals ha obert la porta a l'ús terapèutic d'aquesta

tecnologia. Avui en dia ja hi ha unes quantes estratègies de regulació gènica per tècniques de RNA antisentit en diferents fases d'estudi clínic (diversos càncers com la leucèmia, i infeccions per virus com el VIH, el CMV (citomegalovirus) i el papilomavirus humà) (Wagner, 1994).

La síntesi del RNA-AS pot ser artificial, és a dir exògena, o bé natural, és a dir endògena. En el primer cas cal dissenyar els mRNAs-AS d'acord amb la seqüència del gen, sintetitzar els oligonucleòtids, i afegir-los al medi de cultiu (l'eficiència és molt baixa), per tal que s'incorporin a la cèl·lula i exerceixin la seva funció. En el segon cas la síntesi es realitza a través de la construcció de vectors plasmídics que contenen una seqüència de DNA específica del gen, orientada en sentit contrari de manera que la transcripció produeixi un mRNA-antisentit. Quan es trobin els dos mRNAs hibridaran per complementaritat de bases, formaran una molècula de doble cadena (mRNA-S)-(mRNA-AS) i s'impedirà la seva traducció en proteïna a nivell dels ribosomes.

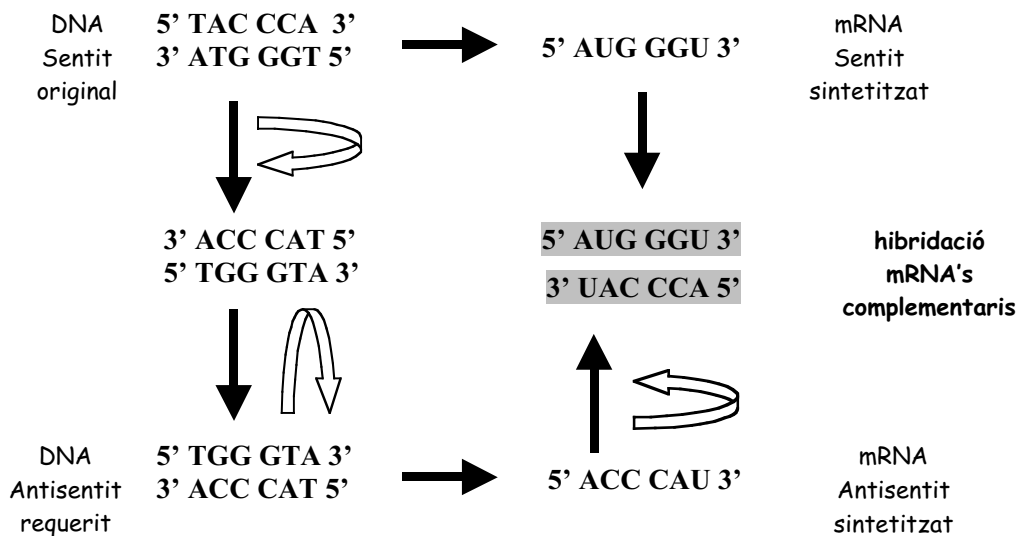


Figura 5.6: El plantejament bàsic experimental pel silenciament de gens per estratègies "antisentit" és el següent: els àcids nucleics antisentit (mRNA-AS) s'aparellen al mRNA diana (amb sentit) i n'impedeixen la seva traducció. Es tracta

doncs de sintetitzar un mRNA complementari al mRNA del gen que interessa regular -reduint la seva traducció- però orientat en sentit contrari.

Els requisits per a un correcte funcionament dels AS en la regulació de l'expressió de gens són:

- una bona elecció de la seqüència diana. Sovint l'elecció es realitza empíricament i s'han de dissenyar varis DNAs-AS, per a trobar algun mRNA-AS que interaccioni i mostri efecte. Hi ha regions susceptibles de funcionar millor (lloc d'unió al ribosoma -RBS-, senyals de translocació) i d'altres pitjor (llaços de l'estructura secundària del RNA poc accessibles a l'AS).
- que es realitzi una ràpida unió al mRNA diana. Això vindrà donat per l'establiment d'un bon contacte entre els RNA's a nivell dels anomenats "kissing loops". Si el fragment de DNA escollit per a la síntesi del mRNA-AS no conté algun fragment d'aquests llaços es pot donar una pobra hibridació. La llargada del fragment que s'expressa és també un factor a considerar.
- per l'especificitat de la molècula de mRNA-AS. Com més elevada sigui la complementaritat de bases més estables seran els complexos formats.
- Per la relació entre les molècules de RNA. Una baixa transcripció del RNA-AS respecte els nivells del RNA-S pot produir una baixa hibridació. Per aquest motiu és desitjable emprar plasmidis d'expressió del DNA-AS multicòpia i/o amb promotors forts de l'expressió de la seqüència de DNA-AS
- pels nivells de degradació intracel·lular del RNA diana, RNA-AS o dels complexos formats.

En tot cas cada RNA-AS actua de manera específica tant pel que fa a la seqüència del gen com al tipus cel·lular.

En aquest apartat es descriu el disseny i construcció de dos vectors d'expressió plasmídics, un basat en el plasmidi d'expressió pJLA603 (Ap. 7.2.2) que porta un

promotor fort del bacteriòfag lambda (P_R-P_L) i un repressor de l'expressió termosensible (cI857) que s'inactiva per temperatura, permetent l'expressió del gen insertat, i l'altre basat en el plasmidi pTrc99A (Ap. 7.2.2), que porta un promotor fort (trp/lac) i un repressor de l'expressió que s'inactiva per IPTG. En ambdós casos es tracta d'insertar el gen *ptsG*, o part d'ell en orientació antisentit, per tal que es formi el mRNA-AS del gen *ptsG* salvatge. La formació *in vivo* d'híbrids del mRNA diana amb el mRNA-AS hauria de permetre, si s'aconsegueix la formació d'híbrids, disminuir el nivell de proteïna EIICB^{Glc} del PTS, i consegüentment, si es confirma la hipòtesi, reduir el flux d'entrada de glucosa a la cèl·lula per sota el nivell d'expressió basal observat en el darrer experiment. L'objectiu final és comprovar si aquesta modificació permet reduir alhora la velocitat de formació d'acetat.

La soca d'*Escherichia coli* utilitzada per a la expressió del RNA-AS en aquest experiment fou la soca d'*Escherichia coli* DH5- α . Aquesta soca presenta una elevada eficiència de transformació i s'utilitza comunament en procediments de clonació. Un cop obtinguts els transformants es senzill extreure el DNA plasmídic i transformar qualsevol altra soca amb aquest material.

El disseny experimental contemplava la clonació del gen *ptsG* complet, o de parts de diferent grandària d'aquest en l'orientació inversa a l'original en els dos plasmidis d'expressió escollits. Un cop obtinguts els vectors amb l'insert en orientació AS es transformaria la soca d'*Escherichia coli* DH5- α , que conté el gen *ptsG* en l'orientació adequada (amb Sentit) per veure, sota diferents condicions d'inducció de l'expressió de la seqüència AS, l'efecte de la interacció de l'híbrid de mRNA-S-mRNA-AS sobre la fisiologia de la cèl·lula en creixement.

En primer lloc es requeria de quantitats del gen *ptsG* per a poder-lo manipular, digerir i fer apte per a la clonació en els plasmidis d'expressió. Per a obtenir nombroses còpies del gen *ptsG* es va realitzar la seva amplificació per reacció en

cadena per la polimerasa (PCR) utilitzant com a DNA motlle el plasmidi pTSG11 descrit anteriorment.

El gen *ptsG* té una grandària de 1520 parells de bases (SWISS-PROT.P05053). El codó d'inici (ATG=GTG), que codifica per una metionina, es troba en la posició 39 de la seqüència codificadora (CDS), i el codó de stop de la transcripció (TAA), en la posició 1472. En base a aquesta seqüència es van dissenyar els oligonucleòtids iniciadors: PTS-L i PTS-R (L de *left* o *downstream*, i R de *right* o *upstream*). Aquests oligonucleòtids es van dissenyar de manera que continguessin l'inici i el final de la transcripció del gen, que fossin d'una grandària de 20 bases nitrogenades, i que continguessin en total unes 11 bases G+C. D'aquesta manera la temperatura d'hibridació ("annealing") dels encebadors amb el DNA motlle seria pròxima a 60°C. La seqüència dels dos primers fou la següent:

PTS-Left: 5' **GCT AAC CTG CAA AAG GTC GGT** 3'

PTS-Right: 5' **GGA TGT ACT CAT CCA TCT CGG** 3'

Ambdós oligonucleòtids tenen 21 unitats, les 21 hibriden amb la seqüència del gen en el DNA motlle. Després de realitzar la reacció en cadena per la polimerasa (Ap.7.6.2) es va obtenir el gen *ptsG* amplificat. A la figura 5.7 es mostra el resultat de la separació de DNA per electroforèsi en gels d'agarosa. La banda més intensa correspon al gen *ptsG*, únic producte amplificat de la reacció.

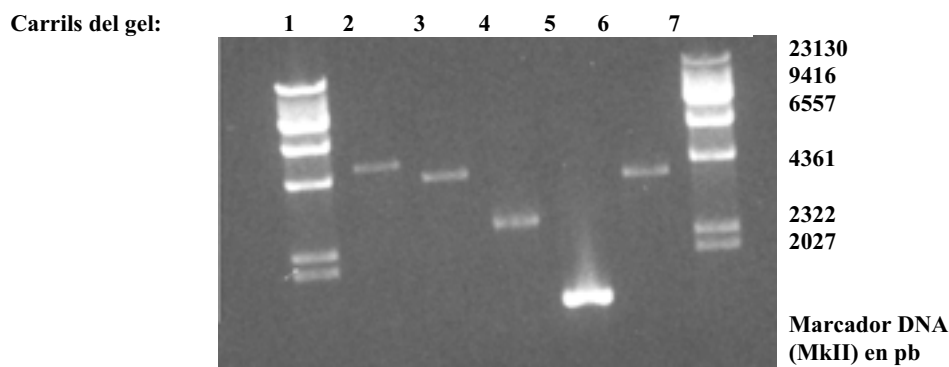


Figura 5.7: Fotografia del gel d'agarosa (al 1.0% concentració) i fragments de DNA separats per electroforèsi (es va carregar 1 µl de cada mostra): En els carrils

1 i 7 va córrer el marcador de grandària de DNA (MarkerII). En el carril 2 es va carregar el plasmidi pJLA603 digerit, i per tant linearitzat, amb EcoR I, (4.9 Kb). En el carril 3 apareix la banda corresponent al plasmidi d'expressió pTrc99A linearitzat per digestió amb Sma I (4.1 Kb). En el carril 5 el fragment de DNA amplificat per PCR a partir del plasmidi pTSG11 del gen *ptsG* (1520 pb). En el carril 4 es visualitza la banda del fragment de DNA del gen *ppc* (2650 pb) que codifica per l'enzim PEPC, obtinguda per reacció en cadena per la polimerasa. Per últim, en el carril 6 es mostra el producte de la reacció d'amplificació d'un fragment del gen *pta* (amplificació d'un fragment de 3800 pb de 4346 pb que té el gen complet) que codifica per l'enzim fosfotransacetilasa (PTA) que participa en la reacció de síntesi i degradació d'acetat. Els productes d'aquests dos darrers carrils (4 i 6) corresponen a gens no emprats en aquest apartat.

La reacció en cadena per la polimerasa havia permès obtenir quantitats considerables del gen *ptsG* com a únic producte específic de la reacció. Com es pot observar a la imatge (carril 5), el fragment de DNA obtingut per amplificació del gen *ptsG*, fou una banda única i intensa de grandària inferior a 2027 pb, per tant es va identificar com el gen *ptsG* amplificat (1520 pb). Un cop purificat (per fenolització i precipitació amb etanol 70°) el producte de la PCR es va preparar per a la seva posterior lligació en cadascun dels plasmidis d'expressió (fosforilació dels extrems roms amb grups OH mitjançant l'enzim fosfonucleòtid quinasa del bacteriòfag T4 (PNK T4) d'*Escherichia coli*). Paral·lelament es van condicionar els vectors d'expressió (pJLA603 i pTrc99A) per tal que poguessin acceptar l'insert. Un cop linearitzats amb EcoR I (carril 2) i Sma I (carril 3) respectivament, els extrems resultants es van reomplir amb T4 DNA polimerasa en presència de dNTP's per tal de deixar-los amb extrems roms. Posteriorment es van defosforilar amb fosfatasa alcalina- CIP- per evitar relligacions dels dos extrems que impedissin incorporar l'insert.

Un cop preparats tots els fragments de DNA es van realitzar les reaccions de lligació tant de l'insert *ptsG* amb el vector pJLA603 com amb pTrc99A (Ap. 7.6.7.5). Finalment es va realitzar la transformació de les soques d'*Escherichia coli* DH5- α competents (Ap. 7.6.8) tant per un com per l'altre plasmidi. Un cop revificades les cèl·lules en LB, durant 1 hora a 28°C i 37°C per un i altre plasmidi respectivament (pJLA603 cal incubar-lo a 28°C de temperatura per evitar l'expressió del gen recombinant, mentre que pTrc99A no ja que no porta el repressor cI857^{ts} que s'inactiva per temperatura) es van sembrar aliquotes de cadascuna de les reaccions en plaques de LB amb i sense ampicil·lina i es van incubar a 28°C o 37°C durant tota la nit, o fins a l'aparició de colònies aïllades.

Les colònies recombinants que havien crescut en medi LB amb ampicil·lina van ser aïllades i cultivades en cultiu líquid (incubació en 10 ml de LB amb ampicil·lina durant tota la nit). Posteriorment, a partir dels sediments de cèl·lules d'aquests cultius es va extreure i purificar el DNA_{pl} (Miniprep: Ap.7.6.1) de 10 colònies resistents (4 de pJLA603-*ptsG* i 6 de pTrc99A-*ptsG*). Aquest DNA va ser utilitzat per al rastreig (screening) dels clons recombinants. Per tal de determinar d'entre els clons recombinants els que havien incorporat el gen *ptsG* es va digerir el material amb Sal I. Aquest enzim no talla el gen *ptsG* i si talla en canvi ambdós plasmidis en una única diana única a nivell del "Multi Cloning Site" (MCS: regió rica en dianes de restricció). Les construccions plasmídiques que haguessin incorporat el gen *ptsG* tant a pJLA603 com a pTrc99A, fos quina fos la seva orientació, haurien de tenir una grandària total de 6.4 Kb, pel cas de construccions basades en pJLA603 (4.9+1.5 Kb), i de 5.6 Kb pel cas de construccions basades en pTrc99A (4.1+1.5 Kb). A la següent figura es pot apreciar el resultat de la digestió amb Sal I d'ambdós construccions.

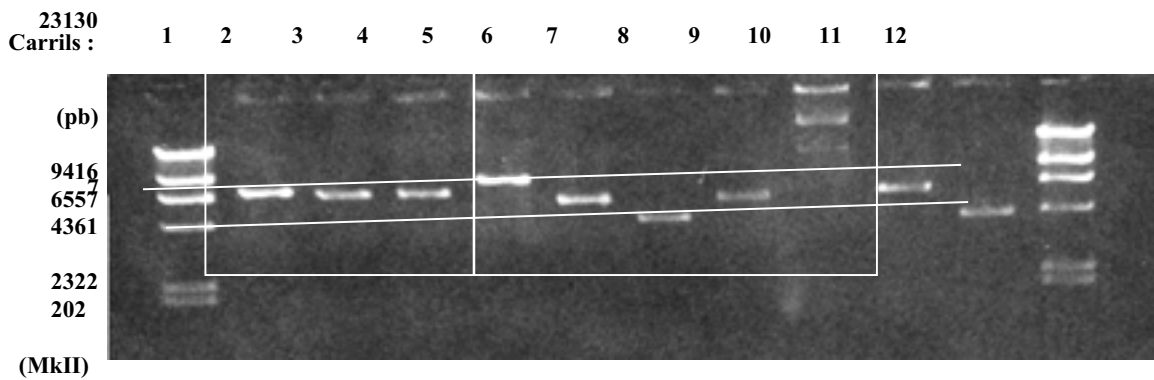


Figura 5.8: separació en gel d'agarosa (1%) del DNA plasmídic dels 10 clons recombinants d'*Escherichia coli* DH5 α /pJLA603-*ptsG* i DH5 α /pTrc99A-*ptsG*, digerits ambdós amb l'endonucleasa de restricció Sal I. En els carrils 1 i 12 hi va córrer el marcador grandària de DNA Marker II (les línies blanques enllacen les bandes del marcador de 4361 pb i 6557 pb). En els carrils 2 a 5 es va fer córrer el DNA digerit amb Sal I de la construcció pJLA603-*ptsG*. Als carrils 6 a 11 el DNA digerit amb Sal I de la construcció pTrc99A-*ptsG*.

Dels 10 primers clons escollits resistents a l'antibiòtic, un cop extret el seu DNA plasmídic i digerit amb Sal I, es van trobar 3 possibles clons transformats amb pJLA603-*ptsG* amb la grandària esperada de 6.4 Kb: carrils 2, 3 i 4, i 3 més de pTrc99A-*ptsG* amb la grandària esperada de 5.7 Kb: carrils 6, 8 i 10. La banda del DNA dels carrils 2, 3 i 4 es troba just a l'alçada de la banda del marcador corresponent a 6.5 Kb, per tant s'havia incorporat l'insert *ptsG* a pJLA603. La banda dels carrils 6, 8 i 10 es troba just per sota la banda del marcador de grandària de DNA de 6.5 Kb i per tant s'havia incorporat l'insert *ptsG* a pTrc99A. Aquest dos vectors es van denominar pJPG2, 3 i 4 i pTPG6, 8 i 10 respectivament. La resta de bandes de DNA poden correspondre a construccions en tàndem si són superiors en grandària (es poden haver lligat dos o més inserts de *ptsG*, un darrera l'altre), com és el cas dels carrils 5 i 9, amb una banda de grandària superior a 6.5 Kb en el primer cas i superior a 5.6 Kb en el segon, o bé corresponen a plasmidis relligats sense haver incorporat el gen *ptsG*, si són d'inferior grandària, com podria ser el cas de les

bandes dels carrils 7 i 11 (la banda d'aquests correspon a la de grandària del pròpi plasmidi pTrc99A sense l'insert, 4.1 Kb).

Per determinar l'orientació de l'insert es va digerir de nou el DNA_{pl} dels clons prèviament digerits amb Sal I de pJPG, amb un altre enzim de restricció, el NcoI, que talla internament el gen *ptsG* a l'alçada del nucleòtid 312 (figura 5.9). Pel que fa als clons amb pTPG es va realitzar un restricció amb Nco I del material no digerit prèviament amb Sal I. Segons la orientació de l'insert en el plasmidi el mapa de restricció, i per tant el patró de bandes que es trobaria després de la restricció, seria diferent. A les a figures 5.9A i 5.9 B es mostren les construccions amb Sentit i Antisentit per els dos plasmidis d'expressió i la posició de les dianes de restricció Sal I i Nco I a PJPg, i Nco I a pTPG

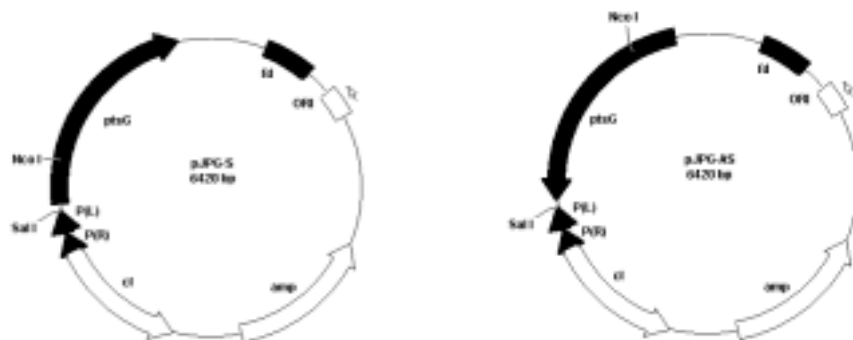


Figura 5.9A: plasmidi pJPG amb el gen *ptsG* inserat en les dues orientacions possibles (pJPG-S i pJPG-AS respectivament), i localització de les dues dianes de restricció escollides per al rastreig del clon: Sal I al MCS (Multi Cloning Site) i diana per Nco I en la posició 312 del gen *ptsG*.

Si l'insert *ptsG* s'havia lligat en orientació amb Sentit (pJPG-S) el resultat de la doble digestió hauria de ser una banda de 6.1 Kb i una de 0.3 Kb. Si la orientació del gen *ptsG* fos l'antisentit (pJPG-AS), el producte de la doble restricció serien dos fragments de 5.2 i 1.2 Kb.

En el cas de pTPG, el producte d'una digestió simple amb Nco I, segons si l'insert s'havia lligat en orientació Sentit o Antisentit serien dos fragments de 5.3 Kb i 0.3 Kb en el primer cas (pTPG-S) i dos fragments de 1.3 i 4.4 Kb en el segon cas (pTPG-AS).

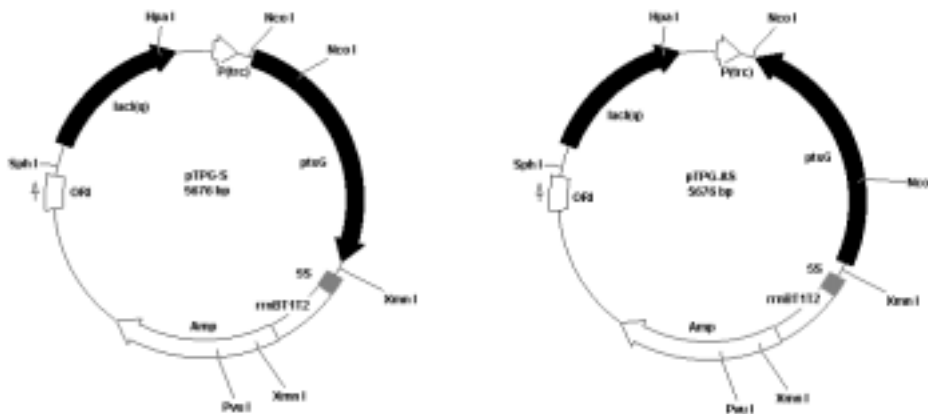


Figura 5.9B: plasmidi pTPG amb l'insert *ptsG* en les dues orientacions possibles, i localització de la diana de restricció Nco I en el MCS i en la posició 312 del *ptsG*.

A la figura 5.10 es mostra el resultat de la separació dels fragments per electroforesi en gels d'agarosa, producte de la doble restricció Sal I, Nco I de DNA plasmídic dels clons recombinants que contenen el plasmidi pJPG (pJPG3 i pJPG4), i de la restricció amb Nco I del DNA plasmídic dels clons amb el vector pTPG (pTGP6, pTGP8 i pTGP10).

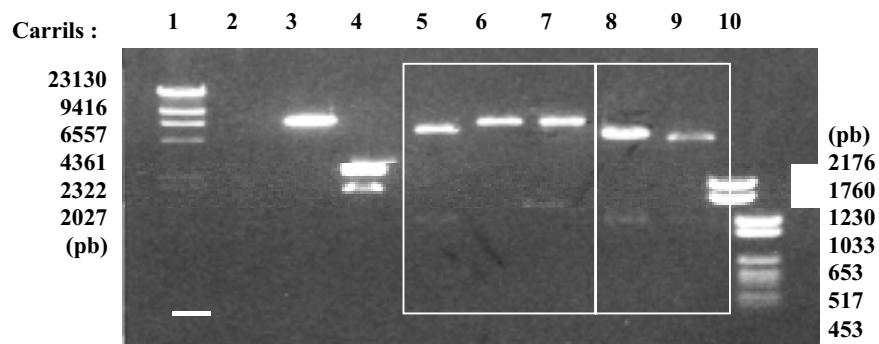


Figura 5.10: fotografia del gel d'agarosa dels fragments de DNA separats electroforèticament, obtinguts per restricció dels clons recombinants. En els carrils 1 i 10 hi van córrer els marcadors de grandària de DNA Marker II. i Marker VI respectivament (els parells de bases de cadascuna de les bandes dels marcadors s'indiquen al costat de la imatge en ordre de grandària. En el carril 5, 6 i 7 hi va córrer el DNA dels plasmidis pJPG3 i pJPG2 i pJPG4 respectivament digerits amb Sal I i Nco I. En els carrils 9 i 10 el DNA de pTPG8 i pTPG10 digerit amb NcoI. En els carrils 2, 3 i 4 hi va córrer el DNA de construccions que no corresponen a aquest apartat.

Com es pot apreciar a la imatge, en el carril 5 es poden apreciar dues bandes, una de més intensa d'aproximadament 5 Kb i una de menys intensa de 1.5 Kb. Aquest patró de bandes corresponia a la construcció pJPG3-amb l'insert en orientació antisentit, per tant els plasmidi es va denominar pJPG3-AS i al clon recombinant d'*Escherichia coli* : DH5 α /pJPG3-AS.

En el carril 6 es va obtenir una sola banda d'aproximadament 6.5 Kb. Aquesta tant podia correspondre a una digestió parcial, i per tant la banda seria de 6.5 Kb, com a un insert en orientació amb sentit on només s'apreciava la banda de 6.1 Kb. La banda de 0.3 Kb no s'apreciava en el gel de concentració 0.8% d'agarosa. En el carril 7 es va obtenir un patró de bandes de 6.5 Kb + 1.7 Kb que no corresponia amb cap patró esperat.

Pel que fa a pTPG digerit amb Nco I es va trobar el següent: en els carrils 8 i 9 es va trobar el patró de bandes esperat per la construcció antisentit: una banda de grandària 4.4 Kb i una de 1.3 Kb, tot i que en el carril 9 aquesta darrera banda era quasi inapreciable. Per tant s'havia obtingut una altra construcció Antisentit pel gen *ptsG* en el plasmidi pTPG. El clon corresponent a aquesta construcció es va denominar pTPG8-AS, i al clon recombinant d'*Escherichia coli* : DH5 α /pTPG8-AS

Per a comprovar l'efecte de l'expressió del DNA del *ptsG* antisentit sobre la fisiologia de la cèl·lula es va dissenyar un experiment amb DH5 α /pJPG3-AS amb l'objectiu d'avaluar l'efecte de diferents nivells d'expressió, és a dir en la realització de cultius a diferents temperatures d'incubació i per tant, a diferents nivells d'inducció. Per això, les cèl·lules recombinants obtingudes es van fer créixer en bioreactor en condicions aeròbiques en medi mínim M9E amb glucosa (15 g/l) ampicil·lina i tiamina. Es van realitzar varis cultius en bioreactor a 28°C, 37°C i 42°C de temperatura. Es va realitzar com a control el cultiu de la soca DH5- α /pJLA603 en les mateixes condicions i a la mateixa temperatura que el clon recombinant DH5- α /pJPG3-AS. Els resultats es mostren en les figures 5.11, 5.12 i 5.13 respectivament per a cada temperatura.

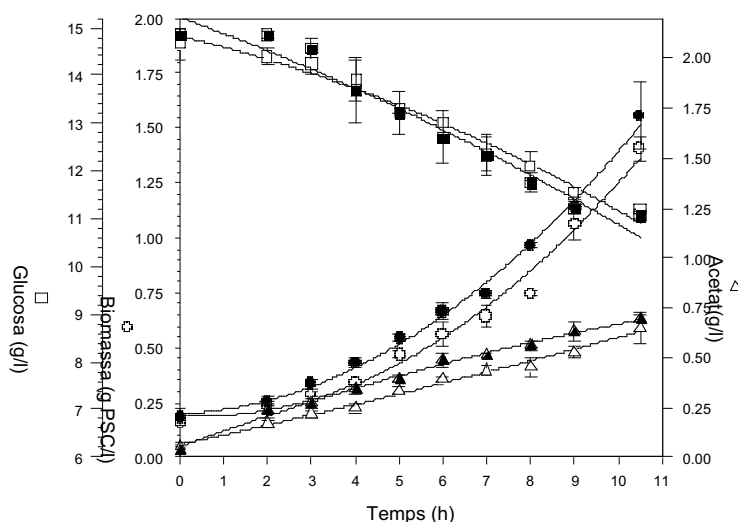


Figura 5.11: cinètica de creixement, consum de glucosa i producció d'acetat per un cultiu d'*Escherichia coli* DH5- α /pJLA603 (símbols plens) i DH5- α /pJPG3-AS (símbols oberts) a 28°C de temperatura .

En aquesta figura es pot observar com a 28°C, condicions en que no hi ha inducció de l'expressió del gen *ptsG-AS*, no s'aprecien diferències significatives de comportament tant pel que fa a cinètica de creixement com de consum de glucosa i producció d'acetat. Al final del cultiu, que va durar 13 hores s'havia assolit una concentració de biomassa de 1.67 g PSC/l de la soca control i 1.48 g PSC/l de la soca amb el plasmidi que porta el gen en orientació antisentit. En ambdós casos no es va esgotar la glucosa del medi per complet i, en el moment d'aturar el cultiu, s'havien consumit uns 3.8 g/l de glucosa, tant en un com l'altre cas. L'acetat produït era molt similar en ambdós casos: 0.73 i 0.70 g/l de concentració. El rendiment de formació d'acetat fou de 0.18 i 0.19 g acetat /g glucosa respectivament.

En la següent figura es mostra el perfil de creixement, consum de glucosa i secreció d'acetat a 37°C.

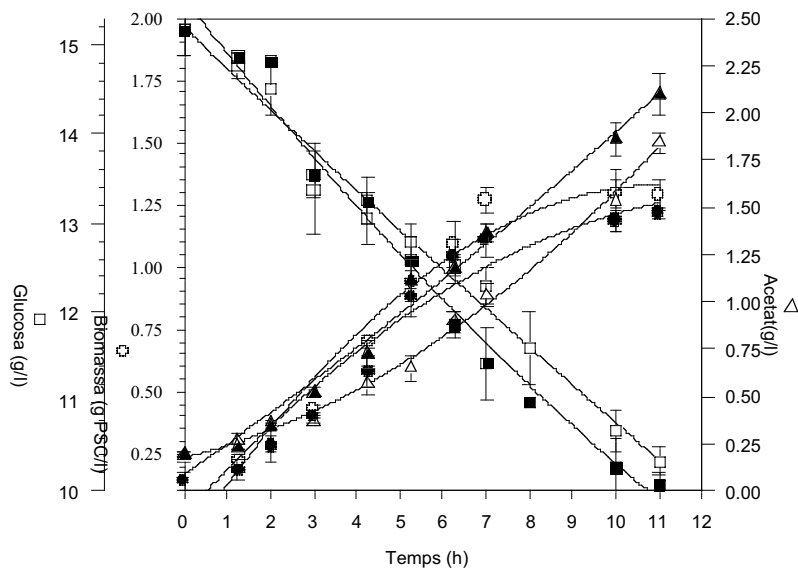


Figura 5.12: cinètica de creixement, consum de glucosa i producció d'acetat de DH5-α/pJLA603 (símbols plens) i DH5-α/pJPG-AS (símbols oberts) a 37°C de temperatura .

En aquestes condicions, es va apreciar una lleugera disminució en la velocitat de consum de glucosa així com, diferències en quant a l'acumulació d'acetat al brou de

fermentació. En aquestes condicions els rendiments de formació d'acetat van assolir valors de 0.43 i 0.39 g/g per la soca control i la soca que expressa el gen antisentit respectivament. Per tant, la soca DH5 α /pJPG3-AS, ara per inducció de l'expressió del gen antisentit, havia permès reduir el rendiment d'acetat en un 10% respecte la soca DH5 α /pJLA603.

Es va realitzar, encara, un darrer cultiu a 42°C, amb el qual es va confirmar que l'expressió del gen antisentit permetia reduir lleugerament la velocitat de consum de glucosa i d'una forma més apreciable la formació d'acetat.

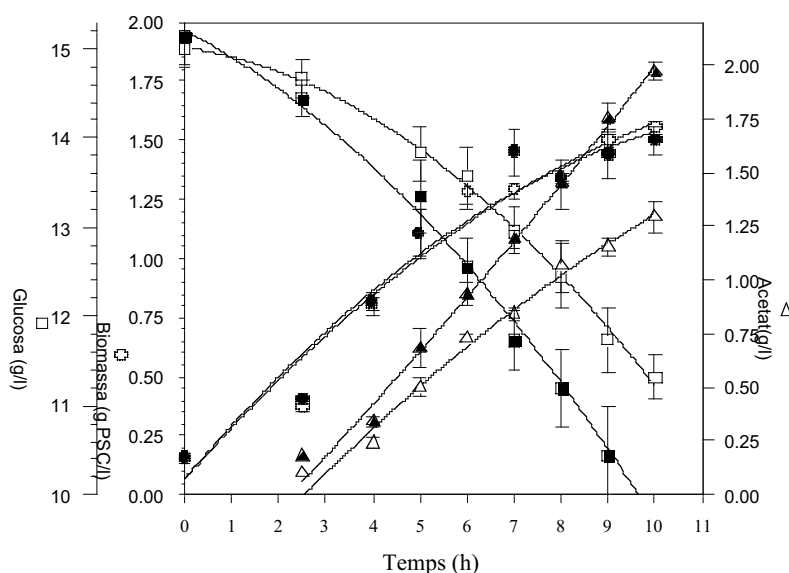


Figura 5.13: cinètica de creixement, consum de glucosa i producció d'acetat de la soca DH5- α /pJLA603 (símbols plens) i DH5- α /pJPG-AS (símbols oberts) a 42°C de temperatura .

En aquestes condicions es van obtenir valors de rendiment de formació d'acetat de 0.40 g/g i 0.35 g/g per la soca control i la soca amb el plasmidi pJPG3-AS. Per tant, el rendiment de formació d'acetat s'havia reduït en un 18.4 %.

Aquests resultats demostraven que la reducció de la velocitat de captació de glucosa, en aquest cas, emprant la tècnica de silenciament de gens per expressió

de la seqüència antisentit del gen *ptsG*, permetia reduir el rendiment de formació d'acetat respecte una soca control que expressa constitutivament el gen *ptsG*. Per tant, es corrobora de nou la hipòtesi que la velocitat de captació de glucosa és la principal causa responsable de la formació d'acetat a *Escherichia coli*. No obstant, aquests resultats posaven també en evidència la importància que té el fenotip de la soca hoste, ja que les diferents soques emprades al llarg d'aquest treball mostren rendiments de biomassa i de formació d'acetat diferents. La soca d'*Escherichia coli* DH5 α és la que presenta un major rendiment d'acetat de les emprades en aquest treball i per tant, la que suposadament ha de mostrar un major efecte de la expressió del gen *ptsG* antisentit en relació amb la producció d'acetat. No obstant, tot i reduir-se el rendiment de formació d'acetat en aquesta soca no s'havia aconseguit millorar el seu comportament pel que fa a rendiment cel·lular. Caldria comprovar, per tant, que succeeix si transformem una soca diferent, com per exemple la K12 que presenta rendiments de formació d'acetat inferiors, amb els plasmidis pJPG-AS emprats en aquest apartat, per tal de veure si s'obtenen nivells de reducció del rendiment d'acetat del mateix ordre. Aquest punt podria ser interessant sobretot en cultius d'alta densitat on la producció d'acetat és més important.

5.4. EFECTE DE LA SOBREEXPRESSIÓ DEL GEN *ppc* DE LA FOSFOENOLPIRUVAT-CARBOXILASA (PEPC) A *Escherichia coli* K12 SOBRE LA FORMACIÓ D'ACETAT

En aquest apartat s'estudia l'efecte de la sobreexpressió d'un enzim clau de la glucòlisi, l'enzim fosfoenolpiruvat-carboxilasa d'*Escherichia coli* i la distribució de fluxos metabòlics intracel·lulars resultant. L'objectiu es veure si la sobreexpressió d'aquest enzim, que catalitza la reacció anapleròtica de reompliment del CAT a nivell de l'oxalacetat, permet augmentar la capacitat del cicle de manera que pugui acomodar més Acetil-CoA provinent de la glucòlisi i alhora es redueixi la formació d'acetat.

Dos intermediaris del CAT, l' α -cetoglutarat i l'oxalacetat són metabòlits intermediaris del cicle dels àcids tricarboxílics, que alhora són precursors de la síntesi d'aminoàcids i nucleòtids. Com que no hi ha síntesi neta d'aquests àcids orgànics en el cicle, s'han de reposar d'alguna manera. Les reaccions que permeten el reompliment del cicle a nivell d'aquests intermediaris es denominen reaccions anapleròtiques. Aquestes reaccions, en cèl·lules procariotes, inclouen: la carboxilació del piruvat per la piruvat-carboxilasa (PirC), la carboxilació del fosfoenolpiruvat per la fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC) i, el cicle del glioxilat que permet reomplir el CAT a nivell del malat. El cicle del glioxilat es troba inhibit per la presència de glucosa, i s'activa només quan s'ha esgotat aquest substrat, permetent a la cèl·lula reomplir el CAT a partir de l'acetat sintetitzat durant el creixement en glucosa (Holms i Bennet, 1971). Les reaccions anapleròtiques més importants en condicions de creixement en glucosa són la fixació de CO_2 tant per la PirC com per la PEPC, que generen ambdós, oxalacetat. El fet que el gen *ppc* que codifica per la PEPC és de menor grandària que el gen que codifica per la PirC i, per tant, més fàcilment manipulable per tècniques de DNA recombinant, va ser un factor que es va valorar positivament alhora d'escollir-ne un dels dos per sobreexpressar-lo.

Escherichia coli utilitza la reacció catalitzada per la fosfoenolpiruvat-carboxilasa (PEPC) per a reomplir el cicle dels àcids tricarboxílics des del fosfoenolpiruvat (PEP), intermediari glucolític, fins a oxalacetat (OAA), intermediari del CAT, utilitzat en importants reaccions biosintètiques. L'enzim PEPC (PEPC: E.C 4.1.1.31.) catalitza la condensació del fosfoenolpiruvat (PEP) amb CO_2 per donar oxalacetat (OAA). Aquesta reacció, com s'ha comentat, té com a funció complementar el CAT per proveir la cèl·lula en creixement de la gran quantitat d'oxalacetat necessari per a la síntesi d'aminoàcids i altres composts. L'OAA és un important substrat per la producció de metabòlits cel·lulars, doncs a partir d'ell es sintetitzen els aminoàcids de la família de l'aspartat, el mateix aspartat, la lisina, la metionina, la treonina i l'isoleucina. Per un altre costat, la condensació de l'acetil-CoA i l'OAA en

citrat, reacció catalitzada per la Citrat-sintasa (CS), permet tancar el cicle i proveir de precursors per a la síntesi d'aminoàcids de la família del glutamat, com el mateix glutamat o la prolina, a més a més, de generar poder reductor útil per a donar energia en forma d'ATP.

La PEPC és un enzim altament regulat al·lostèricament per varis efectors: acetil-CoA, 1,6-bifosfat de fructosa, L-aspartat, GTP, GDP, els àcids grassos de cadena llarga que activen o inhibeixen les dues reaccions que consumeixen PEP. El L-aspartat inhibeix la PEPC i, l'acetil-CoA inhibeix la Piruvat-quinasa (PirK) i el complex de la Piruvat-deshidrogenasa (PirDH), i activa la PEPC, mentre que l'1,6 bifosfat de fructosa activa ambdós enzims.

El gen *ppc* d' *Escherichia coli* K12 que codifica per l'enzim PEPC havia estat aïllat i seqüenciat completament per Izui i col·laboradors (1981). L'estudi de l'estructura i funció d'aquest enzim va portar a aquests autors a clonar el gen *ppc* d' *Escherichia coli* en un plasmidi que permetés la seva sobreexpressió, amb l'objectiu de disposar de quantitats suficients de l'enzim purificat amb fins de recerca bàsica. La proteïna d'*Escherichia coli* K12 recombinant PEPC era idèntica a la nadiua i es comportava igual que aquesta (Izui *et al.* 1983). Posteriors subclonacions van conduir a l'obtenció del plasmidi d'expressió pT3 (Izui *et al.* 1995). Aquest plasmidi (figura 5.14), de 5.2 Kb, conté un fragment DNA de 3.2 Kb de longitud amb el gen *ppc* a partir del nucleòtid 230 després del lloc d'inici de la transcripció, i manté la regió promotora del gen salvatge. Per tant, s'expressa constitutivament com aquest, i està sotmès al control pels mateixos efectors al·lostèrics, esmentats anteriorment. El plasmidi pT3 conté, a més a més, el marcador de selecció de resistència a l'ampicil·lina. Permet obtenir concentracions de PEPC de fins el 30% de la proteïna total, en cèl·lules d'*Escherichia* recombinants creixent en glucosa (Izui *et al.* 1981).

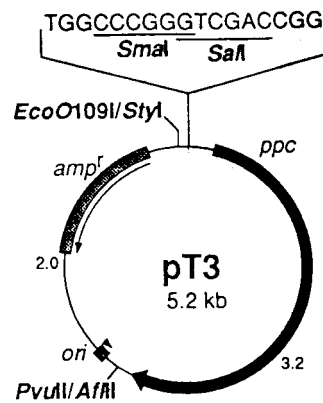


Figura 5.14: detall del plasmidi pT3 que permet la sobreexpressió del gen *ppc* de la PEPC.

Es va obtenir la soca d'*Escherichia coli* portadora del plasmidi pT3 (*Escherichia coli* F15, cedida gentilmente pel Dr. K. Izui de la Universitat de Kyoto) i es va extreure el DNA plasmídic (mini i midipreparacions de DNA_{pl}) per tal de transformar la soca d'*Escherichia coli* K12 emprada en anteriors apartats. El DNA_{pl} obtingut, de 5.2 Kb de grandària, es va purificar i quantificar a partir de la seva separació en gels d'agarosa. Un cop obtingut el vector pT3 pur, es va utilitzar per a transformar cèl·lules competents d'*Escherichia coli* K12. Tots els clons recombinants obtinguts es va comprovar (per digestió amb Sal I, enzim que talla el plasmidi pT3 en una diana externa al gen *ppc*) que contenien un únic fragment de DNA de 5.2 Kb de longitud. Per tant qualsevol d'ells era vàlid per a realitzar un experiment de cultiu en bioreactor, on es pogués apreciar l'efecte de la sobreexpressió del gen *ppc* *in vivo*.

Per a realitzar aquest experiment es va utilitzar un bioreactor (2 litres-Biostat-B) amb les següents condicions d'operació: 37°C de temperatura, pH 7.0, pressió parcial d'oxigen dissolt superior al 30 % de saturació, amb una velocitat d'agitació variable entre 300 i 900 rpm. El cabal d'aire es va prefixar en 1 vvm. El medi de cultiu fou el medi mínim enriquit M9E amb 10 g/l de glucosa, suplementat amb 100 µg/ml d'ampicil·lina per tal de mantenir la pressió selectiva sobre les cèl·lules

transformades. Paral·lelament en un segon bioreactor idèntic es va realitzar com a control el cultiu de la soca salvatge d' *Escherichia coli*, en les mateixes condicions d'operació. Els perfils de concentració de biomassa, glucosa i acetat es mostren a la figura 5.15.

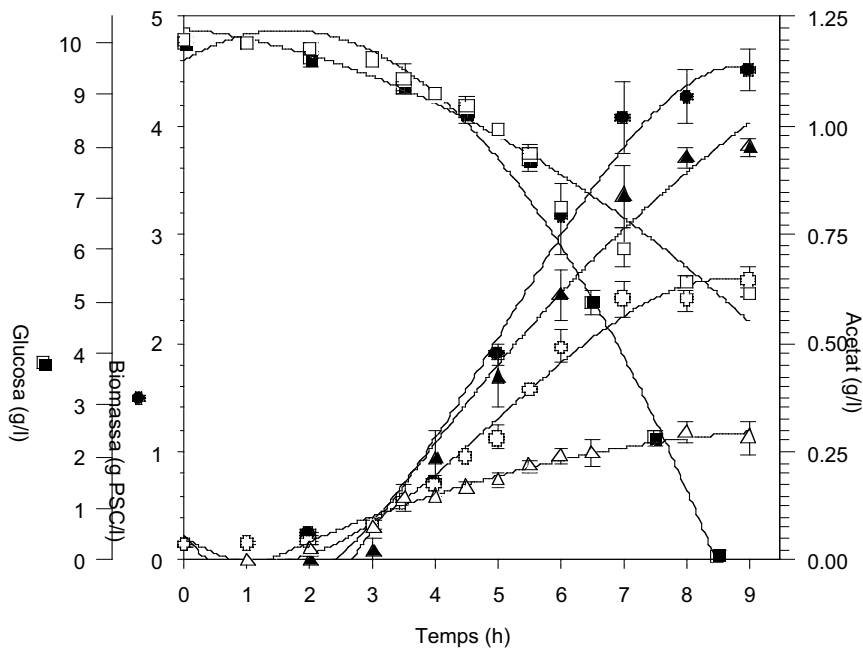


Figura 5.15: cultiu aeròbic de la soca d'*Escherichia coli* K12 salvatge (símbols plens) i d'*Escherichia coli* K12/pT3 (símbols oberts) en medi mineral glucosat M9E amb 10 g/l de glucosa.

Com es pot observar en la figura, la soca recombinant d'*Escherichia coli* K12 que sobreexpressa el gen de la PEPC presenta una menor velocitat específica de creixement ja des de ben aviat. La μ disminueix de 0.73h^{-1} en la soca control a 0.58h^{-1} en la soca recombinant. Això fa que la concentració de biomassa màxima assolida a les 8 hores de durada del cultiu fos de 2.56 g PSC/l per la soca recombinant i 4.3 g PSC/l per la soca salvatge. Durant aquest període la glucosa no es va esgotar en el cultiu de la soca recombinant, només es van consumir 4.6 grams de glucosa dels 10 grams inicials disponibles, mentre que la soca salvatge la va esgotar per complet. L'acetat produït per la soca modificada durant el període de

creixement estudiat fou de 0.27 g/l mentre que en la soca salvatge s'assolien concentracions pròximes a 1 g/l.

A la figura 5.16 es mostren els valors de les velocitats específiques de creixement (μ), consum de glucosa i producció i acetat (q_{Glc} i q_{Hac}), obtinguts per regressió lineal de les dades experimentals del cultiu. Els resultats es mostren en forma de diagrama de barres en comparació amb els valors obtinguts del cultiu de la soca salvatge.

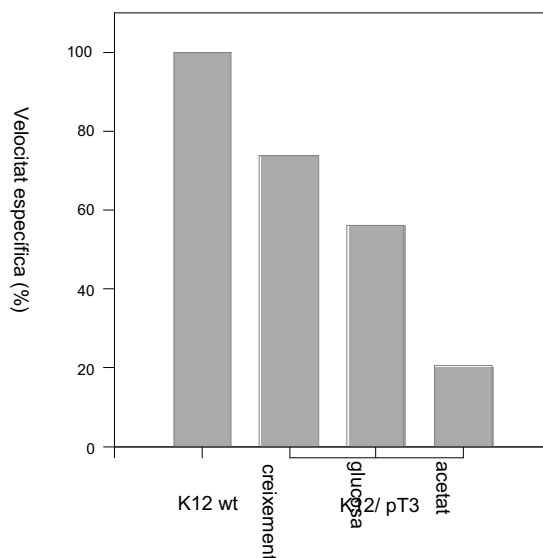


Figura 5.16: Comparació de les velocitats específiques de creixement (μ en h^{-1}), consum de glucosa i producció d'acetat (en mmols/g·h) pel cultiu de *Escherichia coli* K12/pT3 respecte la soca salvatge *Escherichia coli* K12. Els valors de la soca salvatge es prenen com a valor del 100% i les barres mostren la disminució de les velocitats específiques de consum i producció en % respecte aquesta.

D'entrada es va poder observar com la sobreexpressió del gen de la PEPC havia fet que la velocitat específica de creixement s'hagués reduït un 26% (de $0.73 h^{-1}$ en la soca salvatge a $0.58 h^{-1}$ en la soca recombinat). Aquesta reducció de la velocitat específica de creixement es va veure acompanyada d'una reducció de la velocitat específica de consum de glucosa del 44% ($9.95 \text{ mmols/g}\cdot\text{h}$ en la soca salvatge enfront dels $5.57 \text{ mmols/g}\cdot\text{h}$ en la soca modificada). La velocitat d'excreció d'acetat també es va veure dràsticament afectada per la modificació. La reducció

va arribar al 85 %, respecte el valor de velocitat específica en la soca salvatge (3.52 a 0.52 mmols/ g·h).

Es van utilitzar les dades de concentració de components extracel·lulars durant la fase de creixement exponencial i els valors de les velocitats específiques obtinguts a partir d'ells, per a obtenir per mitjà del model estequiomètric presentat al capítol 3, el diagrama de fluxos intracel·lulars, que es mostra en la figura 5.18 (diagrama fluxos complet de pT3). En aquesta figura es mostren els fluxos normalitzats per la velocitat de captació de glucosa, per a poder fer una comparació amb la soca salvatge. Els valors directes dels fluxos estimats per mitjà del model estequiomètric es presenten a l'annex 2.

L'anàlisi dels fluxos metabòlics obtinguts per mitjà del model permet explicar més a fons el comportament observat en el cultiu del clon recombinant que sobreexpressa la PEPC. (Figura 5.17) Al comparar els valors dels fluxos i la seva distribució amb el diagrama de fluxos normalitzats per la soca K12 (figura 4.9) sembla clar que el flux de carboni a través de la reacció anapleròtica de la PEPC és un dels factors que influencia l'excreció d'acetat. L'augment del flux a través de la reacció catalitzada per la PEPC del 20 al 27 % del flux d'entrada de glucosa en la soca salvatge, va fer disminuir el flux d' excreció d'acetat del 35.4 al 9.38%. Per tant, l'objectiu de reduir l'excreció d'acetat es va veure complert.

Malgrat això, si bé la reacció anapleròtica de reompliment del CAT operava a més velocitat, tal i com s'esperava, la velocitat de circulació del CAT, inesperadament, era clarament inferior en la soca recombinant en relació amb la soca salvatge. En aquesta, el flux del CAT representava quasi el 36% del flux d'entrada de glucosa, mentre que, per la soca modificada, aquest flux fou del 21.16%.

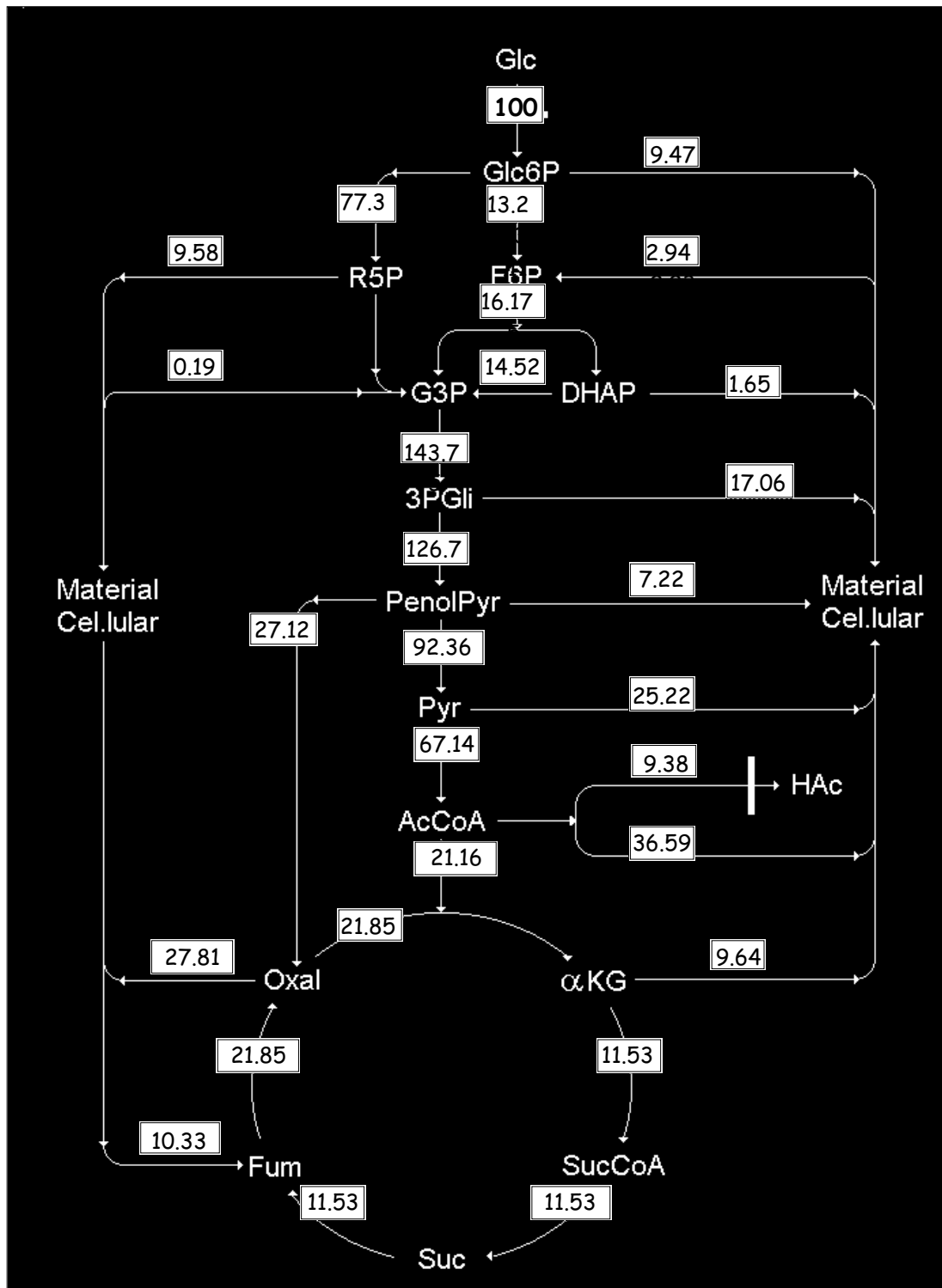


Figura 5.18: Diagrama de fluxos de la soca d'*Escherichia coli* K12/pT3 en % respecte el flux d'entrada de glucosa (en mmols/g·h)

La hipòtesi inicial era que un augment de la capacitat del CAT permetria a la cèl·lula aprofitar millor el piruvat generat en la glucòlisi que un cop convertit en

acetil-CoA podria ser acomodat pel cicle a major velocitat, i per tant la cèl·lula no necessitaria dissipar l'excés de carboni en forma d'acetat.

De l'anàlisi de fluxos es desprèn que el possible motiu de la reducció de la velocitat de producció d'acetat és diferent al previst. La causa metabòlica d'aquest fet es pot explicar perquè al augmentar el flux a través de la PEPC es redueix la disponibilitat de PEP per a la translocació de glucosa a través del PTS. El flux d'entrada de glucosa va passar de 9.9 a 5.5 mmols/g·h. El PEP disponible es va veure reduït en un 20 %. Es va passar de 118.36 a 92 mmols/g·h, per tant, la reacció de translocació de glucosa al PTS, no podia operar a la mateixa velocitat. En la nova situació, no hi havia prou PEP per a translocar tota la glucosa que podria entrar. La cèl·lula, no obstant, fou capaç de reorganitzar els seus fluxos per tal d'aprofitar millor la glucosa, i es pot dir que és més eficient en rendiment cel·lular, doncs excreta menys acetat i destina més carboni a biosíntesi que la soca salvatge. Pràcticament totes les vies de síntesi de precursors es veuen afavorides per la modificació genètica. Els fluxos cap a biosíntesi a partir de l'OAA i l' α -cetoglutarat es van veure incrementats. En aquest sentit es pot dir que s'havia aconseguit potenciar la biosíntesi per a absorbir més esquelets carbonatats.

Per altra banda, sembla que la glucòlisi i el cicle de les pentoses competeixen per la glucosa incorporada. L'augment del flux relatiu que es desvia cap aquesta segona via indica que la cèl·lula recombinant és més eficient en generar recursos biosintètics per la via de les pentoses, tant per a la síntesi d'àcids nucleics, com de NADPH. Sembla ser que la cèl·lula regula els nivells d'expressió dels enzims glucolítics en funció de la velocitat de captació de glucosa. Al captar menys glucosa, la cèl·lula interpretaria que no requereix el mateix nivell d'enzims glucolítics i limitaria la seva expressió en favor dels enzims que intervenen en la via de les pentoses fosfat.

Observant el comportament d'*Escherichia coli* quan es sobreexpressa la PEPC es poden donar resposta a qüestions essencials del metabolisme per aplicar les tècniques d'enginyeria metabòlica. Tot i que el metabolisme d'*Escherichia* ha sigut àmpliament estudiat, moltes característiques de regulació segueixen sent una incògnita. Per aconseguir l'objectiu de manipular racionalment el seu metabolisme cel·lular és important entendre com respon a la sobreexpressió d'enzims, i quins mecanismes de control operen en la cèl·lula en creixement.

En primer lloc es va trobar que la sobreexpressió de la PEPC, per si sola, en presència de glucosa donava un fenotip diferent del de la soca salvatge. La cèl·lula modificada consumia la glucosa a menor velocitat. En contra de l'esperat, la velocitat del CAT fou inferior, tot i haver augmentat el flux de PEP a OAA respecte el flux d'entrada de glucosa a la cèl·lula. No obstant, aquest comportament és desavantatjós. Hi ha un insuficient aport de PEP cap a piruvat per sostenir el creixement. Aquests resultats demostren que la cèl·lula no està optimitzada pel creixement en condicions de laboratori, tot i que existeix la possibilitat d'ajustar el nivell d'enzims nadius de les VCM i millorar el rendiment de creixement.

Aquest exemple indica que els efectes fisiològics de la sobreexpressió de gens d'enzims de les vies centrals del metabolisme s'han d'interpretar amb cautela, doncs la cèl·lula respon sobreexpressant o inhibint altres gens i, per tant, modificant el metabolisme en un sentit diferent al pretès. Els resultats obtinguts demostren que és possible redirigir el metabolisme modificant la concentració dels enzims nadius. No obstant, falten dades de regulació cel·lular per tal de seguir modificant les cèl·lules en el sentit desitjat.

Es pot apreciar com la modificació dels nivells d'enzim PEPC en diferents soques, per si sola o conjuntament amb altres modificacions genètiques, resulta en diferents fenotips i comportaments metabòlics. En un treball en que es

sobreexpressa el gen *ppc* de la PEPC en una soca d' *Escherichia coli* mutant que té desregulat, a més a més, el cicle del glioxilat (mutants *fadR*: soques mutants d' *Escherichia coli* K12 constitutives per la degradació d'àcids grassos que tenen la via del glioxilat augmentada), es redueix l'excreció d'acetat en quatre vegades respecte el control, i el rendiment cel·lular no es veu gaire afectat per la modificació (Walsh *et al.* 1995; Farmer i Liao, 1997). Aquests resultats apunten que *Escherichia coli* no té optimitzats els nivells de PEPC per a créixer bé en cultius en discontinu en condicions d'excés de glucosa (Liao, Chao, Patnaik 1994). Delgado i Liao (1997) prediuen per anàlisi invers de fluxos metabòlics que l'augment del flux de carboni a través de les reaccions anapleròtiques (reacció de la PEPC i via del Glioxilat) redueix l'excreció d'acetat i incrementa el rendiment de creixement. Millard, Chao, Liao i Donnelly (1996) utilitzen la sobreexpressió de la PEPC obtenint 3.5 vegades més concentració de succinat (passant a ser el subproducte majoritari) que en condicions normals.

Els resultats obtinguts en aquests experiments i, les conclusions que es desprenen de l'anàlisi de fluxos metabòlics estimats a partir de les mesures extracel·lulars realitzades han permès identificar alguns dels motius que fan que la soca salvatge presenti una desregulació metabòlica que té com a conseqüència la formació i excreció d'acetat. L'excreció constitutiva d'acetat per *E. coli* K12 és la manera més eficient de balancejar el metabolisme cel·lular entre l'elevada velocitat glucolítica i la limitada capacitat del CAT. En condicions aeròbiques l'enzim PEPC permet reomplir el CAT de l'oxalacetat consumit per a les reaccions biosintètiques, però no s'arriba a una situació de creixement balancejat.

L'alteració metabòlica deguda a la sobreexpressió de la PEPC ha permès redistribuir els fluxos metabòlics intracel·lulars de manera que la velocitat d'entrada de glucosa a través del PTS s'ha vist considerablement reduïda, i a la vegada al disminuir la quantitat de piruvat disponible s'ha reduït la formació relativa d'acetat. La sobreexpressió de la PEPC ha permès redirigir els fluxos de

carboni, disminuint l'excreció d'acetat en un 80%. No obstant, tot i que s'ha reomplert el CAT, la velocitat específica de creixement ha disminuït respecte la soca salvatge. en un 25% i la captació de glucosa en un 45%.

Com s'ha pogut comprovar en aquest capítol, és possible redistribuir els fluxos metabòlics intracel·lulars mitjançant modificacions genètiques senzilles de gens que codifiquen per enzims de les vies centrals del metabolisme. Malgrat això, cal un coneixement més profund dels mecanismes de control i regulació de l'expressió de gens *in vivo* per tal d'assolir els objectius de millora del comportament de les cèl·lules quan es cultiven en bioreactor. Els models metabòlics d'estimació de fluxos intracel·lulars estan incorporant, cada cop més, aquests requisits, i poden representar una eina molt valuosa en la millora de les propietats de cèl·lules d'interès biotecnològic. Per un altre costat, cada cop és més freqüent realitzar modificacions genètiques en més d'un punt d'actuació, ja sigui amb dobles mutants o bé mutants en tota una via. Cada cop és més acceptat que per augmentar un flux metabòlic no n'hi ha prou en determinar quin és el pas limitant d'una via, aïllar-ne el gen responsable i sobreexpressarlo. El desenvolupament de l'anàlisi del control metabòlic (ACM) ha permès evidenciar que el control del flux d'una via està distribuït per tota la xarxa metabòlica. L'èxit d'una modificació genètica resideix en gran mesura en contrarestar l'efecte d'una modificació puntual amb una altre que permeti a la cèl·lula acomodar-se a la nova situació imposada. Així, per exemple, l'objectiu de reduir la formació de subproductes a *Escherichia coli* es podria abordar des d'aquest punt de vista realitzant tant modificacions genètiques a nivell del PTS com de les vies de síntesi d'acetat, lactat o glicogen, és a dir soques doble-mutants.