

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Tesis doctoral

"Optimización de la producción heteróloga de ácido docosahexaenoico en *E. coli*"

LAURA GINER ROBLES

Dirigida por: **Dr. FERNANDO DE LA CRUZ CALAHORRA**

Dr. GABRIEL MONCALIÁN MONTES

Santander, julio de 2018



Los doctores **Fernando de la Cruz Calahorra**, Catedrático de Genética de la Universidad de Cantabria y **Gabriel Moncalián Montes**, Profesor Titular de Genética de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN que Doña **Laura Giner Robles**, Licenciada en Biotecnología por la Universidad de León, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado "Optimización de la producción heteróloga de ácido docosaheptaenoico en *Escherichia coli*".

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación y depósito como Memoria de Doctorado al objeto de optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste expedimos el presente certificado en

Santander, a 12 de Julio de 2018

Fdo. Dr. Fernando de la Cruz Calahorra

Fdo. Dr. Gabriel Moncalián Montes

El presente trabajo ha sido realizado entre el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y el Departamento de Microbiología y Genómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, bajo la dirección del Dr. Fernando de la Cruz Calahorra y el Dr. Gabriel Moncalián Montes, gracias a un contrato de la Universidad de Cantabria asociado a los proyectos “Ingeniería Genética de *Escherichia coli* para mejorar la producción de lípidos ricos en ácidos Grasos omega-3” (TF16-XX-003 - SODERCAN/FEDER) y “Producción de ácidos grasos omega-3 a partir de microorganismos” (2014) en colaboración con la empresa Biomar Microbial Technologies.

A mis abuelas

En primer lugar, quiero agradecer y otorgar el mérito que se merece a la increíble diseñadora Blanca Corrales, por hacer realidad la mejor portada de tesis que podía haber imaginado.

El presente documento no es más que el relato de una travesía que empezó en 2012 en León y que me ha llevado a vivir cuatro bonitos años en Santander. Por supuesto, quiero agradecer a mis directores, mecenas e inspiradores de este viaje, Fernando de la Cruz y Gabriel Moncalián, el permitirme haber vivido esta experiencia. Gracias a Antonio Fernández por haber sido el primero en darme una oportunidad, y a los compañeros de Biomar por haber empezado el trayecto conmigo. Agradezco especialmente a Carlos, por los inspiradores debates científicos y toda la ayuda que me ha prestado durante estos años.

Sin duda, no hay viaje que se precie que no vaya acompañado de un puñado de compinches que hacen el camino un poco más ameno. Por ello, gracias a todos mis compañeros de viaje laboratoril por su apoyo, ideas, y charlas reveladoras... Especial agradecimiento he de hacer a Lorena, con quien he viajado estos cuatro años a través de másteres y montañas, de valles y evaluaciones, y de vaivenes de todo tipo. Otra mención especial la merece Marys, gracias por tus aportaciones, consejos y apoyo desde aquel día de septiembre que nos sentamos juntas por primera vez hace tantos años.

En toda aventura, hay elementos imprescindibles. Nuestras brújulas. Nuestro mapa del tesoro hacia los reactivos y los protocolos perdidos. Muchas gracias a nuestras técnicas de apoyo, Sandra, Sheila, Natalia, Irene, y especialmente a Mati, porque sin ellas esta tesis no sería lo mismo, y yo tendría multitud de canas más.

En esta profesión nuestra, el trabajo nos succiona. Por suerte, en el IBBTEC existen personas que hacen que sea menos trabajo y más vida. Agradezco a mis compañeras y compañeros de fatigas y cafés, por los pequeños momentos que hacen que mis días sean un poco más bonitos y los momentos de frustración menos solitarios. Muchas gracias a Yelina, Judit, Ali, Candela, Rocío, Marta, Ester, Fernando y Mario. Mil gracias a Patri y Helen por responder siempre a todos los planes con un “me apunto” y una sonrisa.

Por supuesto, este viaje no habría sido lo mismo sin los ánimos y el apoyo incondicional de mucha gente. A pesar de la lejanía, familia y amigos han estado ahí en los momentos de pánico y frustración, y también en los de satisfacción y felicidad. Muchas gracias a toda mi familia, por estar siempre ahí para ayudarme y animarme. Sin mis padres, abuelas, tías, primas y primos,

habría llegado hasta aquí con mucha más dificultad. Gracias a mi hermana, Maria, por apoyarme y aguantarme mis quejas, frustraciones, éxitos y alegrías.

Muchas gracias también a aquellos que habéis estado ahí desde los inicios, pasando por las distintas paradas de mi viaje. Gracias a los que me conocen desde los años de adolescencia, y que han seguido dándome su cariño y sinceridad Amanda y Victor. A los que me acompañaron y me acompañan desde los años universitarios: aunque nos vemos poco, nos queremos mucho. Gracias a , Laura, Sergio, Amado, y Silvia, por acogerme y cuidarme hace ya unos cuantos años y otros tantos conciertos, cenas, cines y bailoteos varios por tierras leonesas.

En tierras cántabras también he tenido mi dosis de amistad, he encontrado personas que me han acompañado, y con quien he compartido muchos momentos inolvidables. Agradezco los ratitos de diversión, las conversaciones locas y los calabacines a Juan, Antonio y Laura. A Inés, las charlas, comilonas y ratitos de procrastinación caseros. Gracias a mis *lindy hoppers* favoritos por las horas de bailes y charlas.

Dicen por ahí que “un mar en calma nunca hizo al marinero experto”. Gracias a todos por estar a mi lado, y ayudarme a navegar en la dirección adecuada en los momentos de tormenta. Gracias a todos por mimarme y cuidarme, apoyarme en la risa y la tristeza, en el drama y el alboroto. En definitiva, gracias por estar ahí en este torbellino de eventos y sentimientos que han sido los últimos años y que han culminado en estas páginas.

Contenido

Abreviaturas	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Ácidos grasos omega-3 y su ventaja ecológica.....	3
1.1.1. Propiedades.....	3
1.1.2. Impacto sobre la salud humana	4
1.1.3. Usos en acuicultura	8
1.1.4. Importancia económica de los ácidos grasos omega-3	10
1.1.5. Fuentes de producción de omega-3 actuales	11
1.2. Biosíntesis de ácidos grasos	14
1.2.1. Síntesis de ácidos grasos saturados	14
1.2.2. Insaturación de ácidos grasos	18
1.2.3. Regulación del metabolismo de ácidos grasos	19
1.2.4. Síntesis de LC-PUFA.....	21
1.2.5. Síntesis de EPA y DHA en bacterias marinas.....	25
1.3. Acumulación de lípidos en células bacterianas.....	29
1.3.1. Fosfolípidos	29
1.3.2. Ácidos grasos libres.....	31
1.3.3. Triacilglicéridos.....	32
2. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Cepas bacterianas.....	41
3.2. Plásmidos.....	41
3.3. Oligonucleótidos.....	43
3.4. Técnicas microbiológicas.....	45
3.4.1. Medios de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i>	45

3.4.2. Medición del crecimiento bacteriano	45
3.4.3. Liofilización de muestras.....	45
3.5. Técnicas en biología molecular de ácidos nucleicos	45
3.5.1. Extracción y purificación de ADN de <i>E. coli</i>	45
3.5.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	46
3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
3.5.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	46
3.5.5. Secuenciación Sanger.....	47
3.5.6. Análisis de digestión de ADN mediante enzimas de restricción	47
3.5.7. Secuenciación masiva.....	47
3.5.8. Transformación de ADN	48
3.5.9. Estrategias de clonación.....	49
3.5.10. Análisis de expresión de ARN	51
3.6. Técnicas en biología molecular de proteínas	52
3.6.1. Métodos de sobreexpresión de proteínas y lisado celular	52
3.6.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	52
3.6.3. Purificación de proteínas	53
3.6.4. Determinación de la concentración de proteína total.....	55
3.6.5. Concentración de proteínas y cambio de buffer.....	55
3.6.6. Identificación de proteínas	56
3.7. Técnicas analíticas de ácidos grasos.....	56
3.7.1. Determinación de la composición de ácidos grasos y cuantificación de DHA.....	56
3.7.2. Identificación de DHA mediante TLC.....	57
3.7.3. Extracción de lípidos neutros y análisis por TLC.	58
3.8. Análisis bioinformáticos	58
3.8.1. Bases de datos.....	58
3.8.2. Herramientas bioinformáticas para secuencias de ácidos nucleicos.....	58
3.8.3. Herramientas bioinformáticas para secuencias de proteínas.....	59

3.8.4. Reconstrucción de pLGR13 en secuenciación masiva.....	59
3.9. Análisis estadísticos.....	59
4. RESULTADOS	61
4.1. Mejora de la síntesis de DHA en <i>E. coli</i>	63
4.1.1. Análisis de la expresión de los genes <i>pfa</i>	63
4.1.2. Estudio de expresión de proteínas Pfa.....	69
4.1.3. El caso particular de PfaA: Purificación.....	72
4.1.4. Análisis de la actividad del complejo Pfa	77
4.1.5. Modificación de flujos de carbono.....	78
4.2. Mejora de la producción de biomasa a baja temperatura.....	85
4.2.1. Determinación de la producción óptima de biomasa y DHA.....	85
4.2.2. Introducción de chaperoninas activas a baja temperatura	87
4.3. Acumulación de DHA.....	90
4.3.1. Acumulación de DHA en forma de TAG	90
4.3.2. Secreción de DHA por acción de una tioesterasa	93
4.4. Evolución de la cepa productora de DHA.....	98
4.4.1. Ensayos de competición.....	98
4.4.2. Cinética de crecimiento en condiciones de crecimiento restringido.....	100
5. DISCUSIÓN.....	103
5.1. Mejora de la producción de DHA	106
5.1.1. Los genes <i>pfaABCD</i> tienen una mayor expresión a 15 °C en pDHA4	106
5.1.2. El complejo Pfa reduce su actividad a 25 °C	106
5.2. Mejora de la disponibilidad de sustrato para Pfa	107
5.3. Mejora de la producción de biomasa.....	112
5.3.1. Determinación de la fase óptima de producción de DHA.....	112
5.3.2. Optimización del crecimiento de <i>E.coli</i> a baja temperatura.....	113
5.4. Acumulación de producto final	113
5.4.1. Acumulación de DHA en triacilglicéridos	114

5.4.2. Secreción del DHA al medio	114
5.5. Evolución natural de un sistema de síntesis de DHA	116
6. CONCLUSIONES	119
7. REFERENCIAS.....	123
8. PUBLICACIONES.....	139
9. ANEXOS	142
Anexo 1.....	153
Anexo 2.....	153
Anexo 3.....	155
Anexo 4.....	156

Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
Abs	Absorbancia
ACC	Acetil-CoA Carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de grupos acil
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa
ALA	Ácido α -linolénico
Ap	Ampicilina
Apo	Inactivo
Ara	L-Arabinosa
ARN	Ácido ribonucleico
AT	Aciltransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CLF	Factor de longitud de cadena
Cm	Cloranfenicol
CoA	Coenzima A
C-terminal	Carboxi-terminal
DAG	Diacilglicérido
DE	Desviación estándar
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DH/I	Dehidratasa/isomerasa
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ER	Enoilreductasa
FAME	Ácido graso metilesterificado
FAS	Ácido graso sintasa
FFA	Ácido graso libre
GC	Cromatografía de gases
Holo	Activo
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
Kn	Kanamicina
KR	Cetoreductasa
KS	Cetosintasa
LA	Ácido linoleico
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo

MAT	Malonil aciltransferasa
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N-terminal	Amino-terminal
ORF	Marco de lectura de proteínas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pfa	Ácido graso sintasa de LC-PUFA
PKS	Policétido sintasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppGpp	Guanosin pentafofato
PPT	Fosfopanteteinilo
RBS	Sitio de unión al ribosoma
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa con retrotranscripción
SDS-PAGE	Electroforesis de poliacrilamida-glicina-SDS
TAG	Triacilglicérido
TE	Tioesterasa
TLC	Cromatografía en capa fina
v/v	Relación volumen/volumen

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ácidos grasos omega-3 y su ventaja ecológica

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) son aquellos ácidos grasos cuya cadena tiene una longitud de 18 carbonos o más, y al menos dos enlaces dobles en posición cis. Los LC-PUFA se clasifican en dos grandes grupos en función de la posición del primer doble enlace respecto al carbono omega (ω): ω -3 y ω -6 (**Figura 1A**) (Li y Hu, 2009).

1.1.1. Propiedades

Los LC-PUFA se encuentran principalmente asociados a los fosfolípidos de la membrana celular. Se ha observado que las bicapas lipídicas ricas en este tipo de ácidos grasos presentan un incremento en la fluidez debido a la flexibilidad de sus múltiples dobles enlaces (**Figura 1B**). Por ello, la presencia de LC-PUFA en los fosfolípidos puede alterar algunas de las funciones de la membrana celular, como son la permeabilidad, el transporte de moléculas, la actividad de proteínas asociadas a ella, o la transducción de señales. Además, se ha descrito que la existencia de algunos LC-PUFA, como el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) o el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA), en los fosfolípidos de la envuelta celular de algunas bacterias marinas psicrófilas halladas en hábitats marinos fríos y a gran profundidad podría estar relacionada con la capacidad de adaptación de estas bacterias a condiciones ambientales

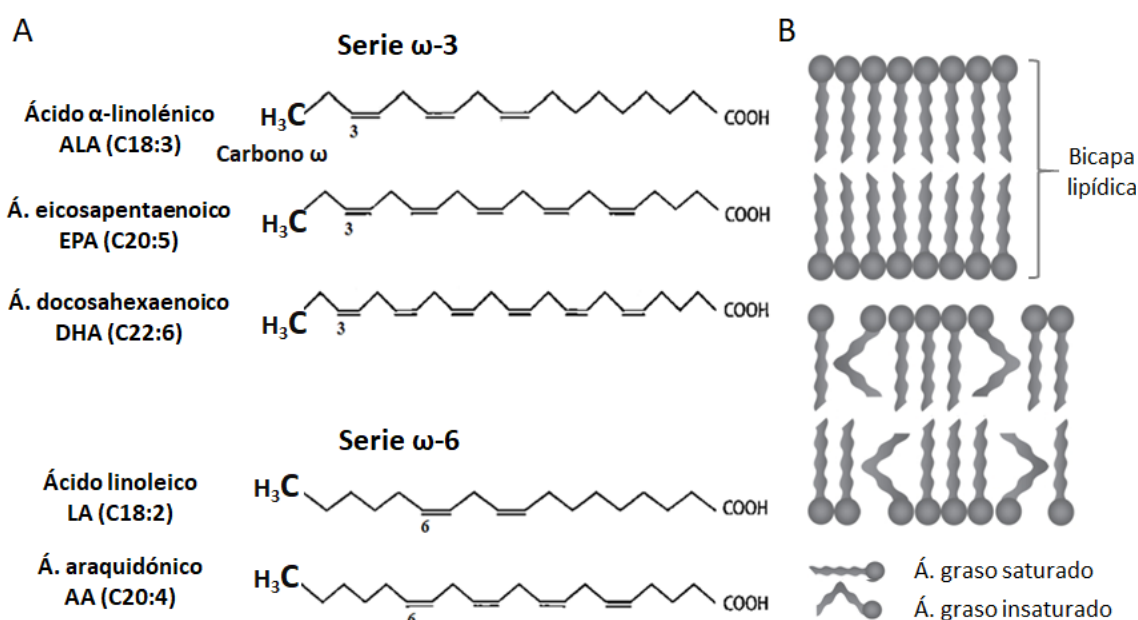


Figura 1. Ácidos grasos poliinsaturados. **A)** Estructura química y nomenclatura de algunos ácidos grasos ω -3 y ω -6. Entre paréntesis se indica el número de carbonos y el número de insaturaciones en la cadena de los ácidos representados. **B)** Efecto de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados sobre la fluidez de la membrana.

extremas en las que habitan (DeLong y Yayanos, 1986; Nichols, 2003). Sin embargo, aunque parece que hay una correlación evidente entre la habilidad de producir LC-PUFA y los fenotipos psicrófilos/piezófilos (Nichols, 2003), Allen y Bartlett (2002) demostraron que un mutante de *Photobacterium profundum*, al que se le había eliminado la ruta de síntesis de LC-PUFA, era capaz de sobrevivir en condiciones de alta presión y baja temperatura, sugiriendo que la presencia de estos ácidos grasos podría no ser esencial.

Las bacterias marinas ricas en LC-PUFA podrían tener dos roles en la red trófica en la que se encuentran. En primer lugar, estas bacterias marinas son el alimento principal de organismos omnívoros y filtradores bentónicos. Por otro lado, estas bacterias forman parte de la comunidad microbiana comensal asociada a animales marinos (Nichols, 2003). Por ello, los LC-PUFA que se han detectado en los lípidos de los vertebrados e invertebrados de aguas profundas en grandes cantidades, esenciales en estos organismos superiores, proceden de la síntesis primaria de bacterias y hongos unicelulares (DeLong y Yayanos, 1986). Por tanto, las bacterias y demás microorganismos productores de LC-PUFA tienen un papel importante en el control de la eficiencia de transferencia de biomasa y energía a cadenas tróficas (Müller-Navarra et al., 2000).

Por último, se ha observado que la presencia de LC-PUFA incrementa la hidrofobicidad de la membrana celular, de forma que estos ácidos grasos podrían actuar como mecanismo de protección de la célula frente a la entrada a través de la bicapa lipídica de compuestos difusibles hidrófilos como especies reactivas del oxígeno (ROS), antibióticos u otros metabolitos secundarios, formando así un escudo hidrofóbico (Nishida et al., 2010). Adicionalmente, los LC-PUFA presentan actividad antioxidante debida a la capacidad reductora de los dobles enlaces, que contrarrestan los efectos oxidantes de compuestos ROS mediante la formación de metabolitos cíclicos oxigenados estables inocuos para la célula (Galano et al., 2015).

1.1.2. Impacto sobre la salud humana

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son esenciales en el cuerpo humano, solo pudiéndose sintetizar a partir de precursores de 18 carbonos ingeridos en la dieta. Los ácidos grasos de la serie ω -3 se sintetizan a partir de ALA, procedente de la ingesta de alimentos, mediante la acción de varias enzimas elongasas y desaturasas que dan lugar a EPA y DHA. Estas enzimas también tienen actividad sobre el LA, cuya elongación y desaturación da lugar a los ácidos grasos de la serie ω -6, como el AA. Es decir, ambas series de ácidos grasos compiten por las enzimas anabólicas que dan lugar a los productos finales de la ruta, y por ello, un desequilibrio en la ratio de ingesta de precursores ω -6/ ω -3 en la dieta favorable a LC-PUFA ω -6

hace que se sintetizen una mayor cantidad de moléculas derivadas de los ácidos grasos de esta serie. Estos LC-PUFA ω -6 son precursores en la síntesis de moléculas proinflamatorias como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos grasos hidroxilados y lipoxinas (**Figura 2A**). Sin embargo, los ácidos grasos ω -3 como el EPA en la sangre y el DHA en el cerebro son intermediarios metabólicos en rutas de síntesis de factores anti-inflamatorios, cuyos efectos se han asociado a un descenso de la coagulación sanguínea y de la vasoconstricción arterial, y a un incremento en la actividad neuroprotectora. El hecho de que ambas series, ω -3 y ω -6, entren en competición por las mismas enzimas en el mismo espacio, y que estas tengan propiedades fisiológicas opuestas (**Figura 2B**), hacen que la ratio de consumo de LC-PUFA ω -6/ ω -3 en la dieta sea de fundamental importancia (**Figura 2C**) (Simopoulos, 2011).

Actualmente, los hábitos alimenticios de la sociedad han modificado la ratio ω -6/ ω -3. Mientras, estudios de la dieta paleolítica estiman que la ratio era de 1:1. En el último siglo, esta ratio ha aumentado notablemente, incrementando desde 6,4:1 en 1909 hasta 10:1 en 1999,

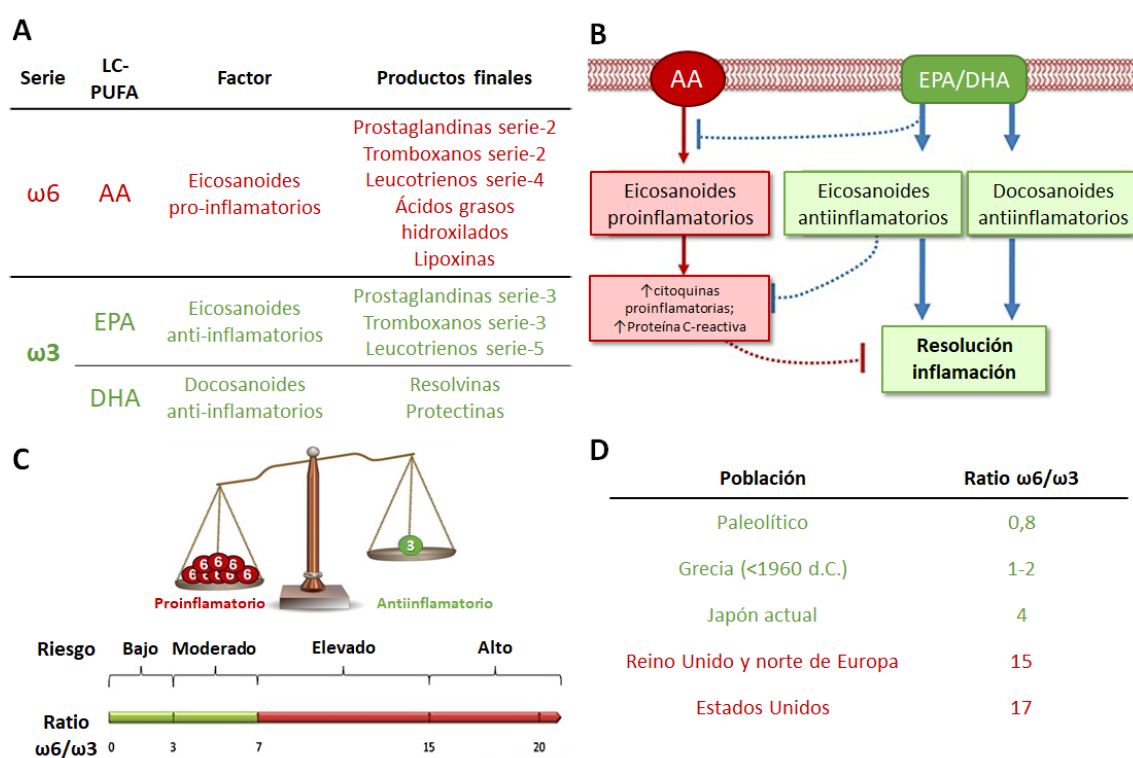


Figura 2. Efectos pro y anti-inflamatorios de las series ω -6 y ω -3 de LC-PUFA. **A)** Productos finales de las rutas metabólicas derivadas de ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). **B)** Efectos de los factores pro y anti-inflamatorios sobre mediadores de la inflamación (citoquinas proinflamatorias y proteína C-reactiva (CRP)). Las líneas continuas indican un efecto activador, las líneas discontinuas indican un efecto inhibitorio. Adaptado de Flock et al. (2013). **C)** El desequilibrio alimenticio entre ω -6/ ω -3 incrementa la reacción inflamatoria y puede conllevar un fallo en la resolución de la inflamación. El riesgo de desarrollar enfermedades derivadas de procesos inflamatorios crónicos leves incrementa con una ratio entre AA/EPA favorable a la serie ω -6. **D)** Ratio ω -6/ ω -3 en la dieta de varias poblaciones. Adaptado de Simopoulos (2011).

alcanzando incluso 15:1 en Estados Unidos y Europa en 2011 (**Figura 2D**). Los autores argumentan que esto puede deberse al incremento en el consumo de aceites ricos en ácidos grasos ω -6, como el aceite de soja o de palma, lo que supone un incremento en 2'5 veces de ácidos grasos de la serie ω -6 junto con un descenso de 2 veces del aporte de ω -3 (Blasbalg et al., 2011; Simopoulos, 2011).

Por tanto, se cree que esta descompensación de la proporción ω -6/ ω -3 favorable a la serie ω -6, precursora de moléculas proinflamatorias activas a muy baja concentración, es la causa de un incremento de la prevalencia de multitud de alergias y alteraciones inflamatorias (Simopoulos, 2011).

El EPA se encuentra principalmente en el torrente sanguíneo, por lo que se relaciona con efectos sobre el sistema vascular, el flujo sanguíneo, y la homeostasis con los metabolitos derivados del AA (Simopoulos, 2011). Por ello, la deficiencia en ω -3, así como el excesivo consumo de ácidos grasos ω -6, se ha asociado con múltiples enfermedades o alteraciones degenerativas causadas por inflamaciones crónicas, como el asma, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso, o la esclerosis múltiple (Abedi y Sahari, 2014).

El mantenimiento de la ratio ω -6/ ω -3 próxima a 1 no solo tiene impacto en la edad adulta, también tiene un efecto importante en el desarrollo de fetos y niños. Tanto el AA (ω -6) como el DHA (ω -3) son esenciales en el proceso de desarrollo, siendo crítico su balance en la formación e integridad estructural del cerebro. Crawford et al. (2003) sostienen que una deficiencia de DHA en la placenta durante la gestación podría ser la causa de ciertas anomalías en la membrana de neuronas y células de la retina en neonatos.

La importancia del papel del DHA en células de la retina y en neuronas cerebrales se debe a que este participa en la señalización celular. Se ha descrito que el DHA está directamente relacionado con la biosíntesis de neurotransmisores, la transducción de señales, la captación de serotonina, la unión de neurotransmisores a receptores β -adrenérgicos y serotoninérgicos, y con la actividad monoamina oxidasa (Abedi y Sahari, 2014; Lagarde, 2008). En los últimos años, se ha apuntado a la inflamación crónica leve como una de las causas de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer. La inflamación es un proceso natural dirigido a restaurar la homeóstasis y promover la curación en los tejidos, siendo resuelta en un determinado punto del proceso por mediadores anti-inflamatorios (**Figura 2B**). En este proceso se produce un incremento inicial de derivados pro-inflamatorios de AA, que se contrarresta por un incremento de derivados anti-inflamatorios, las resolvinas D derivadas de EPA y las resolvinas E derivadas de DHA (Serhan et al., 2014). Distintos estudios indican que ausencia de la fase de resolución de la inflamación podría ser la causa del daño neuronal, y por tanto, del progreso de la enfermedad

(Whittington et al., 2017). Se ha observado que en pacientes con enfermedad de Alzheimer los niveles de DHA en plasma y cerebro son más bajos que en pacientes sanos, por lo que se han realizado distintos estudios para determinar el potencial beneficio de un incremento de la ingesta de LC-PUFA sobre la neuropatología y la función cognitiva. Estudios iniciales en animales describen algunos efectos terapéuticos; sin embargo, en ensayos clínicos en humanos tan solo se ha observado un ligera mejoría de los síntomas al suplementar la dieta con DHA o EPA a pacientes en fases iniciales de la enfermedad (Canhada et al., 2017).

Respecto al sistema cardiocirculatorio, varios autores asocian a los LC-PUFA ω -3 beneficios en distintos procesos: efectos anti-arrítmicos, modulación de la función autónoma, un descenso en la agregación de plaquetas, efectos vasodilatadores, o un descenso en la presión arterial, entre otros (Lee et al., 2008; Simopoulos, 2011). Adicionalmente, otros estudios sostienen que al incrementar la concentración de estas moléculas se reduce el nivel de triglicéridos (TAG) en sangre, cuya presencia a altas concentraciones incrementa la probabilidad de desarrollar pancreatitis y enfermedades coronarias. En el caso de la suplementación solamente con EPA, también se observó un descenso en el nivel de lipoproteína de baja densidad (Gutstein y Copple, 2017; Sharp et al., 2017).

El sistema digestivo también ha sido estudiado en relación con los efectos de los LC-PUFA. Como se ha indicado anteriormente, los hábitos alimenticios han cambiado en los últimos tiempos. Así el desequilibrio ω -6/ ω -3 podría ser una de las posibles explicaciones del incremento de la prevalencia de alteraciones del sistema digestivo como la enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn. Un estudio dietético en humanos describe que la ingesta de LA, de la serie ω -6, incrementa el riesgo de desarrollar colitis ulcerosa, mientras que la ingesta de DHA reduce la aparición de esta alteración (Hart et al., 2009). Sin embargo, a pesar de existir indicios *in vitro* de su efecto anti-inflamatorio, no se ha conseguido determinar el impacto de los LC-PUFA ω -3 sobre otras enfermedades como síndrome de Crohn o enfermedad intestinal inflamatoria, ya que los ensayos clínicos realizados son controvertidos (Scaioli et al., 2017).

Adicionalmente, varios estudios sobre la microbiota intestinal describen una relación entre la ingesta de dietas ricas en grasas con cambios en la composición de la flora microbiana que derivan en una disbiosis o desequilibrio bacteriano, en el que se altera la ratio de firmicutes y bacteroides, e incrementa el conteo de bacterias del género *Lachnospiraceae*. Esta disbiosis puede generar un estado de inflamación, causa de muchas enfermedades del tracto digestivo. (Pu et al., 2016; Watson et al., 2017). En ensayos con animales, se ha descrito que una alimentación rica en LC-PUFA ω -6 provoca el cambio en la composición bacteriana del intestino,

que da lugar a una endotoxemia provocada por la presencia lipopolisacárido (LPS), e incrementa el estado de inflamación general crónica leve; contrariamente, la suplementación de la dieta con LC-PUFA ω -3 reducía notablemente la inflamación y la presencia de LPS. Esto se debe a que estos ácidos grasos provocan un cambio en la microbiota intestinal, de forma que hay un incremento de bacterias supresoras del LPS y de las bifidobacterias, así como un descenso en bacterias productoras de LPS y enterobacterias (Kaliannan et al., 2015). Es decir, los ácidos grasos ω -3 podrían revertir la composición microbiana en ciertas alteraciones y enfermedades, así como incrementar la producción de compuestos anti-inflamatorios en el intestino (Costantini et al., 2017).

Por último, se está evaluando si los LC-PUFA de la serie ω -3 podrían actuar como agentes quimiosensibilizantes en casos de tumores con resistencia múltiple a compuestos quimioterápicos. Se ha visto que una de las propiedades clave de los ω -3 es su capacidad de alterar las propiedades de la membrana celular, mecanismo crucial en la captación de drogas en la célula, así como en la actividad de proteínas de membrana como factores de crecimiento, receptores y transportadores (Burns et al., 1979; Corsetto et al., 2017). Esta aproximación, llamada “Terapia de membrana lipídica”, se basa en la hipótesis de que la alteración específica de los lípidos de membrana puede modificar la composición y estructura de la membrana de células cancerosas, de forma que se altere la actividad y localización de proteínas asociadas a la membrana, y consecuentemente las rutas de señalización *down-stream* cruciales para el desarrollo tumoral (Wirtitsch et al., 2009). Análisis *in vitro* demostraron que el incremento de la quimiosensibilidad provocado por la incorporación en membrana de LC-PUFA ω -3 era mayor en células con fenotipo quimioresistente (Zulstra et al., 1987). En distintos ensayos *in vivo*, se ha observado que los ω -3 administrados a pacientes con tumores sólidos o hematológicos mejoran la eficacia de distintos fármacos quimioterápicos (Wynter et al., 2004). Por tanto, los datos obtenidos de varios estudios dan pie a utilizar los ácidos grasos ω -3 como adyuvantes en tratamientos oncológicos sobre células cancerígenas resistentes a drogas (Corsetto et al., 2017).

1.1.3. Usos en acuicultura

Aunque los LC-PUFA ω -3 tienen una gran importancia en salud humana, su principal aplicación es en acuicultura, actividad que consume el 75% del aceite de pescado producido, mientras que el consumo humano tan sólo supone un 22% (**Figura 3A**). En datos absolutos, la industria de la acuicultura consume 0,8 millones de toneladas al año de aceite de pescado, principalmente para el cultivo de salmónidos (62 %) y peces marinos (19 %), seguidos de crustáceos (6 %) y especies de agua dulce (6%) (**Figura 3B**) (Tocher, 2015).

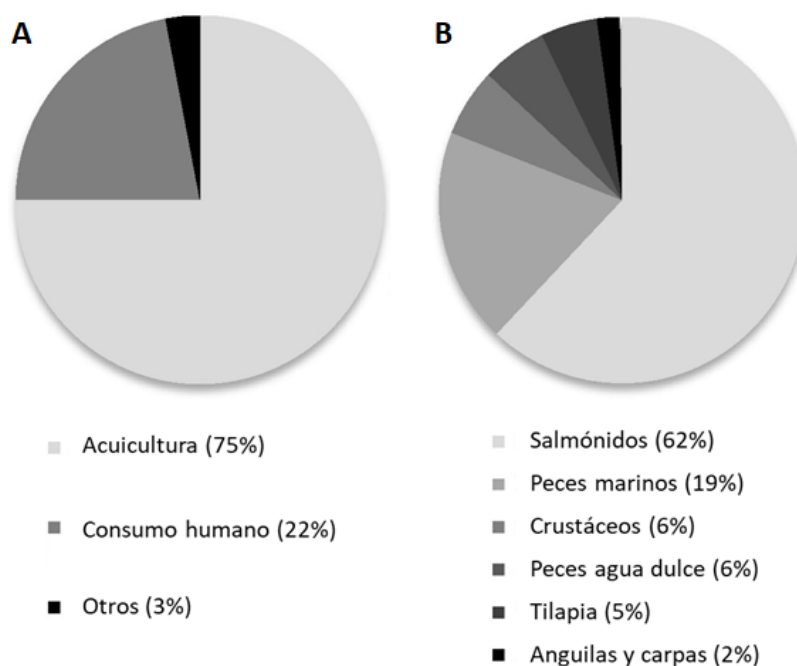


Figura 3. Usos del aceite de pescado rico en LC-PUFA. A) Aplicaciones del aceite de pescado. B) Consumo de aceite de pescado en distintos sectores de la acuicultura. Adaptado de Tocher (2015).

Estudios en 35 especies de peces, parece que las especies de agua dulce y diádromos (peces migradores) son capaces de sintetizar EPA y DHA a partir de ácidos grasos más sencillos. Sin embargo, las especies marinas no son capaces debido a que la ruta metabólica es deficiente en alguna de las enzimas clave, es decir, los LC-PUFA son ácidos grasos esenciales (detallado en el apartado 1.2.4). Por ello, es necesario suplementar la dieta de los peces con aceite de pescado, ya que es un requerimiento para el crecimiento de las especies marinas (Tocher, 2003). Alternativamente, se puede suplementar a las especies de agua dulce y diádromas con aceites vegetales, que contienen ALA. Sin embargo, se ha visto que cuando se suplementa la dieta con aceites vegetales la composición de los tejidos de los peces cambia, enriqueciéndose en ácidos grasos de 18 carbonos y disminuyendo en EPA y DHA (Bell y Tocher, 2009; Tocher, 2009). Por último, se ha empezado a utilizar una fuente alternativa de DHA, las microalgas como *Isochrysis galbana* y *Schizochytrium sp.* (Watters et al., 2012).

Los LC-PUFA, así como los ácidos grasos precursores de estos, se encuentran naturalmente en peces proceden de las redes tróficas, de forma que los eslabones inferiores de las redes son aquellos capaces de sintetizar estos LC-PUFA, mientras que las especies consumidoras son simples acumuladores de estos ácidos grasos. En acuicultura, debe imitarse este proceso por ello, es necesario alimentar a los peces en las distintas fases de crecimiento (Bell y Tocher, 2009; Tocher, 2009).

La suplementación de la dieta en los peces y demás especies cultivadas se realiza en distintas etapas del crecimiento de los individuos. Esta suplementación de la dieta es especialmente importante durante la fase larval, debido al papel esencial de los LC-PUFA en el desarrollo neuronal. Asimismo, se ha visto que es necesario suplementar la dieta de los adultos en fase reproductiva, ya que se ha visto que es necesario para la correcta formación de los huevos en algunas especies (Watters et al., 2012).

Por último, los peces en fase juvenil se alimentan con aceites vegetales, ricos en ALA. Como se ha comentado previamente, estos aceites provocan un incremento en ALA en los tejidos, reduciendo el contenido en LC-PUFA ω -3 (Bell et al., 2003; Bell y Tocher, 2009). Por ello, los ejemplares adultos se alimentan con aceites de pescado en la fase final de cultivo con el objetivo de enriquecer los tejidos en EPA y DHA, previa a su captura y comercialización (Watters et al., 2012).

1.1.4. Importancia económica de los ácidos grasos omega-3

Los requerimientos nutricionales y farmacológicos en humanos, así como las necesidades en acuicultura hacen que el mercado de los LC-PUFA haya incrementado en las últimas décadas.

La Organización mundial de Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) de Naciones Unidas en el informe *"Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation"* (FAO, 2010a), así como estudios poblacionales más recientes (Stark et al., 2016) recomiendan una ingesta mínima diaria de 250-500 mg LC-PUFA en función de ciertos parámetros (edad, sexo, enfermedades, embarazo, etc.). Sin embargo, los datos de consumo indican que solo unos pocos países en el mundo, donde la dieta es rica en pescado azul y marisco, superan dicho consumo de LC-PUFA (Packaged facts, 2012). En otros países, el consumo de alimentos ricos en LC-PUFA como el pescado, el marisco y algunos vegetales es insuficiente.

Por ello, con el objetivo de incrementar esta ingesta diaria de LC-PUFA, se han desarrollado numerosos productos alimenticios fortificados y nutracéuticos. Un estudio del año 2016 (Global Market Insights, 2016) sostiene que solo en Europa en el año 2014 el mercado de productos que contienen DHA o EPA alcanzó los 500 millones de dólares, y se estima un crecimiento del 11% anual hasta 2022, año en el que se prevé que se alcancen los 1.200 millones de dólares. Otro informe de 2011 (Packaged facts, 2012) describe que el mayor consumo de productos fortificados con ácidos grasos ω -3 fue en América del norte con un 42,6% del mercado global, seguido por Europa y Asia-Pacífico.

Los productos más consumidos son aquellos dirigidos a la salud humana y la nutrición, siendo el área de consumo más importante la alimentación infantil, en la que hasta el 90% de las fórmulas infantiles están enriquecidas en DHA o EPA. Otros productos de gran importancia económica que contienen LC-PUFA son los alimentos y bebidas fortificadas, los complementos nutricionales, y productos farmacéuticos y clínicos.

1.1.5. Fuentes de producción de omega-3 actuales

Considerando los datos expuestos previamente, relativos al desequilibrio en el consumo de ácidos grasos LC-PUFA ω -6/ ω -3, así como el papel que juegan en el control de las respuestas inmunes e inflamatorias, parece que es necesario contrarrestar este balance (Tocher, 2015). El consumo por ingestión directa de alimentos ricos en DHA o EPA, como el pescado y el marisco, es insuficiente en gran parte de la población. Por ello, es necesaria una producción y extracción industrial, que permita añadir EPA o DHA en los alimentos fortificados o productos farmacéuticos.

La fuente más habitual de producción y consumo de LC-PUFA es el pescado y sus aceites, así como cefalópodos y crustáceos. Sin embargo, el consumo masivo de pescado ha disparado las alarmas en organizaciones como la FAO, la cual ha alertado sobre los riesgos de utilizar pescado como fuente de LC-PUFA, ya que existen problemas de sobreexplotación de los recursos acuícolas: el 53% de los recursos pesqueros están cerca de estar completamente explotados, el 28% están sobreexplotados, y el 3% están exhaustos o en proceso de recuperación (FAO, 2010). Además, se ha descrito la presencia de diversos contaminantes en el pescado como dicloro-difenil-tricloroetano (DTT), bifenilos policlorados, metilmercurio, metales pesados (Pb, Cr, Hg, Cd, y As) o antibióticos, entre otros. De hecho, la ingesta de pescado contaminado ha incrementado la prevalencia de enfermedades relacionadas con la acumulación de ciertos contaminantes tanto de agua dulce como salada (Abedi y Sahari, 2014). Además, el pescado como fuente industrial de LC-PUFA conlleva otras desventajas como son los elevados costes de purificación de los ácidos grasos, la baja estabilidad del producto por presencia de compuestos oxidantes, o la presencia de olores y sabores desagradables.

Por último, a pesar de ser una importante fuente de pescado, la acuicultura no parece que sea una solución a largo plazo. Esto se debe a que las principales especies cultivadas son carnívoras, como el salmón o la lubina, lo que supone que para producir 1 kg de pescado de piscifactoría es necesario capturar entre 2 y 2,5 kg de pescado salvaje más pequeño, como sardina o arenque. Además, las instalaciones de acuicultura son una fuente de contaminación

por nitratos, así como un riesgo en la transmisión de patógenos. Por todo ello, la presión sobre los recursos pesqueros salvajes es todavía mayor (Jenkins et al., 2009).

Por tanto, se ha empezado a dirigir los esfuerzos sobre la producción industrial de LC-PUFAS hacia el desarrollo de otras fuentes alternativas de ácidos grasos ω -3:

- ❖ El krill antártico (*Euphasia superba*) es un pequeño crustáceo nativo del océano Antártico. Contiene un gran contenido de LC-PUFA debido a su constante ingesta de microalgas y otros microorganismos productores de LC-PUFA. A diferencia del pescado, que acumula los ácidos grasos en forma de aceite, en el krill los ácidos grasos ω -3 se encuentran en forma de fosfolípidos de membrana. Actualmente, existen varios productos en el mercado que contienen LC-PUFA procedentes de krill, bien en forma de extracto o como LC-PUFA purificado. Sin embargo, presenta desventajas similares al pescado como la sobreexplotación de los recursos marinos y la contaminación de los océanos. Además, durante el proceso de extracción de los LC-PUFA, se liberan una serie de proteasas y lipasas que dificultan la purificación y estabilización de los ácidos grasos (Gigliotti et al., 2011).
- ❖ Las plantas ricas en ácidos grasos ω -3 son consumidas habitualmente, sin embargo, las plantas superiores solo son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de 18 carbonos de longitud, como el ácido α -linolénico (ALA). Sin embargo, la única funcionalidad del ALA es servir de precursor para la síntesis de EPA y DHA, y esta ruta es poco activa en humanos (Brenna, Salem, Sinclair, y Cunnane, 2009). Por ello, se han desarrollado varios estudios en los que se han generado plantas transgénicas que contienen los genes esenciales para la síntesis de LC-PUFA como el DHA o el EPA procedentes de bacterias, algas o levaduras (Walsh et al., 2016). Actualmente, los mayores problemas asociados a estas plantas modificadas es el bajo rendimiento en la producción de LC-PUFA (Adarme-Vega et al., 2012).
- ❖ Algunas microalgas y protistas contienen un alto contenido en LC-PUFA, algunos de ellos con más de un 30% de LC-PUFA respecto del total de ácidos grasos. Se caracterizan por contener LC-PUFA específicos, al contrario que plantas y animales, que contienen una mezcla de estos. Además, algunos de los organismos que han sido estudiados por contener altas concentraciones de LC-PUFA pertenecen a los géneros de microalgas *Nannochloropsis* y *Phaeodactylum*, y de traustochytridos como *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* o *Aurantiochytrium* (Metz et al., 2009; Adarme-Vega, 2014). Además, estos organismos acumulan grandes cantidades de ácidos grasos en forma de aceites o triglicéridos (TAG). *Cryptocodinium cohnii* es una microalga con un contenido en DHA de entorno al 30% en forma de TAG, y es utilizado en la producción de DHA de calidad farmacéutica.

Curiosamente, esta microalga utiliza un sistema al del resto de microalgas, que utilizan un sistema similar al de plantas y animales (de Swaaf et al., 2003; Mendes et al., 2009). Actualmente, algunas especies de traustóquitridos están siendo cultivados a gran escala tanto para la producción de DHA o EPA con un alto grado de pureza, como para la producción de biomasa enriquecida en LC-PUFA utilizada como alimento en acuicultura. Su potencial es tan prometedor que la explotación industrial tanto de los organismos como de sus enzimas están protegidas por varias patentes internacionales (Apt et al., patente No. WO2010/107415 A1) y son comercializadas por grandes empresas internacionales, como Royal DSM.

- ❖ Las γ -proteobacterias marinas que contienen LC-PUFA son bacterias psicrófilas y piezófilas. Se cree que podrían utilizar estos ácidos grasos como mecanismo de protección frente al frío y la alta presión (Nichols, 2003). Se han descrito varios géneros de bacterias que son capaces de producir LC-PUFA específicos; algunas de especies sintetizan principalmente EPA como *Shewanella* o *Photobacterium profundum*, mientras otras producen DHA como *Colwellia psycherythraea*, *Moritella marina* o *Psychromonas ingrahamii* (Schulze y Allen, 2011). Estas bacterias introducen el DHA o el EPA en los fosfolípidos de membrana y suelen presentar un solo tipo de LC-PUFA, lo cual facilita la purificación. Su sistema de producción de LC-PUFA es similar al de las microalgas ricas en DHA (ver sección 1.2.4).

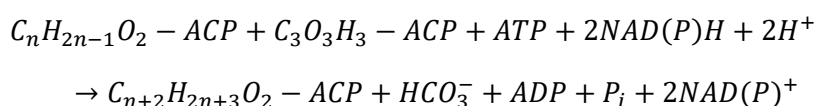
1.2. Biosíntesis de ácidos grasos

1.2.1. Síntesis de ácidos grasos saturados

La síntesis de ácidos grasos es uno de los procesos de mayor importancia en la célula, por ello, esta ruta metabólica está altamente conservada tanto en eucariotas como procariontes.

La vía anabólica para sintetizar ácidos grasos consiste en una serie de reacciones enzimáticas cíclicas que parten de un sustrato corto, que se elonga hasta dar lugar a las distintas especies de ácido graso en la célula. En esta ruta, el acetil-CoA se carboxila a malonil-CoA mediante la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC). Posteriormente, este se transfiere a una proteína portadora de acilos (ACP), que protege el residuo malonilo de reacciones de degradación o de su uso como precursor en otras reacciones anabólicas. El malonil-ACP entra en el ciclo de biosíntesis mediante una reacción de condensación de Claisen con un residuo de acetil-CoA, dando lugar a acetoacetil-ACP. Posteriormente, este se reduce a 3-hidroxiacetil-ACP, se deshidrata a 2-enil-ACP y finalmente se vuelve a reducir para dar lugar al butiril-ACP (**Figura 4C**). Este ácido graso entra en varios ciclos de elongación en el que se añaden dos carbonos más mediante una reacción de condensación con un nuevo residuo de malonil-ACP y las subsiguientes reacciones que dan lugar a una cadena saturada. Al alcanzar una longitud determinada, el ácido graso unido al grupo ACP se utiliza para la formación de fosfolípidos de membrana.

Por tanto, la ecuación estequiométrica que describe un ciclo de la síntesis de un ácido graso es la siguiente (Janßen y Steinbüchel, 2014):



Esta serie de reacciones son iguales en todos los organismos, sin embargo, difieren en la organización de las actividades enzimáticas y su codificación genética. Existen dos grandes grupos de ácido graso sintasa (FAS). La FAS tipo I es un gran complejo proteico multifuncional en el que se encuentran todos los dominios funcionales para sintetizar un ácido graso. En hongos, este complejo está codificado en dos genes que dan lugar a las subunidades α y β , y que se organizan como un heterodécimero ($\alpha_6\beta_6$); en animales, la FAS I está codificada en un solo gen que da lugar a un homodímero (α_6) (Leibundgut et al., 2008; Maier et al., 2010). Por otro lado, la FAS tipo II es complejo disociable formado por varias enzimas monofuncionales que se encuentra en bacterias y en los plástidos de plantas (Harwood, 1988; Rock y Cronan, 1996). En este caso, los distintos genes que codifican estas proteínas discretas no forman un solo operón, sino que están dispersas en el genoma.

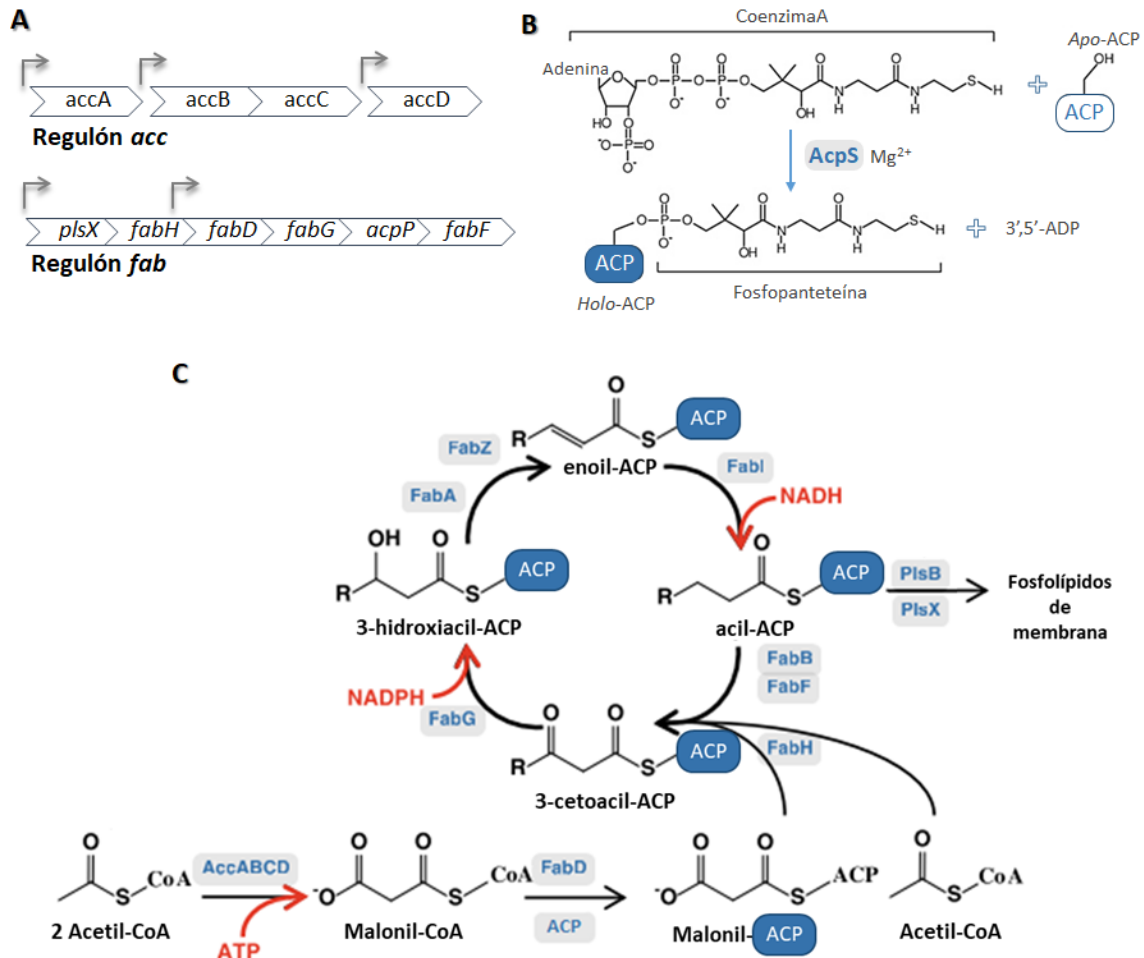


Figura 4. Síntesis de ácidos grasos. **A)** Agrupaciones de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos descritas en *E. coli*. **B)** Reacción de activación de la ACP. **C)** Ruta de síntesis de ácidos grasos en *E. coli*.

La síntesis de ácidos grasos en *E. coli* sigue la misma ruta biosintética general descrita para todos los organismos y está catalizada por un sistema FAS tipo II (**Figura 4A**) (Rock y Cronan, 1996). Por ser una de las rutas de síntesis de ácidos grasos mejor caracterizadas, se describe en detalle a continuación. En primer lugar, la Acc de *E. coli* está formada por cuatro proteínas codificadas en el regulón *acc* (*accABCD*), que son expresadas equimolarmente. Estas proteínas forman el complejo AccABCD con tres dominios activos: biotina carboxilasa (proteína transportadora de biotina carboxílica), carboxilasa-CoA y carboxil transferasa (Choi-Rhee y Cronan, 2003). En esta reacción, se añade un grupo HCO_3^- al acetil-CoA dando lugar a malonil-CoA. Dado que la reacción de carboxilación del acetil-CoA consume ATP, la regulación de este complejo es muy estricta, de hecho, está negativamente regulada por grupos acil-ACP de 6 a 20 carbonos de longitud, de forma que se evita sintetizar un exceso de ácidos grasos. Se ha observado que la sobreexpresión de tres de los genes *acc*, *accBCD*, es suficiente para incrementar la actividad carboxilasa (Davis et al., 2000). Otro ensayo de sobreexpresión, en este

caso del complejo completo *accABCD*, concluyó que este incremento de actividad ACC debe ir acompañada de la expresión de la tioesterasa *TesA*, de forma que el exceso de ácidos grasos producidos por esta sobreexpresión se acumulen en forma de ácidos grasos libres (FFA) en lugar de acil-ACP, y así, evitar la regulación negativa sobre la transcripción del operón *acc* (Zha et al., 2009). Por otro lado, *E. coli* contiene el regulón *fab*, compuesto por los genes *plsX-fabH-fabD-fabG-*acpP-fabF**. El resto de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos, los genes *fabA*, *fabB*, *fabI*, o *acpS*, están dispersos en el genoma de *E. coli* como unidades transcripcionales independientes. Estos genes catalizan el resto de reacciones de la ruta.

Partiendo de una molécula de malonil-CoA, la malonil-CoA ACP transacilasa, *FabD*, cataliza la transferencia de la fracción malonil a la ACP, dando lugar a malonil-ACP (Joshi y Wakil, 1971). Se ha descrito que la delección del gen *fabD* es letal en *E. coli* (Zhang y Cronan, 1998), mientras que su sobreexpresión provoca alteraciones de la composición de ácidos grasos: disminuye la proporción de ácido palmitoleico (C16:1) mientras que incrementa la proporción de ácido *cis*-vaccénico (C18:1n7) (Magnuson et al, 1993). Además, cabe destacar que la ACP, codificada por *acpP*, se sintetiza en forma inactiva, *apo*. Por tanto, para que adapte su forma activa, *holo*, debe modificarse postraduccionamente mediante la acción de una ACP sintasa (*AcpS*) que le transfiere un grupo prostético fosfopanteteína (PPT) procedente de una molécula de coenzima A (CoA) (**Figura 4B**) (Chan y Vogel, 2010). La *AcpS* de *E. coli* parece modificar exclusivamente la ACP codificada por *AcpP*; sin embargo se ha observado que otras sintasas de esta familia, como la *Sfp* de *Bacillus subtilis*, son capaces de modificar ACP de otras rutas metabólicas (Lambalot et al., 1996).

A continuación, el enzima *FabD* cataliza una reacción en la que se une un residuo de malonil-CoA sobre la cola PPT de la ACP activada. De esta forma, el malonil unido a la ACP queda determinado hacia la síntesis de ácidos grasos, además de ser protegido de la acción de enzimas catalíticas. El malonil-ACP entra en el primer ciclo de elongación (**Figura 4C**) mediante una reacción catalizada por la enzima *FabH*, con actividad 3-cetoacil sintasa III (KS III). Esta enzima condensa malonil-ACP y acetil-CoA dando lugar a 3-cetoacil-ACP. La sobreexpresión de *FabH* da lugar a un aumento de los ácidos mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) (Tsay et al., 1992), mientras que la delección de este gen conduce a un aumento de los niveles de ácidos grasos de 18 carbonos de longitud. Además, aunque no es un gen esencial, se ha visto que tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y sobre el tamaño celular, probablemente debido a la disminución de la capacidad de producir ácidos grasos (Yao et al., 2012).

Tras la reacción de condensación, el grupo cetónico del 3-cetoacil-ACP es reducido por la 3-cetoacil-ACP reductasa (*FabG*), consumiendo un NADPH y dando lugar un grupo hidroxilo

(Toomey y Wakil, 1966). A continuación, el grupo alcohol del β -hidroxiacil-ACP es deshidratado por las β -hidroxiacil-ACP deshidratasas FabZ dando lugar a un doble enlace y liberando una molécula de agua. Estas deshidratasas presentan distinta afinidad por sustrato, de forma que FabZ actúa sobre moléculas 3-hidroxiacil-ACP de cadena corta y larga indiferentemente de si son saturadas o insaturadas, mientras que FabA tiene mayor afinidad por cadenas intermedias, aunque también puede utilizar cadenas cortas o largas (Heath y Rock, 1996). El enoil-ACP se reduce utilizando NADPH o NADH mediante la enoil-ACP reductasa (FabI) dando lugar a la cadena alquílica totalmente saturada. Esta reductasa es esencial en *E. coli*, y un punto clave en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, ya que es inhibida por el producto final de la vía con el objetivo de evitar el gasto energético que supone la síntesis de ácidos grasos (Bergler et al., 1996).

La molécula de acil-ACP entra en sucesivas rondas de elongación, en las que se suceden las reacciones cíclicas descritas. En contraposición al ciclo inicial de elongación, los subsiguientes ciclos de elongación se inician mediante la misma reacción de condensación, pero catalizada por las KS I (FabB) y KS II (FabF), utilizando como sustrato la cadena acil-ACP en elongación y una molécula de malonil-ACP. La participación de estas enzimas KS en cada ciclo está determinada por su especificidad de sustrato. La KS III, FabH, utiliza sustratos de hasta 4 carbonos de longitud, es decir, utiliza principalmente acetil-CoA pero también tiene actividad utilizando propionil-CoA y butiril-CoA. Sin embargo, FabB y FabF tienen afinidad por sustratos de mayor tamaño. Además, FabB es la única KS capaz de elongar las cadenas insaturadas de 10 carbonos de longitud producidas por FabA. Por ello, la delección de *fabB* provoca un fenotipo auxótrofo para ácidos grasos insaturados (Cronan et al., 1969), mientras que la sobreexpresión de esta proteína incrementa el porcentaje de C18:1n-7 (Clark et al., 1983). Por último, FabF es la única capaz de elongar ácido palmitoleico (C16:1) a ácido vaccénico (C18:1) (Edwards et al., 1997). La delección del gen *fabF* da lugar a un mutante sensible a temperatura (Garwin et al., 1980), mientras que la sobreexpresión es letal (Subrahmanyam y Cronan, 1998). Existen evidencias *in vitro* de la capacidad de FabB y FabF de catalizar el ciclo inicial de elongación realizado mayoritariamente por FabH. Sin embargo, se cree que utilizan una vía alternativa en la que decarboxilan malonil-ACP a acetil-ACP y utilizan este último como sustrato de la reacción de condensación (Alberts et al., 1972; D'Agnolo et al., 1975; McGuire et al., 2001). Adicionalmente, se observó que una cepa de *Lactococcus lactis* en la que se había delecionado *fabH* retenía el 10% de la actividad de síntesis de ácidos grasos; los autores suponen que esta actividad procede de la acción secundaria de descarboxilación de malonil-ACP de FabB y FabF (Cronan y Thomas, 2009).

1.2.2. Insaturación de ácidos grasos

En la síntesis de ácidos grasos insaturados (**Figura 5**), FabA cataliza tanto una deshidratación como una reacción de isomerización. Esta función de isomerización es exclusivamente realizada sobre sustratos de 10 átomos de carbono (β -hidroxidecanoil-ACP), en la que FabA primero deshidrata la molécula para dar lugar a *trans*-2-decenoil-ACP y posteriormente isomeriza el doble enlace a *cis*-3-decenoil-ACP. De esta forma la reacción de la enoil reductasa no se produce, manteniendo el doble enlace en la cadena creciente. A continuación, FabB inicia otro nuevo ciclo de elongación, en el que se completan las cuatro reacciones básicas (KS, KR, DH y ER) durante 3 o 4 ciclos más para dar lugar a *cis*-9-palmitoleil-ACP (C16:1n7) y *cis*-11-vaccenoil-ACP (C18:1n7), respectivamente. Esta KS es la única capaz de utilizar sustratos de cadena insaturada, por lo que su actividad es esencial para la célula; de hecho, la delección de este gen convierte a la célula en auxótrofa para ácidos grasos insaturados (Feng y Cronan, 2009)

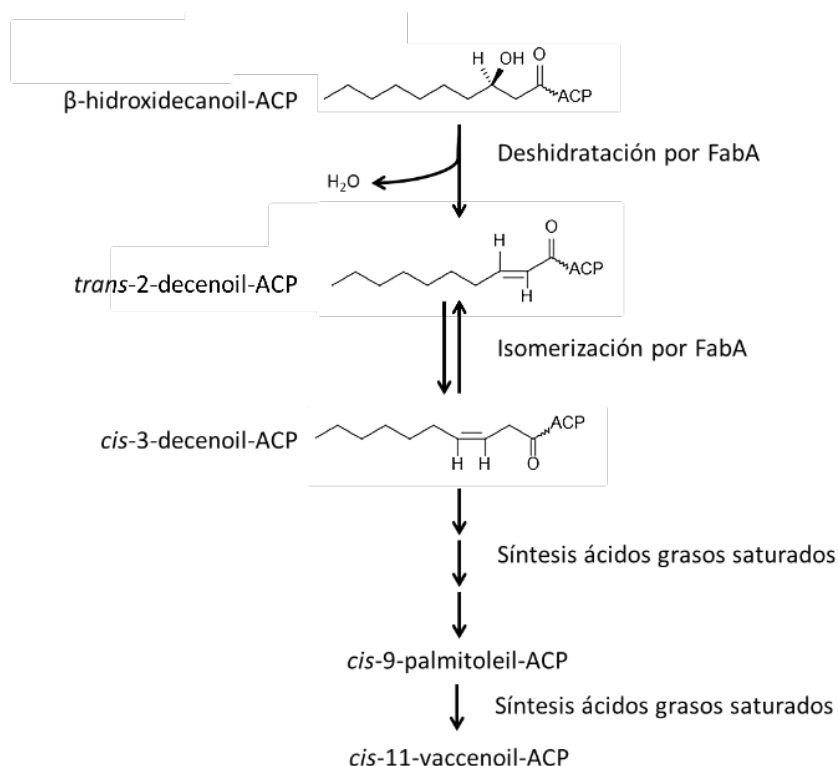


Figura 5. Ruta de síntesis de ácidos grasos insaturados en *E. coli*. FabA realiza una reacción de isomerización del doble enlace dando lugar a *cis*-3-decenoil-ACP, que posteriormente es elongado hasta formar los ácidos grasos C16:1n7 y C18:1n7. Tomado de Santos-Merino (2017).

1.2.3. Regulación del metabolismo de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos es un proceso energéticamente costoso, por lo que, tanto *E. coli* como el resto de organismos tienen una regulación del sistema muy estricta (**Figura 6**). La actividad de esta ruta biosintética está acoplada al crecimiento celular (Yao et al., 2012), y es uno de los principales puntos de regulación para el control de la homeóstasis de membrana (Zhang y Rock, 2008). Así, cuando la célula se encuentra bajo una situación energética favorable, se activa la síntesis de ácidos grasos y se reprime la degradación de los mismos, de forma que pueden ser utilizados para la biosíntesis de membrana, o para la síntesis de otros metabolitos. Sin embargo, en condiciones de escasez de nutrientes (carbono, aminoácidos, fosfato, etc.) se inhibe la síntesis de ácidos grasos y se incrementa actividad degradativa de los mismos (Janßen y Steinbüchel, 2014).

El principal actor en esta regulación es el factor de transcripción FadR, que reprime la transcripción de todos los genes relacionados con el ciclo de degradación de ácidos grasos en condiciones de crecimiento óptimo (Fujita et al., 2007). La represión de estos genes se levanta en situaciones de necesidad energética mediante la interacción de FadR con un acil-CoA de cadena larga procedentes del exterior de la célula (transportador FadL) o de la degradación de fosfolípidos de membrana (Henry y Cronan, 1991). FadR, además, tiene una segunda función como activador de la expresión de genes de la síntesis, tanto del operón *fabHGDG*, como *fabA* y *fabB* (My et al., 2013). Los genes *fabA* y *fabB* tienen además una segunda regulación mediante el factor de transcripción FabR. Este factor de transcripción citosólico es el responsable de mantener la homeostasis de la membrana: cuando FabR está unido a ácidos grasos insaturados reprime *fabA* y *fabB*, mientras que la unión a ácidos grasos saturados levanta dicha represión (Zhu et al., 2009).

Dada la estrecha relación entre el estado energético de la célula y el metabolismo de ácidos grasos, existe también una regulación basada en el estado de la célula. En primer lugar, existe una regulación mediante inhibición enzimática mediante la interacción de sustratos y productos de la ruta con determinadas enzimas para evitar la actividad de la ruta cuando se acumulan los productos finales: la presencia de Acil-ACP de cadena larga inhibe la actividad del complejo Acc y FabH, y la acumulación de ácido palmitoleico inhibe la enoil reductasa FabI. Además, la presencia de ACP libre (sin acilo), inhibe la ruta de Kennedy de síntesis de fosfolípidos, asegurando así que ésta solo esté activa en abundancia de ácidos grasos (**Figura 6**).

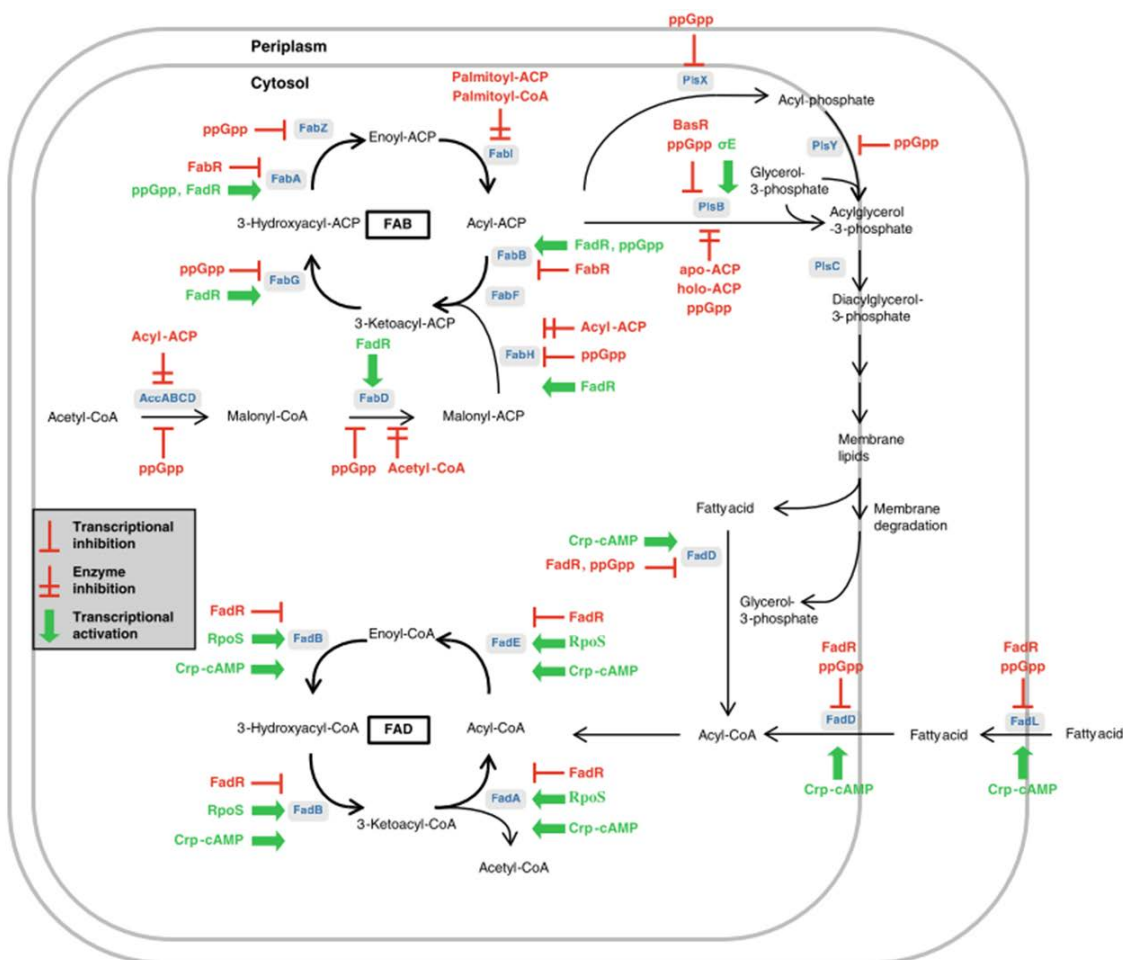


Figura 6. Regulación del metabolismo de ácidos grasos en *E. coli*. Las flechas verdes indican activación transcripcional, la flecha roja simple indica inhibición transcripcional y la flecha roja doble indica inhibición enzimática. Abreviaciones: FAB – biosíntesis de ácidos grasos, FAD – degradación de ácidos grasos, ppGpp – guanosin-5-trifosfato- 3-difosfato, Crp-cAMP – complejo AMP cíclico con su receptor. Figura tomada de Janßen y Steinbüchel (2014).

Además, la situación energética de la célula está acoplada al metabolismo de ácidos grasos mediante dos moléculas de señalización: el factor guanosin-5-trifosfato- 3-difosfato ((p)ppGpp) y por el factor adenosin monofosfato cíclico (AMPc).

El (p)ppGpp es una molécula sintetizada por RelA o SpoT como respuesta a situaciones de estrés de la célula como puede ser la ausencia de una fuente de carbono o de aminoácidos, la limitación de fosfato o hierro, o la inhibición de la síntesis de ácidos grasos (Janßen y Steinbüchel, 2014). La proteína SpoT sintetiza (p)ppGpp como respuesta a la detección de una reducción o inhibición de la síntesis de ácidos grasos. Se cree que SpoT interactúa con las ACP, y detecta el estado del metabolismo lipídico de la célula (Battesti y Bouveret, 2006). En caso de que la síntesis de ácidos grasos esté inhibida, se dispara un incremento de la síntesis de (p)ppGpp que lleva a una inactivación transcripcional sobre los genes de síntesis de ácidos grasos (Janßen y Steinbüchel, 2014). Se ha observado que el incremento de (p)ppGpp disminuye la actividad

enzimática FabZ y PlsB, y reduce la transcripción de los promotores *fabH*, *plsB*, *accBC* y *fadR*. En contraste, el incremento de (p)ppGpp incrementa la transcripción de *fabA* y *fabB*, así como los genes de degradación de ácidos grasos, *fad*; esto probablemente se deba al descenso de la transcripción del inhibidor FadR. Asimismo, se incrementa la transcripción de *cpa*, la enzima encargada de la síntesis de derivados cíclicos de ácidos grasos, y de *ybhO*, responsable de la síntesis de cardiolipina. Todos estos procesos se observan típicamente durante el inicio de la fase estacionaria. Por ello, se cree que esta mediación de (p)ppGpp se realiza mediante la activación de la expresión del factor sigma RpoS, expresado durante la entrada en fase estacionaria o en situaciones de estrés celular (Battesti et al., 2011).

En el caso de la segunda molécula de señalización, el AMPc, se sintetiza a partir de ATP en ausencia de glucosa y se une al receptor CRP, de forma que se convierte en un factor de expresión activado en condiciones energéticas desfavorables para la célula (Shimizu, 2013). El complejo CRP-cAMP induce la expresión de los genes de degradación de ácidos grasos, así como induce la expresión del transportador de membrana de ácidos grasos FadL en condiciones de carencia de fuente de carbono. Asimismo, reprime la expresión del factor FadR con el objetivo de levantar completamente la represión sobre la β -oxidación e inhibe la síntesis de ácidos grasos (Feng y Cronan, 2012).

1.2.4. Síntesis de LC-PUFA

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) son sintetizados mediante dos vías distintas: la elongación de ácidos grasos existentes, o la producción *de novo* por sintasas de LC-PUFA.

La ruta aerobia se encuentra en animales, plantas, algas y cianobacterias, quienes utilizan la vía llamada aerobia. Esta ruta metabólica (**Figura 7**) consiste en una serie de reacciones consecutivas de desaturación dependiente de oxígeno y elongación del ácido esteárico (C18:0) que dan lugar a los distintos LC-PUFAS de la serie ω -3 (ALA, EPA y DHA) o de la serie ω -6 (LA y AA). En el caso de cianobacterias, algas y plantas, llevan a cabo tres desaturaciones en serie (Δ^9 , Δ^{12} , y Δ^{15}), siendo el ALA el producto final de la ruta. En animales superiores, la síntesis se inicia a partir de ácido linoleico (ruta ω -6) o α -linolénico (ω -3) procedentes de la dieta, dado que carecen de las desaturasas Δ^{12} y Δ^{15} . Las desaturasas Δ^6 y Δ^5 , así como la elongasa Δ^6 , pueden actuar en sustratos ω -6 u ω -3, dando lugar a AA y EPA respectivamente. El DHA se sintetiza a partir de EPA mediante la elongasa Δ^5 y la desaturasa Δ^4 (Napier, 2002).

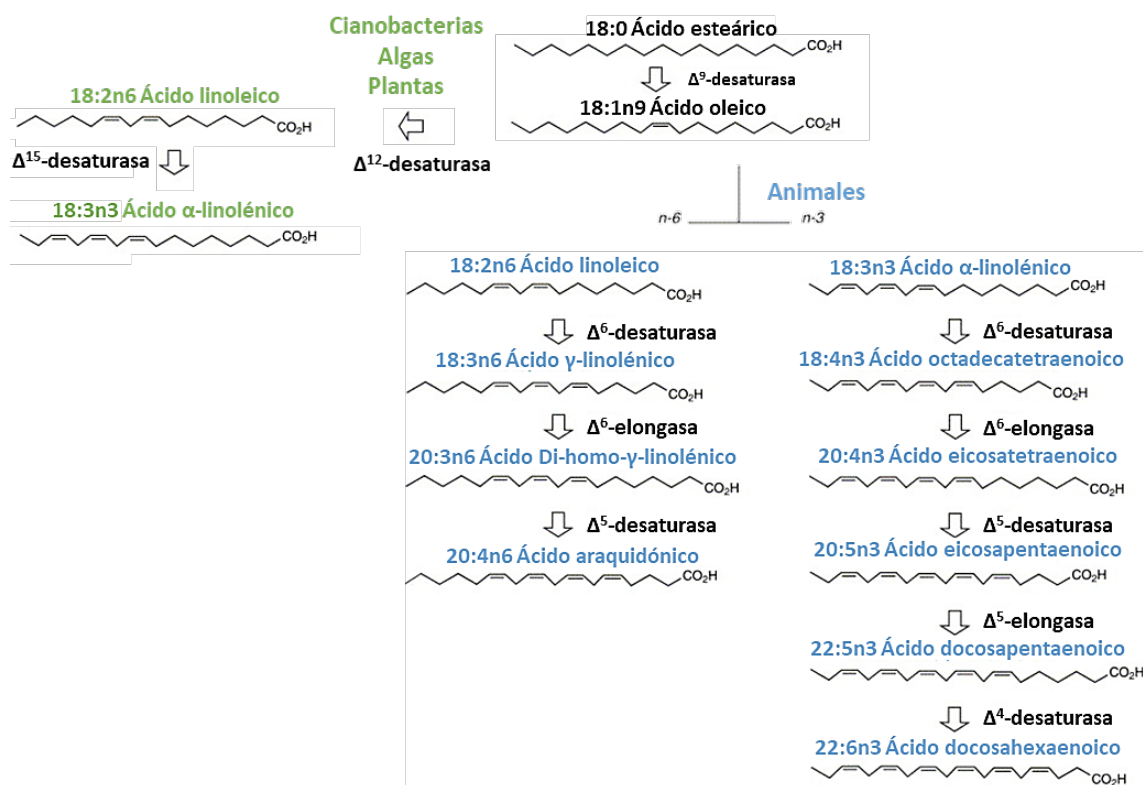


Figura 7. Ruta aerobia de síntesis de LC-PUFAS descrita en cianobacterias, algas y plantas (verde) y animales (azul). La nomenclatura de los ácidos grasos describe el número de carbonos, el número de insaturaciones y la posición de la insaturación desde el extremo omega. La nomenclatura de las enzimas Δ se refiere a la posición del carbono que modifica la enzima contando desde el carboxilo terminal. Adaptado de Napier (2002).

Sin embargo, se ha descrito que esta ruta es poco activa en algunos animales como humanos (Brenna et al., 2009) o peces carnívoros (Watters et al., 2012), por lo que es recomendable la ingesta de especies de LC-PUFA de cadena más larga, como DHA o EPA.

Recientemente, se ha identificado y caracterizado una segunda ruta, llamada anaerobia o *de novo*, que se encuentra en los traustoquítridos y las γ -proteobacterias marinas. Esta ruta metabólica está catalizada por FAS tipo I llamadas LC-PUFA sintasa (Pfa). El complejo Pfa se ha descrito como un sistema de síntesis de ácidos grasos secundario, responsable tanto de la síntesis de LC-PUFA como de otros glicolípidos o cadenas alquílicas de lípidos fenólicos, y está ampliamente distribuido en 45 géneros pertenecientes a 10 filos taxonómicos distintos. Estos complejos Pfa están codificados por un clúster poligénico cuya distribución de dominios está altamente conservada. Shulse y Allen (2011) describen que los distintos dominios de los clústeres *pfa* presentan un alto nivel de homología entre especies filogenéticamente muy distantes. En su publicación clasifican 86 clústeres en 20 grupos según (i) el número y organización de los dominios, (ii) el análisis filogenético de los dominios enzimáticos, y (iii) el producto final de la vía enzimática. La amplia distribución de las especies taxonómicas

identificadas, así como la ausencia de genes ortólogos en especies cercanas, sugiere que los clústeres *pfa* se pueden haber diseminado mediante transferencia horizontal, y se han mantenido debido a ventajas adaptativas. Adicionalmente, estudios evolutivos sostienen que los complejos Pfa han derivado de las sintasas de ácidos grasos bacterianas y de las PKS iterativas mediante múltiples eventos genéticos, como duplicaciones y pérdidas de genes (Jenke-Kodama et al., 2005).

Por ello, varios autores sugieren que la ruta biosintética de las Pfa es análoga a la ruta descrita para la síntesis de ácidos grasos mediante los sistemas FAS bacterianos y la síntesis de policétidos de las PKS iterativas (Napier, 2002; Jenke-Kodama et al., 2005; Yoshida et al., 2016; Santín y Moncalián, 2018). Esta ruta biosintética, al igual que las FAS y las PKS, consiste en tres fases: iniciación, elongación y finalización. De igual forma que en la síntesis de ácidos grasos descrita en el apartado anterior, la iniciación consiste en la activación de los dominios ACP de la proteína PfaA mediante la transferencia del grupo prostético PPT desde un CoA a la serina activa de la ACP catalizada por el dominio PPTasa del propio sistema Pfa. Este paso de activación es esencial para la actividad de Pfa (Okuyama et al., 2007); sin embargo, se ha observado que, en estudios de expresión heteróloga de sistemas Pfa en *Escherichia coli*, la actividad PPTasa de Pfa puede ser sustituida por la enzima EntD (Sugihara et al., 2010). Además, al contrario que en los sistemas FAS tipo II, en todos los sistemas Pfa los grupos ACP se encuentran en un gran polipéptido en forma de repeticiones en tándem del dominio ACP, cuyo número varía en cada organismo (Shulse y Allen, 2011). De hecho, se ha descrito que la capacidad de producción de LC-PUFA en cada organismo está determinada por el número de repeticiones del dominio ACP (Jiang et al., 2008; Hayashi et al., 2016). Por ejemplo, los traustequítridos, que contienen un 30-40% de LC-PUFA, tienen sistemas Pfa con 9 dominios ACP (Metz et al., 2009), mientras que *M. marina* tiene, que contiene tan solo 5 dominios ACP, contiene un 5-10% de DHA según las condiciones de producción (Kautharapu et al., 2013).

La fase de elongación parte de un sustrato de cadena corta, acetil-CoA y malonil-CoA. El acetil-CoA se utiliza como cebador, que se elonga en sucesivos ciclos mediante la condensación de unidades de malonil (Allemann y Allen, 2018; Metz et al., 2001). Estos sustratos son incorporados a las proteínas portadoras de acilos (ACP) del polipéptido PfaA mediante una aciltransferasa (AT) o una malonil aciltransferasa (MAT) respectivamente (Santín, 2017; Santín y Moncalián, 2018). Durante el proceso de elongación, la Pfa sintetiza una molécula completa de un determinado LC-PUFA mediante un proceso iterativo análogo al de la síntesis *de novo* de ácidos grasos (**Figura 8**): el dominio KS añade dos carbonos al malonil-ACP mediante una reacción de condensación de Claisen a la cadena de ácido graso creciente; a continuación, KR

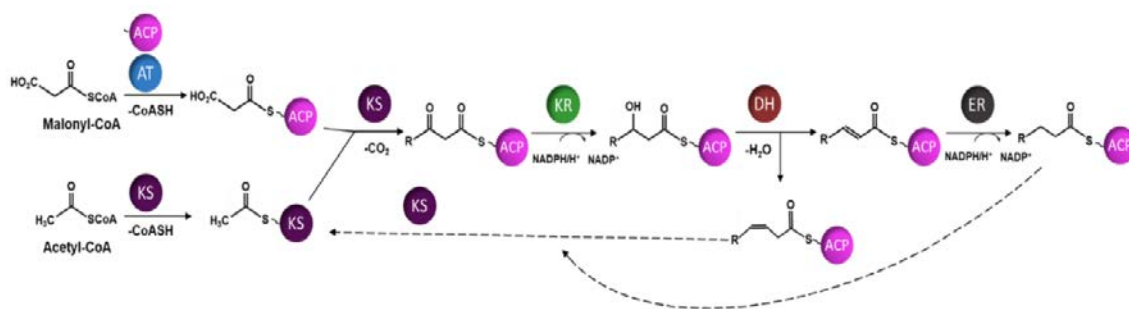


Figura 8. Análisis general de la ruta de síntesis *de novo* de LC-PUFA. Se indica cada enzima con distinto color: fucsia - proteína transportadora de acilos (ACP), morado – cetosintasa (KS), azul- aciltransferasa, verde – cetoreductasa (KR), rojo – dehidratasa (DH), negro – enoil reductasa (ER). Las líneas discontinuas indican el inicio de un nuevo ciclo de elongación. Adaptado de Santín y Moncalián (2018).

reduce el grupo cetónico dando lugar a un grupo hidroxilo utilizando el cofactor NADPH como donador de electrones; finalmente un dominio DH/I cataliza primero una deshidratación del grupo hidroxilo, generando un doble enlace Δ^2 en posición *trans* en el ácido graso creciente. En función de la posición y la geometría de este doble enlace puede sufrir dos modificaciones: una reducción a enlace sencillo mediante la ER con el gasto de una molécula de NADPH, o una isomerización a Δ^2 -cis o Δ^3 -cis mediante acción de la DH; este doble enlace se mantiene en la cadena hasta el final de la síntesis (Napier, 2002; Shulze y Allen, 2011; Yoshida et al., 2016). Estas reacciones se han inferido en base a los dominios funcionales identificados en los clústeres génicos *pfa* similares a los dominios encontrados en sistemas FAS y PKS; por tanto, es necesario confirmar esta hipótesis con evidencias experimentales.

En este tipo de complejos enzimáticos, así como en las PKS iterativas, la longitud del producto final parece estar determinada por el dominio heterodimérico KS/CLF (*chain length factor*), ausente en las sintasas FAS. En un primer ensayo, se observó que la mutación de aminoácidos específicos en este dominio KS/CLF generaba moléculas con distinta longitud de cadena en sistemas PKS (Tang et al., 2003). Se ha observado que el dominio KS/CLF contiene un túnel hidrofóbico donde se elonga la molécula creciente, que podría estar relacionado con la longitud final de la cadena de carbonos, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular.

La fase de finalización consiste en la liberación del ácido graso unido al grupo prostético del dominio ACP de PfaA. El mecanismo se desconoce, sin embargo, se han propuesto tres posibles procesos de terminación de la síntesis de LC-PUFA (Yoshida et al., 2016). El proceso más habitual en la síntesis de ácidos grasos es la transferencia de un ácido graso unido al dominio ACP a una molécula de 1-acilglicerol-3-fosfato, dando lugar a ácido fosfatídico. Esta reacción de transacilación está catalizada por la proteína 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (AGPAT) y

está descrita en multitud de microorganismos, incluida *E. coli* como PlsC. Por tanto, la AGPAT podría estar actuando sobre LC-PUFA unidos al dominio ACP de PfaA.

Por otro lado, la terminación de la síntesis de LC-PUFA podría estar mediada por una enzima tioesterasa (TE). Estas enzimas liberan los ácidos grasos unidos tanto a dominios ACP como a grupos CoA, dando lugar a ácidos grasos libres (FFA). Estos ácidos grasos posteriormente se activan mediante las acil-CoA sintetetasas o acil-ACP sintetasas, y posteriormente son incorporados a los fosfolípidos por acción de AGPAT. *M. marina* MP-1 y *Photobacterium profundum* SS9 contienen genes que codifican enzimas TE aguas arriba del gen *pfaA*. Ensayos *in vitro* indican que la TE de *P. profundum* tiene especificidad de sustrato por ácidos grasos de cadena larga, como el EPA; además, su sobreexpresión *in vivo* incrementa el contenido de ácidos grasos totales en la bacteria (Rodríguez-Guilbe et al., 2013). Por último, se ha propuesto un tercer mecanismo, en el que el propio complejo Pfa podría tener actividad TE. En concreto, Oyola-Robles et al. (2014) publicaron que la delección de esta enzima no afectó a la producción de LC-PUFA en *P. profundum*, y por ello, asumieron que la actividad TE debía estar contenida en el propio complejo Pfa. En concreto, los autores proponen el dominio DH de PfaC como responsable de esta actividad. La sobreexpresión de varios dominios DH de *P. profundum* SS9 en *E. coli* incrementó los ácidos grasos totales de la bacteria, mientras que la sobreexpresión de la deshidratasa de *E. coli*, FabA, no tuvo dicho efecto sobre la producción de ácidos grasos (Yoshida et al., 2016). Previamente, se han descrito otras enzimas DH y TE de estructura similar con una actividad dual deshidratasa-tioesterasa como se propone en este mecanismo (Dillon y Bateman, 2004). En *Schizochytrium* sp. los LC-PUFA unidos a los dominios ACP del complejo Pfa se liberan en forma de FFA. Los autores sostienen que esta actividad puede deberse a la acción de tioesterasas, componentes integrados en el complejo Pfa de *Schizochytrium*. Posteriormente, estos FFA son activados por una ACS específica de LC-PUFA, y utilizados para la síntesis de fosfolípidos de membrana o de TAG (Metz et al., 2009).

1.2.5. Síntesis de EPA y DHA en bacterias marinas

En este trabajo, se ha utilizado la bacteria *Moritella marina* MP-1, previamente llamada *Vibrio marinus* (Urakawa et al., 1998). Esta bacteria marina es psicrófila y piezófila, y produce DHA mediante un sistema Pfa. *M. marina* contiene un clúster génico *pfa* (Morita et al., 2000). El complejo proteico Pfa en *M. marina* está codificado por 5 genes esenciales para la síntesis de DHA (**Figura 9 A**): cuatro de ellos (*pfaA*, *pfaB*, *pfaC*, y *pfaD*) se localizaron por análisis de homología de secuencia con genes *pfa* de la bacteria productora de EPA *Shewanella* sp. (Morita

et al., 2000), mientras que el gen *pfaE* se localizó años después aguas arriba del clúster *pfaABCD* (Orikasa et al., 2006).

El uso de bacterias nativas productoras de LC-PUFA como cepa industrial es complicado debido a la dificultad de cultivo que presentan: en primer lugar, las condiciones ambientales en las que habitan estas bacterias son difíciles de reproducir en laboratorio, y adicionalmente, la ausencia de herramientas moleculares para la manipulación de estas bacterias dificulta el proceso de optimización. Por ello, se han desarrollado distintas estrategias en las que se han clonado genes *pfa* en vectores de expresión y se han expresado en cepas más adecuadas para el cultivo a escala industrial como *E. coli* (Orikasa et al., 2009; Peng et al., 2016) o *Lactococcus lactis* (Amiri-Jami et al., 2014).

Orikasa et al. (2006b) clonaron inicialmente los genes *pfaABCD* de *M. marina* en el plásmido llamado pDHA3, y lo expresaron junto con un plásmido pET21a con el gen *pfaE* de *M. marina*. Al analizar el patrón de ácidos grasos en fase exponencial media-tardía, observaron que la temperatura óptima de síntesis de DHA era 15 °C, con un contenido en DHA entorno al 5% respecto al total de ácidos grasos, mientras que a 20 °C la concentración se reducía al 1%, y no

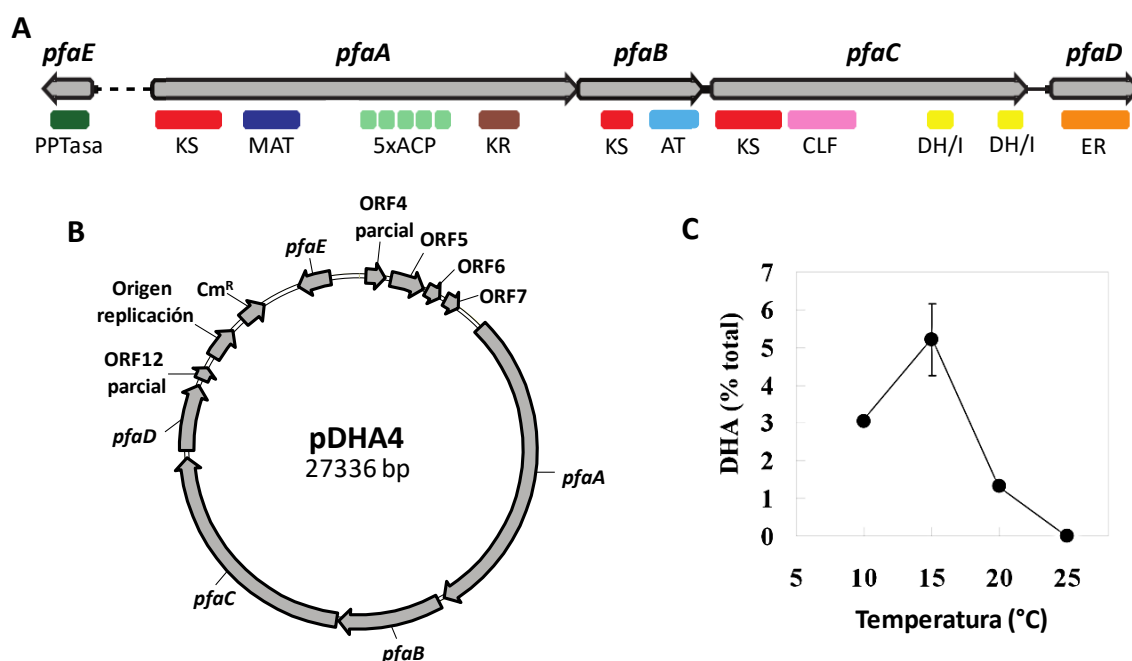


Figura 9. Clúster *pfa* de *Moritella marina* MP-1. **A)** Distribución de los dominios enzimáticos en los genes *pfa*. Abrev.: PPTasa – fosfopanteteinil transferasa, KS- cetosintasa, MAT – malonil aciltransferasa, ACP – proteína portadora de acilos, KR – cetoreductasa, AT – aciltransferasa, CLF – *chain length factor*, DH/I – dehidratasa/isomerasa, ER – enoil reductasa. Adaptado de Shulse y Allen (2011). **B)** Esquema del plásmido de expresión pDHA4 con los 5 genes *pfa* y ORFs adyacentes (Orikasa et al., 2009). Abrev.: CmR – cassette de resistencia a cloranfenicol. **C)** Producción heteróloga de los genes de *M. marina* clonados en pDHA3 (*pfaABCD*) y pET21c:*pfaE* en *E. coli* DH5α a distintas temperaturas de cultivo. Tomado de Orikasa et al. (2006b).

se detectaba 25 °C (**Figura 9C**). Estos datos concuerdan con el patrón de síntesis de DHA en la bacteria nativa (Kautharapu et al., 2013).

Posteriormente, Orikasa et al. (2009) clonaron los cinco genes de *M. marina*, *pfaABCDE*, en un mismo vector de expresión llamado pDHA4 (**Figura 9B**). La expresión heteróloga de este vector en la cepa de *E. coli* DH5α a 15 °C produjo un 4% de DHA respecto al total de ácidos grasos cuando se analizó a las 96h de cultivo. En el mismo trabajo, describieron que el intercambio del gen *pfaB* por el de la bacteria productora de EPA *Shewanella pneumatophori*, daba lugar a un cambio en el producto final de DHA a EPA.

Adicionalmente se ha descrito el efecto del antibiótico cerulenina sobre la producción de LC-PUFA mediante la ruta *de novo*. La cerulenina, o epoxidodecadienamida (número CAS: 17397-89-6), es un antibiótico antifúngico producido por el hongo *Cephalosporium caerulens* (**Figura 10A**). Este compuesto se une covalentemente a la cisteína catalítica (Cys163) del centro activo formado por la triada His-His-Cys de los dominios KS de FabB y FabF (**Figura 10B**). Adicionalmente, la cadena de acilo de la molécula de cerulenina se dispone a lo largo de un bolsillo hidrofóbico de la propia KS en el que queda protegida. Como ya se ha explicado previamente, FabB y FabF son las KS encargadas iniciar los ciclos de elongación de ácidos grasos mediante la adición de dos carbonos a la cadena de acilo creciente situado en el bolsillo hidrofóbico. Por tanto, la unión de la cerulenina al centro catalítico impide que se elonguen los ácidos grasos (Moche et al., 1999; Price et al., 2001).

Sin embargo, la tercera KS de *E. coli*, FabH, responsable de la condensación inicial de acetil-CoA y malonil-ACP, no es inhibida por la cerulenina. Esta diferencia se debe a que el centro catalítico de FabH está compuesto por la triada His-Asn-Cys (Davies et al., 2000), en lugar de His-His-Cys de FabB y FabF. Además, la enzima FabH carece del bolsillo hidrofóbico descrito en FabB y FabF. Ambas características diferenciales de la estructura de FabH son importantes para explicar la diferencia de inhibición por cerulenina. En primer lugar, la segunda histidina de la

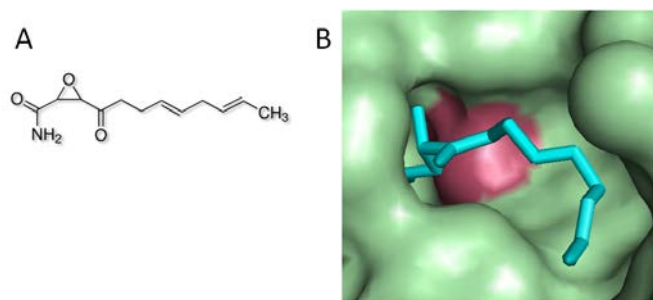


Figura 10. Estructura de la cerulenina y su efecto sobre las cetosintasas I y II (PfaB y PfaF). **A)** Estructura molecular de la cerulenina. **B)** Unión covalente de la cerulenina (cian) al aminoácido catalítico (Cys163, rojo) localizado en el canal hidrofóbico de la cetosintasa II (FabF, verde) de *E. coli* (PDB: 1B3N; Moche et al., 1999).

triada de FabB y FabF ayuda a estabilizar la cadena de acilo creciente mediante puentes de hidrógeno, y en segundo lugar, la presencia del bolsillo hidrofóbico necesaria para cadenas de acilo largas parece determinante para proteger la cadena de acilo de la cerulenina (Price et al., 2001). Por tanto, la cerulenina es capaz de inhibir a FabB y FabF por un mecanismo de mimetismo de la estructura de un ácido graso de cadena larga, mientras que no es capaz de inhibir FabH porque esta enzima ha evolucionado para albergar en su centro activo cadenas de acilo cortas.

La inhibición de la actividad FabB y FabF supone una reducción de la elongación de los ácidos grasos, y por ello, una reducción en la proporción de ácidos grasos de cadena media y larga y un incremento en los de cadena corta (Moche et al., 1999; Price et al., 2001). Asimismo, la inhibición de actividad FAS disminuye el consumo de sustrato, malonil-CoA, que se acumula en el citoplasma, incrementa incluso en 50 veces su concentración, y por tanto, queda disponible para otras rutas biosintéticas nativas o heterólogas (van Summeren-Wesenhagen y Marienhagen, 2015).

Por tanto, en organismos que poseen dos sistemas de síntesis de ácidos grasos, FAS y Pfa, el malonil-CoA acumulado como consecuencia de la inhibición del sistema FAS se utiliza por la Pfa para la síntesis de LC-PUFA, puesto que el dominio KS de este sistema no es inhibido por la cerulenina (**Figura 10C**). El uso de este antibiótico para mejorar la producción de LC-PUFA se ha probado en *C. psycherythraea* (Wan et al., 2016), *Thraustochytrium sp.* (Hauvermale et al., 2006), *M. marina MP-1* y *S. marinistestina IK-1* (Morita et al., 2005). También se ha testado en sistemas Pfa heterólogos de *M. marina* y *C. psycherythraea* expresados en *E. coli* (Orikasa et al., 2009; Peng et al., 2016).

1.3. Acumulación de lípidos en células bacterianas

Los ácidos grasos producidos por las ácido graso sintasas, tanto FAS como Pfa, tienen distintos destinos en función del tipo de organismo. En general, se pueden encontrar en la célula como parte los de fosfolípidos de membrana, formando gotas lipídicas en forma de triacilglicéridos, o de forma libre en el citoplasma celular (**Figura 11**).

1.3.1. Fosfolípidos

El principal destino de los ácidos grasos en la célula es la formación de fosfolípidos, principal constituyente de la membrana celular. En *E. coli* existen tres grandes tipos de fosfolípidos: fosfatidil glicerol, fosfatidi letanolamina y cardiolipina. Los fosfatidilgliceroles son el componente mayoritario de las membranas en *E. coli*. Están compuestos por una molécula de glicerol-3-fosfato esterificado con dos ácidos grasos. El primer paso en la síntesis de fosfolípidos

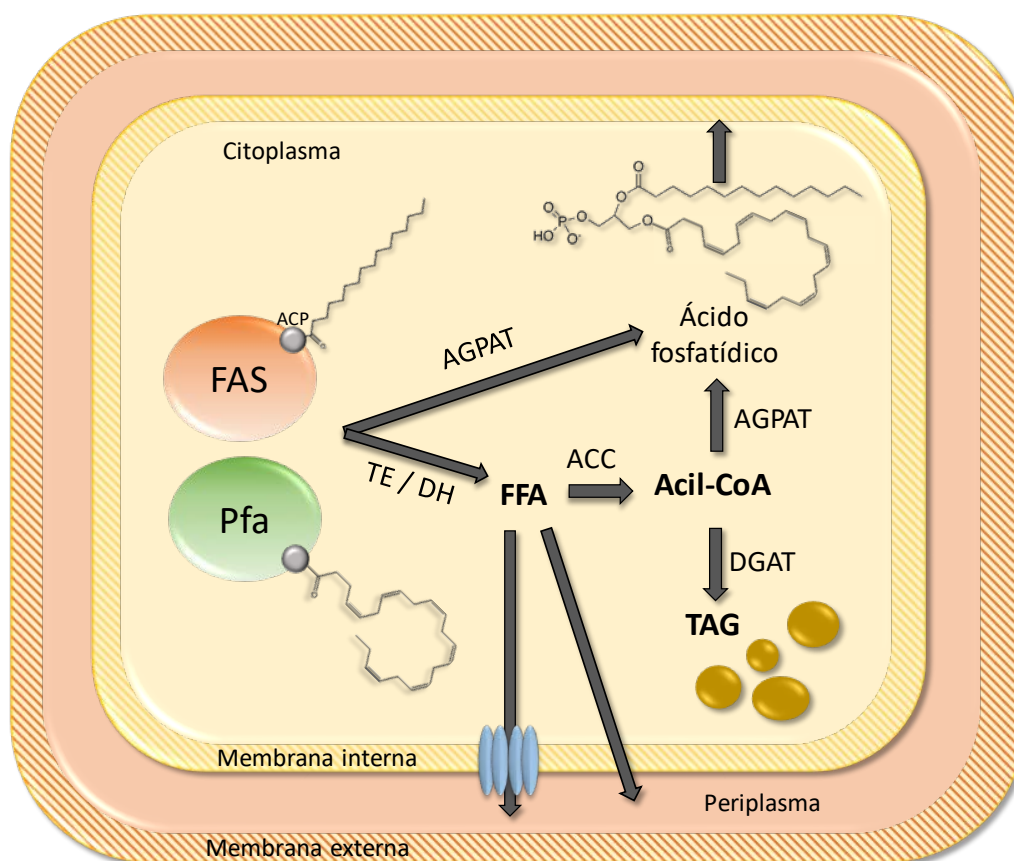


Figura 11. Acumulación de lípidos en células bacterianas. Los ácidos grasos producidos en las Sintasas de ácidos grasos (FAS o Pfa), se utilizan principalmente para formar fosfolípidos de membrana (ácido fosfatídico), bien por acción directa de la enzima AGPAT, o PlsC en *E. coli*, o bien son liberados previamente de su unión ester a los dominios portadores de acilos (ACP) mediante la acción de tioesterasas (TE/DH). Algunas bacterias son capaces de liberar el exceso de ácidos grasos libres (FFA) al periplasma celular mediante mecanismos de difusión o bombas de secreción. Otras bacterias, las oleaginosas, son capaces de acumular ácidos grasos en forma de triglicéridos en una ruta en la que interviene la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT).

Introducción

es la acilación de un grupo glicerol-3-fosfato (**Figura 12**). La ruta más habitual catalizada por las proteínas PlsX y PlsY, enzimas que reconocen los ácidos grasos unidos a ACP, y catalizan síntesis de acilglicerol-3-fosfato o ácido lisofosfatídico. Alternativamente PlsB, cataliza la transacilación de moléculas acil-CoA o acil-ACP a una molécula de glicerol fosfato para dar lugar a este mismo producto. Posteriormente PlsC, una transacilasa de membrana introduce un segundo grupo acilo sobre el ácido lisofosfatídico para dar diacilglicerol-3-fosfato o ácido fosfatídico. Este compuesto es el sustrato común para la síntesis de todos los fosfolípidos, los cuales difieren en los grupos polares unidos al grupo fosfato de esta molécula. Así, se forma un intermediario mediante la unión de un grupo citosin trifosfato (CTP), grupo que posteriormente se sustituye por un grupo neutro en el caso de fosfatidil etanolamina, o por un grupo ácido en el caso del fosfatidil inositol y la cardiolipina (Dowhan, 1997; Zhang y Rock, 2008)

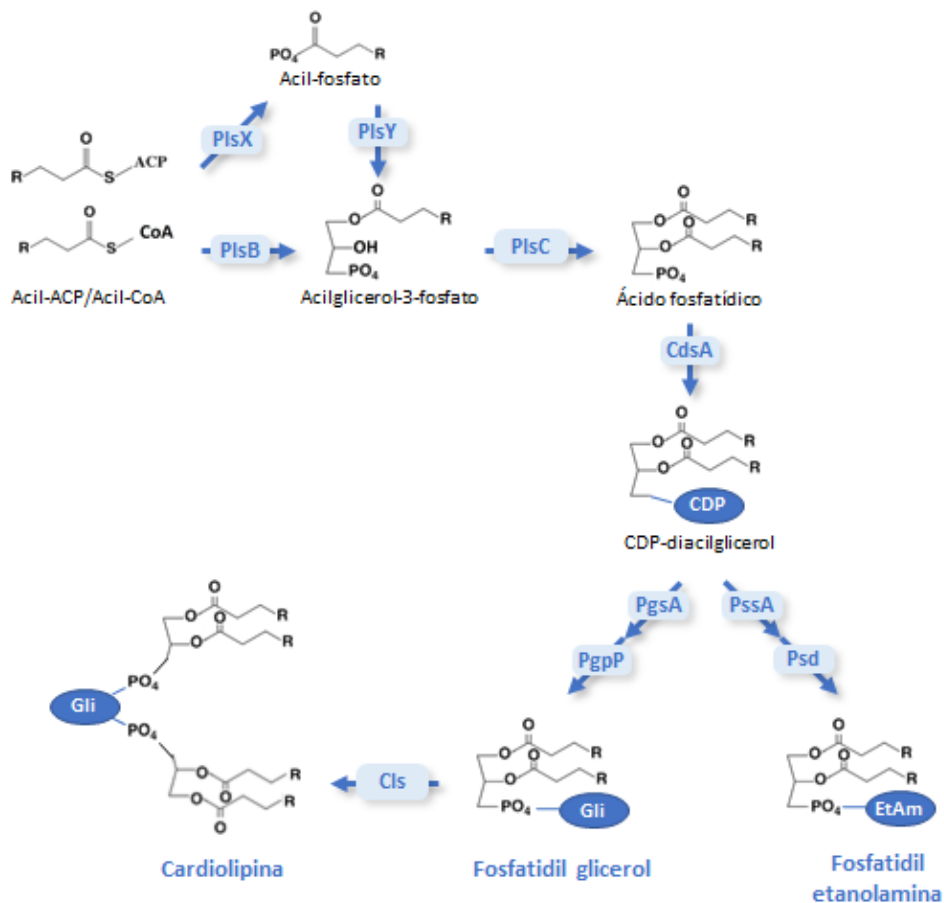


Figura 12. Ruta biosintética de los fosfolípidos de membrana en *E. coli*. En la ruta de Kennedy, dos aciltransferasas (PlsB, PlsC) catalizan la transesterificación de dos ácidos grasos sobre una molécula de glicerol-3-fosfato. En una segunda vía, PlsX sustituye el grupo ACP o CoA por un grupo fosfato, y posteriormente, PlsY transesterifica el acil-fosfato sobre un glicerol-3-fosfato. La transacilasa PlsC forma el ácido fosfatídico, precursor de los principales fosfolípidos de membrana. El ácido fosfatídico se modifica añadiendo una cabeza polar de tipo neutro para dar fosfatidil etanolamina o ácida para dar lugar a fosfatidil glicerol y cardiolipina.

Estos fosfolípidos participan en la homeostasis de membrana y son determinantes en la topología de las proteínas ancladas. De hecho, alteraciones en la composición de los distintos fosfolípidos da lugar a defectos en el transporte de solutos y electrones, así como en la iniciación de la replicación de ADN y división celular (Xie et al., 2006; Zhang et al., 2005). Recientemente se ha descrito que la cardiolipina, a pesar de ser el fosfolípido menos abundante, es esencial en la formación de estructuras membranosas no lamelares en el citoplasma celular (Carranza et al., 2017).

Los fosfolípidos de membrana además participan en rutas de biosíntesis de otras moléculas estructurales. El fosfatidil-glicerol transfiere la cabeza polar, el glicerol-1-fosfato, a los oligosacáridos derivados de la membrana (MDO), los cuales tienen un importante papel en la homeostasis en el espacio periplásmico (Kennedy, 1982). Los residuos de esta actividad son moléculas de diacilglicerol (DAG), las cuales se reciclan por conversión a ácido fosfatídico mediante la acción de la kinasa de lípidos DgkA (Raetz y Newman, 1979). En el caso de la fosfatidil-etanolamina, se utiliza el ácido graso de la posición 1 en la acilación postraducciona de lipoproteínas (Zhang y Rock, 2008). El residuo, de igual forma que el DAG, se recicla para volver a formar nuevos fosfolípidos. En este caso, se vuelve a introducir un nuevo grupo acilo en la posición mediante la acción de la aciltransferasa Aas (Jackowski et al., 1994).

1.3.2. Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres (FFA) son otra de las formas en las que se encuentran los ácidos grasos en las células. Los FFA que se acumulan en el citoplasma proceden principalmente del exterior de la célula transportadas a través de FadL, o como producto de degradación de la membrana catalizado por fosfatasas. Una pequeña porción procede de la ruptura del enlace tioéster entre el ácido graso y las ACP, o en menor medida con el CoA, en una reacción enzimática catalizada por tioresterasas. Estos FFA suelen acumularse en la fase exponencial tardía hasta la fase estacionaria (Cho y Cronan, 1995). *E. coli* contiene una tioresterasa periplásmica, TesA, encargada de liberar ácidos grasos que son transportados al interior de la célula a través del transportador de membrana FadL (Cho y Cronan, 1995). Diversos estudios sobre producción de biodiesel en *E. coli*, utilizan una variante de la proteína TesA, a la cual se ha eliminado la señal de secreción de la proteína TesA con el objetivo de cambiar la localización de la proteína al citoplasma ('TesA). De esta forma, 'TesA utiliza como sustrato los ácidos grasos sintetizados por la FAS en el citoplasma, que son liberados de las ACP en lugar de destinarse a formar parte de los fosfolípidos de membrana (Cho y Cronan, 1995; Shin et al., 2016). La sobreexpresión de 'TesA en *E. coli* da lugar a un incremento del nivel de FFA de entre 12 y 35 veces respecto a la cepa control (Janßen y Steinbüchel, 2014).

Sin embargo, el exceso de FFA en el citoplasma puede dar lugar a efectos tóxicos (Lennen et al., 2011; Royce et al., 2013). Este exceso de FFA intracelulares generalmente se secretan al periplasma, mediante un mecanismo de difusión en el caso de FFA de cadena corta o media (Maloy et al., 1981; Meng et al., 2013), o mediante un sistema de secreción basado en proteínas de membrana AcrAB-TolC en los FFA de cadena larga (Lennen et al., 2013).

Explotando este efecto, algunos estudios orientados a la sobreproducción de ácidos grasos, han utilizado la inserción o modificación de tioesterasas citoplasmáticas que han dado lugar a un incremento en la síntesis y secreción de FFA, no solo en *E. coli* (Elbahloul y Steinbüchel, 2010; Liu et al., 2012), también en otros organismos de interés industrial como la levadura oleaginosa *Yarrowia lypolitica* (Ledesma-Amaro et al., 2016) o la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ruffing, 2014). Curiosamente, los sistemas PKS de microorganismos terrestres contienen un dominio TE en la propia sintasa que libera los productos finales de la ruta, mientras que en la mayoría de sistemas Pfa está ausente (Shulse y Allen, 2011). Sin embargo, *Photobacterium profundum* contiene una proteína con actividad tioesterasa codificada por el ORF6, aguas arriba de los genes *pfaABC* responsables de la producción de EPA en la bacteria (Rodríguez-Guilbe et al., 2013).

1.3.3. Triacilglicéridos

En procariotas oleaginosos, la acumulación de ácidos grasos se realiza en forma de triacilglicéridos (TAG) o aceites. La reacción está catalizada por una enzima dual con actividad éster sintasa de ceras/acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa (WS/DGAT) (**Figura 13**). Esta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso activado, acil-CoA, a un alcohol graso o un diacilglicerol para dar lugar a ceras o TAG, respectivamente. Los traustoquítridos, microorganismos destacados por ser capaces de producir un 30-40% de DHA a 25-30 °C, acumulan tanto LC-PUFA como otros ácidos grasos en forma de TAG, es decir, poseen una DGAT capaz de utilizar DHA y otros LC-PUFA como sustrato (Metz et al., 2009). En estos organismos, la proporción celular de lípidos puede alcanzar el 50% de la masa total (Raghukumar, 2008).

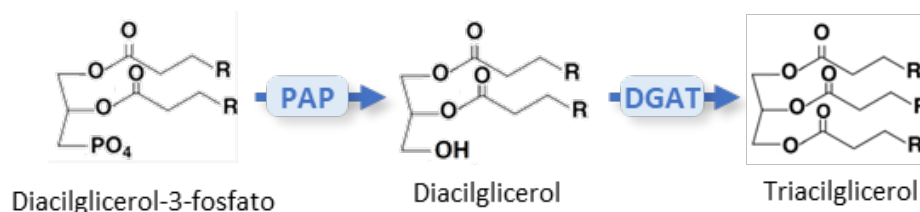


Figura 13. Ruta de biosíntesis de triacilglicéridos a partir de ácido fosfatídico o diacilglicerol-3-fosfato mediante la acción de la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) y la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT).

Algunos estudios orientados a la mejora de la producción de LC-PUFA han utilizado esta estrategia con el objetivo de incrementar el nivel de DHA o EPA. Xie et al. (2015) describen el uso de la levadura oleaginosa *Y.lipolytica* como chasis metabólico en el que introducen los genes desaturasa y elongasa necesarios para la síntesis de EPA, de forma que se acumula hasta un 30% de TAG enriquecidos en EPA.

Respecto a bacterias no oleaginosas, se ha conseguido acumular TAG en el citoplasma de la cepa de *E. coli* C41 mediante la expresión heteróloga de la WS/DGAT de la bacteria termófila *Thermomonospora curvata* (tDGAT) a temperaturas superiores a 25 °C (Lázaro et al., 2017; Moncalián et al., patente no. WO2014/049180). En este mismo sistema de producción de TAG, Lázaro (2016) describe la expresión heteróloga de la tDGAT junto con el sistema Pfa de *M. marina* en la cepa de *E. coli* C41, sin embargo, no consiguió detectar DHA en los TAG producidos a 21,5 °C.

2. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

2.3. Motivación

El ácido docosahexaenoico es un compuesto de alto interés nutricional y farmacológico. Su producción a partir de aceite de pescado hasta la fecha presenta muchas desventajas, mientras que la síntesis en traustoquítridos debido a su protección industrial supone un monopolio que evita la competencia con otros productos.

En este proyecto se plantea desarrollar un sistema de síntesis alternativo a las fuentes de producción actuales. Para ello, se planteó utilizar el complejo proteico Pfa de la bacteria marina *Moritella marina*, cuya similitud de secuencia con el complejo de traustoquítridos es inferior al 80%. Debido a la complejidad de su cultivo en condiciones de laboratorio y a gran escala, se decidió expresar las proteínas en una cepa de *E. coli*, cuya utilización industrial está optimizada y muy extendida, debido a que las herramientas moleculares de las que se dispone son muy amplias.

2.4. Objetivo

El principal objetivo de este trabajo es mejorar la producción de DHA mediante la caracterización del funcionamiento molecular del sistema Pfa de *M. marina* cuando se expresa heterológicamente en *E. coli*. De esta forma se pretende encontrar las condiciones más adecuadas para utilizar este sistema para un posterior escalado industrial.

2.5. Subobjetivos

Para abordar este amplio objetivo, se han planteado cuatro subobjetivos que permitan abordar y optimizar el sistema desde distintos puntos de vista:

- o Mejorar la síntesis de DHA mediante la caracterización de distintos aspectos moleculares del complejo Pfa.
- o Mejorar la producción de biomasa bacteriana en las condiciones óptimas de síntesis de DHA.
- o Desarrollar una estrategia de acumulación o secreción de DHA que permita producir una mayor cantidad del ácido graso, así como protegerlo de los procesos anabólicos de la célula.
- o Desarrollar una estrategia de evolución de la cepa optimizada que permita seleccionar mutantes con una mayor capacidad de sintetizar DHA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en el presente trabajo se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas de *E.coli* utilizadas en este trabajo.

Nombre	Características	Origen
DH5α	<i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , $\Phi80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$ U169, <i>hsdR17</i> (<i>rK-mK</i> ⁺), λ - [<i>Nx</i> ^R]	(Grant et al., 1990)
BW27783	<i>F</i> ⁻ , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ -, , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> $\Delta(\text{araH-araF})570(::FRT)$, $\Delta\text{araEp-532}::FRT$, $\phi\text{Pcp8araE535}$	(Khlebnikov et al., 2001)
BW25113	<i>F</i> ⁻ , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ -, , <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	(Datsenko y Wanner, 2000)
Colección KEIO	Conjunto de cepas portadoras de mutaciones en marco de un único gen derivadas de BW25113.	(Baba et al., 2006)
BL21 (DE3)	<i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), $\lambda(\text{DE3 } [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5])$, [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S)	(Studier y Moffatt, 1986)
MDS42	Genoma reducido de MG1655. $\Delta\text{fhuACDB}$, ΔendA . Deleción de 699 genes adicionales.	(Posfai et al., 2006)
BL21 Arctic express	Cepa derivada de BL21. Contiene los genes <i>Cpn60</i> y <i>Cpn10</i> de <i>Oleispira antártica</i>	Agilent technologies (Ferrer et al., 2003)

3.4. Plásmidos

3.4.1. Plásmidos publicados

En este trabajo se han utilizado los plásmidos detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Plásmidos publicados previamente utilizados en este trabajo

Nombre	Inserto	Promotor/inductor	Replicón	Fenotipo	Referencia
pDHA4	Clúster génico <i>pfa</i>	Promotores nativos de <i>M. marina</i>	p15A	Cm ^R	(Orikasa et al., 2009)
pBAD33	-	pBAD/arabinosa	P15A	Cm ^R	(Guzman et al. , 1995)
pBtDGAT	tDGAT	pBAD/ arabinosa	p15A	Cm ^R	(Villa Torrecilla, 2012)
pET29c-pfaC	<i>pfaC</i>	T7/IPTG	pBR322	Kn ^R	(Santín, 2017)
pET29c-pfaD	<i>pfaD</i>	T7/IPTG	pBR322	Kn ^R	(Santín, 2017)

3.4.2. Plásmidos contruidos

Los plásmidos contruidos durante el desarrollo de este trabajo se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Plásmidos contruidos para este trabajo mediante clonación de enzimas de restricción (ER) o por ensamblaje isotérmico (EI).

Nombre	Inserto	Promotor Inductor	Tamaño (Kpb)	Origen replicación (N° copias)	Cassette selección	Construcción
pLGR1	tDGAT	pBAD/Ara	7,3	p15A (~10)	Ap ^R	Construido por EI. Oligos 1 y 2 para amplificar el vector pBtDGAT (tabla); oligos 3 y 4 para amplificar el gen de resistencia a ampicilina del vector pET3a.
pLGR2	pfaE	T7/IPTG	5,5	pBR322 (~15-20)	Ap ^R	Construido por ER. Gen <i>pfaE</i> amplificado con los oligos 5 y 6; clonado mediante enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>NdeI</i>
pLGR3	pfaAB	pBAD/Ara	16,1	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 9 y 10 para amplificar <i>pfaA</i> y <i>pfaB</i> de pDHA4; oligos 7 y 8 para abrir el vector pBAD33.
pLGR4	pfaC	pBAD/Ara	11,3	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 11 y 12 para amplificar <i>pfaC</i> de pDHA4; oligos 7 y 8 para abrir el vector pBAD33.
pLGR5	pfaDE	pBAD/Ara	7,8	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 13 y 14 para amplificar <i>pfaD</i> de pDHA4; oligos 15 y 16 para amplificar <i>pfaE</i> de pLGR2; oligos 7 y 8 para abrir el vector pBAD33.
pLGR8	pfaCDE	pBAD/Ara	14,0	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 20 y 21 para amplificar pfaC + promotor de pLGR4; oligos 18 y 19 para abrir el vector pLGR5. Sin terminadores intermedios.
pLGR9	pfaA HisTag Cterm	pBAD/Ara	13,3	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 9 y 22 para amplificar pfaA de pLGR3 y añadir la cola de histidinas; oligos 7 y 8 para abrir el vector pLGR3.
pLGR10	pfaA HisTag Nterm	pBAD/Ara	13,3	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 23 y 24 para amplificar pfaA de pLGR9 y añadir la cola de histidinas; oligos 7 y 25 para abrir el vector pLGR9.
pLGR13	pfaABCDE	pBAD/Ara	24,9	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por EI. Oligos 17 y 26 para amplificar pfaCDE + promotor de pLGR8; oligos 18 y 27 para abrir el vector pLGR3.
pLGR12	ORF7	pAnt/-	4,3	pSC101 (~5)	Kn ^R	Construido por EI. Oligos 28 y 29 para amplificar el ORF7 (tioesterasa) de pDHA4; oligos 30 y 31 para abrir el vector pUA66.
pLGR14	ORF7	pBAD/Ara	5,7	p15A (~10)	Cm ^R	Construido por ER. Se extrae el ORF7 de pLGR12 y se clona en pBAD33 usando <i>BamHI</i> y <i>PstI</i> .
pLGR15	ORF7	pBAD/Ara	5,9	p15A (~10)	Ap ^R	Construido por EI. Oligos 1 y 2 para amplificar el vector pLGR14; oligos 3 y 4 para amplificar el gen de resistencia a ampicilina del vector pET3a.

3.5. Oligonucleótidos

A continuación, se detallan los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de este trabajo según su finalidad: construcción de plásmidos (**Tabla 4**), comprobación por PCR y secuenciación Sanger, y cuantificación de la expresión por RT-qPCR (**Tabla 5**).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los plásmidos recogidos en la **Tabla 3**.

Nº oligo	Nombre	Secuencia (5'>3')
1	pBAD_CmDEL_F	AGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGA
2	pBAD_CmDEL_R	GCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGC
3	pBAD_AmplINS_F	TCAGGCGTAGCACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC
4	pBAD_AmplINS_R	ATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
5	pfaE_NdeI_F:	AAAAACATATGTACAGCGGCG
6	pfaE_BamHI_R:	AAAAAAGGATCCCTATTTAGCGTC
7	MMclon_pBAD_F	GGCTGTTTTGGCGGATGA
8	MMclon_pBAD_R	GCTAGCCCAAAAAACGGGT
9	MMclon_1_pfaAB_F	ACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAGCAGGAGCAATAACGCAATGGC
10	MMclon_1_pfaAB_R	GTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCCTATTTGTTCTGTGTTGCTATATGGC
11	MMclon_2_pfaC_F	ACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAGCAGGAGATATACATATGGAAAATATTGC
12	MMclon_2_pfaC_R	GTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCCTACGCTTCAACAATACTTAAACG
13	MMclon_3_pfaDE1_F	ACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAGCAGGAGATATACATATGTCGAGTTTAGG
14	MMclon_3_pfaDE1_F	AGCTTATCTTTTACGCCGCTGTACATATGTATATCTCCTTTAATCACTCGTACGATAACTTGC
15	MMclon_4_pfaDE2_F	CTTAAGTACAGAAATGGCAAGTTATCGTACGAGTGATTAAGGAGATATACATATGTACAGCGG
16	MMclon_4_pfaDE2_R	GTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCCTTATTTAGCGTCAGGTTAA
19	MMclon2_F	TCATTTTGCCTTCAGCCAT
20	MMclon2_R	TCTGAATGGCGGGAGTATGA
21	MMclon3_3F	TGAAGTTAAAAACATCGTTTTAAGTATTGTTGAAGCGTAACGGCAGAAAAGTCCACATTG
22	MMclon3_2F	AACCTTTCATTCCAGCGG
23	MMclon3_2R	TTACGCTTCAACAATACTTAAACGATG
24	pfaA_HisTag_R	ATCCGCCAAAACAGCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACATATCGTTCAAAATGTCACTGA
25	pfaA_HT-Nterm_F	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATAGCAGCGGCATGGCTAAAAAGAACACCACATCG
26	pfaA_HT-Nterm_R	GTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCCCTATGACATATCGTTCAAAATGTCACTG
27	pBAD_HT-Nterm_F	CATGCCGCTGCTATGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATTGCGTTATTGCTCTGCTAG
28	pLGR13_CDE_R	ACAGCCCTATTTAGCGTCAGGTT
29	pLGR13_pfaEpfaA	ACCTGAGACTAATTTTAAACCTGACGCTAAATAGGGCTGTCGGCAGAAAAGTCCACATTG
30	ORF7-pUA_F	CCAACGGATCCTCTAGATTTAAGAAGGAGATATACATATGACAAAGATATACCATCATCC
31	ORF7-pUA_R	ATGCCTCTAGAGCTTGCATGCCTGCAGGTCTGGACATTTATTTACTAACCATTGCAGCTAAC
32	pUA66_R	ATGTATATCTCCTTCTTAAATCTAG
33	pUA66_F	TAAATGTCCAGACCTGC

Los nucleótidos **en negrita** indican las colas de homología necesarias para la clonación por ensamblaje isoterma; los nucleótidos subrayados indican las dianas de restricción para la clonación por enzimas de restricción.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR cuantitativa, comprobación por PCR y secuenciación Sanger.

Nombre	Secuencia (5'>3')	Descripción	Referencia
RG_cysG_F	TTGTCGGCGGTGGTGTATGTC	Gen referencia RT-qPCR (RG).	(Zhou et al., 2011)
RG_cysG_R	ATGCGGTGAACTGTGGAATAAACG	Uroporfirin III C-metiltransferasa	
RG_CmR_F	GCAAGATGTGGCGTGTACGG	RG. Codifica la proteína Cloranfenicol acil transferasa	
RG_CmR_R	GAAACTCACCCAGGGATTGGC		Este trabajo
TG_pfaA_F	ACGTTATTGCTGGTCGTATCGC	Gen diana RT-qPCR (TG).	Este trabajo
TG_pfaA_R	TCAAGTAAGTCTGAGATCGCCATT	Oligo interno <i>pfaA</i> <i>M. marina</i>	
TG_pfaB_F	CAATCGGGCGTAAATGCTC	TG. Oligo interno <i>pfaB</i> <i>M. marina</i>	Este trabajo
TG_pfaB_R	AACAAACCAACCTGCTCTGC		
TG_pfaC_F	GGTCAGATCCCTTGGTCTGTTGC	TG. Oligo interno <i>PfaC</i> <i>M. marina</i>	Este trabajo
TG_pfaC_R	ACGTTGCGCTTTCGCTTGG		
TG_pfaD_F	GGTCTAGTGCCTGATGCGTTGA	TG. Oligo interno <i>PfaD</i> <i>M. marina</i>	Este trabajo
TG_pfaD_R	GCTCTAATGCTTCTTCTGCTGGTGC		
TG_pfaE_F	TCGATAAACCCAAGCCCAT	TG. Oligo interno <i>PfaE</i> <i>M. marina</i>	Este trabajo
TG_pfaE_R	CTCAACCCACTGCACAACAA		
TG_pfaAB_F	GTGACAACGGCTTGGACTGTG	TG. Zona intergénica entre <i>pfaA</i> y <i>pfaB</i> de pDHA4	Este trabajo
TG_pfaAB_R	TACATCAGCAATCAGCAACACCGC		
TG_pfaBC_F	CCGATTCCACAACGCAGCAAA	TG. Zona intergénica entre <i>pfaB</i> y <i>pfaC</i> de pDHA4	Este trabajo
TG_pfaBC_R	TTCGTAACATAAAGCCCCATTGATT		
TG_pfaCD_F	GTGGTTGAAGGCGGTGGTAAAGC	TG. Zona intergénica entre <i>pfaC</i> y <i>pfaD</i> de pDHA4	Este trabajo
TG_pfaCD_R	TCCAAGCCCAGTTAATTGCGTTGT		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Oligo. universal promotor T7	
pT7	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Oligo. universal terminador T7	
mm_pfaE_F	GATAGCGAATCCCCACTCC	Oligo. interno <i>pfaE</i> <i>M. marina</i>	(Lázaro, 2016)
mm_pfaE_R	ACAGCCAATGACGCCAAAT	Oligo. interno <i>pfaE</i> <i>M. marina</i>	(Lázaro, 2016)
Rk1	AGCCGAATAGCCTCTCCACCCA	Resistencia Kanamicina	(Datsenko y Wanner, 2000)
Fk2	CATCTCACCTTGCTCCTGCCGA	Resistencia Kanamicina	(Datsenko y Wanner, 2000)
Rk3	CAAGAAGGCGATAGAAGGCGATG	Resistencia Kanamicina	(Datsenko y Wanner, 2000)
MMclon_SEQ	TGCTGCACCCAAGTATCTTCA	Gen <i>araC</i> de pBAD33	Este trabajo
MMclon_SEQext	GGAATAAGGGCGACACGG	Gen <i>araC</i> de pBAD33	Este trabajo
pBADseq	CGTCACACTTTGCTATGCCA	promotor pBAD en pBAD33	
pBAD2	TCTCATCCGCCAAAACAGC	terminador en pBAD33	Este trabajo
FabHS	GCTACAAAAGAGCCTGACGAGG	Gen <i>fabH</i> en <i>E. coli</i>	Este trabajo
fabHE	CAATCACACCAGCGCAAACCAG	Gen <i>fabH</i> en <i>E. coli</i>	Este trabajo
337F	GACTCCTACGGGAGGC	Oligo universal ARN ribosomal 16S	
1100R	GGGTTGCGCTCGTTG	Oligo universal ARN ribosomal 16S	

3.6. Técnicas microbiológicas

3.6.1. Medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, Pronadisa) (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989), suplementado con 1,5% (p/v) de agar bacteriológico para medio sólido. En medios con selección por antibiótico se utilizó Ampicilina (Ap) a concentración final de 100 µg/ml (Apollo), cloranfenicol (Cm) a 25 µg/ml (Apollo), y kanamicina (Kn) a 50 µg/ml (Apollo), todos ellos esterilizados mediante filtración (0,22 µm). La inducción de la expresión de genes bajo el promotor pBAD se llevó a cabo en cultivos con DO₆₀₀ de 0,5-0,8 a una concentración final de L-Arabinosa (Sigma-Aldrich) de 0,1% (p/v), mientras que la inhibición de la expresión se realiza con 0,2% (p/v) de Glucosa (Sigma-Aldrich). El inhibidor de la síntesis de ácidos grasos cerulenina (Cayman chemical) se utilizó a concentraciones subinhibitorias de 0,5-5 µg/ml. Los cultivos se incubaron en un equipo con unidad de refrigeración “New Brunswick™ Innova® 43R, orbit diameter 1 inch” (Eppendorf) a 160 rpm.

Las cepas bacterianas se conservaron congeladas a -20 °C o -80 °C en glicerol-peptona (50 % de glicerol (v/v) y 0,75 % de peptona (p/v)) a partir de pellets recogidos en fase estacionaria.

3.6.2. Medición del crecimiento bacteriano

El crecimiento de los cultivos se midió mediante determinación de la DO₆₀₀ en un dispositivo “Nanodrop 2000c” (Thermo Scientific) utilizando muestras de 1ml de cultivo. Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en un lector de placas con espectrofotómetro Victor3 (Perkin Elmer) con un volumen de muestra por triplicado de 200 µl.

3.6.3. Liofilización de muestras

La liofilización de pellets y sobrenadantes se realizó utilizando las muestras previamente congeladas a -80 °C. Se mantuvieron a <30 mBar de presión y -50 °C durante 48h en un equipo “FreeZone -50C Benchtop Freeze Dryer” (Labconco).

3.7. Técnicas en biología molecular de ácidos nucleicos

3.7.1. Extracción y purificación de ADN de *E. coli*

- ADN plasmídico de cultivo bacteriano. Se utilizó “GeneJET plasmid miniprep kit” (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante.

- Purificación de ADN de gel agarosa. Tras cortar una banda de un gel de electroforesis se utilizó “GeneJET gel extraction kit” (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante.
- Purificación de ADN de una reacción enzimática o PCR. Se utilizó “GeneJET PCR purification kit” (Fermentas), siguiendo el protocolo del fabricante.

3.7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración tanto de ADN como de ARN se midió espectrofotométricamente a 260nm en un sistema “Nanodrop 2000c” (Thermo scientific) utilizando 2µl de muestra. Se comprobó la pureza del ADN extraído teniendo en cuenta la relación 260/280 nm ($\sim 1,8$) y 260/230 nm (~ 2).

3.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando tres enzimas distintas según la finalidad del ensayo y las características de los amplicones.

Las amplificaciones de comprobación de clones se realizaron utilizando una enzima tipo Taq polimerasa purificada por el servicio de apoyo del IBBTEC. Esta enzima tiene una tasa de error similar a la Taq polimerasa comercial “Biotaq™ DNA Polymerase” de Bioline ($1 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-6}$ errores/pb). La mezcla de reacción para esta polimerasa contenía las siguientes concentraciones: tampón para PCR 1X (500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 1 % Tritón, pH 9), 2 mM de $MgCl_2$, 10 mM de nucleótidos, 1 µM de cada oligonucleótido, 0,5 µl de polimerasa, y agua Milli-Q® hasta un volumen final de 20 µl. A la mezcla se le añadió la colonia bacteriana o el ADN a analizar. El programa de temperaturas de referencia utilizado fue el siguiente: (i) desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; (ii) 30 ciclos de 3 pasos: 30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de hibridación ADN/cebador y 1 min por kb de ADN amplificado a 72 °C; (iii) elongación final durante 10 min a 72 °C.

En el caso de reacciones de amplificación cuyo producto final se utilizó para secuenciación Sanger o clonaje se utilizaron polimerasas de alta fidelidad de copia. Para amplicones de menos de 8 kb se utilizó la polimerasa “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” con buffer HF ($4,4 \cdot 10^{-7}$ errores/pb; Thermofisher), mientras que para amplificaciones de más de 8 kb se utilizó la polimerasa “Herculase II Phusion DNA polymerase” ($1,3 \cdot 10^{-6}$ errores/pb; Agilent). Se utilizaron las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación especificadas por el fabricante.

3.7.4. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para visualizar la presencia y tamaño de las bandas de ADN tanto en los productos de PCR como en digestiones por enzimas de restricción se desarrollaron las muestras por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron geles de agarosa al 1 % (p/v), preparada en tampón TBE 0,5x

(Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM pH 8,2). Tras hervir y disolver la mezcla y atemperar la solución hasta 60-70 °C, se añadieron 5 µl de agente intercalante *SafeView Classic* (ABM) por cada 100 ml de agarosa. Las muestras de ADN se mezclaron en una proporción 5:1 con tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v) en tampón TBE 0,5x). En función de los tamaños moleculares se emplearon distintos marcadores moleculares: “Generuler 1 Kbp DNA ladder plus” y “Generuler 100 pb DNA Ladder” (ThermoFisher). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales utilizando tampón TBE 0,5x, y aplicando un voltaje de 120 V. Los geles se visualizaron en un transiluminador “UV Gel Doc 2000” (BioRad) y se analizaron mediante el programa “Quantity One” (BioRad).

3.7.5. Secuenciación Sanger

Todos los plásmidos construidos o modificados en este trabajo fueron verificados mediante secuenciación de ADN en el servicio de secuenciación Sanger de la empresa “Stab Vida” llamado “You Tube It”. Las muestras fueron preparadas según las indicaciones del servicio.

3.7.6. Análisis de digestión de ADN mediante enzimas de restricción

Algunos de los clones de mayor tamaño y complejidad construidos en este trabajo (**Tabla 3**, **Figura 16**, y **Figura suplementaria 1**) fueron comprobados mediante enzimas de restricción previamente a su comprobación por secuenciación Sanger. Para ello se comparó el patrón de digestión del plásmido predicho mediante “NEBcutter V2.0” (New England Biolabs) utilizando enzimas con más de 4 sitios de restricción en el plásmido analizado. Se digirieron 500 ng de plásmido utilizando enzimas tipo “FastDigest” (ThermoFisher) en reacciones con un volumen final de 20 µl que contenían buffer “FastDigest” 10X y 1 µl de la enzima. El tiempo de digestión, así como la inactivación de la enzima, se adaptó según las especificaciones de cada enzima para asegurar la correcta digestión de los plásmidos y evitar el efecto estrella. El resultado de la digestión se visualizó mediante un gel de agarosa.

3.7.7. Secuenciación masiva

Debido al gran tamaño y la complejidad en la construcción del plásmido pLGR13 (25 Kpb), portador de los genes *pfaABCDE*, se comprobó mediante secuenciación masiva para detectar la inserción de mutaciones puntuales, deleciones o inserciones, que pudieran afectar a la producción de DHA.

Para ello, se introdujo el plásmido en la cepa de *E. coli* MDS42 y se extrajo el ADN genómico. Se partió de pellet de cultivo líquido de 10 ml incubado a 37 °C toda la noche. Se resuspendió el pellet en 550 µl solución de lisis (tiocianato de guanidino 5 M, EDTA 0,1 M, y sarkosil 0,5 % (p/v)).

Después, se añadió 250 µl de acetato de amonio 7,4 M, y 500 µl de cloroformo: isoamilalcohol (24:1). Esta mezcla se agitó en vórtex durante 30 min.

La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante, sobre el que se añadió de nuevo 500 µl de cloroformo: isoamilalcohol (24:1), se volvió a agitar 30 min en vórtex y se centrifugó. El sobrenadante se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol y se recogió el ADN precipitado. Posteriormente, se hicieron 3 lavados del precipitado con 500 µl de etanol al 70 % (v/v), centrifugando a 8.000 rpm durante 5 min entre cada lavado. Se secó el pellet en un equipo “Concentrator 5301” (Eppendorff) durante 20 min, y se resuspendió en 100 µl de agua Milli-Q® filtrada. A continuación, se midió la concentración de ADN, y se trató con 2 µl de RNAsa (Thermo Fisher) durante 1 h a 37 °C.

La muestra se purificó posteriormente con el “Kit DNA minikit” (QIAGEN) para limpiar las impurezas que puedan quedar. Para ello, se añadió a la muestra 400 µl de TRIS 100 mM a pH 8, y 200 µl de etanol 96 %. Tras agitar en un vórtex, se añade esta mezcla en una columna del kit y se siguen las instrucciones de lavado. La muestra se eluyó en 100 µl de buffer TE del kit a 56 °C. Por último, se midió la concentración en “Nanodrop” y se corrió un gel de agarosa para ver la calidad del ADN.

La concentración de ADN total en las muestras a secuenciar se midió utilizando “Nanodrop 2000” (Thermo Scientific) y “Qubit 2.0 Fluorometer” (Invitrogen). Para su secuenciación, se fragmentó 1 µg de ADN con el ultrasonificador “Bioruptor Nex gen” (Diagenode), usando un programa de 20 ciclos de 30 s a 4 °C. Se comprobó la calidad de la muestra utilizando un “Bioanalyzer 2100” (Agilent Technologies) con el kit “DNA 1000” (Agilent Technologies). A continuación, se prepararon y validaron las librerías de ADN utilizando el kit “TruSeq DNA Sample Preparation” y “Bioanalyzer” junto con el chip “High Sensitivity DNA” (Agilent Technologies). Las librerías se prepararon con un tamaño de inserto de 400 pb y se colocaron adaptadores para realizar lecturas de secuencia pareadas (“paired-end”) de 101 bases de longitud (reads). La cuantificación de las librerías se realizó mediante Real Time PCR utilizando “StepOnePlus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems). Se utilizó el kit “TruSeq PE Cluster v5-CS-GA” (Illumina) para preparar el “Flow Cell”. Finalmente, las muestras fueron secuenciadas por la empresa “BGI” utilizando “Hiseq 2500 Sequencing System” de “Illumina”.

3.7.8. Transformación de ADN

La transformación de las cepas de *E. coli* con ADN se realizó mediante electroporación, dadas la alta eficiencia del método (Dower et al., 1988) y las facilidades logísticas del laboratorio.

Para la preparación de las bacterias electrocompetentes se crecieron cultivos en LB hasta una DO_{600} de 0,4-0,6, y tras exponerlas 30 min a hielo, se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrifuga "5810 R" de Eppendorf. A continuación, se realizaron 2 lavados en agua Milli-Q® autoclavada y a 6 °C. Seguidamente, se realizó un último lavado, esta vez con glicerol 10 % (v/v) también a 6 °C en las mismas condiciones de centrifugación. Después del último lavado, las células se resuspendieron en un volumen de glicerol 10 % de tal manera que se concentrasen 100 veces respecto al volumen original del cultivo. A continuación, se prepararon alícuotas de 50 µl que fueron congeladas inmediatamente en un baño de hielo seco. Estas alícuotas se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Por su parte, el ADN que se va a electroporar tiene que estar libre de sales. El ADN procedente de una purificación se empleó directamente, pero el procedente de reacciones enzimáticas se microdializó antes de su uso. La muestra de ADN se dejó reposar durante 30 min sobre un filtro de nitrocelulosa "Millipore GS" de 0,05 µm de tamaño de poro, que a su vez flotaba en una placa de Petri con agua Milli-Q®.

La transformación propiamente dicha se realizó mezclando una alícuota de células competentes y el ADN deseado. Cuando se trató de ADN plasmídico purificado se usaron 1-2 µl, mientras que en el caso de una ligación se usó todo el volumen de la reacción. Esta mezcla se añadió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm "Gene Pulser" (BioRad), previamente enfriada en hielo. Se sometió a un pulso eléctrico (2,5 kV/cm, capacitancia 25 µF y 200 Ω) usando un electroporador "MicroPulser" de BioRad. Rápidamente esta mezcla fue resuspendida en 1 ml de medio LB estéril precalentado a 37 °C, y se pasó el resultante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 - 2 h, en función de los genes de resistencia a expresar. Finalmente, se plaquearon 200 µl del cultivo en una placa de Petri con LB agar suplementado con los antibióticos adecuados para seleccionar los transformantes. En algunos casos, se añade 0,5% de glucosa al medio LB con el objetivo de inhibir la expresión del promotor pBAD.

3.7.9. Estrategias de clonación

3.7.9.1. Sistema de clonación por enzimas de restricción

Este sistema de clonación utiliza enzimas de restricción para generar fragmentos de ADN con extremos compatibles para su posterior ligación con la enzima ligasa del fago T4.

Para ello, se utilizaron enzimas de restricción "FastDigest" de Thermo Scientific. La reacción de digestión para preparar los extremos tanto del inserto como del vector se realiza de igual

forma que en el análisis de digestión por ER (**Sección 3.5.6**), teniendo en cuenta que los tiempos de incubación varían en función del origen del ADN (plasmídico, genómico, o fragmento de PCR).

Simultáneamente a la reacción de restricción, los vectores se desfosforilaron mediante una reacción con fosfatasa alcalina, con el objetivo de eliminar el grupo fosfato de los extremos tanto 3' como 5', sustrato de la ligasa T4, y así evitar la recircularización del fragmento por los extremos. Para ello, los vectores digeridos se trataron con fosfatasa alcalina termosensible "FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase" (ThermoFisher) durante 10 min a 37 °C, añadiendo 1U de enzima/μg de ADN a cada tubo de reacción.

Posteriormente, se llevó a cabo la ligación entre inserto y vector mediante el uso de la ligasa "T4 DNA ligase" (Fermentas): 20 - 100 ng de vector, inserto en una relación molar de entre 1:1 y 5:1 frente al vector, 1 μl de ligasa y 2 μl del tampón, en un volumen final de reacción de 20 μl. Aunque las instrucciones del fabricante indican que la ligación se debe realizar durante 10 min a 22 °C, generalmente se incubó durante la noche para incrementar la eficiencia. Por último, se inactivó la enzima a 65 °C durante 10 min, se microdializó sobre filtros de 0,22 μm de tamaño de poro (Millipore) para eliminar las sales y se electroporó en células de *E. coli* DH5α.

3.7.9.2. Método de ensamblaje isotérmico ("Isothermal assembly")

El método de ensamblaje isotérmico (Gibson et al., 2009) fue elegido como principal herramienta para la construcción de los distintos plásmidos utilizados en este trabajo. Este método permite ensamblar uno o más fragmentos en una sola reacción mediante homología de los extremos de los fragmentos.

Para ello, se preparan los fragmentos a ensamblar mediante PCR con polimerasas de alta fidelidad de copia (**sección 3.5.3**). Para ello, se incorporaron las zonas de homología en los fragmentos utilizando oligonucleótidos (**Tabla 4**) con colas homólogas a la región de solapamiento aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. Los productos de PCR se visualizaron mediante gel de agarosa, donde se seleccionaron aquellos fragmentos con el tamaño adecuado. Posteriormente, se extrajeron estos fragmentos del gel y se trataron 5 min a 37 °C con 1 μl de "FastDigest DpnI" (ThermoFisher) en su buffer correspondiente para eliminar restos de ADN molde.

La reacción de ensamblaje isoterma consiste en tres pasos: (i) la exonucleasa T5 elimina nucleótidos del extremo 5' de las dos hebras de ADN de los fragmentos con regiones terminales solapantes; (ii) los extremos cohesivos de distintos fragmentos se unen por homología de secuencia y la polimerasa "Phusion High-Fidelity DNA Polymerase" completa las zonas de cadena

sencilla; (iii) por último, la ligasa Taq cataliza la unión de los cortes. Para ello, es necesario utilizar el buffer adecuado para que las reacciones se den adecuadamente.

Este buffer se preparó en un stock inicial de 6 ml, mezclando 3 ml de 1M Tris-HCl pH 7,5, 150 µl de 2 M MgCl₂, 60 µl 100 mM dGTP, 60 µl 100 mM dCTP, 60 µl 100 mM dTTP, 60 µl 100 mM dATP, 300 µl 1 M DTT, 1,5 g PEG 8000, 300 µl, 100 mM NAD y agua Milli-Q®. Se dividió en 18 alícuotas de 320 µl, siendo congeladas a -20 °C para su posterior uso. Posteriormente, utilizando una de estas alícuotas se preparó la mezcla de reacción añadiendo 1,2 µl de “T5 Exonuclease” (Epicentre), 20 µl de polimerasa polimerasa “Phusion High-Fidelity DNA” (Thermo Scientific), 160 µl de ligasa de “Taq DNA ligase” (New England Biolabs) y 700 µl de agua Milli-Q®. Se prepararon alícuotas de 15 µl en tubos de PCR y se guardaron a -20 °C.

A estas alícuotas se añadió 5 µl con los distintos fragmentos partiendo de 100 ng del fragmento portador del cassette de resistencia a antibiótico y/o del origen de replicación, y una proporción molar de 1:1 a 1:5 del resto de fragmentos. En caso de exceder este volumen, la mezcla de fragmentos de ADN se desecó en un equipo “concentrator 5301” (Eppendorff) y se resuspendió en 5 µl de agua Milli-Q®. La mezcla de reacción y se incubó durante 60 min a 50 °C. Posteriormente, se microdializó y electroporó en *E. coli* DH5α (sección 3.5.8).

3.7.10. Análisis de expresión de ARN

Para los análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa se utilizaron como muestra de partida 1 ml de cultivo recogido cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,8. Con el objetivo de proteger la muestra de la actividad de RNAsas, se añadieron 2 volúmenes de “RNAprotect” (QIAGEN), se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se recogió el pellet. A continuación, se rompieron las células mediante tratamiento enzimático con lisozima y proteinasa K, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se utilizó el kit de extracción de “RNAeasy” (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó en 50 µl de agua Milli-Q®. El ADN genómico contaminante se eliminó utilizando el kit “Ambion RNA Turbo DNA-free” (Thermofisher) según se indica en las especificaciones del producto y se midió la concentración final de ARN.

La reacción de cuantificación mediante PCR (qPCR) se llevó a cabo utilizando el kit “KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR” (KAPA biosystems), según las indicaciones para el equipo “StepOne Plus” (Applied Biosystems). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 20 µl, con 50 ng de ARN de partida, y la siguiente concentración de reactivos: “KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix” a 1X, oligonucleótidos “forward” y “reverse” a 200 nM, “KAPA RT Mix” a 1X, y “ROX high” a 10 nM. El programa de temperaturas fue el siguiente: 5 min a 42 °C, 3 min a 95

°C, 40 ciclos de desnaturalización (3 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C), y una curva de desnaturalización desde 60 °C hasta 95 °C con incrementos de 0,5 °C.

3.8. Técnicas en biología molecular de proteínas

3.8.1. Métodos de sobreexpresión de proteínas y lisado celular

En este trabajo, se han realizado algunos ensayos de caracterización de proteínas, para los cuales fue imprescindible su purificación.

Inicialmente, los cultivos se inocularon en matraces de LB de 500 ml utilizando un preinóculo de 25 ml crecido toda la noche a 37 °C. Este cultivo se creció a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5-0,7, momento en el cual se paró el crecimiento mediante un baño a 4 °C, con el objetivo de bajar la temperatura del matraz para que la expresión se produjese a 15-18 °C. En ese momento, el cultivo se indujo y se dejó crecer a toda la noche a 15-18 °C para la correcta expresión de las proteínas Pfa.

A continuación, se procedió a la purificación de la proteína sobreexpresada. Todos los pasos desde este punto se desarrollaron a 4 °C para minimizar la degradación de las proteínas. Se recogió el cultivo mediante centrifugación en equipo “Avanti J-30I” (Beckman Coulter) con un rotor JA-10 a 4.000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta su procesamiento.

Para ello, el pellet se resuspendió en 25 ml de un buffer de lisis, adecuado para su posterior purificación, y se suplementó con 0001 % del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich). La ruptura celular se llevó a cabo mediante sonicación, utilizando 3 ciclos de 1 minuto al 80 % de energía, y 1 minuto de descanso para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Posteriormente, el lisado se ultracentrifugó a 40.000 rpm durante 15 min en una ultracentrifuga “Sorvall WX Ultra Series Centrifuge” (Thermo Scientific) con un rotor T-865.

Para comprobar la correcta expresión de la proteína, se tomó una muestra tanto del cultivo inicial, como del sobrenadante y pellet obtenidos tras la ultracentrifugación del sonificado y se observó mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.

3.8.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La expresión de proteína se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en buffer de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Se utilizaron geles con distinto porcentaje de

poliacrilamida (8-15 %, p/v) en función del tamaño de la proteína de interés. Los geles se prepararon usando 0,1 % SDS (Sigma-Aldrich) y acrilamida:bis-acrilamida (29:1) (BioRad).

Para la preparación de muestras, se utilizó buffer de carga 2X compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS al 2 % (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,1 % (p/v), y 100 mM de β -mercaptoetanol. Para la comprobación de la expresión de proteínas, se cogió 1 ml de cultivo, se centrifugó y se resuspendió el pellet en 200 μ l de buffer de carga 2X. En el caso de los protocolos de purificación, los sobrenadantes de centrifugación se diluyeron en proporción 1:1 en buffer de carga 2X, mientras que una pequeña porción de pellet se resuspendió en el mismo buffer.

Las muestras se incubaron 5 min a 100 °C, y se cargaron 10 o 15 μ l en cada pocillo del gel de acrilamida. Se utilizó “PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder” (ThermoFisher) como marcador de peso molecular.

La electroforesis se desarrolló en un sistema “Mini-protean” (BioRad) a 180 V durante 50 minutos en buffer SDS-PAGE 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 1 % (p/v) SDS, pH 8,4). Posteriormente, los geles se tiñeron 30 min en una solución de azul brillante de Coomassie R-250 (Merck) al 0,1% (p/v) en metanol:ácido acético (5:1, v/v). Por último, los geles se destiñeron en una solución metanol:ácido acético:agua Milli-Q® (1:1:8, v/v/v).

3.8.3. Purificación de proteínas

3.8.3.1. Precipitación con sulfato de amonio

El paso inicial para eliminar parte de los contaminantes del sobrenadante de sonicación fue la precipitación fraccionada con sulfato de amonio. Para ello, se utilizó una tabla de precipitación de proteínas con sulfato de amonio (Panreac) para calcular la cantidad de sal que añadir en cada porcentaje de precipitación. Se hicieron precipitaciones con un porcentaje final de 20 %, 40 %, 60 % y 80 % de saturación final de sulfato de amonio, con el objetivo de acotar un rango de saturación en el que hubiese una precipitación mayoritaria de la proteína de interés respecto al total de proteínas en la muestra. Posteriormente, se acotó con mayor precisión la saturación adecuada para la precipitación de la proteína de interés.

La precipitación de proteínas con sulfato de amonio se hizo en agitación constante a 4 °C. Se añadió poco a poco la sal, y se dejó agitar hasta su completa disolución antes de añadir más con el objetivo de evitar subidas puntuales localizadas en la concentración. La mezcla se centrifugó a 17.000 rpm durante 15 min a 4 °C en un equipo “Avanti J-30I” (Beckman Coulter) con un rotor JA-17. El resto del sobrenadante se utilizó para otra ronda de precipitación,

mientras que el pellet se resuspendió en un buffer adecuado. Se tomó muestra del sobrenadante y del pellet para una electroforesis SDS-PAGE.

3.8.3.2. Purificación mediante columnas de afinidad

Para la purificación de las proteínas sobreexpresadas se utilizaron diversos métodos de purificación aprovechando algunas características fisicoquímicas diferenciales de las proteínas:

- Intercambio iónico: se utilizaron resinas de intercambio iónico empaquetadas en columnas “HiTrap Q HP” y “HiTrap SP HP” (GE Healthcare) de 1ml de volumen de columna (CV). El buffer de equilibrado (buffer A) estaba compuesto por tampón fosfato 100 mM a pH 7,2 suplementado con ditioneitol (DTT) 2 mM y EDTA 2 mM, mientras que el buffer de elución (buffer B) contenía además NaCl 100 mM.
- Interacción con Níquel: para proteínas con un *tag* de 6 residuos de histidinas, se utilizó una resina cargada con níquel “HisTrap HP” (GE Healthcare) de 1ml CV. En este caso, el buffer A estaba compuesto por Tris-HCl pH 7,5, NaCl 300 mM y 20 mM de imidazol, mientras que la concentración de imidazol (Sigma-Aldrich) en el buffer B era de 500 mM.

La carga de proteína en la columna se realizó mediante el uso de una bomba peristáltica “Minipuls 3” (Gilson) a un flujo adecuado a las especificaciones del fabricante para cada columna. En primer lugar, se lavó la columna con 5 CV de agua Milli-Q® filtrada, y a continuación se equilibró con 5 CV de buffer A. Posteriormente, se cargó la muestra, y se recogió el eluido. Por último, se lavó la columna cargada con 5 CV de buffer A antes de conectarla al sistema “Fast protein liquid chromatography” (FPLC) tipo “ÄKTA” (GE Healthcare). Utilizando este sistema se eluyó la proteína de la columna mediante un gradiente de buffer B utilizando el siguiente programa: lavado inicial con 1 ml de buffer A, gradiente de 0 a 100 % de buffer B en 15 fracciones, lavado con 5 ml de buffer B, y lavado final con 5 ml de buffer A.

Todos los buffers fueron filtrados utilizando “Membrana MF-Millipore, 0,45 µm” (Merck Millipore) para eliminar burbujas y partículas en suspensión que puedan dañar la matriz de las columnas.

3.8.3.3. Ensayos de afinidad utilizando resina de níquel en *batch*

Con el objetivo de testar la capacidad de unión de las proteínas a la resina de níquel, se hizo una prueba inicial de afinidad. Para ello, se utilizó 1 ml de sobrenadante de sonicación en un buffer A idéntico al descrito en el apartado 3.6.3.2 para columnas de afinidad por níquel. Este sobrenadante se mezcló con 100 µL de resina “His-Select Nickel Affinity Gel” (Sigma-Aldrich) previamente lavada en buffer A. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, con agitaciones mediante vortex cada 2 minutos. Se centrifugó en un equipo de sobremesa “XXX” (Eppendorf) para eliminar las proteínas que no se unen a la resina (*flowthrough*), y finalmente se eluyó la

proteína de la resina añadiendo 50 µL de buffer B descrito previamente con una concentración final de 500 mM de imidazol. Se tomaron muestras del sobrenadante inicial, del *flowthrough*, del eluido y de la resina restante y se comprobó la efectividad del proceso mediante electroforesis SDS-PAGE.

3.8.3.4. Purificación mediante columnas de exclusión molecular

El último paso de purificación fue mediante una columna de exclusión molecular “Superose 6” (GE Healthcare) utilizando un buffer compuesto por Tris-HCl pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM y DTT 2 mM en un equipo “ÄKTA Basic PH/C 10” (Amersham Biosciences). La columna se lavó previamente a la inyección de la proteína con agua “Milli Q” (Millipore), y posteriormente se equilibró en el buffer descrito previamente filtrado (ver sección 3.6.3.2).

La muestra de proteína concentrada se centrifugó a 14.000 rpm en un equipo “Centrifuge 5415R” (Eppendorff) con rotor F45-24-21 durante 5 min a 4 °C. Se inyectaron 500 µl de muestra y se llevó a cabo un programa de elución a un flujo de 0,3 ml/min, y recogiendo 25 fracciones de 1 ml en un colector de fracciones. La presencia de proteína se monitorizó mediante absorbancia a 280 nm. Muestras de cada fracción fueron analizadas mediante SDS-PAGE.

Con el objetivo de determinar la masa molecular de las proteínas en cada fracción se hizo una carrera con patrones comerciales a 10 mg/ml de Alcohol dehidrogenasa (150 KDa), β-amilasa (200 KDa), Apoferritina (443 KDa), Tiroglobulina (669 KDa) de “Gel Filtration Markers Kit” (Sigma-Aldrich).

3.8.4. Determinación de la concentración de proteína total

La concentración de proteína total se determinó mediante medición de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro “Nanodrop 2000c” (Thermo scientific). En muestras de proteína purificada, se utilizó el coeficiente de extinción de la proteína para determinar su concentración con mayor precisión.

3.8.5. Concentración de proteínas y cambio de buffer

Las soluciones de proteína obtenidas tras los distintos métodos de purificación contienen una alta concentración de sales, así como una concentración muy baja de proteína. Con el objetivo de concentrar las proteínas y disminuir la concentración de sales (NaCl, imidazol, etc.), se utilizaron centricones (Millipore), sistemas de filtración de distinto tamaño de poro que permiten el paso de moléculas pequeñas y retienen otras de mayor tamaño como son las proteínas. Para ello, se centrifugaron las muestras en un equipo “Centrifuge 5810R” (Eppendorff) con rotor A-4-62 a 4.000 rpm diluyéndolas 1/5 en el buffer adecuado en varios

pasos de centrifugación hasta alcanzar las condiciones adecuadas para los experimentos subsiguientes.

3.8.6. Identificación de proteínas

La identificación de proteínas se realizó mediante espectrometría de masas “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization” con detector “Time of Flight” (MALDI-TOF) en el servicio de proteómica de la Universidad del País Vasco gracias a la ayuda del Dr. Kerman Aloria. Las masas moleculares y la secuencia de los péptidos de las proteínas se determinaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, a partir de bandas de proteína cortadas de geles de acrilamida. La identificación de los péptidos obtenidos de cada proteína se realizó mediante la aplicación informática MASCOT contra la base de datos Swissprot.

3.9. Técnicas analíticas de ácidos grasos

3.9.1. Determinación de la composición de ácidos grasos y cuantificación de DHA

El perfil y la cuantificación relativa de ácidos grasos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC) en “Biomar Microbial Technologies” (Léon). El aislamiento de ácidos grasos procedentes de pellets o sobrenadantes liofilizados se realizó utilizando el método Folch (Folch, Lees, y Sloane Stanley, 1957), y su metilesterificación con metanol se realizó según métodos previamente descritos (Ichihara y Fukubayashi, 2010). Los ácidos grasos metil éster (FAME, por sus siglas en inglés) concentrados se analizaron en un cromatógrafo de gases (modelo 7890 A, Agilent) equipado con una columna capilar DB-23 (Agilent) y un detector de ionización en llama (FID) utilizando helio como gas de arrastre a una presión constante de 52.248 psi. El programa de temperaturas fue el siguiente: 130 °C durante 1 min, seguido de un incremento a 2,75 °C/min hasta alcanzar los 215 °C, y por último 12 min a 215 °C. Posteriormente la columna se limpió por incremento balístico de la temperatura hasta 230 °C, donde se mantuvo durante 2min. La inyección de la muestra se realizó en una cámara “split-splitless” a 270 °C, con un “split ratio” de 10:1. La detección de los compuestos se llevó a cabo en el detector FID a 280 °C con un flujo de aire de 200 ml/min, H₂ a 30 ml/min, y N₂ a 22,5 ml/min. La identificación de los FAME se hizo mediante comparación del tiempo de retención con estándares comerciales (Supelco® 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich).

El perfil de ácidos grasos se expresa como porcentaje del área del pico de cada ácido graso en relación a la suma de las áreas del total de ácidos grasos. Debido a la gran cantidad de ruido

obtenido en los cromatogramas, se tuvo en cuenta tan sólo los picos correspondientes a ácidos grasos identificados previamente en *E. coli* (Oursel et al., 2007): ácidos grasos saturados (C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 y C18:0) e insaturados (C16:1, C17:0 cíclico, C18:1, C18:2 y C19:0 cíclico). Además de los ácidos grasos de *E. coli*, también se tuvo en cuenta los picos de DHA y EPA procedentes de la síntesis de a.g. ω -3 por el sistema Pfa.

Para los estudios de cuantificación de DHA, se hizo una recta patrón de un estándar comercial de DHA que relacionaba el área de los picos con la masa. Además, se utilizó metiltricosanoato como estándar interno.

3.9.2. Identificación de DHA mediante TLC

La detección de DHA mediante cromatografía en capa fina (TLC) se realizó con el objetivo de observar la utilización de sustratos marcados radiactivamente en la síntesis de ácidos grasos (adaptado de Metz et al., 2001 y Metz et al., 2009). Los cultivos se inocularon y se crecieron a 37 °C durante una hora para activar el crecimiento. Al llegar a una densidad óptica de 0,5, se bajó la temperatura en un baño con hielo y se indujeron con arabinosa. Se mantuvieron a 15 °C o 25 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica superior a 2, momento en el que se recogieron las células por centrifugación, se concentraron 10 veces en el buffer de actividad (buffer fosfato 100 mM a pH 7,5 suplementado con 2 mM EDTA y 2 mM DTT). Los cultivos concentrados se lisaron mediante sonicación en un equipo “Bioruptor™ NextGen” (Diagenode) usando un programa de 10 ciclos de 30 s a 4 °C. Se utilizó el lisado completo para el ensayo de actividad. Los sustratos para la síntesis de ácidos grasos se añadieron a 100 μ l de lisado justo al inicio de la reacción: malonil-CoA a 200 μ M, (14 C)-2-malonil-CoA a 7,7 μ M (0,04 μ Ci, 15 KBq), (14 C)-1-acetil-CoA a 1,4 μ M (0,04 μ Ci, 15 KBq), acetil-CoA a 40 μ M, y NADPH a 1 mM. Las muestras se incubaron 1h a 15 °C o 25 °C. Posteriormente, se extrajeron y derivaron a FAME mediante metanolisis ácida a 90 °C durante 1 h usando 400 μ l de metanol con 0,4% (v/v) de ácido clorhídrico. A continuación, los FAME de las muestras atemperadas se extrajeron dos veces con 500 μ l de hexano, y se concentraron por evaporación en una campana de gases a 50 °C.

Los ensayos por TLC se llevaron a cabo en placas de “polygram silicagel G” (Macherey-Nagel) como fase sólida, y hexano:dietil éter (87,5/12,5) como fase móvil. Las placas se desarrollaron 3 veces usando la misma fase móvil. Posteriormente se secaron y se visualizaron utilizando un equipo “Fluoro Image Analyzer FLA-510” (Fujifilm). La identificación del DHA se hizo por comparación de la distancia recorrida con el patrón comercial de éster metílico de DHA (Sigma-Aldrich).

3.9.3. Extracción de lípidos neutros y análisis por TLC.

La composición de los lípidos neutros se analizó por cromatografía en capa fina (TLC). Los lípidos del pellet y sobrenadante liofilizado procedentes de cultivos de 50ml se extrajeron con una mezcla de hexano e isopropanol en proporción 3:2 durante al menos 3 h. Posteriormente, las fases se separaron por centrifugación y se secaron en un sistema “Concentrator 5301” (Eppendorff). Los lípidos se resuspendieron en hexano y se cargaron en una placa “Polygram Silica Gel” (Macherey-Nagel). La fase móvil consistió en una mezcla hexano: dietil éter: ácido acético (80:20:1). La placa se desarrolló hasta que el frente alcanzó el borde superior de la placa. Los lípidos se visualizaron usando vapores de yodo. Se utilizaron patrones para identificar los distintos lípidos: ceras, ésteres metílicos de ácido graso (FAME), triacilgliceroles (TAG) y ácidos grasos libres (FFA).

3.10. Análisis bioinformáticos

3.10.1. Bases de datos

Se han utilizado distintas bases de datos para la obtención y comparación de las secuencias de los distintos genes descritos en este trabajo. Las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas están albergadas en la base de datos de genes y nucleótidos del “National Center for Biotechnology Information” o NCBI (National Institutes of Health, NIH). Las secuencias y estructuras de las proteínas utilizadas se encuentran depositadas en la base de datos “Protein Data Bank” o PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, RCSB).

3.10.2. Herramientas bioinformáticas para secuencias de ácidos nucleicos

Las secuencias se han visualizado y manipulado utilizando el programa informático “Vector NTI” (ThermoFisher Scientific). La herramienta Primer3 se ha utilizado como apoyo al diseño de oligonucleótidos descritos en las **Tablas 4 y 5**. Las temperaturas de anillamiento de cada oligonucleótido para PCR se calcularon mediante el software “Tm calculator” (ThermoFisher Scientific), y la conformación estructural secundaria de cada secuencia se comprobó mediante el software “Nucleic Acid Package: NUPACK” (Caltech).

Por último, en los análisis de los clones mediante enzimas de restricción descritos en la sección **3.5.6** se utilizó el software “NEBCutter 2.0” (New England Biolabs) para determinar las enzimas a utilizar y calcular los fragmentos obtenidos tras la digestión.

Para la búsqueda de secuencias de nucleótidos se ha utilizado la herramienta “BLASTn” (*National Center for Biotechnology Information, NCBI*).

3.10.3. Herramientas bioinformáticas para secuencias de proteínas

La búsqueda de secuencias proteicas homólogas se realizó utilizando la herramienta “BLASTp” (NCBI). El alineamiento de las secuencias obtenidas se realizó mediante la plataforma “tCOFFEE” (Di Tommaso et al., 2011; Centre for Genomic Regulation) con el algoritmo “Expresso” para alineamiento según motivos estructurales (Armougom et al., 2006). Las secuencias obtenidas se trataron con la herramienta “ESPrpt” (Robert y Gouet, 2014) para obtener una secuencia consenso.

En cuanto al tratamiento de las estructuras proteicas, se utilizó el servicio “Phyre” (Imperial College of London) para encontrar análogos estructurales de proteínas de interés. Como herramienta de manipulación y visualización de estructuras proteicas se utilizó el programa “Pymol”.

3.10.4. Reconstrucción de pLGR13 en secuenciación masiva.

La reconstrucción de las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva correspondientes al plásmido pLGR13 en la cepa *E.coli* MDS412 (sección 3.5.7) se llevó a cabo utilizando la herramienta PLACNET (Lanza et al., 2014; Vielva et al., 2017). Este programa utiliza el ensamblador Velvet para generar *contigs* a partir de los *reads* obtenidos en la “secuenciación pair-end” (Illumina). El programa, a través de “Bowtie” y “Prodigal”, consigue separar las secuencias correspondientes al plásmido pLGR13 de las del cromosoma de MDS42. Estas secuencias presentan un *coverage* más alto (> 1500) que el genoma (< 200), siendo *coverage* el número de veces que se ha secuenciado el mismo nucleótido. Los *contigs* identificados como plásmido se ensamblaron utilizando la herramienta “ContigExpress” del programa “Vector NTI” (Invitrogen) y se alinearon contra la secuencia del plásmido.

3.11. Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el paquete informático “SPSS Statistics” versión 22.0. (IBM Corporation). La comparación entre los promedios entre grupos respecto del control se realizó utilizando el test ANOVA de una vía con el análisis post-hoc de Dunnet. En la comparación de promedios de distintos grupos entre sí se utilizó el análisis post-hoc de Tukey. El valor de significación se estableció en 0,05.

4. RESULTADOS

Este trabajo de tesis doctoral se ha realizado en paralelo a un proyecto industrial en colaboración con “Biomar Microbial Technologies” para el desarrollo de cepas de *E. coli* óptimas para la producción a gran escala de ácidos grasos ω -3, en particular DHA. Los ensayos preliminares en nuestro laboratorio mostraron que *E. coli* BW27783 transformada con el plásmido pDHA4 era capaz de producir hasta un 7% de DHA respecto al total de ácidos grasos a 15 °C. Este porcentaje es ligeramente superior al descrito en otras cepas de *E. coli* transformadas con el mismo plásmido. Sin embargo, a 25 °C y temperaturas superiores no se consiguió detectar DHA en los cultivos. Debido a que esta temperatura de cultivo tan baja genera unos costes de enfriamiento inasumibles, y que la biomasa producida es notablemente inferior, se decidió mejorar el rendimiento de producción de DHA en *E. coli* mediante distintas estrategias.

4.3. Mejora de la síntesis de DHA en *E. coli*

4.3.1. Análisis de la expresión de los genes *pfa*

M. marina es una bacteria psicrófila que habita en ambientes marinos que oscilan entre los 10 °C y los 20 °C (Kautharapu et al., 2013). Los autores describieron que la temperatura óptima para la síntesis de DHA en esta bacteria es 15 °C, descendiendo el contenido en DHA a temperaturas superiores. Resultados similares se obtuvieron expresando los genes *pfaABCDE* de *M. marina* el plásmido pDHA4 en *E. coli* (Orikasa et al., 2009).

Orikasa et al. (2009) construyeron el plásmido pDHA4 introduciendo 22.471 pb del clúster *pfaABCD* de *M. marina* MP-1 (GenBank: AB025342.2) en el plásmido pET21a con el gen *pfaE*. Así, el plásmido pDHA4, secuenciado por Lázaro (2016), contiene el clúster *pfaABCD* tal y como se encuentra en *M. marina*, no habiéndose descrito los sistemas de regulación génica en este clúster. El gen *pfaE* de *M. marina* MP-1 (GenBank: AB262366.1) está en pDHA4 bajo el control de un promotor T7 en un vector tipo pET21a (GenBank: EF456737.1).

A la vista de estos datos, la hipótesis planteada para explicar la ausencia de DHA en *E. coli* a temperaturas superiores a 15 °C podría deberse a la presencia de algún mecanismo de termorregulación de la expresión del clúster *pfaABCD*.

Actualmente no existen evidencias de la regulación nativa de los genes *pfa* en *M. marina*, así como de la expresión de estos genes en *E. coli*. Allen y Barlett (2002) describieron el clúster *pfa* de una bacteria taxonómicamente cercana a *M. marina*, *Photobacterium profundum*. Los autores mostraron ensayos de *primer extension* que indicaban la existencia de un promotor aguas arriba de *pfaA*. Además, mediante ensayos de hibridación describieron la posible presencia de un promotor débil aguas arriba de *pfaC* y un promotor más fuerte precediendo a

Resultados

pfaD, sin embargo, no aportaron evidencias experimentales de su localización exacta. Siendo los clústeres de *P. profundum* y *M. marina* tan similares (**Figura 12A**), comparamos las secuencias de las zonas precedentes a *pfaA* de ambos organismos con el objetivo de determinar la presencia del promotor en *M. marina* (**Figura 12B**). Esta comparación permitió localizar las cajas -35 y -10 del promotor, así como la zona de inicio de la transcripción (+1), la secuencia de unión de ribosomas (RBS), y la metionina inicial de PfaA (ATG).

Posteriormente, dado que los autores no aportaron evidencias de la presencia de los promotores en *pfaC* y *pfaD*, se analizó *in silico* la secuencia de la región que precede a estos genes mediante el software de predicción de promotores BPROM (Softberry), con el objetivo de determinar si, efectivamente, podría haber de promotores nativos de *M. marina* en el plásmido pDHA4. El análisis se realizó usando un fragmento de 200 nucleótidos aguas arriba de cada uno de los genes *pfa*. El software detectó posibles promotores precediendo a *pfaC* y *pfaD*. Sorprendentemente, el software no detectó el promotor caracterizado en *P. profundum*, por lo que sería necesario comprobar experimentalmente la presencia de los promotores predichos.

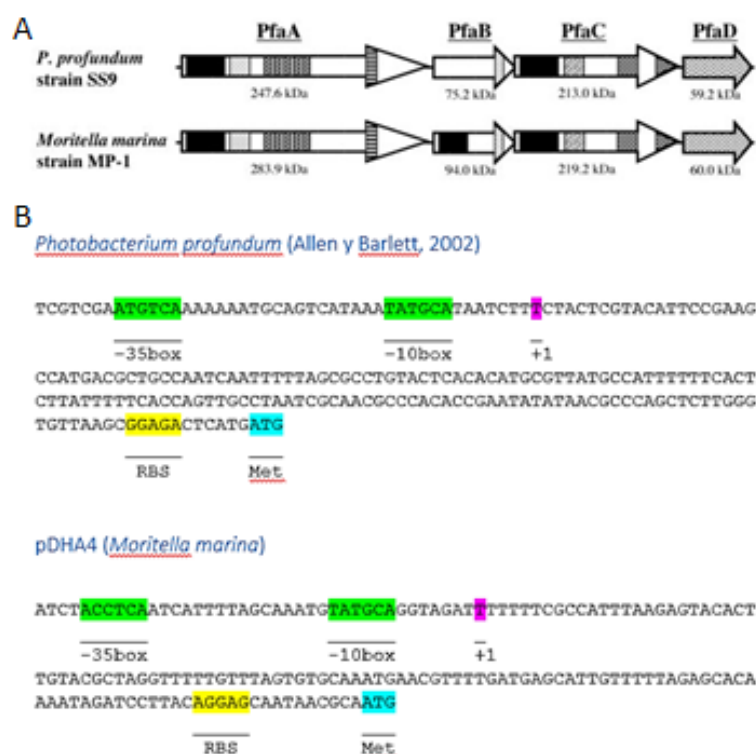


Figura 14. Comparación del clúster *pfa* de *Photobacterium profundum* y *M. marina*. A) Esquema comparativo de los genes *pfa* y los dominios enzimáticos entre *P. profundum* y *M. marina* (modificado de Allen y Barlett, 2002) B) Localización de los distintos componentes del promotor de *pfaA* en los genes de *M. marina* clonados en pDHA4. Se indica en verde las cajas de reconocimiento de la RNA polimerasa (-35 y -10), en fucsia el sitio de inicio de transcripción del gen, en amarillo el sitio de unión de los ribosomas, y en cian la metionina inicial de la proteína PfaA.

Por tanto, los datos indican que podría haber varios promotores nativos de *M. marina* en pDHA4, y que estos son los responsables de la expresión del complejo Pfa, por ende, de la síntesis de DHA. Por tanto, la reducción de la expresión mediada por estos promotores podría ser la responsable de que no se detecte DHA a temperaturas altas, dado el origen psicrófilo de *M. marina*, y por el posible papel de adaptación al frío de los LC-PUFA. Para comprobar esta hipótesis se decidió llevar a cabo un análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa acoplada a una reacción de transcripción reversa del ARN total (RT-qPCR) en el que se analizó el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes *pfa* clonados en el plásmido pDHA4.

Para ello, se utilizó el método de cuantificación relativa de ARN o $\Delta\Delta Ct$. Este método analiza la expresión génica respecto a dos parámetros de referencia: el gen de referencia y la condición de referencia. El gen de referencia es un gen cuya expresión es estable bajo distintas condiciones testadas, de tal manera que se elimina el efecto de otras fluctuaciones no relacionadas con las variables en estudio. La condición de referencia es aquella frente a la que se comparan el resto de condiciones analizadas.

En el presente estudio, se estableció el gen de referencia *cysG* (uroporfirin III C-metiltransferasa) en base a un estudio previo (Zhou et al., 2011), por su estabilidad en la expresión génica bajo las distintas temperaturas de cultivo testadas, mientras que la condición de referencia utilizada fue 37 °C.

El estudio consistió en determinar la expresión génica de los genes diana *pfaA*, *pfaC* y *pfaD* bajo distintas temperaturas de cultivo: 15 °C, 20 °C y 25 °C. Los resultados de expresión génica de los distintos genes *pfa* estudiados se calcularon a partir el ciclo de *threshold* (Ct ; número de ciclo en el que la fluorescencia acumulada sobrepasa la fluorescencia basal) de cada muestra mediante las siguientes fórmulas, siendo *rrsA* el gen de referencia, *pfaACDE* los genes diana, 37 °C la temperatura de referencia, 15 °C, 20 °C y 25 °C las temperaturas de ensayo:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{pfaACD} - Ct_{rrsA})_{temp\ ensayo} - (Ct_{pfaACD} - Ct_{rrsA})_{37^{\circ}C}$$

$$Cuantificación\ relativa = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En la **Figura 15A**, se recogen los valores de cuantificación relativa de los distintos genes *pfa* a 15 °C, 20 °C y 25 °C respecto a la temperatura de referencia (37 °C). Se puede observar que la expresión de los genes *pfaA*, *pfaC* y *pfaD* a 15 °C fue mayor que la expresión a 20 °C y 25 °C; curiosamente, la expresión a 20 °C fue aproximadamente 2 veces mayor que a 25 °C. Sin embargo, la expresión de *pfaE*, que está controlada por un promotor T7 no inducido, no presentó un descenso de la expresión a temperaturas más bajas. Estos datos coinciden con el

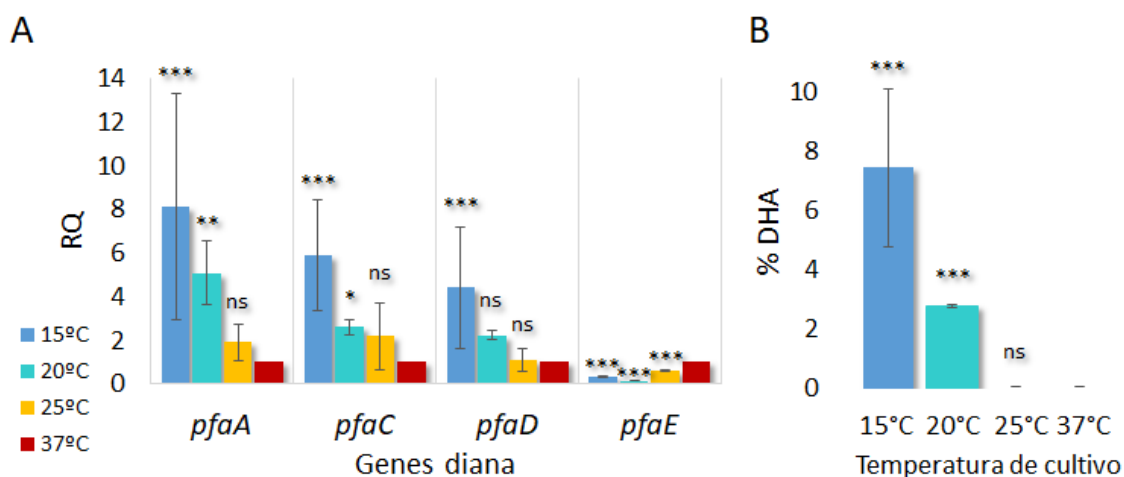


Figura 15. Estudio de expresión de los genes *pfaABCDE* en el plásmido pDHA4. **A)** Cuantificación relativa (Ecuación 1) de la expresión de los genes *pfaA*, *pfaC*, *pfaD*, y *pfaE* a 15°C, 20°C y 25°C usando *rrsA* como gen de referencia y 37°C como temperatura de referencia. Se representa el promedio y desviación estándar de 3 repeticiones. **B)** Producción de DHA en la cepa BW 27783 transformada con el plásmido pDHA4. El análisis por cromatografía de gases se realizó al final de la fase exponencial de los cultivos. Se representa el promedio y la desviación estándar. Se indica el grado de significación (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; no significativo - ns $p > 0,05$).

patrón de producción de DHA a las distintas temperaturas (**Figura 13B**); sin embargo, cabe destacar que a pesar de no observarse DHA a 25 °C y 37 °C, sí hay expresión de los genes *pfa*.

Estos datos de expresión génica y del contenido de DHA podrían indicar que existe un mecanismo de regulación de la expresión génica que promueve la expresión de los genes responsables de la síntesis de DHA. Por ello, se decidió construir un plásmido que contuviera los cinco genes *pfa* precedidos de un promotor inducible por arabinosa, el cual permite controlar la expresión génica independientemente de la temperatura ambiental del cultivo. Este sistema de expresión se introduce en la cepa *E. coli* BW22783, que contiene una serie de modificaciones, como la delección de los genes de degradación de arabinosa o la inserción de un transportador de arabinosa de baja eficiencia, que garantizan el óptimo funcionamiento del sistema de regulación (Guzman et al., 1995),

En este proceso se utilizó la técnica de ensamblaje isoterma (Gibson et al., 2009), previamente descrita (**sección 3.5.9.2**), debido al gran tamaño de los fragmentos a ensamblar. En primer lugar, se construyeron, tres plásmidos que contenían un promotor pBAD seguido de *pfaAB* (pLGR3), *pfaC* (pLGR4) y *pfaDE* (pLGR5) como se describe en la **Figura 16**; posteriormente se comprobó mediante secuenciación Sanger con los oligonucleótidos pBADseq y pBAD2 (Tabla 5) que la inserción fuese correcta.

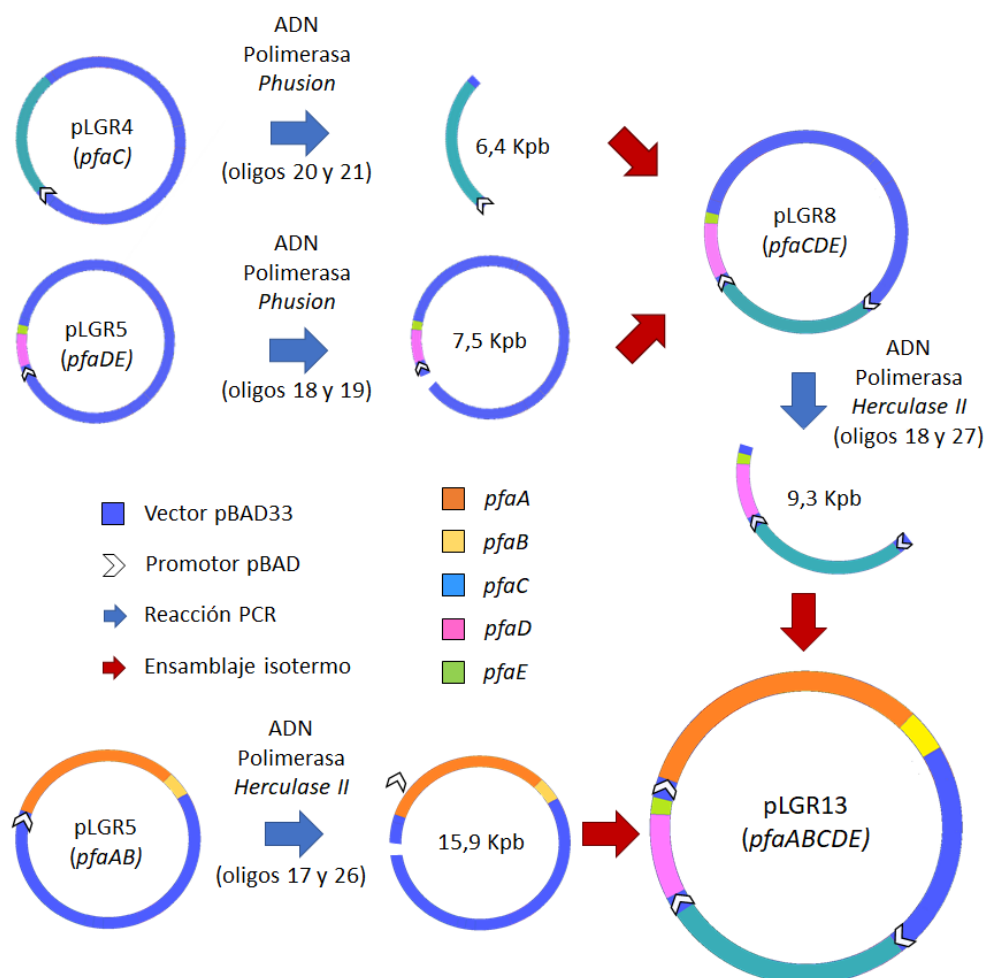


Figura 16. Construcción del plásmido pLGR13 mediante ensamblaje isotermo a partir de los plásmidos pLGR3, pLGR4 y pLGR5 utilizando los oligonucleótidos recogidos en la Tabla 4.

A continuación, se procedió a insertar los cinco genes en un solo plásmido como se muestra en la **Figura 16**. En primer lugar, se amplificó por PCR un fragmento del plásmido pLGR4 compuesto por el promotor pBAD y *pfaC*, y se abrió por PCR el plásmido pLGR5 por la zona del promotor pBAD. Ambos fragmentos se ensamblaron usando las zonas homologas en los extremos generadas durante la amplificación por PCR, de forma que el fragmento que contenía pBAD y *pfaC* quedó colocado delante de los genes *pfaDE*. El plásmido resultante, llamado pLGR8, se comprobó que las zonas de solapamiento estuviesen correctamente ensambladas por secuenciación Sanger usando el oligonucleótido MMclon_SEQext (**Tabla 5**) antes de iniciar el siguiente paso de clonación.

El último paso consistió en abrir mediante PCR el plásmido pLGR8 por la zona precedente al promotor pBAD y *pfaAB*, y se amplificó un fragmento del plásmido pLGR8 que contenía *pfaC* y *pfaDE* con sus respectivos promotores. En este caso se utilizó la polimerasa *Herculanse II*, debido al gran tamaño de los fragmentos amplificados. Estos fragmentos se ensamblaron de forma que

Resultados

el fragmento que contenía los genes *pfaCDE* se insertó aguas arriba de los genes *pfaAB*. El plásmido final se nombró pLGR13, y contenía los cinco genes *pfa* con tres promotores pBAD precediendo los genes *pfaA*, *pfaC* y *pfaD*. En este caso, el plásmido se comprobó inicialmente secuenciando las zonas de solapamiento por secuenciación Sanger, y se comprobó la correcta colocación de los genes mediante un análisis de digestión con enzimas de restricción: HindIII (4 fragmentos), EcoRV (8 fragmentos), BamHI (4 fragmentos), y MscI (7 fragmentos). Se obtuvieron tres clones cuya secuenciación y patrón de digestión fueron correctos (**Figura suplementaria 1**).

El ADN total de la cepa de *E. coli* MDS42 transformada con cada uno de estos clones se secuenció mediante secuenciación masiva, tal como se describe en materiales y métodos. Con el objetivo de diferenciar el ADN genómico del plasmídico, se ensamblaron los *reads* y se analizaron con la herramienta PLACNET (Lanza et al., 2014), como se describe en materiales y métodos. En este análisis, se obtuvieron varios cientos de *contigs*, aunque tan sólo se seleccionaron aquellos con un *coverage* superior a 1500 que deberían corresponder al ADN plasmídico, ya que el *coverage* de los *contigs* correspondientes al genoma era entre 10 y 200. De esta forma, se obtuvieron entre 10 y 15 *contigs* para uno de los tres clones, los cuales se alinearon contra la secuencia teórica de pLGR13 en *ContigExpress* (Invitrogen Corporation). Se comprobó que no se habían introducido mutaciones en las regiones codificantes durante las distintas etapas del proceso de ensamblaje isoterma. La secuencia completa del plásmido construido se encuentra en el fichero adjunto (pLGR13.gb).

El análisis de expresión de los genes *pfaA*, *pfaC* y *pfaD* en pLGR13 se realizó mediante RT-qPCR, de igual manera que en el plásmido pLGR13. En este caso, se analizaron cultivos de BW-pLGR13 inducidos con arabinosa y BW-pDHA4, incubados a 15 °C y 25 °C. Los resultados (**Figura 17A**) indican que la expresión de los cuatro genes ha incrementado debido a la sustitución de los promotores (RQ de pLGR13 vs pDHA4). Adicionalmente, se ha revertido el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes, ya que en BW-pLGR13 la expresión es menor a 15 °C que a 25 °C; esta relación es justo la contraria a la descrita para pDHA4, en que la temperatura a la que se detectó la máxima expresión fue a 15 °C (**Figura 15**).

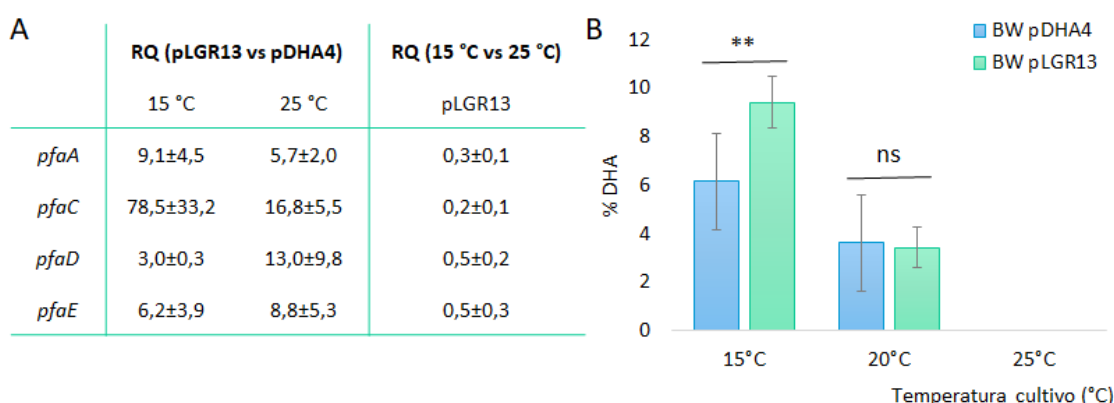


Figura 17. Caracterización de la expresión génica y la producción de DHA en BW 27783 – pLGR13. A) Expresión relativa de los genes *pfaACDE* en pLGR13. Se indica el promedio y desviación estándar del valor RQ (ecuación 1) de la expresión de pLGR13 respecto a pDHA4, y de pLGR13 a 15 °C respecto a 25 °C. B) Producción de DHA a 15 °C, 20 °C, y 25 °C de BW-pDHA4 y BW-pLGR13.

Respecto a la producción de DHA (**Figura 17B**), a 15 °C la cepa BW 27783 transformada con el plásmido pLGR13 presentó un 9,4% de DHA cuando la expresión se inducía con arabinosa, un nivel de producción superior al de la cepa transformada con pDHA4 (6%). Sin embargo, al cultivar esta cepa en presencia de glucosa (inhibidor de la expresión del sistema pBAD33) o en ausencia de inductor, la producción de DHA fue del 0% y un 2,4% respectivamente. Estos datos indican que el sistema pBAD33 funciona correctamente. En el análisis de ácidos grasos de los mismos cultivos incubados a 20 °C el contenido de DHA se encontraba entorno al 3,5% en ambas cepas; a 25 °C no se detectó DHA, al igual que ocurría con el plásmido pDHA4.

Con los datos obtenidos, podemos deducir que, la expresión de los genes *pfa* clonados en el plásmido pDHA4 estaba determinada por la temperatura de incubación, efecto que se ha subsanado reemplazando los promotores nativos de *M. marina* por el promotor pBAD. Este reemplazo ha incrementado la expresión tanto a 15 °C como a 25 °C, siendo esta mayor que en el plásmido pDHA4. Este incremento de la expresión ha provocado un incremento de la síntesis de DHA a 15 °C. Sin embargo, la mejora en el sistema de expresión a 25 °C no se ha trasladado a la producción de DHA, ya que a 25 °C no aparece DHA en los perfiles cromatográficos.

4.3.2. Estudio de expresión de proteínas Pfa

La expresión heteróloga de genes en cualquier hospedador suele presentar una gran variedad de dificultades. Uno de los principales problemas que aparecen es la diferencia en la frecuencia de uso de los codones de cada aminoácido del organismo donador (en este caso, *M. marina*) y el organismo hospedador (*E. coli*). Con el objetivo de determinar si el uso de codones podía afectar a la expresión heteróloga de los genes de *M. marina*, se hizo una comparación de

Resultados

las frecuencias de uso de codones de los cinco genes *pfaABCDE* que contiene el plásmido pDHA4. En este caso, se ha analizado solamente el clúster *pfa*, puesto que se ha descrito previamente que este tipo de clúster se ha transferido horizontalmente (Shulze y Allen, 2011), y por ello, el genoma completo de *M. marina* podría no ser representativo del clúster *pfa*. Como se observa en la **Figura 18**, la gran mayoría de los codones tienen una frecuencia similar en ambos organismos. Sin embargo, existen algunos codones que podrían dar lugar a problemas durante la traducción de algunos aminoácidos: cisteína (Cys), prolina (Pro), o glutamina (Gln). A pesar de existir diferencias en el uso de codones entre ambos organismos, estos aminoácidos no son tan frecuentes en las proteínas Pfa como para suponer un problema de traducción (Cys 1,1%, Pro 4,3%, Gln 5,2%). Además, un análisis del uso de codones realizado con la herramienta *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 reveló que las proteínas Pfa tenían un bajo contenido en codones no óptimos para su expresión en *E. coli*: 14% en PfaA, 15% en PfaB, 13% en PfaC, 14% en PfaD y 21% en PfaE. Estos datos indican que, a pesar, de tener un uso de codones ligeramente diferente, la expresión de las proteínas Pfa no debería ser un problema. Esa gran semejanza en el uso de codones podría deberse a que son dos especies cercanas taxonómicamente, dado que ambas son γ -proteobacterias.

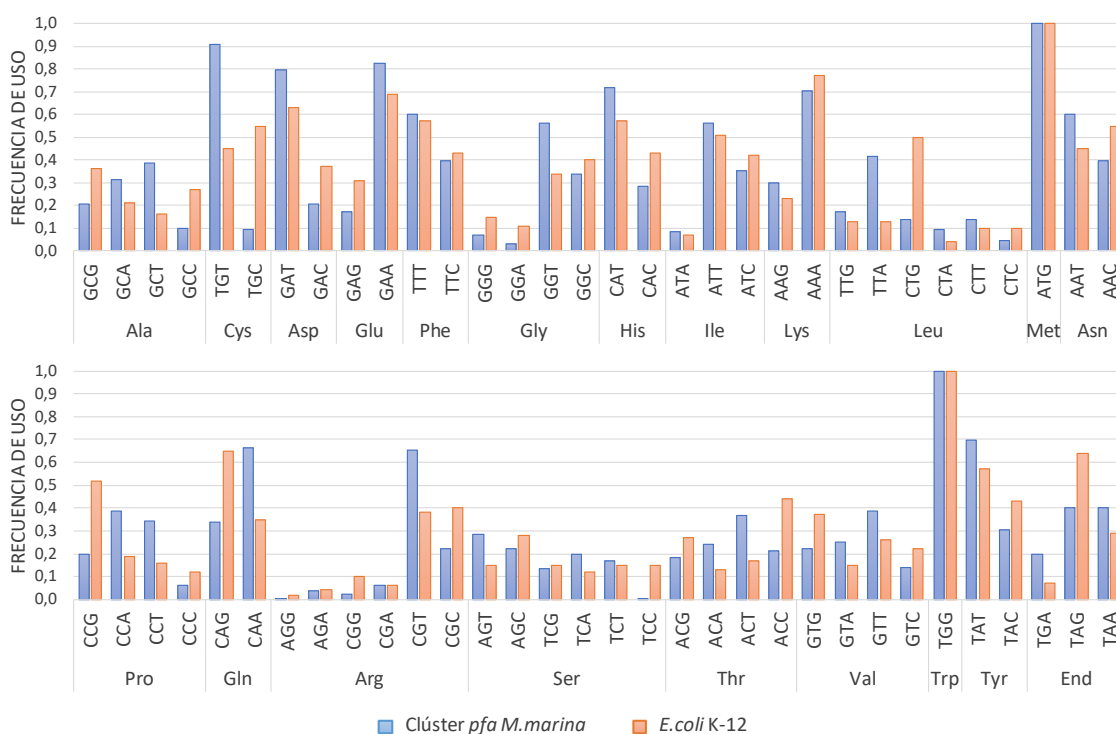


Figura 18. Comparativa del uso de codones entre *Moritella marina* y *Escherichia coli*. Abreviaturas: Ala - alanina, Cys - cisteína, Asp - ácido aspártico, Glu - ácido glutámico, Phe - fenilalanina, Gly - glicina, His - histidina, Ile - isoleucina, Lys - lisina, Leu - leucina, Met - metionina, Asn - asparragina, Pro - prolina, Gln - glutamina, Arg - arginina, Ser - serina, Thr - treonina, Val - valina, Trp - triptófano, Tyr - tirosina, End - parada.

A continuación, se analizó la presencia/ausencia de las cinco proteínas Pfa de muestras de cultivo mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Inicialmente, se analizó la expresión de la proteína PfaE, aprovechando que este gen está controlado por un promotor T7 en el plásmido pDHA4. Se transformó en la cepa de *E. coli* C41, que contiene el sistema de la ARN polimerasa del fago T7 en su cromosoma, y se expresó a 15 °C. Como se observa en la **Figura 19A**, en la inducción con IPTG se observa una banda de proteína justo por debajo de 35 KDa, tamaño correspondiente a PfaE (33 KDa). Sin embargo, en la cepa control (C41) y en la cepa no inducida, esta banda no aparece. El contenido de DHA en la cepa C41 con el plásmido pDHA fue del 1%, tanto con inducción de *pfaE* como sin inducción. Este resultado podría indicar que la expresión basal de *pfaE* genera suficiente actividad PPTasa para activar eficientemente los grupos ACP de PfaA, y mantener así la producción de DHA. Por tanto, la expresión de *pfaE* es correcta a 15 °C, y por ello no es un cuello de botella en el proceso.

Posteriormente, se expresaron las proteínas codificadas en el plásmido pDHA4 en la cepa *E. coli* BW27783, cuya capacidad de producción de DHA a 15 °C es superior a la cepa C41 (7,5% vs 1%). Sin embargo, en el análisis de proteínas de esta cepa incubada tanto a 15 °C como a 25 °C no se consiguió observar ninguna de las cinco proteínas Pfa en el gel (no mostrado). Puesto que los datos de RT-qPCR indicaban que, en efecto, había una expresión basal de los genes, se utilizaron los plásmidos pLGR3 (*pfaAB*), pLGR4 (*pfaC*), y pLGR5 (*pfaDE*) con el objetivo de incrementar la expresión de las proteínas para facilitar su identificación. Estos plásmidos contienen un promotor pBAD inducible por arabinosa delante de los genes, que permite

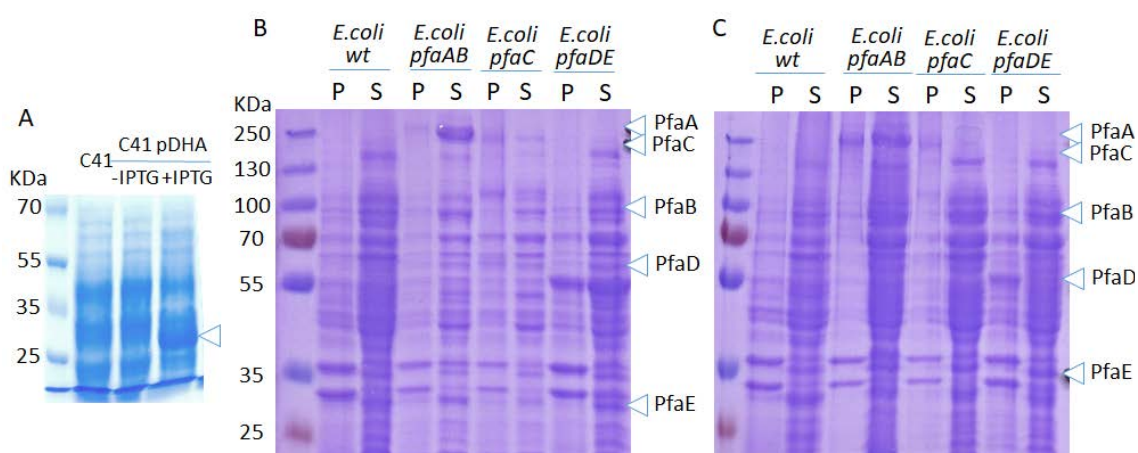


Figura 19. Sobreexpresión proteínas Pfa. **A)** Expresión del plásmido pDHA4 en la cepa *E. coli* C41 a 25°C utilizando IPTG como inductor del promotor T7 de *pfaE*. Se indica con una flecha PfaE. **B-C)** Sobreexpresión de los genes *pfa* a 15°C (B) y 25°C (C). Se muestra por separado el pellet (P) y sobrenadante (S) obtenido tras la sonicación y ultracentrifugación de los cultivos. Se ha utilizado *E. coli* BW 27783 como control, y *E. coli* BW 27783 transformada con pLGR3 (*pfaAB*), pLGR4 (*pfaC*), y pLGR5 (*pfaDE*). Las flechas indican la localización de las bandas correspondientes a las proteínas PfaA (283 KDa), PfaB (94 KDa), PfaC (219 KDa), PfaD (58 KDa) y PfaE (33 KDa).

sobreexpresar eficientemente las proteínas. En este caso, se analizó por SDS-PAGE el patrón de proteínas de cultivos incubados a 15 °C (**Figura 19B**) y 25 °C (**Figura 19C**). Se observan las proteínas localizadas en el sobrenadante (SN), proteínas solubles, y en el pellet (P), proteínas asociadas a membrana o en forma de cuerpos de inclusión, obtenidos tras la centrifugación de cultivos lisados. En los cultivos a 15 °C, se observa la expresión de PfaA y PfaD. Algo más dudosa es la expresión de PfaB, PfaC y PfaE. Las cinco proteínas aparecen principalmente en el sobrenadante de la sonicación en las muestras sobreexpresadas a 15 °C, lo que podría indicar que las proteínas son solubles y están correctamente plegadas. Sin embargo, a 25 °C las proteínas aparecen también en el pellet.

En el caso de la proteína PfaA, se confirmó su identidad por espectrometría de masas MALDI-TOF (sección 3.6.6). Los péptidos obtenidos correspondieron inequívocamente a la proteína PfaA de *M. marina* MP-1 en la base de datos. Esta proteína, es la más grande del sistema Pfa y contiene los dominios básicos para la iniciación de la síntesis de un ácido graso.

4.3.3. El caso particular de PfaA: Purificación

La proteína PfaA es un polipéptido de 2652 aminoácidos, con un peso molecular de 283,8 KDa. Esta proteína contiene varios dominios funcionales claves en la iniciación de la síntesis de DHA (**sección 1.2.4**): el dominio KS-AT que cataliza la transferencia y condensación de residuos de malonil, cinco dominios ACP encargados de sostener el ácido graso creciente, el dominio KR encargado de reducir el grupo cetónico a hidroxilo de la cadena creciente, y un dominio DH cataliza la reducción del grupo hidroxilo y libera una molécula de agua, manteniendo un doble enlace en la cadena (Santín, 2017). Estos dominios conforman la unidad básica de iniciación en la síntesis de una molécula de DHA, y por ello hacen de esta proteína un buen punto de partida para su caracterización. La purificación de esta proteína permitiría realizar ensayos de actividad para determinar el rango de temperatura a la que el sistema Pfa es activo.

A la hora de purificar PfaA se probaron diversas estrategias de expresión y purificación. En primer lugar, se sobreexpresó en BW 27783 a 15 °C el plásmido pLGR3 (genes *pfaA* y *pfaB* controlados por un promotor pBAD) inducido con arabinosa 0'1% junto con el plásmido pLGR2 (gen *pfaE* controlado por un promotor T7) con expresión basal, debido a que la cepa BW 27783 no contiene el sistema de expresión de la RNA polimerasa T7. El objetivo de la coexpresión de la proteína PfaE es obtener la forma activa de PfaA, cuyos dominios ACP se modifiquen postradruccionalmente mediante la adición de un residuo PPT, y poder así realizar ensayos de actividad posteriores a la purificación de la proteína. En todos los casos, los pellets de cultivos de *E. coli* BW27783 transformada con el plásmido pLGR3 y pLGR2 se recogieron y congelaron a

-80 °C. Posteriormente, se descongelaron a 37 °C para facilitar la ruptura de las células y se resuspendieron en buffer de lisis compuesto buffer fosfato 100mM a pH 7,5 suplementado con EDTA 2mM, DTT 2mM y el inhibidor de proteasas PMSF. La muestra se lisó por sonicación y se ultracentrifugó para separar los residuos celulares de la fracción acuosa que contenía las proteínas solubles, fracción utilizada para la purificación de PfaA que ya habíamos visto previamente que estaba en dicha fase (**Figura 19B**).

En primer lugar, se probó la precipitación con sulfato amónico como método preliminar de purificación (**Figura 20A**). Esta técnica permite eliminar parte de las proteínas nativas de *E. coli* de la muestra. Con el objetivo de encontrar un rango de precipitación específico de PfaA, el

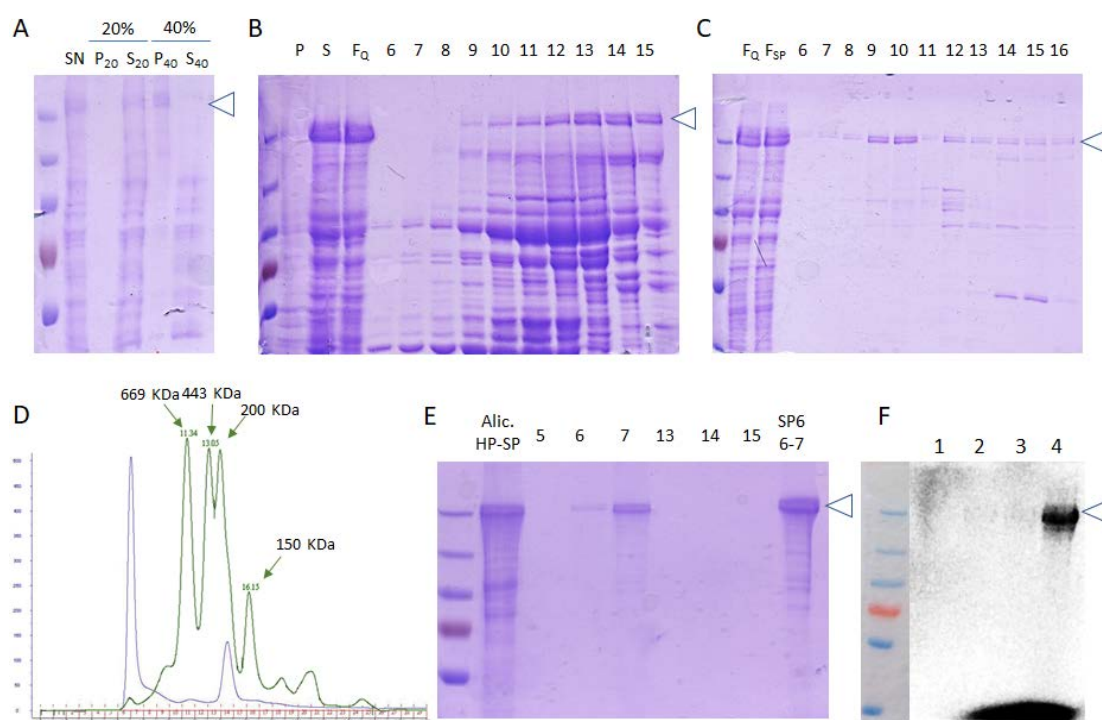


Figura 20. Purificación de la proteína PfaA activada (flecha blanca) a partir de un cultivo BW 27783 con el plásmido pLGR3 sobreexpresado a 15 °C. **A)** Precipitación del sobrenadante de sonicación mediante sulfato amonio (20% y 40% de saturación). Se muestran los sobrenadantes (S) y precipitados (P) de los dos pasos de precipitación. **B)** Purificación mediante columna de intercambio aniónico HP-Q del sobrenadante de sonicación (S). Se muestra el *flowthrough* (FQ) y las fracciones eluidas mediante el gradiente de NaCl (6-15). **C)** Purificación mediante columna de intercambio catiónico HP-SP del *flowthrough* de la columna HP-Q (FQ). Se muestra el *flowthrough* de HP-SP (FSP) y las fracciones de elución (6-16). **D-E)** Purificación mediante columna de exclusión molecular Superosa 6 de las alícuotas 6-11 concentradas (Alic. HP-SP) de la columna HP-SP. Se observa los cromatogramas (D) superpuestos de la muestra (azul) y de los patrones de peso molecular (verde; tiroglobulina – 669KDa, apoferritina – 443 KDa, β -amilasa – 200 KDa, alcohol deshidrogenasa – 150 KDa). En el gel se observan la muestra de partida (Alic. HP-SP), las fracciones correspondientes a los picos del cromatograma (5–7, 13-15), y el resultado de la concentración de las muestras 6 y 7 (SP6 6-7). **F)** Análisis de la unión de sustratos radiactivos a la muestra SP6 6-7. El buffer de reacción contiene buffer fosfato 100mM pH 7,2 suplementado con EDTA 1mM y DTT 1mM. Las muestras se han incubado 30 min a 25 °C. Se ha añadido 1-¹⁴C-Acetil-CoA 16 μ M (calle 1), 2-¹⁴C-Malonil-CoA 100 μ M (calle 2), 1-¹⁴C-Acetil-CoA 16 μ M + Malonil-CoA 100 μ M (calle 3), y 1-¹⁴C-Acetil-CoA 16 μ M + Malonil-CoA 100 μ M + NADPH 5mM (calle 4).

Resultados

ensayo se realizó en cuatro pasos de precipitación: 20%, 40%, 60% y 80% de saturación final de sulfato de amonio. La proteína PfaA precipitó con un 40% de saturación junto con algunas proteínas más, mientras que la mayoría de las proteínas de *E. coli* precipitaron por encima de ese valor de saturación.

Posteriormente, se utilizaron columnas de intercambio iónico, puesto que el punto isoeléctrico teórico calculado mediante el software ProtParam (Gasteiger et al., 2005) es de 4,76. Se utilizó un buffer fosfato 100mM a pH 7,5 suplementado con EDTA 2mM y DTT 2mM para cargar una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP (GE Healthcare), y se eluyó utilizando un gradiente de NaCl hasta 1M de concentración final en el mismo buffer. Como se observa en la Figura 20B, la proteína se unió parcialmente a la columna aunque también se observa mucha cantidad en el descarte o *flowthrough*, lo que indica que sólo una parte de la proteína se estaría uniendo mediante interacciones iónicas. Pese a la inespecificidad del proceso, se consiguió eliminar gran parte de las proteínas contaminantes, por lo que, se intentó repetir este proceso en una columna de intercambio catiónico (**Figura 20C**) utilizando el *flowthrough* de la columna de intercambio aniónico como muestra de partida. En este caso, la unión de la proteína PfaA a la resina fue ligeramente mejor, aunque contenía muchas bandas inespecíficas. El hecho de que se una a ambas columnas podría indicar que en la superficie de la proteína existen zonas tanto con carga positiva como carga negativa, motivo por el que tan sólo una parte de las moléculas PfaA se unen a cada una de las columnas. Se intentó cambiar el pH del buffer a 6,5 y 8, sin embargo, no se observó una mejora en la especificidad en la unión de PfaA (geles no mostrados).

Las alícuotas que contenían PfaA obtenidas por intercambio catiónico se concentraron mediante filtración por centrifugación, con el objetivo de concentrar la muestra y cambiar el tampón por uno compuesto por Tris 20 mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM y DTT 1mM a pH 7,5. Aprovechando el gran tamaño de la proteína, se cargó la muestra concentrada en una columna de exclusión molecular Superosa 6 (GE Healthcare). El cromatograma y gel SDS-PAGE (**Figura 20C-D**) muestran que PfaA se encuentra en el pico de absorbancia observado entre las fracciones 6 y 7, las cuales se corresponden con el volumen vacío de la columna. Esto indicaría que PfaA forma agregados de proteínas cuyo peso molecular es mayor de 600 KDa. A pesar de haber obtenido proteína purificada, el rendimiento del proceso general fue bastante bajo ya que de 500ml de cultivo iniciales, se obtuvieron 1,25 mg totales de proteína.

Con el objetivo de mejorar el proceso de purificación, se clonó el gen *pfaA* en un vector pBAD33 con una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína. El plásmido llamado pLGR9, se sobreexpresó en *E. coli* BW27783 a 15 °C y se sonicó en un buffer Tris 100mM suplementado con NaCl 300mM a pH 7,5. Se utilizó una concentración de imidazol inicial de

20mM para reducir las interacciones inespecíficas de otras proteínas sin colas de afinidad. Inicialmente, se realizó un ensayo en *batch* para comprobar la capacidad de unión de la cola de histidinas al níquel. En la **Figura 21A**, se observa que la proteína PfaA se une ligeramente a la resina (fracción del eluido, E), sin embargo, la mayor parte de la proteína queda en el *flowthrough* (F).

A continuación, se repitió el proceso utilizando una columna HisTrap HP (GE Healthcare) con un gradiente de imidazol desde 20 mM hasta una concentración final de 500 mM. La unión a la resina de níquel de nuevo resultó débil, ya que aparece PfaA tanto en el *flowthrough* como en las fracciones eluidas (7-11). Esto podría significar que la cola de histidinas en C-terminal no está accesible. Por ello, se construyó el plásmido pLGR10, en el que se colocó la cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. La purificación de esta proteína PfaA mediante columnas

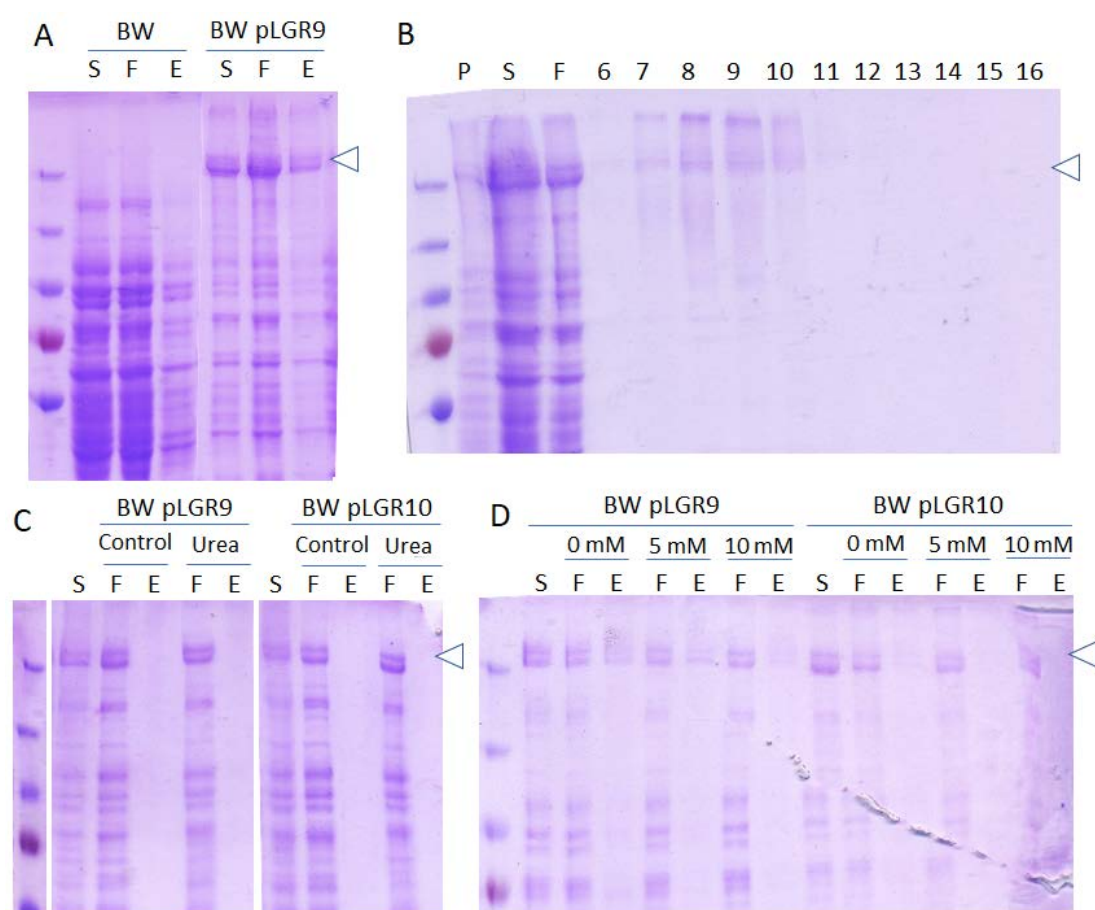


Figura 21. Purificación de la proteína PfaA con cola de histidinas (PfaA-HT) mediante unión a resina de níquel. **A)** Ensayo de unión del Pfa-HT a la resina de níquel en *batch* usando sobrenadante de sonicación de *E. coli* BW 27783 (control) y BW 27783 - pLGR9; **B)** Purificación mediante columna HP-HisTrap de PfaA-HT expresada desde el plásmido pLGR9; **C)** Ensayo de unión de PfaA a resina de níquel en *batch* con la cola de histidinas en el extremo C-terminal (pLGR9) y N-terminal (pLGR10) en condiciones nativas y desnaturalizantes. **D)** Ensayo de unión de PfaA en la resina de níquel en *batch* utilizando distintas concentraciones de imidazol (0, 5 y 10 mM) en el buffer inicial (buffer A). Abreviaturas: P – pellet, S – sobrenadante, F – *flowthrough*, E – fracción eluida. La flecha indica la altura a la que aparece PfaA.

Resultados

de HisTrap HP tampoco tuvo un gran rendimiento, y presentó muchas uniones inespecíficas (gel no mostrado).

Para comprobar que la cola de His no estaba accesible, se testó en *batch* la unión de PfaA a la resina de níquel en condiciones desnaturalizantes añadiendo al buffer inicial urea 3N como compuesto desnaturalizante. Como se observa en la **Figura 21C**, la proteína PfaA, indiferentemente de la posición de la cola de histidinas, se localiza en el *flowthrough*; es más, apenas se observa proteína en el eluido en la condición control. Esto hace que nos planteemos si existe un problema de especificidad, en otras palabras, si la cola de histidinas se une suficientemente fuerte al níquel utilizando un *buffer* inicial con 20mM de imidazol. Por ello, se testó en *batch* la unión de la cola de histidinas usando distintas concentraciones iniciales de imidazol (0 mM, 5 mM y 10 mM). La proteína presentó una mejor unión a la resina de níquel a baja concentración de imidazol (**Figura 21D**), aunque la mayor parte permaneció en el *flowthrough*. Además, la unión inespecífica de otras proteínas también incrementó.

Cabe destacar la aparición de una banda de mayor tamaño que PfaA y que co-purifica con esta. Se ha observado que esta banda sólo aparece en ausencia de DTT en el *buffer* (**Figura 21**), pero no cuando este está presente (**Figura 20**). El tamaño y la co-purificación de esta banda, sugiere que pueda ser un agregado de PfaA, dado que el DTT es un compuesto reductor que se añade a los búferes para evitar que se produzcan interacciones entre las proteínas, y, por tanto, para evitar que se formen agregados. En el caso del buffer utilizado con la columna de níquel, este compuesto no se añade para evitar que reduzca los iones metálicos. Además, se ha observado que algunas purificaciones en las que se utiliza DTT, aparece esta banda superior si el *buffer* no se ha preparado al momento (no mostrado), indicando que el DTT es un compuesto con una rápida degradación. Este dato podría indicar que los agregados observados en la purificación mediante exclusión molecular podrían evitarse incrementando la concentración del DTT presente en el *buffer*.

Por tanto, las distintas aproximaciones de purificación de PfaA indicaron que el protocolo más adecuado sería una precipitación inicial con sulfato de amonio al 40%, seguida de cromatografía de intercambio catiónico HP-SP, y posteriormente, cromatografía de exclusión molecular con la columna Superosa6.

Con el objetivo de comprobar la viabilidad de la proteína obtenida, se inició una prueba de medición de la actividad cetoreductasa del dominio KR de PfaA (**Figura suplementaria 2**). En este ensayo se midió la desaparición del cofactor NADPH mediante espectrofotometría en presencia de los sustratos de la PfaA, malonil-CoA y acetil-CoA, a distintas temperaturas. El resultado parece sugerir la presencia de actividad KR a 18 °C, disminuyendo la actividad a

temperaturas superiores. Sin duda, este ensayo supone tan solo una prueba de concepto, por lo que es necesario, una vez optimizada la purificación de PfaA, hacer ensayos para determinar las concentraciones de proteína, sustratos y demás parámetros.

4.3.4. Análisis de la actividad del complejo Pfa

Con el objetivo de determinar el grado de actividad *in vitro* de las proteínas Pfa a distintas temperaturas, se puso a punto un ensayo de detección de ácidos grasos marcados radiactivamente por incorporación de sustratos marcados ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -malonil-CoA y $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetil-CoA). Mediante cromatografía en capa fina (TLC) se pueden separar los ácidos grasos metilesterificados (FAME) en función del tamaño molecular (Metz et al., 2001; Metz et al., 2009).

En este ensayo, se analizó el impacto de la temperatura sobre la actividad del complejo Pfa. Se testó tanto la temperatura de crecimiento del cultivo, como la temperatura de incubación del ensayo enzimático. Se utilizaron tres cepas: *E. coli* BW27783 como control negativo de la síntesis de DHA, y *E. coli* BW27783 transformada con pDHA4 y pLGR13, con el objetivo de comparar la diferencia en la expresión de proteínas Pfa en ambos sistemas. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo como se indica en el apartado de material y métodos.

Lo resultados del ensayo se recogen en **Figura 22**, en la que se muestra la señal radioactiva obtenida tras la separación de los FAME por TLC; las manchas superiores corresponden a ácidos grasos de cadena corta y media (comigración con ácido oleico metilesterificado), mientras que el DHA migra por debajo (comigración con un patrón comercial de DHA metilesterificado, flecha blanca).

En los cultivos incubados a 15 °C durante la expresión de las proteínas Pfa (Figura 20, superior), las cepas portadoras de pDHA4 y pLGR13 presentan dos manchas, los ácidos grasos de cadena corta-media y el DHA. Sin embargo, el control negativo (BW sin transformar) tan sólo presenta una mancha correspondiente a los ácidos grasos de cadena corta-media. Las manchas de DHA tanto de BW-pDHA4 como BW-pLGR13 son más intensas cuando la reacción de síntesis de DHA se lleva a cabo a 15 °C, mientras que a 25 °C son mucho más leves. Además, se observa que la cepa BW-pLGR13 presenta una mancha de mayor intensidad comparada con BW-pDHA4, lo que indica una mayor síntesis de DHA. Curiosamente, se observa en los cultivos a 15 °C y ensayados a 15 °C (imagen superior izquierda) que las manchas de ácidos grasos de cadena corta-media disminuyen conforme incrementa el tamaño de la mancha de DHA.

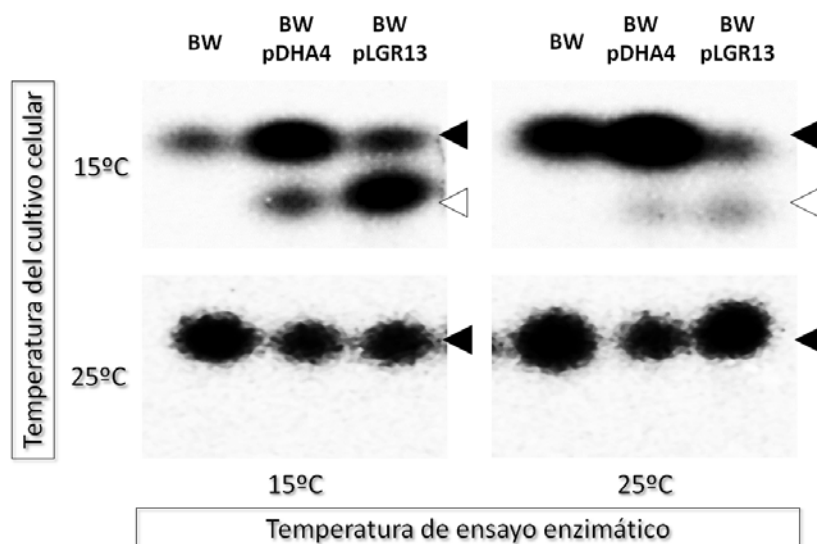


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la síntesis *in vitro* de DHA en BW, BW-pDHA4 y BW-pLGR13. El lisado celular de cultivos crecidos a 15°C (imág. superiores) o 25°C (imág. inferiores) se ha incubado en buffer fosfato 100 mM suplementado EDTA 1mM y DTT 1mM a pH 7,2. El ensayo se ha iniciado añadiendo sustratos radiactivos 2-14C-malonil-CoA y 1-14C-acetil-CoA, así como NADPH como cofactor esencial de la reacción. Las muestras se han incubado durante 1 h a 15°C o 25°C. Posteriormente, se ha realizado una derivación de los ácidos grasos a FAME mediante una metilesterificación ácida en HCl 0,4% en metanol a 90°C durante 1h. Los FAME se han extraído en hexano 3 veces, y se han separado 3 veces por TLC en silicagel y hexano-dietil éter en proporción 95:5. Se ha utilizado oleato metil éster y DHA metil éster como patrones para identificar las manchas. Las manchas superiores de cada TLC corresponden a ácidos grasos de cadena corta-media (flecha negra), y las manchas inferiores corresponden a DHA (flecha blanca).

En los ensayos donde las células han crecido a 25 °C, ninguna de las cepas portadoras del complejo Pfa presenta producción de DHA. En contraposición, se observa que sí se sintetizan ácidos grasos de cadena corta-media por actividad del sistema FAS independientemente de la temperatura de cultivo. Estos resultados parecen indicar que no existe actividad de síntesis de DHA en los cultivos crecidos a 25 °C.

4.3.5. Modificación de flujos de carbono

El segundo reto de este trabajo se basa en la hipótesis de que existe una competición por los sustratos comunes (acetil-CoA y malonil-CoA) entre la síntesis de ácidos grasos de *E. coli* (FAS) y la síntesis de DHA del sistema Pfa de *M. marina*. En trabajos previos, se ha observado que el inhibidor de la síntesis de ácidos grasos cerulenina incrementa 3 veces la producción de DHA en *M. marina* (Morita et al., 2005) y de 4 veces en *C. psycherythraea* (Wan et al., 2016). Por ello, con la intención de optimizar los flujos metabólicos de *E. coli* para mejorar la capacidad de síntesis de DHA, se testó inicialmente el inhibidor cerulenina en la cepa *E. coli* BW27783 expresando el plásmido pDHA4. Posteriormente, se examinó el efecto de la delección en marco de distintos genes de *E. coli* en presencia de este mismo plásmido.

4.3.5.1. Efecto del inhibidor cerulenina sobre la producción de DHA

En primer lugar, para comprobar si esta hipótesis es correcta, se analizó el efecto de la cerulenina en la cepa de *E. coli* BW27783 portadora del plásmido pDHA4 (BW-pDHA4), utilizando concentraciones subinhibitorias de este antibiótico ($< 5 \mu\text{g/ml}$). Los cultivos se mantuvieron a 15°C durante 48h, se centrifugaron y posteriormente se analizó su composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Las cepas sin tratar con cerulenina presentaron alrededor de un 7% de DHA, mientras que el DHA aumentó a 12%, 15% y 17% utilizando cerulenina a concentraciones 0,5, 1,0 y 2,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (**Figura 23**). Sin embargo, aunque la mejor producción se observó utilizando 2 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina, la densidad óptica del cultivo apenas incrementó, es decir, el crecimiento celular se vio afectado debido a la escasez de ácidos grasos provocada por el bloqueo parcial de la FAS. Por ello, los ensayos posteriores se realizaron utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina. Bajo estas condiciones, la producción neta de DHA fue de 2,8 mg DHA/ L cultivo en ausencia de cerulenina, y de 8,1 mg DHA/ L en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cerulenina.

Asimismo, la cerulenina también tuvo un efecto sobre la composición de ácidos grasos en BW-pDHA4. Los ácidos grasos de cadena media, como el ácido mirístico (C14:0), incrementaron su proporción en presencia de cerulenina (2% vs 10%), mientras que los niveles de ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) y el derivado ciclopropano de 17 carbonos (C17cic)

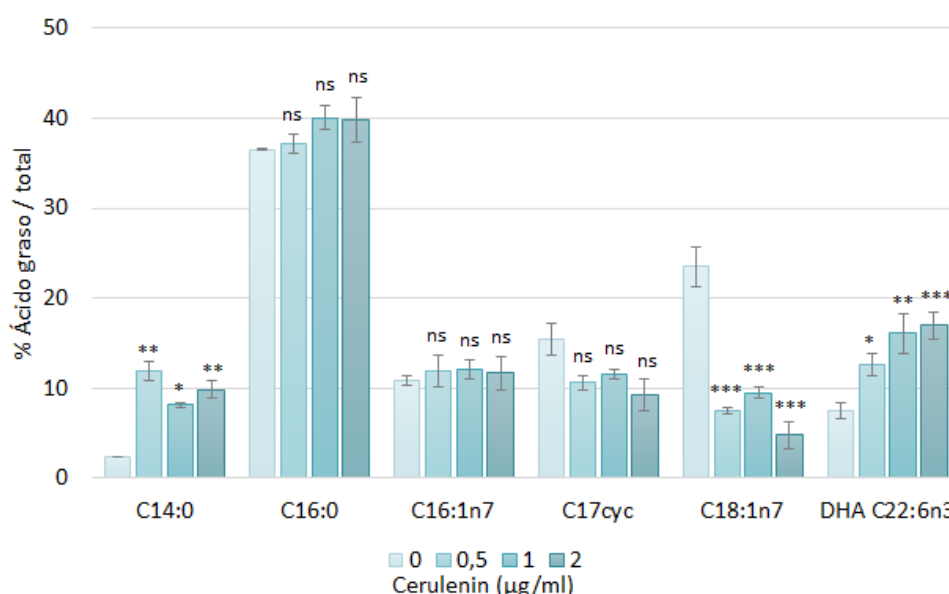


Figura 23. Alteración de la composición de los ácidos grasos mayoritarios en *E. coli* BW 27783 (pDHA4) tratados con distintas concentraciones de cerulenina (0-2 $\mu\text{g/ml}$). Las barras indican el promedio y la desviación estándar. El resultado del test paramétrico se indica con asteriscos de acuerdo con el nivel de significación obtenido (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; no significativo - ns $p > 0,05$).

no presentan variaciones significativas. Sin embargo, la proporción de ácido cis-vaccénico (C18:1n7) disminuyó visiblemente (23% vs 7%) (ver **Figura suplementaria 3**).

Estos datos coinciden con resultados descritos por otros autores previamente: en la bacteria *M. marina* se observa un incremento del 6 al 19% en el contenido de DHA cuando se trata con cerulenina (0,5-2 µg/ml) (Kautharapu et al., 2013; Morita et al., 2005), mientras en *Colwellia psycherythraea* el contenido de DHA incrementó del 2% al 10% (Wan et al 2016). También se han descrito variaciones similares en el perfil de ácidos grasos en *M. marina* (Morita et al., 2005), *C. psycherythraea* (Wan et al., 2016), o en *E. coli* expresando heterológamente el sistema *pfaABCDE* de *C. psycherythraea* (Peng et al., 2016).

Por tanto, estos resultados parecen indicar la presencia de una competición por el sustrato entre ambas rutas biosintéticas, de modo que cuando la cerulenina inhibe la actividad de la FAS sintasa hay una mayor concentración malonil-CoA disponible para la PUFA sintasa (van Summeren-Wesenhagen y Marienhagen, 2015).

4.3.5.2. Efecto de la delección del gen *fabH* sobre la producción de DHA

Una vez comprobado el efecto de la cerulenina, se planteó buscar mutaciones génicas que permitieran modificar los flujos de carbono, es decir, utilizar una mutación que mimetice el efecto de la cerulenina.

Como se ha mencionado previamente, la cerulenina inhibe las enzimas FabB and FabF, dos de las principales cetosintas involucradas en la síntesis de ácidos grasos (Moche et al., 1999). Ambas enzimas están implicadas en la elongación de la cadena creciente de ácido graso mediante la condensación de unidades de malonil unido a ACP. La tercera KS del sistema FAS es FabH, la principal enzima de la iniciación de la síntesis de ácidos grasos, dado que cataliza la condensación de una molécula de malonil-ACP con un grupo acetil-CoA o propionil-CoA. Sin embargo, FabH no es inhibida por la cerulenina (Janßen y Steinbüchel, 2014). Por ello, la hipótesis que se plantea es que, de forma análoga al efecto de la inhibición de FabB y FabF por la cerulenina, la delección del gen *fabH* podría incrementar la producción de DHA.

Con el objetivo de testar el efecto de la delección de *fabH*, se transformó el mutante portador de una delección en marco en el gen *fabH* de la colección KEIO (Baba et al., 2006) con el plásmido pDHA4 (Δ fabH-pDHA4). Esta cepa se cultivó a 15 °C durante 48 h en ausencia de cerulenina. Se analizó la capacidad de producción de DHA, la variación de la composición en ácidos grasos de la célula, y el crecimiento mediante monitorización de la DO 600nm (**Figura 24**). Respecto al contenido en DHA, se observa una mejora significativa en la producción de DHA causada por la

delección del gen *fabH*, cepa que alcanza el 24 % de DHA (**Figura 24A**). Este contenido en DHA es 3 veces mayor que la cepa control BW-pDHA4, siendo la producción de 11,2 mg DHA/L. Además, la ausencia de la actividad KS de FabH produce una alteración en la composición de los ácidos grasos. Comparando el perfil de la cepa BW-pDHA4 y $\Delta fabH$ -pDHA4 se observa un descenso notable en el ácido graso C16:0 (36,5% BW-pDHA4 vs 16,7% $\Delta fabH$ -pDHA4), y C17cic (15,4% vs 3,8%). En contraste, el ácido graso de cadena larga cis-vaccénico se incrementa significativamente (23,5% vs 45,2%) (ver **Figura suplementaria 3**).

Posteriormente, con el objetivo de analizar el efecto de una inhibición más estricta del sistema, se analizó el impacto de la cerulenina sobre la cepa $\Delta fabH$ -pDHA4 (**Figura 24B**). En este experimento, la producción de ácidos grasos se vio alterada simultáneamente por la delección

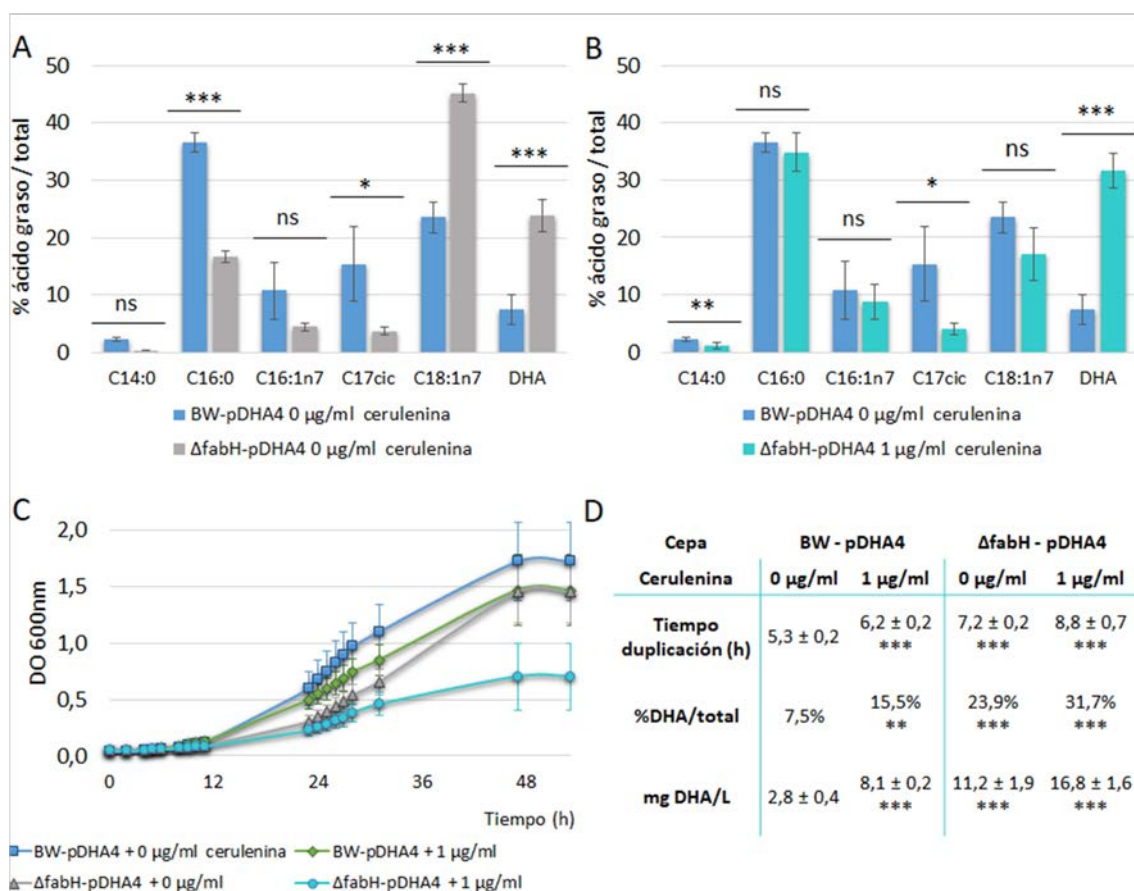


Figura 24. Efecto de la delección *fabH* (A) y el inhibidor cerulenina (B; 1 µg/ml) sobre la producción de DHA. **A)** Composición de los ácidos grasos mayoritarios de las cepas *E. coli* BW-pDHA4 y $\Delta fabH$ -pDHA4 bajo el efecto de 0 µg/ml de cerulenina. **B)** Composición de los ácidos grasos mayoritarios de las cepas *E. coli* BW-pDHA4 con 0 µg/ml de cerulenina y $\Delta fabH$ -pDHA4 con 1 µg/ml de cerulenina. **C)** Cinética de crecimiento de BW-pDHA4 y $\Delta fabH$ -pDHA4 en ausencia y presencia (1 µg/ml) de cerulenina a 15°C durante 50 horas. Se utilizaron seis cultivos independientes para cada cepa y condición. **D)** Parámetros de crecimiento y producción de las cepas testadas en presencia y ausencia de cerulenina. Se indica el tiempo de duplicación (calculado durante la fase exponencial a partir de los cultivos representados en la el apartado C), y la producción de DHA en valores relativos (%DHA respecto al total de ácidos grasos) y absolutos (mg DHA por litro de cultivo).

Todos los resultados se indican como promedio y desviación estándar. Los asteriscos indican el nivel de significación obtenido (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; ns $p > 0,05$).

de *fabH* y por la inhibición parcial inducida por la cerulenina sobre FabB y FabF. Bajo estas condiciones doblemente limitantes, la producción de DHA alcanzó el 31,7% respecto al total de ácidos grasos ($16,8 \pm 1,6$ mg DHA/L), 4,9 veces superior a la cepa control BW-pDHA4 sin tratar con cerulenina. Además, se observó una alteración de otros ácidos grasos Figura 24C. En primer lugar, la proporción de ácido mirístico en $\Delta fabH$ -pDHA4 tratada con cerulenina fue mayor que BW-pDHA4 sin tratar (2.3% vs 1.2%), mientras el ácido C17cic fue menor en $\Delta fabH$ -pDHA4 que en el control (4,2% vs 15,6%). Adicionalmente, se observa una reducción drástica en la capacidad de crecimiento (**Figura 24C-D**), siendo el tiempo de duplicación 2,5 horas más lento que BW-pDHA4 sin cerulenina (8,8 h vs 5,3 h).

4.3.5.3. Efecto de otras delecciones en marco sobre la producción de DHA

Enmarcado en la misma estrategia, se testó el efecto sobre la síntesis de DHA de otras delecciones. Estos mutantes sirvieron además para establecer un control del efecto de una delección en marco en el sistema en estudio *per se*. Se seleccionaron y transformaron con el plásmido pDHA4 una serie de cepas mutantes de la colección KEIO según los siguientes criterios (**Figura 25**):

(i) Genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos: *fabF* (KS responsable de la producción de ácido cis-vaccénico), *fabR* (regulador global del metabolismo de ácidos grasos) y *tesA* (tioesterasa de ácidos grasos). Las tres cepas mutadas no mostraron mejoras significativas respecto de la cepa control, BW-pDHA4. Como se muestra en la **Figura 25B**, el contenido en DHA subió desde el 7,5% en BW-pDHA4 al 10,9% en $\Delta fabR$ -pDHA4 y 12,5% en $\Delta tesA$ -pDHA4 bajo las mismas condiciones de cultivo. Curiosamente, la delección de FabF tan sólo incrementó la producción de DHA hasta 9,1%, un efecto mucho menos notorio que la inhibición parcial de la actividad enzimática FabB y FabF generada por la cerulenina (hasta un 17% de DHA), probablemente, debido a que FabF actúa en los ciclos de elongación de ácidos grasos más tardíos, como se ha explicado en la introducción.

(ii) También se analizó el efecto de la delección de dos genes codificantes para enzimas de la ruta de degradación de ácidos grasos, con el objetivo de evitar el consumo de DHA: *fadE* (enzima de la β -oxidación), y *fadR* (regulador del metabolismo de ácidos grasos). Ninguno de estos dos mutantes mostró diferencias significativas comparadas con la cepa control, puesto que $\Delta fadE$ -pDHA4 and $\Delta fadR$ -pDHA4 tan solo tuvieron un incremento en el contenido en DHA hasta el 8,9% y 10,7% respectivamente.

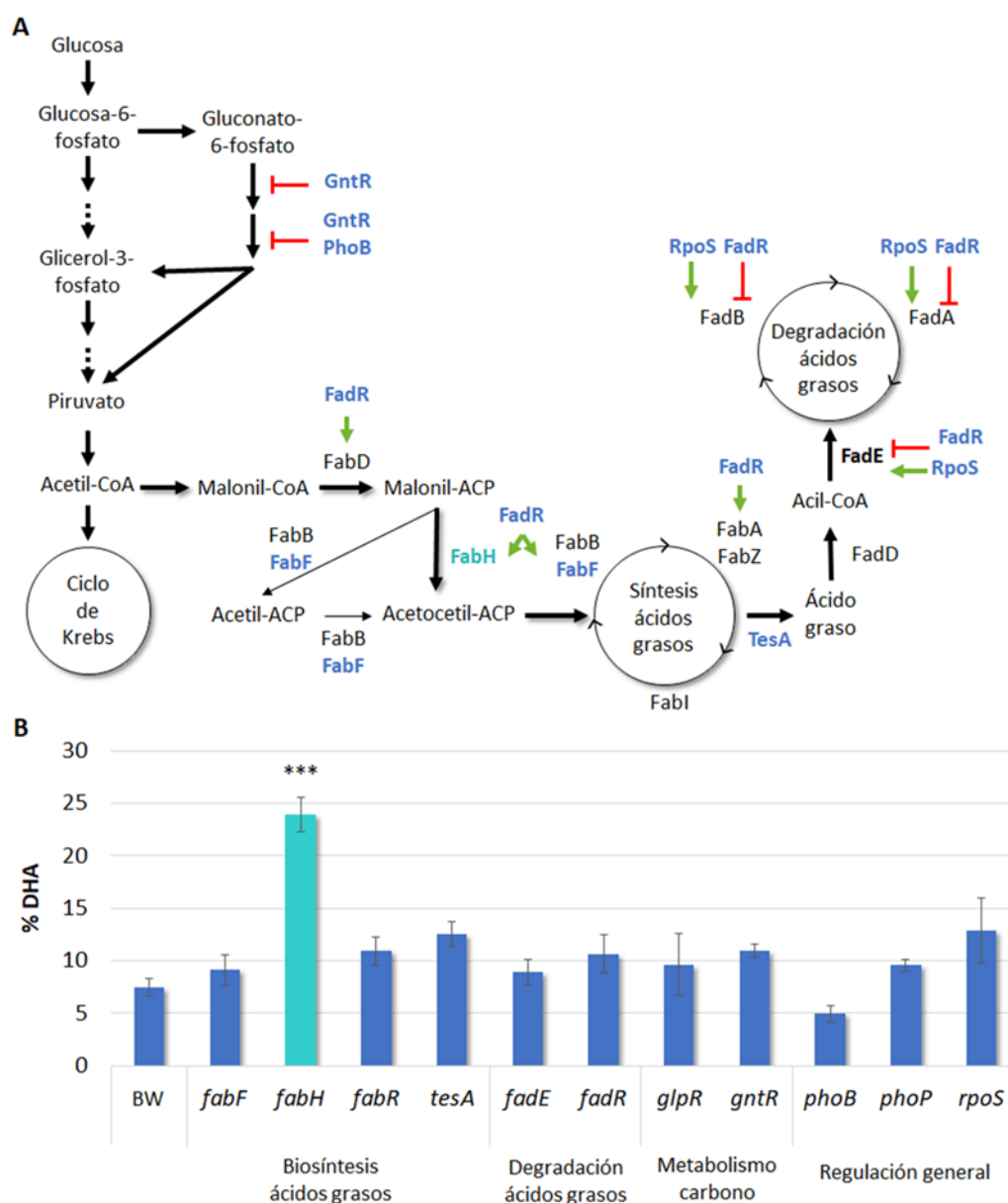


Figura 25. Producción de DHA en mutantes KEIO transformados con pDHA4. **A)** Esquema simplificado del metabolismo del carbono de *E. coli*. Los flujos de reacción están representados por flechas negras (línea continua si es una reacción, línea discontinua si son varias reacciones). La reacción catalizada por FabH está indicada en azul claro, y en azul oscuro se indica el resto de proteínas correspondientes a los genes seleccionados. Las flechas verdes indican una regulación positiva de la expresión génica; las flechas rojas indican una regulación negativa de la expresión génica. Abreviaturas: CoA – coenzima A, ACP – proteína portadora de acilos. **B)** Porcentaje de DHA respecto del total de ácidos grasos en las cepas mutantes seleccionadas y la cepa control. Se indica el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó respecto a la cepa control; se indica con asteriscos solo los resultados significativos (***) - $p < 0.001$.

(iii) Por otro lado, se analizaron los genes de factores de regulación relacionados con rutas del metabolismo del carbono: *glpR* (represor del regulón del glicerol-3-phosphate), y *gntR* (represor de la ruta Entner-Doudoroff). De nuevo, ambos mutantes no mostraron diferencias significativas respecto de la cepa control, dado que el contenido en DHA tan sólo incrementó del 7,5% al 9,8% en $\Delta glpR$ -pDHA4 y 11,0% en $\Delta gntR$ -pDHA4.

Resultados

(iv) Por último se analizó la mutación de genes codificantes para proteínas de regulación relacionadas con el *switch* metabólico entre la síntesis y la degradación de ácidos grasos (Janßen y Steinbüchel, 2014): *phoB* y *phoP* (regulador dual que regula el balance entre síntesis y degradación de ácidos grasos en función del estado energético de la célula), y *rpoS* (factor sigma relacionado con la red de regulación de ácidos grasos). Estos mutantes no mostraron diferencias significativas en el contenido en DHA, puesto que $\Delta phoB$ -pDHA4, $\Delta phoP$ -pDHA4 y $\Delta rpoS$ -pDHA4 contenían un 5,0 %, 9,6% y 12,9% de DHA, respectivamente.

4.4. Mejora de la producción de biomasa a baja temperatura

Uno de los aspectos más importantes en la potencialidad de escalado industrial de un proceso biológico como el que se describe en el presente trabajo es la capacidad de producción de biomasa. Es decir, es tan importante la optimización de la síntesis del compuesto de interés como la cantidad de células que lo sintetizan. Por ello, en esta segunda rama de estudio se plantea determinar las condiciones adecuadas para mejorar la biomasa, dentro del rango de condiciones en las que la síntesis de DHA es óptima. Esto supone un reto dado que el producto buscado se sintetiza a una temperatura tan baja que el funcionamiento de *E. coli* se ve afectado por una reducción de la velocidad metabólica de todas sus rutas.

Por este motivo, se ha abordado un proceso de optimización de la capacidad de crecimiento de *E. coli* a baja temperatura.

4.4.1. Determinación de la producción óptima de biomasa y DHA

En primer lugar, se realizó un ensayo de crecimiento y producción simultáneo, con el objetivo de caracterizar el crecimiento de la bacteria a 15 °C y la fase de crecimiento óptima para la síntesis de DHA. Se inoculó *E. coli* BW27783 pDHA4 en LB y se cultivó a 15 °C durante 120 horas. Durante el cultivo, se midió el crecimiento bacteriano por densidad óptica a 600nm, y se tomaron diversas muestras a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas para su análisis por GC.

En la **Figura 26** se observa que el crecimiento a 15 °C de *E. coli* presenta una fase de latencia de aproximadamente 12 horas. En ese momento entra en fase exponencial hasta que alcanza la fase estacionaria a las 48 horas de cultivo, en el que la densidad óptica se estabiliza. Respecto al

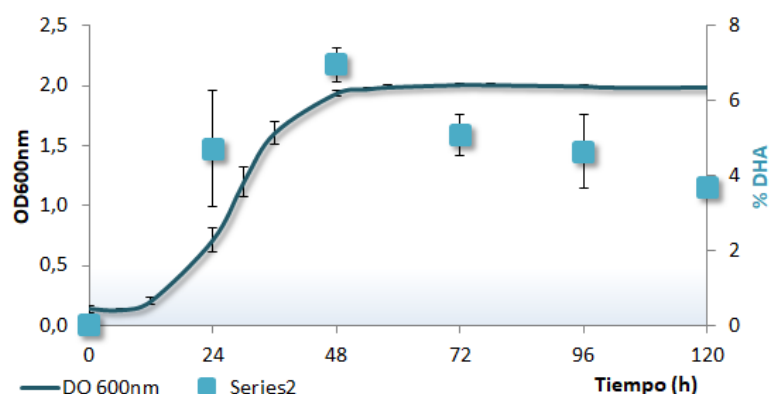


Figura 26. Crecimiento celular y producción de DHA en la cepa *E. coli* BW27783 transformada con el plásmido pDHA4. Se representa el crecimiento como la densidad óptica del cultivo a 600nm (DO 600nm) y la producción de DHA como el porcentaje de DHA respecto del total de ácidos grasos.

Resultados

contenido en DHA, su síntesis se inicia durante la fase exponencial, alcanzando el valor máximo al final de esta fase. Posteriormente, el porcentaje de DHA respecto al total de ácidos grasos decrece a lo largo de la fase estacionaria. Por tanto, parece que la síntesis de DHA se produce durante la fase de crecimiento activo de la célula, y posteriormente es degradado o modificado.

Como prueba de concepto, se realizó un ensayo en el que se promovió inicialmente la acumulación de biomasa, y posteriormente se indujo la síntesis de DHA. Es decir, se dividió el proceso en dos etapas con el objetivo de comprobar si ambos procesos, crecimiento celular y la síntesis de DHA, están acoplados. Para ello, se llevó a cabo una primera etapa de crecimiento bacteriano rápido a 37 °C, seguida de una etapa de inducción de la expresión de los genes *pfaABCDE* a 15 °C. Concretamente, se inoculó la cepa *E. coli* BW 27783 pDHA4 (BW-pDHA4) y *E. coli* BW 27783 pLGR13 (BW-pLGR13) en medio LB y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 2,0. En ese momento, se centrifugaron los cultivos a 4 °C para bajar la temperatura, y se resuspendieron las células en medio LB concentrando las células 10 veces. Esta alta densidad celular provoca la entrada del cultivo en fase estacionaria de las células (Navarro Llorens et al., 2010). A continuación, se indujo la expresión de los promotores pBAD de pLGR13 con 0,2% de arabinosa los cultivos concentrados y se incubaron a 15 °C durante 24 h. Se tomaron muestras de estos cultivos a distintos tiempos para analizar tanto la síntesis de proteínas como la producción de DHA.

En el análisis por electroforesis SDS-PAGE de las proteínas Pfa (datos no mostrados), se vio que aparecían bandas correspondientes a proteínas Pfa a partir de las 8h de inducción en la cepa con el plásmido pLGR13, mientras que no se observaron las proteínas Pfa al expresar pDHA4. En los análisis por cromatografía de gases de las muestras recogidas a distintos tiempos no se detectó DHA, tanto usando el plásmido pLGR13 como pDHA4. Durante este tiempo, la densidad óptica se mantuvo estable, es decir, no parece que se produjeran divisiones celulares.

Por último, se ha realizado un ensayo en el que se ha promovido el crecimiento celular a 37 °C en la fase de latencia del cultivo, y posteriormente, se ha disminuido la temperatura de incubación a 15 °C en el momento que se ha inducido la expresión del promotor pBAD con arabinosa. Los resultados de este ensayo se recogen en la **Figura 27**; los cultivos incubados inicialmente a 37 °C (línea continua) presentan una fase de latencia de 2 horas, mientras que en los cultivos incubados continuamente a 15 °C es de más de 12 horas (línea de puntos). Por consiguiente, los cultivos preincubados a 37 °C inician la fase exponencial mucho antes, y entran en fase estacionaria entorno a las 30 horas de cultivo, en lugar de las 50 horas de los cultivos incubados continuamente a 15 °C. El análisis de la composición de ácidos grasos indica que no

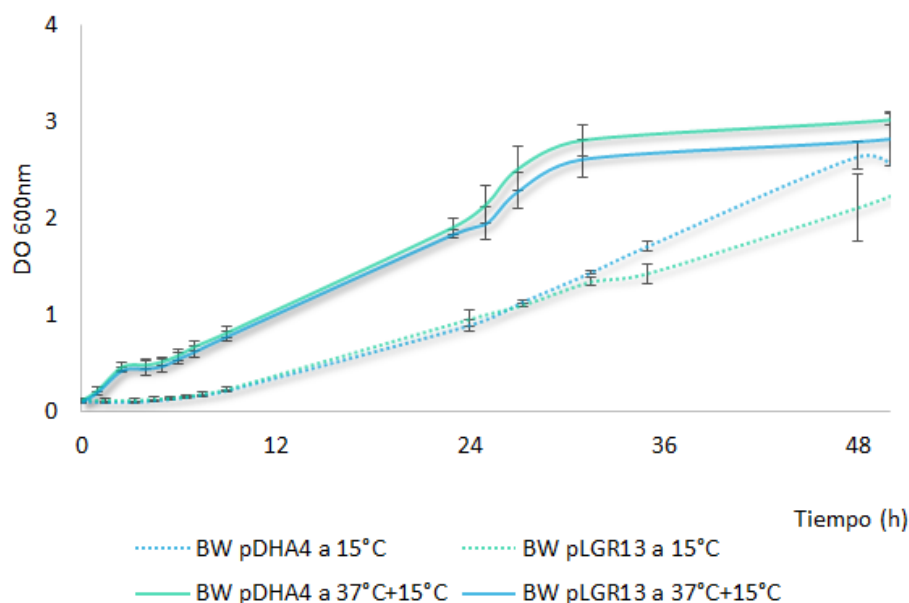


Figura 27. Optimización de los tiempos de crecimiento en *E. coli* a 15°C. Las cepas de *E. coli* BW-pDHA4 y BW-pLGR13 se incubaron continuamente a 15°C (línea de puntos), o se preincubaron inicialmente a 37°C durante 15 h y posteriormente a 15°C (línea continua). Se tomaron datos de crecimiento por densidad óptica durante 50 h. Se indica el promedio y desviación estándar de tres cultivos independientes para cada cepa y condición.

hay diferencias en la producción de DHA entre ambos protocolos de cultivo, manteniéndose en el 7% de DHA en ambas cepas.

Por tanto, parece que la síntesis de DHA está acoplada al crecimiento activo de la célula, es decir, tanto los ácidos grasos como el DHA se producen durante la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Además, se ha descrito que una preincubación de las células a 37 °C ayuda a reducir el tiempo final del cultivo, siendo este de tan sólo 30 horas.

4.4.2. Introducción de chaperoninas activas a baja temperatura

A pesar de haber determinado el momento óptimo para la producción de DHA y biomasa, así como haber acortado el tiempo de cultivo, es necesario desarrollar una estrategia que permita mejorar el crecimiento de *E. coli* a baja temperatura.

A 15 °C, *E. coli* crece muy despacio, con tiempos de duplicación de 5,3 horas en condiciones de cultivo óptimas (**Figura 24D**). Esto se debe a que *E. coli* es una bacteria mesófila, cuyo rango de crecimiento óptimo se produce entre 21 °C y 42 °C, siendo el máximo a 37 °C. Por ello, presenta problemas de crecimiento a temperaturas inferiores a 20 °C. Este hecho se debe a la baja actividad de sus chaperoninas GroEL y GroES por debajo de dicha temperatura (Strocchi et al., 2006), por tanto, no son capaces de asistir a otras proteínas durante su síntesis y plegamiento

Resultados

para conformar correctamente su estructura tridimensional. Esto conlleva que el metabolismo de la bacteria se ralentiza por el mal funcionamiento de sus sistemas básicos.

Con el objetivo de suplir esta carencia de la actividad chaperonina a bajas temperaturas, Ferrer et al. (2003) expresaron en *E. coli* los genes *cpn60* y *cpn10* de la bacteria psicrófila *Oleispira antarctica*, dos chaperoninas análogas a GroEL y GroES cuyo rango de actividad de plegamiento se encuentra entre 4 °C y 18 °C. Ferrer et al. habían demostrado que la expresión de Cpn10 y Cpn60 mejoraba la capacidad de plegamiento de las proteínas de *E. coli* a bajas temperaturas, permitiendo a la bacteria crecer incluso por debajo de 8 °C.

Por ello, se adquirió la cepa *Arctic express* (Agilent technologies), una cepa derivada de *E. coli* BL21 portadora de un plásmido que expresa constitutivamente las chaperoninas Cpn60 y Cpn10 de *Oleispira antártica*. En primer lugar, se transformó la cepa *Arctic express* tanto con el

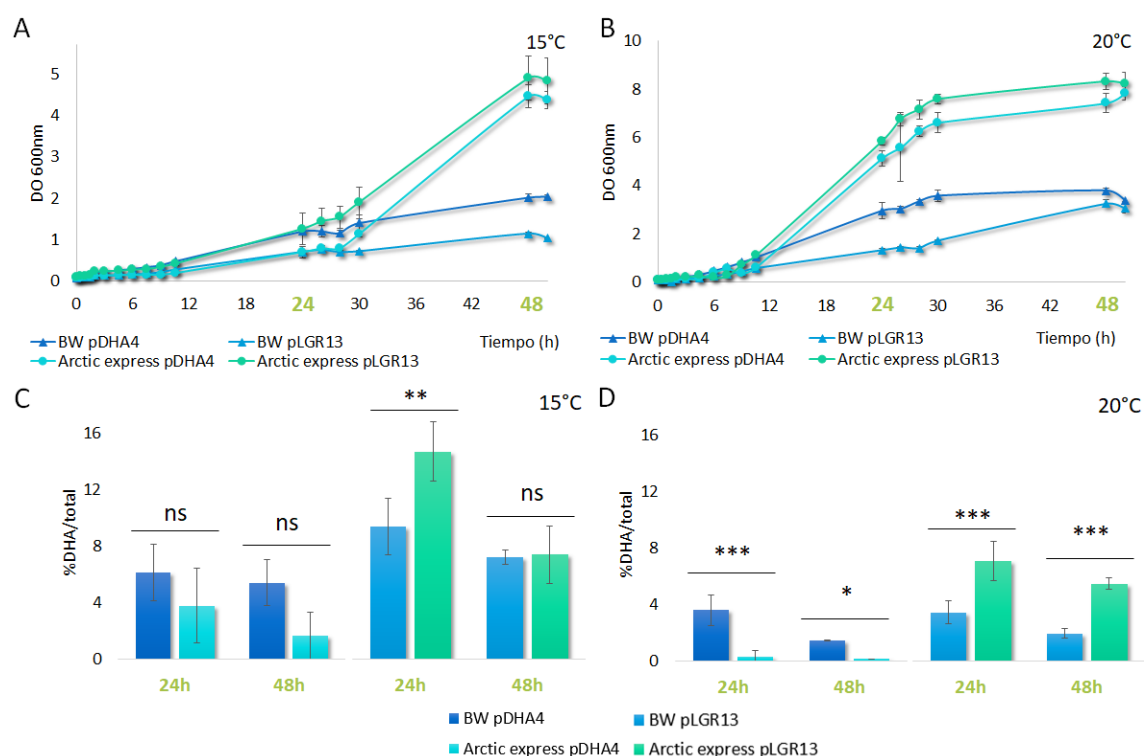


Figura 28. Efecto en el crecimiento y producción de DHA de las chaperonas Cpn60 y Cpn10 en la cepa *Arctic express* transformada con pDHA4 y pLGR13, respecto de la cepa de *E. coli* BW27783. **A-B)** Cinética de crecimiento a 15 °C (**A**) y 20 °C (**B**) en las cepas BW27783 y *Arctic express* transformadas con los plásmidos pDHA4 y pLGR13 durante 72 de cultivo. Los cultivos se mantuvieron 1'5 h a 37 °C, momento en el que se bajó la temperatura y se indujo la expresión de los promotores pBAD con arabinosa (0'1%) Las medidas se tomaron de tres cultivos independientes, tomando tres muestras de cada uno. Se indica en verde el momento en el que se tomó muestra para el análisis de ácidos grasos. **C-D)** Producción de DHA a 15 °C (**C**) y 20 °C (**D**) a las 24h y 48h desde el inicio del cultivo de las cepas BW27783 y *Arctic express* transformadas con los plásmidos pDHA4 y pLGR13. Se representa el promedio y la desviación estándar de los triplicados de cada cepa y plásmido. La significación de las diferencias está indicada: *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; no significativo (ns) $p > 0,05$.

plásmido original pDHA4 como con el plásmido sintético pLGR13. Posteriormente, se monitorizó el crecimiento de las células a 15 °C y 20 °C, y se analizó el contenido en DHA a las 24h y 48h de cultivo. Como se observa en la **Figura 28 (A-B)**, la cepa *Arctic express* tiene un crecimiento más rápido y alcanza una mayor densidad óptica al llegar a fase estacionaria comparado con la cepa BW 27783 tanto a 15 °C como a 20 °C. A ambas temperaturas, las células presentan una fase de latencia larga (> 6 h). A 15 °C, el crecimiento empieza a incrementar a las 26 horas en la cepa *Arctic express*. Sin embargo, en BW se mantiene un crecimiento lento hasta llegar a fase exponencial a las 50 h desde el inicio del cultivo. A 20 °C, el crecimiento exponencial se inicia entre las 6 y 8 horas, y se alarga hasta alcanzar una DO 600 de 6,5-7,5 en *Arctic express*, momento en el que entra en fase exponencial a las 30 horas de cultivo; en BW- pDHA4 se alcanza la exponencial con una DO600 cercana a 4 a las 30 h de cultivo, mientras que BW-pLGR13 presenta un crecimiento más lento y continuado hasta las 40-48h, cuando alcanza una DO600 en torno a 3,5. Estos datos de crecimiento indican que hay incremento de biomasa de 2 veces en términos densidad óptica en las cepas que contienen las chaperoninas respecto a la cepa control BW.

Respecto a la producción de DHA (**Figura 28 C-D**), el contenido de DHA en la cepa *Arctic express* transformada con el plásmido pLGR13 presenta una mejora de 1,6 veces respecto a la cepa BW-pLGR13 (14,7% vs 9,4%) y de 2,4 veces respecto a BW-pDHA4 (14,7% vs 6,1%) durante la fase exponencial del cultivo a 15 °C (**Figura 28 A y C**, 24h) y de 2 veces respecto a BW-pLGR13 y BW-pDHA4 al final de la fase exponencial a 20 °C (7,1% vs 3,4%, y 7,1% vs 3,6% respectivamente). Durante la fase estacionaria (48h) no se observan diferencias a 15 °C, sin embargo, a 20 °C (**Figura 28 B y D**) la presencia de chaperoninas psicrófilas mejora el contenido de DHA en 2,7 veces respecto a BW-pLGR13 (5,5% vs 2,0%) y 3,9 veces respecto BW-pDHA4 (5,5% vs 1,4%). La cepa *Arctic express* transformada con pDHA4 mejoró el crecimiento respecto a BW-pDHA4 a ambas temperaturas, sin embargo, el contenido de DHA extrañamente fue entre 2 y 10 veces inferior a BW-pDHA4 en las distintas condiciones testadas. Este hecho podría deberse a una incompatibilidad entre pDHA4 y el plásmido portador de los genes *cpn10* y *cpn60*, dado que se ha comprobado posteriormente que comparten el mismo origen de replicación, p15A. Adicionalmente, se ha analizado el contenido en DHA de las mismas cepas cultivadas a 25 °C a las 24 y 48h, sin embargo, no se detectó DHA en ninguna de las cepas testadas.

4.5. Acumulación de DHA

En el objetivo 3 de este trabajo se pretende desarrollar una estrategia de acumulación o secreción de DHA que permita producir grandes cantidades de DHA, así como protegerlo de los procesos degradativos de la célula. Para ello se ha diseñado dos aproximaciones: acumular DHA en forma de triglicéridos (TAG) mediante el uso de la tDGAT (**sección 1.3.3**), o secretar el DHA en forma de ácido graso libre (FFA) mediante sobreexpresión de una tioesterasa (**sección 1.3.2**).

4.5.1. Acumulación de DHA en forma de TAG

La primera estrategia para acumular DHA en la célula se basa en la estrategia utilizada por los organismos oleaginosos productores de LC-PUFA, los traustóquidos, los cuales almacenan los ácidos grasos en forma de TAG mediante el uso de las DGAT (Raghukumar, 2008). Por ello, se propone sintetizar TAG ricos en DHA en *E. coli* mediante la expresión simultánea del plásmido pDHA con una enzima DGAT, de modo que las moléculas de DHA producidas por el sistema Pfa sean incorporadas en TAG.

Como ya se ha comentado anteriormente, previamente se ha descrito la actividad de la DGAT de *T. curvata* (tDGAT) bajo el promotor T7 expresado en células *E. coli* C41 (Lázaro, 2016; Lázaro et al., 2017). Este enzima es capaz de sintetizar tanto TAG como ceras a 37 °C en *E. coli*. Sin embargo, no se ha testado la producción de TAG a baja temperatura, condición óptima para la síntesis de DHA. Por ello, se cambió el sistema de expresión de tDGAT por el sistema pBAD33. Guzman et al. (1995) diseñaron la cepa *E. coli* BW27783 (BW) para la expresión del sistema pBAD, debido a que esta cepa es deficiente en la ruta de degradación de arabinosa y, además, tiene el transportador de membrana de arabinosa que permite obtener un alto nivel de expresión de los genes bajo el promotor inducible pBAD. Por ello, se construyó el plásmido pLGR1 mediante ensamblaje isoterma a partir del plásmido pBAD33::tDGAT, al cual se cambió el *cassette* de resistencia a cloranfenicol por un *cassette* de resistencia a ampicilina procedente del vector comercial pET3a para poder co-expresarlo con el plásmido pDHA4.

Posteriormente, se realizó un ensayo de producción de TAG y ceras a 15 °C y 37 °C y los lípidos neutros de cultivos saturados se extrajeron para análisis por TLC como se describe en Materiales y métodos. El análisis de los lípidos neutros mediante TLC indica que hay una actividad dual de la tDGAT en la que se producen tanto TAG y como ceras tanto a la temperatura óptima para *E. coli*, 37 °C, como a la temperatura óptima para la síntesis de DHA, 15 °C, (**Figura 29**). En comparación con el control negativo (*E. coli* BW27783 sin plásmidos), aparecen manchas

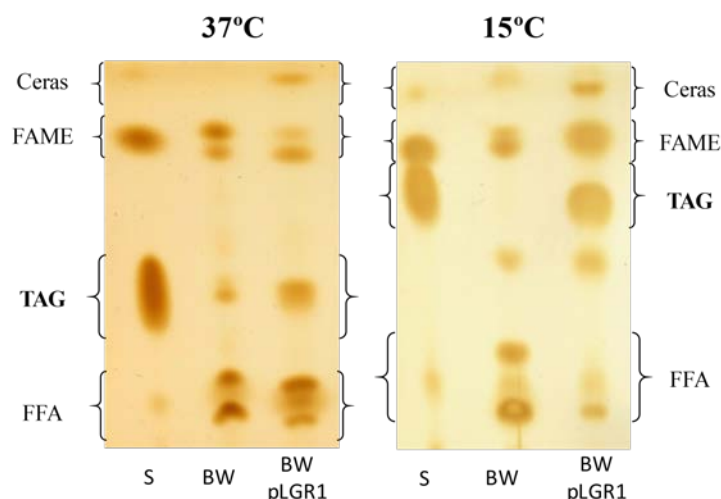


Figura 29. Análisis de la síntesis de TAG y ceras por la tDGAT a distintas temperaturas en *E. coli* BW27783 con el plásmido pLGR1 (pBAD33-tDGAT). Se utiliza un patrón (S) para identificar los distintos lípidos neutros: ceras, metil éster de ácido graso (FAME), triacilglicéridos (TAG), y ácidos grasos libres (FFA).

de TAG y ceras cuando se sobreexpresa la tDGAT. Además, la mancha correspondiente a los ácidos grasos libres es menos intensa a 15 °C, en comparación con los cultivos a 37 °C.

Una vez comprobada la correcta producción de TAG a 15 °C utilizando el plásmido pLGR1, se introdujeron simultáneamente los plásmido pLGR1 y pDHA4 en la cepa de *E. coli* BW27783, de forma que la cepa final contiene tanto Pfa sintasa como tDGAT. Esta cepa (BW pLGR1-pDHA4) se cultivó a 15 °C y 25 °C con el objetivo de probar la capacidad de tDGAT para incorporar DHA en TAG.

Los cultivos incubados durante 48 h se analizaron por TLC (**Figura 30A**). El control negativo, la cepa BW sin plásmidos no muestra producción de TAG o ceras (calles 1 y 2). Cuando la construcción de tDGAT se expresa únicamente a niveles basales (calles 3-6) aparecen manchas débiles de TAG y ceras, y manchas más intensas de FFA, a ambas temperaturas de incubación. Sin embargo, la inducción del sistema pBAD con arabinosa (calles 7-10) aumenta la intensidad de las manchas de TAG y ceras. Las cepas que contienen ambos plásmidos muestran un patrón similar a la cepa que sólo contiene la tDGAT, es decir, la síntesis de DHA no parece afectar a la producción de TAG y ceras. Por el contrario, disminuye el contenido en FFA en los cultivos inducidos con arabinosa a 15 °C (calles 7 y 9).

Adicionalmente, se analizó la presencia de DHA mediante cromatografía de gases tanto en el pellet celular completo, como en las distintas manchas de la TLC. En los pellets celulares no se detectó DHA a 25 °C en ninguna de las cepas analizadas; sin embargo, a 15 °C se detectó DHA en todas las cepas que contienen el plásmido pDHA4 (**Figura 30B**). La cepa BW-pDHA4 presenta un 6% de DHA. Sorprendentemente, en la cepa BW pLGR1-pDHA4 el contenido de DHA

Resultados

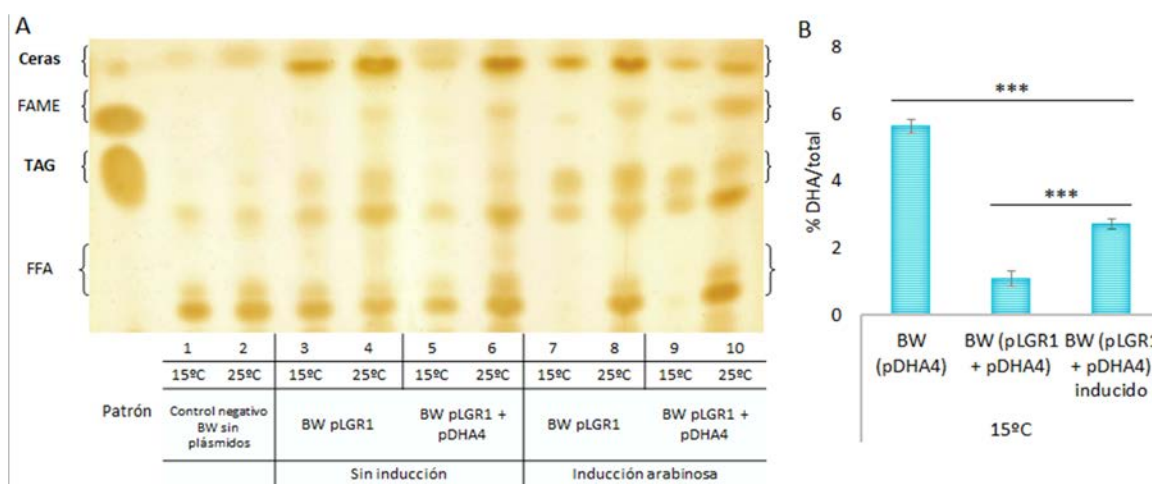


Figura 30. Producción de TAG y DHA en células de *E. coli* BW27783 transformadas con los plásmidos pLGR1 (tDGAT) y pDHA4 (Pfa). **A)** La actividad tDGAT a 15°C y 25°C fue analizada mediante el análisis de lípidos neutros por TLC. Se indica con corchetes la posición de distintos lípidos neutros. **B)** Las cepas portadoras del plásmido pDHA4 fueron analizadas mediante GC. Se representan el promedio y desviación de tres réplicas de los cultivos a 15°C; en los cultivos a 25°C no se detectó DHA. El resultado del análisis estadístico de los datos mediante el test One-Way ANOVA con post-hoc Tukey. Se indica con asteriscos en función del grado de significación obtenido (***) $p < 0,001$.

desciende cuando el sistema Pfa se coexpresa con la tDGAT, con una producción de DHA de 1,1% sin inducir y 2,7% con arabinosa.

Por último, se analizó el perfil de ácidos grasos de ceras y TAG por cromatografía de gases. La escasa muestra de las ceras impidió determinar la composición de estas. Sin embargo, sí se consiguió establecer la composición de los TAG (**Tabla 6**). Estos lípidos están compuestos mayoritariamente por ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y cis-vaccénico (C18:1) independientemente de la presencia del complejo Pfa. Sin embargo, la proporción de cada especie de ácido graso varía en función de la temperatura de cultivo. En cualquier caso, ninguna de las muestras analizadas contenía DHA en los TAG.

Tabla 6. Composición en ácidos grasos de los TAG producidos por la enzima tDGAT en *E. coli* BW27783 a 15 °C y 25 °C. Se indican los porcentajes respecto del total de ácidos grasos de las especies más abundantes.

		% Ácido graso/total							
Cepa y temperatura de cultivo		C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	DHA
BW (tDGAT)	15 °C	1,4	24,5	1,0	32,7	23,6	0,9	10,7	0,0
BW (tDGAT + pDHA)	15 °C	1,6	26,8	1,1	31,1	23,5	1,2	11,0	0,0
BW (tDGAT)	25 °C	4,0	21,7	3,0	40,3	8,1	3,7	5,0	0,0
BW (tDGAT + pDHA)	25 °C	5,9	20,5	4,0	35,5	8,6	4,2	5,2	0,0

Una de las posibles explicaciones de la ausencia de DHA en las manchas de TAG es la incorrecta extracción de los LC-PUFA o su degradación durante el proceso debido a la alta

inestabilidad que le confieren las múltiples insaturaciones. Se realizó una pequeña prueba en la que se analizó la composición en ácidos grasos de cultivos de B27783 y BW 27783 expresando la enzima tDGAT a 15 °C en medio mínimo suplementado con aceite de pescado (**Figura suplementaria 4**). Con el objetivo de comparar la eficiencia de detección de ácidos grasos se analizó tanto el pellet de los cultivos como un raspado de una extracción lipídica depositada sobre una capa fina de sílice. Comparando la composición de ácidos grasos de los pellets como de los extractos de manchas en sílice se observa que disminuye la cantidad de LC-PUFA detectada (ALA, DPA, EPA, y DHA), sin embargo, se mantiene o incrementa la proporción de otras especies de ácidos grasos.

4.5.2. Secreción de DHA por acción de una tioesterasa

La segunda estrategia planteada para evitar la degradación de DHA e intentar acumular el ácido graso fue la introducción de una tioesterasa en el sistema. Las tioesterasas son enzimas que catalizan la liberación de los ácidos grasos de su unión a coenzima A (Dillon y Bateman, 2004; Meng et al., 2013). Se ha descrito que la acumulación de ácidos grasos libres (FFA) en el citoplasma de *E. coli* provoca una reducción de la viabilidad celular debido a una desestructuración de la integridad de la membrana que provoca una inducción de la respuesta frente a estrés y una pérdida de la fuerza del gradiente de protón asociada a la respiración aerobia (Lennen et al., 2011). Por ello, como mecanismo de defensa ante su toxicidad, los FFA son expulsados al exterior de la célula (Janßen y Steinbüchel, 2014). Este sistema de eflujo de ácidos grasos probablemente se realice mediante el sistema ArcAB-TolC (Lennen et al., 2013) o por difusión pasiva (Meng et al., 2013). Aprovechando este sistema natural, se ha observado que la sobreexpresión de tioesterasas citoplasmáticas induce una acumulación de ácidos grasos en el exterior de las células (Cho y Cronan, 1995). Además de evitar la toxicidad, el rendimiento de producción de ácidos grasos incrementa, de forma que es una de las aproximaciones más utilizadas en estudios de producción de biocombustibles basados en ácidos grasos tanto en *E. coli* como en otros microorganismos (Janßen y Steinbüchel, 2014; Ledesma-Amaro et al., 2016; Lin et al., 2013; Shin et al., 2016)

La tioesterasa utilizada en nuestro trabajo procede de la propia *M. marina*. El plásmido pDHA4 contiene, además de los genes esenciales *pfaABCDE*, algunos genes adyacentes del genoma de *M. marina*. Se identificó el ORF7 del clúster como una tioesterasa por similitud a otras proteínas utilizando la secuencia de aminoácidos en una búsqueda en la herramienta BLASTp (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Se seleccionaron las secuencias

Resultados

identificadas como tioesterasas en microorganismos productores de LC-PUFA (Shulse y Allen, 2011) para posteriores análisis bioinformáticos: *P. profundum* SS9 (productor de EPA; 86% identidad de secuencia frente al ORF7 de *M. marina*), *C. psycherythraea* 34H (DHA; 83% id.), *P. ingrahamii* 37 (DHA; 80% id.), *S. psychrophila* (EPA; 62%), *S. baltica* (EPA; 56%), y como especie más alejada se seleccionó el único traustóquitrado con una tioesterasa identificada, *Aurantiochytrium* sp. (DHA; 32%).

Se ha realizado un alineamiento múltiple de secuencia utilizando la plataforma *t-coffee* (Centro de Regulación Genómica; Kemena y Notredame, 2009; Di Tommaso et al., 2011), en particular, se ha usado el algoritmo *expresso* (Armougom et al., 2006) con el objetivo de utilizar los datos estructurales en el alineamiento (**Figura 31**). Como se observa, existe una gran homología entre las proteínas de las distintas especies, siendo la más alejada *Aurantiochytrium* sp.; las zonas mejor conservadas se encuentran en el entorno del residuo catalítico (Rodríguez-Guilbe et al.; 2013), el ácido aspártico en la posición 17 (Figura 31, estrella roja,).

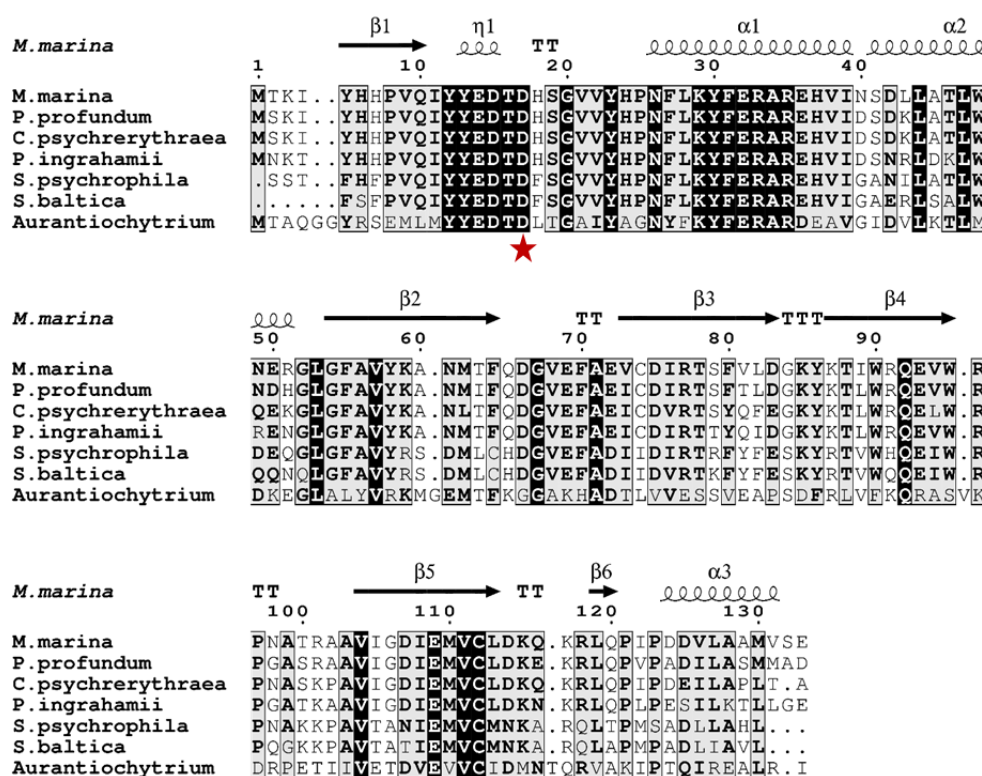


Figura 31. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos identificadas mediante BLASTp (NCBI). Se ha utilizado el algoritmo *Expresso* (CRG) para generar un alineamiento múltiple de secuencias en base a su estructura. Posteriormente, se ha identificado las similitudes y estructura secundaria consenso utilizando la herramienta ESPrpt. En el esquema se indica la estructura secundaria (α-hélices se representan con hélices, láminas β con flechas negras, y los giros con las letras TT) así como el alineamiento múltiple de las proteínas seleccionadas (los aminoácidos se muestran coloreados en negro, gris y blanco en función del % identidad entre las secuencias). Se indica el aminoácido catalítico (D17) con una estrella roja.

Dado el alto grado de similitud entre *M. marina* y las proteínas descritas, se utilizó la secuencia de aminoácidos del ORF7 para encontrar la estructura tridimensional a la que mejor se ajuste mediante la herramienta bioinformática protein homology/analogy recognition engine (Phyre) (Imperial College London; Kelley et al., 2015). El mejor resultado obtenido fue la estructura cristalina (PDB: 3r87) de la tioesterasa caracterizada por Rodríguez-Guilbe *et al.* (2013) (**Figura 32 A-B**). Se utilizó la herramienta Pymol para alinear tridimensionalmente ambas estructuras (**Figura 32C**) y localizar el centro activo.

Por tanto, dada la similitud tanto en la secuencia como en la estructura secundaria, así como por su localización próxima al clúster *pfa*, asumimos que este ORF7 podría ser una tioesterasa, y que podría utilizar DHA como sustrato.

Por ello, con el objetivo de acumular y secretar DHA en forma de ácido graso libre se clonó la tioesterasa codificada en el ORF7 del clúster de *M. marina*. Para ello se construyeron los vectores pLGR12 y pLGR15 en los que se insertó el ORF7 bajo el control del promotor constitutivo fuerte pAnt del plásmido R388 (Fernandez-Lopez et al., 2014) y un promotor pBAD inducible con arabinosa (Guzman et al., 1995), respectivamente. Estos plásmidos se introdujeron en *E. coli* BW27783 junto con el vector pDHA4 y se cultivaron a 15 °C durante 48h.

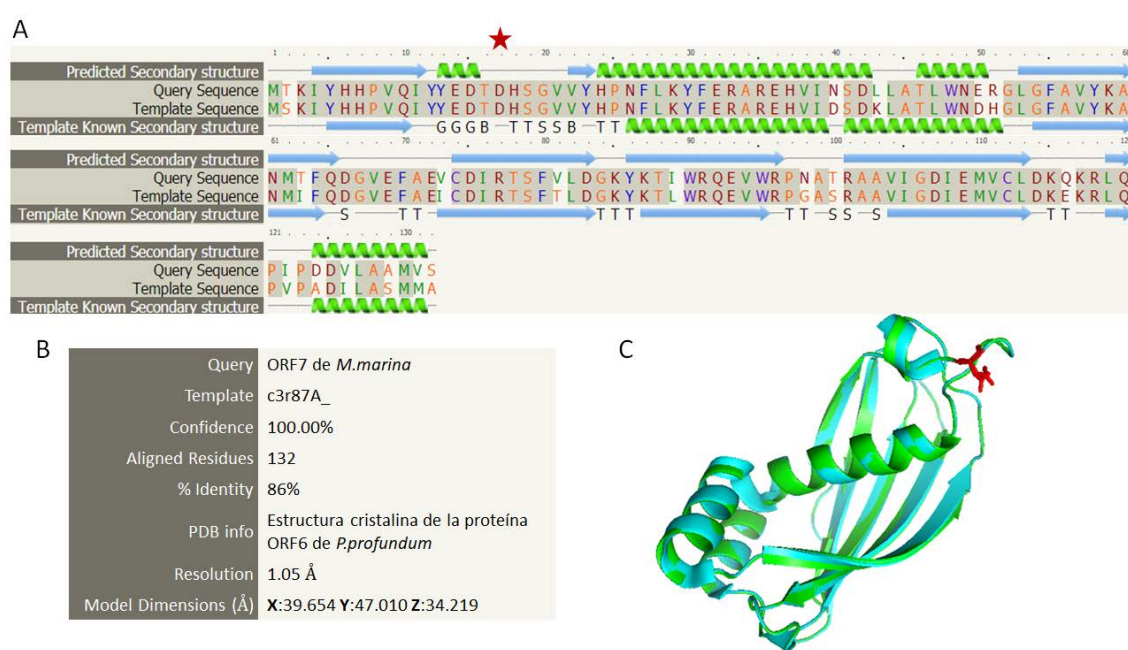


Figura 32. Modelado de la estructura tridimensional de la proteína ORF7 de *M. marina*. A-B) Predicción estructural de la proteína ORF7 (*query*) utilizando como referencia (*téplate*) la estructura cristalina del ORF6 de *P. profundum* (PDB: 3r87) mediante la herramienta *Phyre* (Kelley et al., 2015). Arriba, se indica la predicción de la estructura secundaria del *query* y la estructura secundaria del *template* (hélices α – hélices verdes, láminas β – flechas azules, T – *hydrogen bonded turn*, S – *bend*, B – puente, G – hélice 3-turn helix). Se indica el aminoácido catalítico con una estrella roja. C) Alineamiento tridimensional de la estructura cristalina 3r87 (verde) y el modelo predicho por *Phyre* del ORF7 de *M. marina* (verde) utilizando el visor molecular PyMol. Se indica el aminoácido catalítico en rojo.

Resultados

En primer lugar, con el objetivo de detectar el DHA en el medio extracelular, el cultivo se centrifugó, y se liofilizó por separado tanto el pellet como el sobrenadante. El dato más llamativo fue que tan sólo se detectaba DHA en el pellet de las células que contienen el plásmido pDHA4, siendo el valor notablemente más bajo en las cepas que co-expresan la tioesterasa y el sistema *pfa* (**Figura 33A**). Es decir, dado que en el sobrenadante no se detectó DHA en ninguna de las cepas, podría indicar que el DHA se encuentra en el interior de la célula, bien en el citoplasma de la célula en forma de FFA, o bien en como parte de los fosfolípidos en la membrana.

En paralelo, se analizó la expresión de la proteína tioesterasa mediante electroforesis SDS-PAGE. Como se observa en la **Figura 33B**, en los cultivos en los que se expresa constitutivamente la proteína (plásmido pLGR12; calles 3 y 5), aparece una banda intensa de 15 KDa. Extrañamente, en los cultivos con expresión inducida por arabinosa, la banda de la proteína apenas destaca en comparación con la cepa sin expresión de tioesterasa. Esto podría deberse a que ambos plásmidos, pLGR15 y pDHA4, contienen el mismo origen de replicación, p15A. Por tanto, debería sustituirse este sistema de replicación por otro compatible.

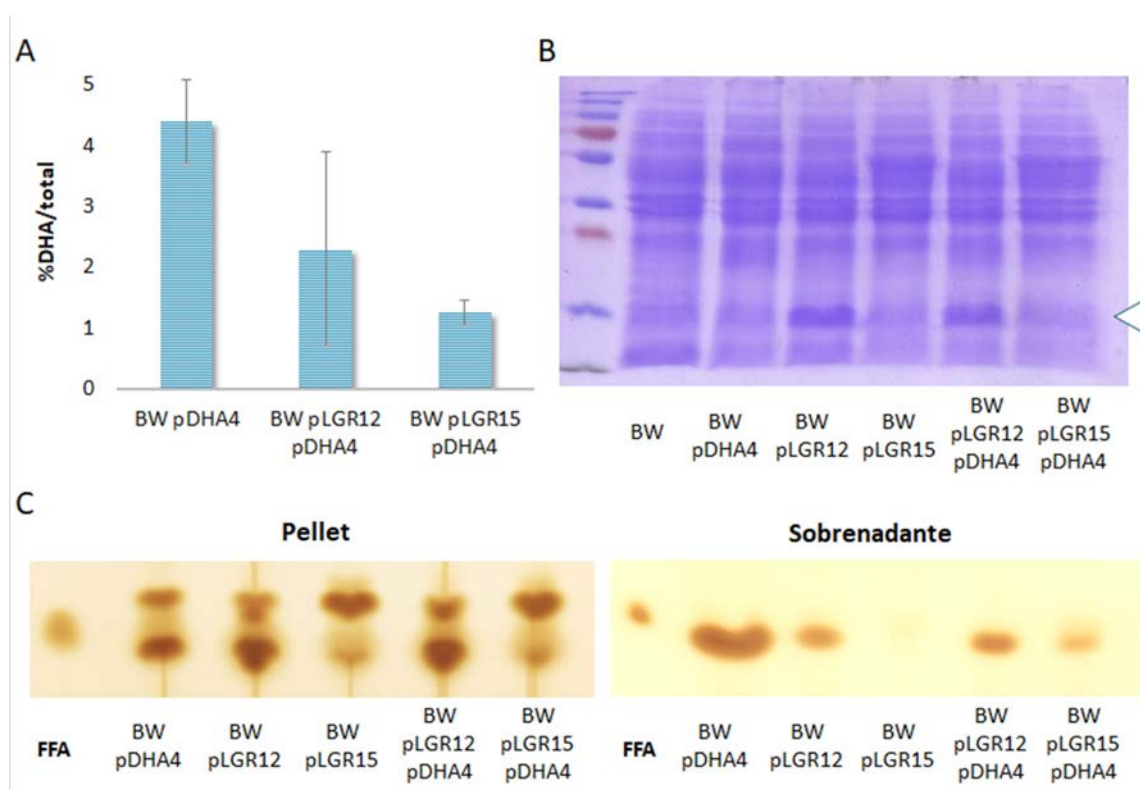


Figura 33. Secreción de DHA en forma de ácido graso libre en cultivos a 15°C durante 48h. **A)** Producción de DHA durante la coexpresión con la tioesterasa de *M. marina*. Se muestra el promedio y desviación estándar de tres réplicas de pellet celular de cada cepa. Los sobrenadantes no presentaban DHA. **B)** Análisis de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes de los mismos cultivos. Se indica con una flecha la presencia de la banda de 15 KDa correspondiente a la tioesterasa. **C)** Análisis de lípidos neutros, tanto en el pellet (izquierda) como en el sobrenadante (derecha), mediante cromatografía en capa fina de extractos de lípidos neutros. Se muestra solamente la fracción correspondiente a los ácidos grasos libres (FFA).

Por último, a partir de los cultivos centrifugados y liofilizados, se hizo un análisis de la composición de los lípidos neutros mediante TLC del pellet y el sobrenadante del cultivo. Tal como se muestra en la **Figura 33C**, aparecen marcas correspondientes a FFA más intensas en el pellet del cultivo, observándose un pequeño incremento en la intensidad de las manchas en las cepas portadoras de la tioesterasa; es especialmente llamativa la diferencia en el patrón en los cultivos cuya expresión de la tioesterasa ha sido inducida con arabinosa (pLGR15). En el caso del sobrenadante, destaca que la calle con mayor cantidad de FFA es la correspondiente a la cepa sin tioesterasa, mientras que las cepas portadoras de la tioesterasa apenas presentan FFA en el exterior de la célula, independientemente de la presencia del plásmido pDHA4. Este dato es llamativo, dado que estudios previos describen que la sobreexpresión de tioesterasas en el citoplasma de *E.coli* provocan una exportación de los FFA al exterior de la célula (Janßen y Steinbüchel, 2014).

Estos ensayos iniciales indican que la tioesterasa se está expresando correctamente en el plásmido pLGR12, sin embargo, no se detecta una exportación de DHA al exterior celular. Sería conveniente desarrollar un sistema de análisis *in vivo* e *in vitro* de la actividad tioesterasa, y probablemente purificar la proteína para estudiar su actividad *in vitro*.

4.6. Evolución de la cepa productora de DHA

El último objetivo de este trabajo es la obtención de una cepa evolucionada para incrementar la capacidad de síntesis de DHA. El plan de trabajo consiste en generar una librería de mutantes del plásmido pDHA4, y posteriormente realizar un *screening* en el que se seleccionen aquellos mutantes con mayor capacidad de producción.

Por ello, el primer trabajo que se realizó en este apartado fue encontrar un método para identificar las cepas con mayor contenido en DHA. La estrategia inicial fue adaptar varios métodos de identificación de microorganismos ricos en ácidos grasos ω -3 que explotaban algunas de las propiedades fisicoquímicas que el DHA y otros PUFA confieren a la célula, con el objetivo final de adaptarlo a un cribado *high throughput*. En primer lugar, se testó la resistencia a agentes oxidantes externos proporcionada por la presencia de LC-PUFA en membrana en un método descrito por Tilay y Annapure (2012), y en segundo lugar, se testó la capacidad reductora de estas células en un ensayo colorimétrico de reducción de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Ryan et al., 2010; Bianchi et al., 2014). Sin embargo, ninguno de los ensayos mostró diferencias de las cepas productoras de DHA respecto a los controles (datos no mostrados).

Alternativamente, se optó por una estrategia de autoselección de células ricas en DHA, es decir, exponer a las cepas mutantes generadas frente a condiciones selectivas en las que la presencia de DHA en la célula suponga una ventaja ambiental para el crecimiento celular; de esta forma, previsiblemente, el mutante con mayor contenido en DHA prevalecerá sobre otras cepas empobrecidas en este ácido graso, siendo el método ideal para la selección de variantes con una mayor capacidad de producción de DHA.

1.1.6. Ensayos de competición

Dados los resultados obtenidos en apartados anteriores, para los ensayos de autoselección se utilizaron las condiciones que previamente se ha determinado como óptimas para la síntesis de DHA: temperatura de incubación de 15 °C y presencia de cerulenina.

Para testar la capacidad de selección de estas condiciones se diseñó un ensayo de competición en el que, en el mismo recipiente de cultivo, se mezclaron un 50% de células productoras de DHA, en este caso *E. coli* BW 27783 pDHA4 con una resistencia genómica a rifampicina (BW Rif^R-pDHA4), y un 50% de células control, *E. coli* BW 27783 con el plásmido pBAD33 sin insertos con resistencia genómica a ácido nalidíxico (BW Nx^R-pBAD33). Estos cultivos mixtos se incubaron a distintas temperaturas (15 °C, 18 °C, 21 °C y 28 °C) y se trataron con varias concentraciones subletales de cerulenina (0, 0,5 y 5 µg/ml). Al final de la fase exponencial, se

subcultivó cada ensayo de competición en medio fresco con una DO inicial de 0,15, y se volvió a incubar en las mismas condiciones hasta alcanzar de nuevo la fase estacionaria. En cada subcultivo se tomaron tres muestras de cada matraz, se diluyeron y se sembraron en placas de LB suplementadas con rifampicina o ácido nalidíxico para hacer un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC). En la **Figura 34**, se recogen los resultados obtenidos en estos ensayos de competición. Se representa el porcentaje de células portadoras del plásmido pDHA4 al final de cada subcultivo calculado según la ecuación 2:

$$\% pDHA4 = \frac{UFC Rif^R}{UFC Rif^R + UFC Nx^R} \cdot 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

En estas competiciones se observa que efectivamente, hay un efecto de selección de cepas ricas en DHA frente a una desaparición de las células control (**Figura 34A**). Este efecto parece estar producido tanto por la temperatura, dado que el enriquecimiento es mucho más rápido a 15 °C y 18 °C, como por la cerulenina, especialmente a alta concentración de cerulenina (5 µg/ml). En el cultivo con mayor capacidad de selección (15 °C, 5 µg/ml cerulenina), en tan solo 24 horas de incubación las células portadoras del plásmido pDHA4 y, por ello ricas en DHA, sustituyen casi por completo a las células control; es decir, parece que los cultivos se enriquecen en aquellas células capaces de sintetizar DHA cuando las condiciones de crecimiento son más restrictivas para el crecimiento celular. En el rango de temperaturas en las que se observa síntesis de DHA (15 °C, 18 °C y 21 °C, **Figura 34B**) aun cuando la concentración de cerulenina es de 0,5 µg/ml este efecto de enriquecimiento de BW-pDHA4 se mantiene, aunque es menos acusado, mientras que el enriquecimiento desaparece en ausencia de cerulenina. En contraste, a 28 °C, temperatura a la que no se detecta DHA en las células, el porcentaje de células portadoras del plásmido pDHA4 se mantiene alrededor del 50% en todo momento, independientemente de la concentración de cerulenina. Por tanto, comparando los resultados de la competición con el contenido en DHA, se observa que las condiciones que favorecen la proliferación de células portadoras del plásmido pDHA4 está asociada a un mayor contenido en DHA. Por ello, estos resultados podrían indicar que la presencia del complejo Pfa favorece el crecimiento cuando la actividad de síntesis de ácidos grasos (FAS) de *E. coli* se reduce.

Resultados

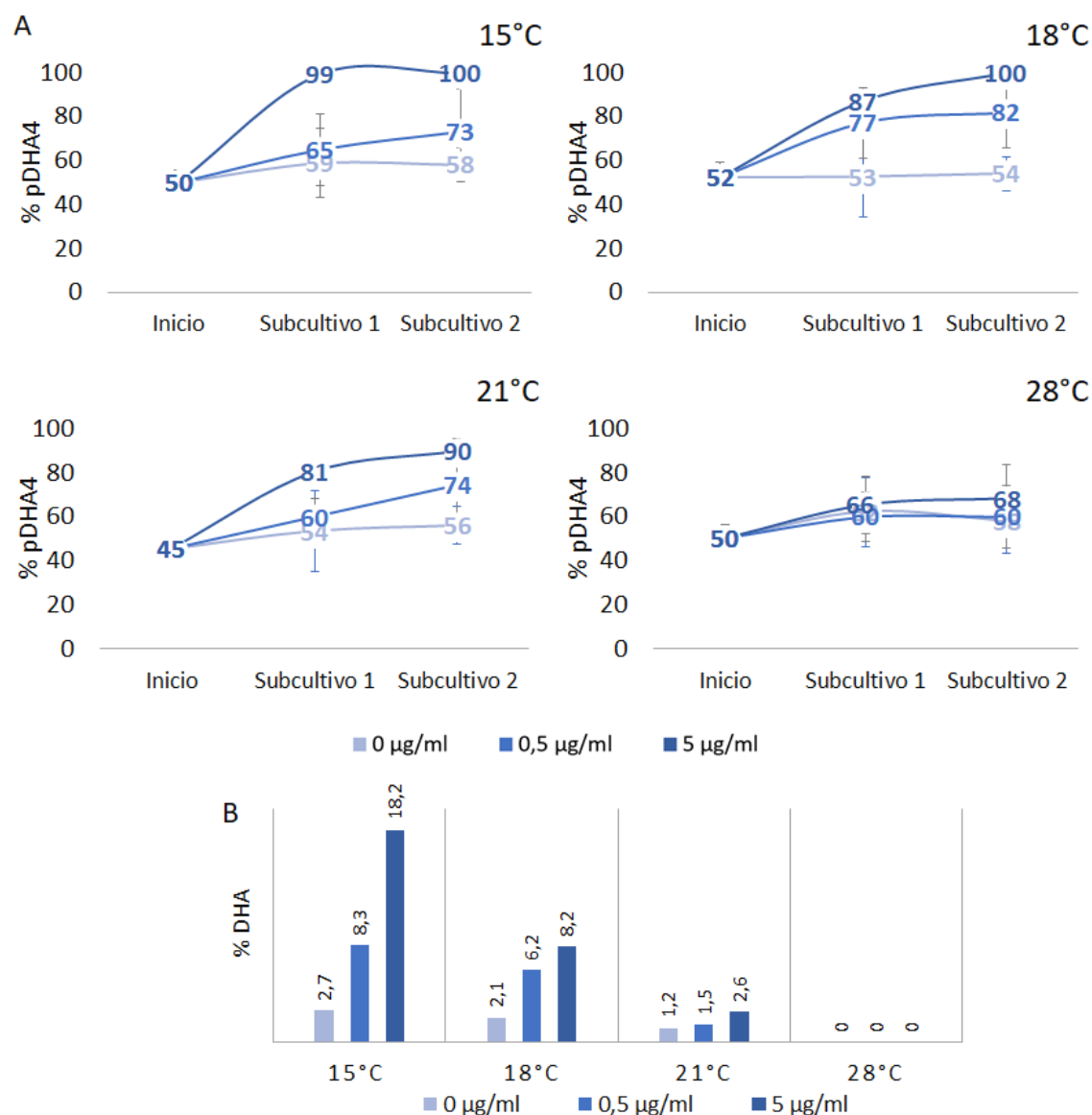


Figura 34. Competición entre células ricas en DHA y células control a distintas temperaturas (15°C, 18°C, 21°C y 28°C) y distintas concentraciones de cerulenina (0, 0,5 y 5 µg/ml). **A)** Porcentaje de células productoras (calculado mediante la Ecuación 2) durante dos subcultivos en fase estacionaria, bajo distintas condiciones de cultivo. **B)** Contenido en DHA de los cultivos al final del segundo subcultivo expresado como porcentaje de DHA respecto al total de ácidos grasos.

1.1.7. Cinética de crecimiento en condiciones de crecimiento restringido

Con la finalidad de dilucidar si el enriquecimiento en células portadoras del plásmido pDHA4 se debe a diferencias en el crecimiento entre la cepa *E. coli* BW27783 Rif^R - pDHA4 y la cepa control BW27783 Nx^R - pBAD33, se han realizado cinéticas de crecimiento de estas cepas en cultivos axénicos bajo las mismas condiciones a las que se han llevado a cabo los ensayos de

competición. En este caso, se ha monitorizado la densidad óptica del cultivo durante 96h, con un subcultivo a medio fresco a las 48 horas.

Como se observa en la **Figura 35**, apenas existen diferencias entre los cultivos BW Nx^R - pBAD33 (**Figura 35A**) y BW Rif^R -pDHA4 (**Figura 35B**) sin cerulenina, o con una concentración

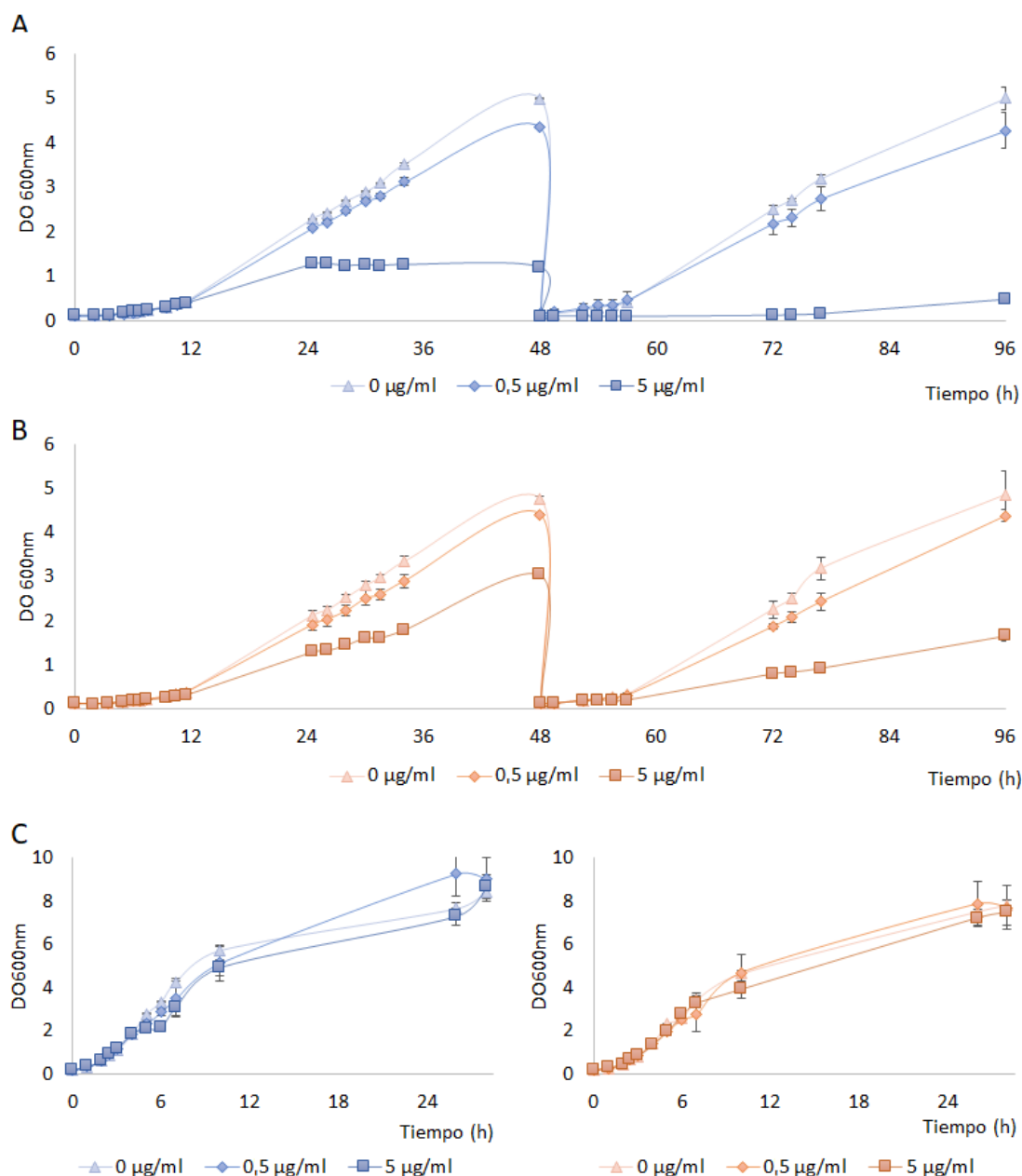


Figura 35. Crecimiento a 15 °C de las cepas *E. coli* BW27783 Nx^R - pBAD33 (A, azul) y BW27783 Rif^R -pDHA4 (B, naranja) a distintas concentraciones de cerulenina: 0 µg/ml – triángulos, 0,5 µg/ml – rombos, y 5 µg/ml – cuadrados. Se registró la densidad óptica durante 48 horas, se diluyeron los cultivos en medio fresco con una DO de partida de 0,15, y se monitorizó el crecimiento 48 horas adicionales. C) Cinética de BW27783 Nx^R - pBAD33 (azul) y BW27783 Rif^R -pDHA4 (naranja) a 28 °C a tres concentraciones distintas de cerulenina: 0 µg/ml – triángulos, 0,5 µg/ml – rombos, y 5 µg/ml - cuadrados. En todos los gráficos se indica el promedio y la desviación estándar de tres cultivos independientes para cada condición.

Resultados

baja del inhibidor (0,5 µg/ml). Sin embargo, en los cultivos en los que se ha suplementado el medio de cultivo con 5 µg/ml de cerulenina, el crecimiento celular es muy lento y apenas se observa un incremento de la densidad óptica. Este efecto es más drástico en los cultivos BW Nx^R-pBAD33 que apenas presentan un ligero incremento de la densidad óptica, en comparación con los cultivos que portan los genes *pfa*. Este fenómeno podría deberse a la inhibición del sistema de síntesis de ácidos grasos de *E. coli* por la acción conjunta de la inhibición de FabB y FabF por la cerulenina.

5. DISCUSIÓN

El sistema Pfa de síntesis de ácidos grasos poliinsaturados procedente de la γ -proteobacteria *M. marina* genera una situación de complejidad metabólica en la célula hospedadora, *E. coli*, ya que esta nueva ruta biosintética requiere de sustratos esenciales para el funcionamiento de la célula. Los mismos sustratos, malonil-CoA y acetil-CoA, necesarios para sintetizar la molécula energética por excelencia de una célula, el ácido graso.

La degradación de estas moléculas genera el carbono y energía necesarios para la síntesis de otras moléculas, mientras que su síntesis supone el gasto tanto de carbono como de energía. Por ello, la regulación del metabolismo de ácidos grasos es muy estricta y está asociada a la situación energética de la célula (Yao et al., 2012). Así, los ácidos grasos se degradan en momentos de escasez de nutrientes, y solo se sintetizan cuando hay un excedente de energía y sustratos.

Sin embargo, la presencia de una ruta metabólica heteróloga como es la síntesis de DHA mediante el complejo Pfa, la cual no parece sufrir una acción reguladora en el huésped, supone un reto para todo el sistema metabólico y regulatorio de *E. coli*. Es decir, se crea una situación de gasto energético en la bacteria en la que sistema heterólogo compite por los sustratos para funcionar, y los desvía de las rutas habituales de la bacteria, mientras que la bacteria en este caso no es capaz de reducir o bloquear esta actividad.

Adicionalmente, el sistema Pfa requiere una temperatura muy baja, 15°C, para su funcionamiento correcto. La bacteria *E. coli*, mesófila, presenta una baja actividad enzimática a dicha temperatura, dado que su capacidad metabólica se encuentra al 40-50% de la velocidad óptima de funcionamiento (Ferrer et al., 2003).

Sumado el efecto de la temperatura sobre la eficiencia enzimática, y la desviación de nutrientes hacia la ruta heteróloga, nos encontramos, *a priori*, con un sistema sumamente ineficiente. Sin embargo, el estudio de ciertos aspectos de la biología de la célula y del funcionamiento del sistema Pfa nos ha permitido mejorar el rendimiento del sistema.

5.1. Mejora de la producción de DHA

El DHA producido mediante el sistema Pfa de *M. marina* tiene una temperatura óptima de síntesis de 15 °C. Uno de los retos más importantes del presente estudio ha sido determinar las causas a nivel molecular por el que no se detecta síntesis de DHA a temperaturas superiores a 25 °C, con el objetivo de mejorar este aspecto de la producción que supone que el proceso sea inviable de escalar industrialmente debido a los altos costes que supone el enfriamiento de los cultivos.

5.1.1. Los genes *pfaABCD* tienen una mayor expresión a 15 °C en pDHA4

La primera hipótesis planteada fue una expresión génica ineficiente a altas temperaturas. Esta sospecha se basa en la descripción de la construcción del plásmido pDHA4 (Orikasa et al., 2009), quienes clonaron el clúster génico *pfa* de *M. marina* completo, es decir, la expresión de los genes *pfaABCD* está dirigida por promotores nativos de la bacteria marina. Estos promotores podrían presentar problemas de expresión al no ser bien reconocidos por la maquinaria de transcripción de *E. coli*. Por ello, decidimos caracterizar la expresión del plásmido pDHA4 en *E. coli*.

En primer lugar, apoyados por la literatura (Allen y Bartlett, 2002), así como de las predicciones *in silico*, conseguimos determinar la presencia del promotor aguas arriba de *pfaA* en el plásmido pDHA (**Figura 14**), y predecir la presencia de un promotor precediendo a *pfaC* y otro a *pfaD*. Con estos datos, decidimos analizar la expresión de estos tres genes mediante RT-PCR. Los datos obtenidos indican que existe expresión de los tres promotores a todas las temperaturas analizadas, y que esta expresión *pfaA*, *pfaC* y *pfaD* es mayor a 15 °C, dato que se correlaciona con el contenido en DHA de las células (**Figura 15**). Dado que la maquinaria de *E. coli* parece estar reconociendo y expresando los promotores heterólogos a cualquier temperatura, esto podría indicar que existe algún tipo de factor de transcripción implicado, quizás del sistema *Cold-shock* de *E. coli*, o que hay estructuras secundarias en la zona reguladora que estabilizan la maquinaria de transcripción a bajas temperaturas.

Con el objetivo de mejorar la expresión de los genes *pfa*, se construyó el plásmido sintético pLGR13. En este plásmido el promotor pBAD dirige la expresión de los genes *pfaABCDE*. Los resultados de RT-qPCR para este plásmido indican que se ha eliminado el impacto de la temperatura sobre la expresión de los genes *pfa*, ya que los niveles de expresión de los genes *pfa* son incluso mayores a 25 °C que a 15 °C (**Figura 17**). Además, parece que ha incrementado la expresión de los genes en el plásmido sintético (pLGR13) respecto a pDHA4. Este incremento se corresponde con un incremento de la proporción de DHA a 15 °C, lo cual indicaría que una

mayor cantidad de ARN da lugar a mayor cantidad de complejo Pfa, y, por ende, a una mayor cantidad de DHA final. Sin embargo, esta mejora de la expresión, no supone un cambio en la cantidad de DHA a 25 °C.

5.1.2. El complejo Pfa reduce su actividad a 25 °C

La mejora de la expresión a 25 °C debería haber provocado un incremento en la cantidad de proteína, y por ello, un aumento en la cantidad total de DHA producido a esta temperatura. Al menos eso ocurre a 15 °C donde, comparando la relación de DHA y ARN producido, parece que una mayor cantidad de complejo Pfa presente permite sintetizar más moléculas de DHA. Sin embargo, no está claro si el incremento de DHA es resultado de un incremento de la actividad de las proteínas o de la cantidad de enzima presente. Por tanto, se plantea una segunda hipótesis: la ausencia de DHA a 25 °C puede deberse a una alteración bien en la síntesis de las proteínas, o bien en la actividad de las proteínas Pfa.

En primer lugar, se comparó el uso de codones entre los genes de *M. marina* y *E. coli*. Se observaron algunas diferencias en la frecuencia de codones, sin embargo, corresponden a aminoácidos poco frecuentes, por lo que no debería ser un problema en la síntesis de proteínas.

Posteriormente se comparó la capacidad de síntesis de proteínas producida por los sistemas de expresión pDHA4 y pLGR13. El plásmido pLGR13 presenta mayor cantidad de proteínas PfaA y PfaC, puesto que se pueden observar a simple vista en un gel SDS-PAGE (**Figura 19**), probablemente debido al incremento en la expresión descrito. Las proteínas PfaB, PfaD y PfaE no se ven claramente, puesto que al ser más pequeñas quedan enmascaradas por otras proteínas de *E. coli*. Solo se puede suponer, que estas proteínas se están sintetizando, probablemente en mayor cantidad que con el plásmido pDHA4 debido al, ya argumentado, incremento en la expresión. Adicionalmente. Si se compara la síntesis de proteínas a 15 °C y 25 °C, se observa que a 25 °C aparece mayor cantidad de proteínas Pfa en el pellet de sonicación, lo que indicaría que las proteínas forman agregados, probablemente por un problema de plegamiento. Sería necesario purificar las cinco proteínas y realizar ensayos de actividad y de plegamiento para determinar si alguna de las proteínas pierde su estructura, y por tanto su actividad, a temperaturas superiores a 20 °C.

Con esta idea, se intentó purificar PfaA, la mayor de todas las proteínas Pfa del complejo. Debido a su tamaño y complejidad, tan solo se ha conseguido purificar una pequeña cantidad de PfaA activa. Cabe resaltar que PfaA podría formar agregados proteicos o multímeros (**Figura 20 y Figura 21**; bandas superiores, cercanas al borde del gel) en ausencia del agente reductor DTT. Esto puede deberse a que hay interacciones entre varias unidades de PfaA o que presenta

dificultades en el plegamiento, y por ello tiende a agregar. Esto explica los malos resultados obtenidos en las columnas de afinidad por Ni, puesto que el buffer utilizado no contiene DTT. Sería necesario utilizar alguna estrategia que permita mejorar la estabilidad de PfaA, como puede ser generar proteínas de fusión con colas de estabilidad. Otra posible estrategia podría ser utilizar equipos de electroforesis preparativa en condiciones nativas, que permita purificar grandes volúmenes de muestra, sin las restricciones de tamaño de los agregados.

La fracción final se ha utilizado para determinar si la proteína obtenida era activa mediante un ensayo de unión a sustrato, en el que se ha observado que, efectivamente, la mayor señal obtenida es a la altura de PfaA. Además, se inició un ensayo de actividad cetoreductasa, aunque la escasez de proteína purificada tan solo ha permitido realizar ensayos preliminares (**Figura suplementaria 2**). Debido a la falta de réplicas, no es posible sacar conclusiones claras, sin embargo, las tendencias de las cinéticas de reacción parecen indicar que podría haber un efecto de la temperatura sobre la actividad KR.

Por tanto, el análisis de expresión de proteínas no ha generado una información concluyente acerca de la correcta síntesis de las proteínas Pfa. Para mejorar la comprensión sobre el sistema proteico se puso a punto un ensayo de síntesis *in vitro* de DHA utilizando los extractos crudos de distintos cultivos celulares (**Figura 22**). En este ensayo se observó que el complejo Pfa pierde actividad a 25 °C. Si se comparan los datos *in vivo* (análisis de ácidos grasos por GC) con los datos *in vitro* (**sección 4.1.4**), se deduce que el complejo Pfa pierde actividad conforme se incrementa la temperatura. Curiosamente, este ensayo *in vitro* muestra que los extractos obtenidos de células cultivadas a 15 °C presentan una síntesis de DHA elevada cuando el ensayo se lleva a cabo a 15 °C, al contrario que en células cultivadas a 25 °C, en las que no se observa síntesis de DHA. Estos datos indican no sólo que hay una pérdida de actividad del complejo al incrementar la temperatura, sino que probablemente esta se deba la alteración de la estructura, bien de las proteínas completas o bien de los centros activos. Este hecho podría deberse a que el complejo Pfa procede de una bacteria psicrófila, y por ello, sus proteínas están adaptadas a funcionar a temperaturas muy bajas. Varios estudios sobre proteínas psicrófilas muestran que estas presentan una estructura termolábil; es más, se ha observado que el centro activo pierde su funcionalidad a temperaturas mucho más bajas que la temperatura de desplegamiento (D'Amico et al., 2003). Esto se debe a que este tipo de proteínas en general, presentan centros activos mucho más abiertos que facilitan la entrada de los sustratos (Feller, 2013). Por tanto, es posible que las proteínas Pfa estén perdiendo su actividad catalítica a altas temperaturas debido a la desordenación del centro catalítico, aunque mantengan la estructura en la proteína.

Esta hipótesis está apoyada por los resultados de producción de DHA en presencia de chaperoninas psicrófilas. El hecho de que se incremente el contenido en DHA en la cepa *Arctic express* transformada con pLGR13 podría indicar que las proteínas sobreexpresadas estarían plegándose adecuadamente auxiliadas por las chaperoninas Cpn10 y Cpn60 (**Figura 28**).

En conclusión, la mejora de la síntesis de DHA se ha realizado mediante la sustitución de los promotores nativos que dirigen la expresión de los genes *pfa*. Además, se ha determinado que la temperatura óptima de síntesis de DHA es de 15 °C debido a que la actividad del complejo Pfa es máxima a esa temperatura, e indetectable a 25 °C.

5.2. Mejora de la disponibilidad de sustrato para Pfa

La principal meta de este trabajo es obtener una cepa de *E. coli* con una capacidad mejorada de producir DHA. En estudios previos, se ha sugerido la existencia de un mecanismo de competición por sustrato entre el sistema de síntesis de DHA (Pfa) y el sistema de síntesis de ácidos grasos canónico de la bacteria (FAS) (Hauvermale et al., 2006; Naoki Morita, Nishida, et al., 2005; Wan et al., 2016). Esto se debe a que el malonil-CoA y el acetil-CoA son los sustratos de ambas rutas, ya que se utilizan la misma reacción inicial de condensación de Claisen mediada por cetosintasas.

Se ha descrito que el uso de concentraciones subinhibitorias de cerulenina alteran parcialmente la actividad KS de FabB y FabF del sistema FAS, lo que, consecuentemente, incrementa la concentración intracelular de malonil-CoA disponible para otras rutas metabólicas (van Summeren-Wesenhagen y Marienhagen, 2015). Adicionalmente, se ha publicado que la cerulenina no inhibe la actividad del sistema Pfa procedente de *Thraustochytrium sp.* en la producción heteróloga de LC-PUFA en *E. coli* (Hauvermale et al., 2006). De modo que parece que el sistema Pfa utiliza el malonil-CoA intracelular para la producción de DHA, cuya disponibilidad incrementa cuando la ruta canónica FAS está parcialmente bloqueada.

Los resultados *in vivo* mostrados en este trabajo (**sección 4.1.5.2**) sugieren que el incremento de la producción de DHA en el mutante $\Delta fabH$ (**Figura 24**) podría deberse a un efecto similar al de la cerulenina. En ambos casos, la ruta de síntesis de ácidos grasos FAS está alterada, lo cual provoca una acumulación de sustratos. Esto podría indicar que la disponibilidad de malonil-CoA es un cuello de botella para la producción de DHA en el sistema heterólogo. Como se muestra en el modelo (**Figura 36**), los datos sugieren que existe un mecanismo de competición por sustrato entre los sistemas FAS y Pfa (Giner-Robles et al., 2018).

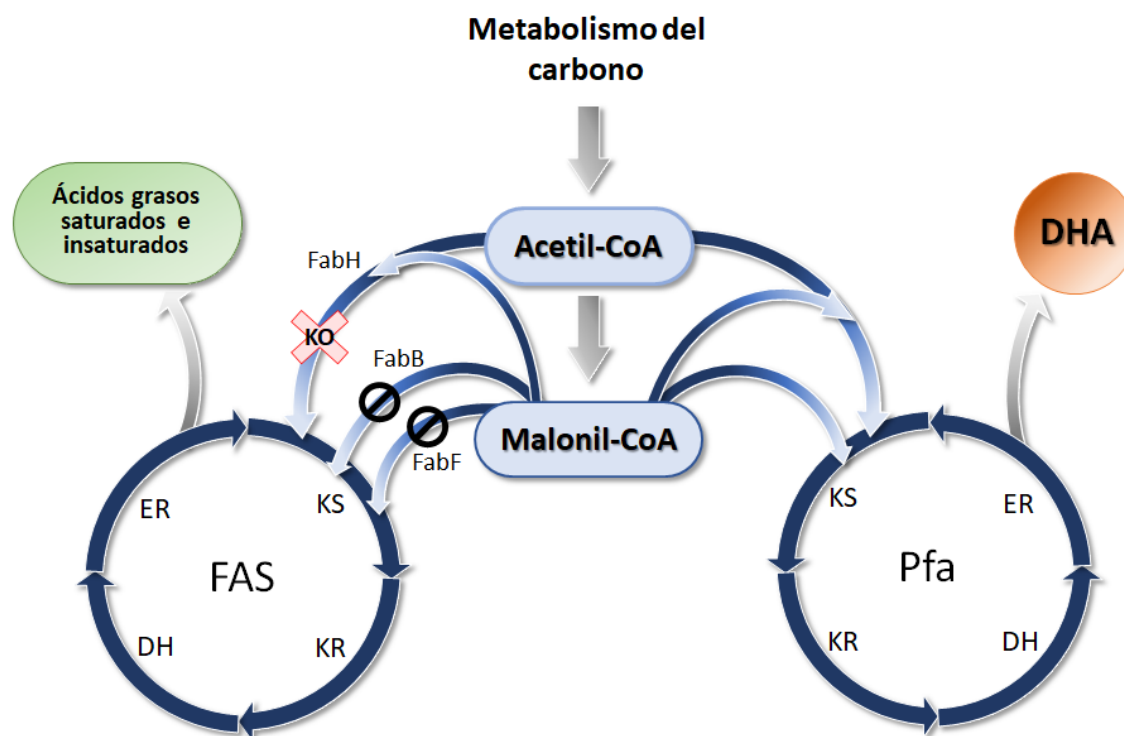


Figura 36. Esquema del modelo para la utilización metabólica de acetil-CoA y malonil-CoA por los sistemas de ácidos grasos canónico (FAS) y heterólogo (Pfa). En una célula portadora del sistema Pfa, se establece una competición entre las rutas biosintéticas FAS y Pfa por el malonil-CoA. Este sustrato es comúnmente consumido por la sintasa FAS para la producción de ácidos grasos saturados e insaturados mediante una serie de ciclo consecutivos compuestos por las reacciones de ceto síntesis (KS), ceto reducción (KR), deshidratación/isomerización (DH) y enoil reducción (ER). La inhibición parcial de la reacción inicial de KS mediante la adición de cerulenina (señal de bloqueo negra) o la deleción de *fabH* (cruz roja, KO) podría beneficiar a la producción de DHA debido a una disminución de los sustratos por la FAS, de forma que estos son redirigidos hacia la ruta biosintética de Pfa.

Como se ha mencionado en la introducción, FabH es la enzima responsable de la iniciación del primer ciclo de elongación en la ruta de síntesis de ácidos grasos. Cataliza la condensación de malonil-ACP y acetil-CoA para dar lugar a acetoacetyl-ACP. En ciclos posteriores, esta reacción es catalizada por FabB primero hasta ácido palmítico y palmitoleico, y FabF en los últimos ciclos de elongación hasta dar lugar al ácido cis-vaccénico (Edwards et al., 1997; Janßen y Steinbüchel, 2014). Sin embargo, *fabH* no es un gen esencial (Yao et al., 2012) a pesar de tener una actividad tan temprana en el ciclo, por lo que posiblemente *fabB* o *fabF* estén sustituyendo parcialmente esta actividad. De hecho, existen ensayos *in vitro* que describen una actividad secundaria de FabB y FabF en la que catalizan la descarboxilación de malonil-ACP y, posteriormente, la condensación de este con otra molécula de malonil-ACP (Alberts et al., 1972). Este efecto se ha observado *in vivo* en una cepa mutante de *Lactococcus lactis* a la que se le delecionó *fabH*, en la que se mantenía un 10% de actividad de síntesis de ácidos grasos (Lai y

Cronan, 2004). Cronan y Thomas (2009) también argumentan que la síntesis residual observada en *L. lactis* $\Delta fabH$ podría deberse a la actividad secundaria de FabB y FabF.

La actividad secuencial de las KS también explica por qué la delección de *fabH* tiene un impacto mayor sobre la síntesis de DHA (aumento de 4 veces respecto al control) que la inhibición por cerulenina (aumento de 2,8 veces). Curiosamente, la delección de *fabF* no tuvo un efecto notable sobre la producción de DHA (**Figura 25A**), probablemente debido a que la presencia de ácido vaccénico no es esencial (Garwin et al., 1980), y que en ese punto de la ruta metabólica disminuye la cantidad de malonil-CoA consumido.

El análisis del resto de mutantes KEIO seleccionados muestra que la delección de genes implicados con la regulación del metabolismo de ácidos grasos no tuvo un impacto significativo sobre la síntesis de DHA. Los reguladores transcripcionales FabR, FadR y RpoS, así como PhoB y PhoP, coordinan la biosíntesis y degradación de ácidos grasos en respuesta a la situación energética de la célula (Janßen y Steinbüchel, 2014). Por ello, cabría esperar que la eliminación de alguno de estos reguladores tuviese un impacto sobre la síntesis de DHA. Sin embargo, ninguno de ellos alteró significativamente el contenido en DHA de las células. Tan sólo se puede especular que, debido a la estricta regulación de las rutas metabólicas de los ácidos grasos, probablemente existen varios niveles de regulación, y que estos modulan las distintas enzimas clave de las rutas que responden al estatus energético de la célula (My et al., 2013).

Otro aspecto llamativo de estos resultados fue en el mutante relacionado con la degradación de ácidos grasos. Se seleccionó *fadE* con la intención de reducir la degradación general de ácidos grasos, ya que FadE es la enzima inicial de la β -oxidación encargada de catalizar la oxidación de las moléculas de acil-CoA mediante la introducción de un grupo enoil en la cadena. Previamente, se había descrito que la delección de *fadE* provoca la acumulación de compuestos acil-CoA debido a su incapacidad de degradarlos (Dirusso et al., 1999; Campbell y Cronan, 2002). Probablemente, el efecto más impactante de esta delección se encuentre en la acumulación de lípidos totales (no analizado), en lugar de en el cambio de la composición del perfil de ácidos grasos. En consecuencia, el contenido relativo de DHA se mantiene estable.

A pesar del incremento en la síntesis de DHA, la delección de *fabH* presenta un hándicap importante: la disminución de la tasa de crecimiento de la bacteria. Los datos de cuantificación indican que la productividad total de las cepas mutantes incrementa, a pesar de la disminución en el crecimiento (**Figura 22C-D**). Sin embargo, es necesario incrementar la capacidad de crecimiento de estas células y que la acumulación de biomasa sea aceptable para que el proceso industrial sea viable. Por ello, se propone realizar mutantes condicionales, de forma que tan solo

se disminuya la expresión de ciertos genes en condiciones óptimas para la síntesis de DHA. Otra opción sería insertar en la célula un sistema interferente (como ARN interferente o el sistema “deadCRISPR”) de forma que se reduzca en un momento determinado la producción de enzimas de síntesis de ácidos grasos como FabH, FabB, FabF o FabD, así como enzimas de la β -oxidación como FadE/FadH, con el objetivo de maximizar los flujos de sustrato en dirección a la síntesis de DHA, así como reducir su degradación durante la fase de síntesis de DHA.

En conclusión, los datos obtenidos en este ensayo sugieren que para incrementar la concentración intracelular de malonil-CoA es necesario interceptar la ruta metabólica en las reacciones iniciales de condensación de la ruta, o incluso antes, momento en el que el sustrato se une a la ACP y queda determinado hacia la síntesis de ácidos grasos canónica. Siendo FabH la única enzima no esencial en la iniciación de la síntesis de ácidos grasos, la convierte en una buena diana para la alteración de esta ruta metabólica.

5.3. Mejora de la producción de biomasa

Uno de los datos más importantes en un sistema de producción microbiológico industrial es el balance óptimo entre la producción de biomasa, la producción de metabolito de interés y el tiempo mínimo necesario para ello.

5.3.1. Determinación de la fase óptima de producción de DHA

Por ello, en primer lugar, se determinó la fase de crecimiento óptima para la síntesis de DHA. En la **Figura 26** se observa que el máximo contenido en DHA del cultivo es al final de la fase exponencial. Zhang y Rock (2008) escriben que “no existe un destino alternativo considerable para los ácidos grasos en la mayoría de bacterias, ya que todos los ácidos grasos de cadena larga producidos por la ruta FAS son incorporados a las membranas”. Esto podría indicar que el destino del DHA está asociado a la síntesis de membrana celular, y por ello, la acumulación de DHA tan sólo es activa durante la división celular.

Además, se observa que el porcentaje de DHA disminuye a medida que avanza la fase estacionaria, lo cual podría indicar que el DHA está siendo modificado o degradado por enzimas específicos de la fase estacionaria. Durante esta fase estacionaria, se producen múltiples cambios provocados por la expresión del factor sigma específico de esta fase, RpoS, con el objetivo de preparar a la célula para la supervivencia. Uno de los principales procesos es la reducción de la división celular y el enanismo (Nyström, 2004). El enanismo produce células esféricas y más pequeñas mediante un proceso de autodigestión, en la que se utiliza material procedente de la envuelta como fuente de carbono y energía (Reeve et al., 1984). Este cambio

en el metabolismo entre ambas fases de crecimiento podría explicar porque el DHA se acumula durante la fase exponencial de crecimiento, en la que se sintetiza la membrana y el DHA se incorpora activamente en los fosfolípidos, así como la disminución del ácido graso durante la fase estacionaria, en la que es utilizado para mantener a la célula en funcionamiento.

Esta reflexión está apoyada por el ensayo de crecimiento seguido por un periodo de producción (**apartado 4.2.1**). Durante la fase de obtención de biomasa a 37 °C se consiguió acumular un gran número de células, las cuales se concentraron. Este proceso de concentración paró la división celular. Posteriormente, se añadió el inductor de la expresión de los genes *pfa* y se disminuyó la temperatura de incubación. El resultado de la expresión de estos genes a baja temperatura fue ausencia de DHA en las muestras. Esto se debe a que las células no se dividieron durante la fase de inducción, por lo que la ausencia de DHA en la membrana apoya la hipótesis de que es necesario que la membrana esté en formación o remodelación durante la síntesis de DHA, con el objetivo de que este sea utilizado como sustrato en la síntesis de fosfolípidos de membrana y así quedar protegido frente a los procesos degradativos de la célula.

Por tanto, el DHA, al igual que sucede el resto de ácidos grasos de *E. coli*, el DHA tan sólo tiene dos destinos en la célula: bien formar parte de los fosfolípidos de membrana, o bien ser degradado.

5.3.2. Optimización del crecimiento de *E.coli* a baja temperatura

Una vez determinada la temperatura y fase de crecimiento adecuada para la síntesis de DHA, se propuso optimizar la producción de biomasa. Como se ha visto, la síntesis de DHA se lleva a cabo efectivamente por debajo de 25 °C, siendo su producción óptima a 15 °C. La producción de biomasa a esta temperatura es bastante limitada debido a las dificultades que tienen las bacterias mesófilas de crecer por debajo de los 25 °C. En estas bacterias, la actividad chaperona es un factor limitante debido a que se inactivan los sistemas GroEL/GroES (Ferrer et al., 2003); por ende, disminuye la actividad de las proteínas *housekeeping* de *E. coli* (Strocchi et al., 2006). Por otro lado, el sistema Pfa utilizado en este trabajo procede de una bacteria psicrófila. Diversos autores sugieren que para una síntesis adecuada de proteínas de origen psicrófilo es necesario que la formación de las proteínas se lleve a cabo en condiciones de temperatura que aseguren el correcto plegamiento y, por ello, que permita mantener la actividad y la integridad estructural (Bjerga et al., 2016).

Por ello, se optó por implementar una estrategia de bioingeniería en la que se ha convertido *E. coli* en un hospedador psicrófilo. Esta táctica ha consistido en introducir un sistema de

chaperoninas de origen psicrófilo en *E. coli*, Cpn10 y Cpn60 de *O. antarctica* (Ferrer et al., 2004; Ferrer et al., 2003), de forma que estas enzimas complementen la actividad de GroEL/GroES reducida por la baja temperatura. Los ensayos de síntesis de DHA y capacidad de crecimiento en presencia de estas proteínas indican que hay una mejora en la velocidad de crecimiento y una mayor síntesis de DHA a 15 °C y 20 °C (**Figura 28**). Por tanto, los resultados parecen indicar que la velocidad metabólica de *E. coli* ha mejorado debido a un incremento de capacidad de plegamiento de proteínas. Por ello, el incremento de la síntesis del contenido en DHA puede deberse tanto a que incrementa la disponibilidad de sustratos y cofactores debido a una mayor actividad de las rutas anabólicas del carbono, como la glicólisis y el ciclo de Krebs.

5.4. Acumulación de producto final

En el apartado anterior, así como en la introducción se ha explicado que el único destino posible en una bacteria no oleogénica como *E. coli* es la incorporación del DHA en los fosfolípidos de membrana (Zhang y Rock, 2008). Con el objetivo de proteger y acumular el producto final se han utilizado dos herramientas biotecnológicas claves en diversos estudios de producción de lípidos a gran escala.

5.4.1. Acumulación de DHA en triacilglicéridos

La primera estrategia ha consistido en introducir la enzima DGAT de *Thermomonospora curvata* con el objetivo de sintetizar triacilglicéridos ricos en PUFA, es decir, almacenar DHA en forma de TAG. Anteriormente, ya se había conseguido sintetizar TAG mediante expresión heteróloga en *E. coli* de esta enzima a 37 °C utilizando el sistema de expresión T7 en la cepa de *E. coli* C41 (Lázaro, 2016; Lázaro et al., 2017). Sin embargo, no se consiguió detectar DHA en los TAG al coexpresar ambos sistemas.

Dado que el complejo Pfa parece no ser activo por encima de los 20 °C, en este trabajo se ha desarrollado un sistema en el que se ha conseguido acumular una pequeña proporción de TAG a 15 °C utilizando el sistema pBAD para expresar la enzima tDGAT en la cepa *E. coli* BW27783 (Figura 29). Además, se ha expresado el sistema Pfa junto con la tDGAT con el objetivo de introducir el DHA producido en los TAG. Los análisis de GC indicaron que, a pesar de estar produciéndose DHA, este no se encuentra entre los ácidos grasos que componen los TAG; es más, no se encuentra en ninguno de los lípidos neutros analizados. Por tanto, con toda probabilidad el DHA está siendo usado para la síntesis de fosfolípidos.

Uno de los principales resultados de esta sección es la ausencia de DHA en los TAG. Se han planteado distintas explicaciones para este resultado. En primer lugar, los resultados recogidos en la **Tabla 6** sugieren que la tDGAT no utiliza DHA como sustrato, puesto que los TAG están compuesto mayoritariamente por ácido mirístico, palmítico, palmitoleico y cis-vaccénico, de igual forma que se describió previamente a 25 °C (Lázaro, 2016). Esto podría deberse a que la enzima no es capaz de utilizar DHA como sustrato bien por el tamaño de la cadena, o bien por el número de insaturaciones. Es decir, la conformación tridimensional del DHA podría provocar dificultades en el acceso de la molécula al centro activo de la tDGAT, y por tanto, ausencia de actividad catalítica sobre este ácido graso. Por ello, sería necesario realizar otros experimentos que ayuden a determinar el rango de sustratos de la tDGAT.

Alternativamente a la hipótesis de la especificidad de sustrato, una explicación podría ser la ausencia de actividad Acil-CoA Sintetasa (ACS) sobre DHA. Las DGAT utilizan ácidos grasos activados, es decir, una enzima ACS añade un grupo CoA a la molécula de FFA, de manera que la forma activada puede ser utilizada en distintas rutas metabólicas. Se ha descrito que las ACS presentan un rango estrecho de sustrato sobre los que actúan, por tanto, es probable que *E. coli* no contenga una enzima ACS capaz de activar DHA (Metz et al., 2009).

Además de no conseguir proteger el DHA en TAG, los resultados de GC sobre los cultivos indican que la presencia de tDGAT en células que expresan el sistema Pfa provoca un descenso del contenido en DHA (**Figura 30B**). En ausencia de tDGAT, el sustrato disponible se distribuye entre el sistema FAS y el sistema Pfa para sintetizar ácidos grasos de cadena media-larga y DHA respectivamente, que se incorporan a los fosfolípidos de membrana. En presencia de la tDGAT, los productos sintetizados por el complejo FAS se utilizan para sintetizar tanto fosfolípidos como TAG, mientras que el DHA tan solo puede dirigirse hacia la síntesis de fosfolípido. Por ello, podría haber un efecto sumidero de los ácidos grasos producidos por la FAS, que provoque un incremento de la síntesis de estos. Esto incrementaría el consumo de sustrato libre, redirigiendo el flujo de sustratos hacia la síntesis de ácidos grasos de FAS. En consecuencia, debido a la competición por sustrato (**Figura 36**), la síntesis de DHA se vería reducida (6% vs 3%) por escasez de malonil-CoA disponible.

Por tanto, es necesario corregir la capacidad de la tDGAT de utilizar DHA, o bien sustituir esta enzima por otras con un mayor rango de especificidad de sustrato y que presente mayor actividad a 15 °C.

5.4.2. Secreción del DHA al medio

La segunda estrategia de acumulación y protección de DHA ha consistido en utilizar una tioesterasa para acumular el ácido graso en forma de FFA en el citoplasma o en el exterior de la célula. Para ello, se ha identificado una enzima tioesterasa mediante análisis de secuencia con una tioesterasa activa sobre LC-PUFA previamente descrita por Rodríguez-Guilbe et al. (2013). Por tanto, se plantea la hipótesis de que la proteína codificada por el ORF7 en *M. marina* podría ser una enzima tioesterasa activa sobre LC-PUFA, y, en consecuencia, su expresión incrementaría la concentración de DHA libre en el citoplasma de la célula, o en el medio externo.

A pesar de la prometedora perspectiva de clonar y sobreexpresar la tioesterasa en *E. coli* junto con los genes *pfa*, los datos de cromatografía de gases, electroforesis SDS-PAGE y TLC (**Figura 33**), indican que, aunque se observa expresión de la proteína, la co-expresión de ambos plásmidos afecta a la producción de DHA y reduce la presencia de FFA en el citoplasma y en el exterior de la célula. Se han planteado varias opciones que podrían explicar este efecto. Desde que la tioesterasa no sea activa en las condiciones experimentales testadas, hasta que no utilice DHA como sustrato. También es posible que la cepa no secrete correctamente los FFA o que la acumulación sea insuficiente para hacer notorio este eflujo. Como control experimental, debería haberse utilizado una tioesterasa previamente testada, como la tioesterasa citosólica 'TesA (Cho y Cronan, 1995) o la tioesterasa de *P. profundum* (Rodríguez-Guilbe et al., 2013), con el objetivo de comprobar el efecto de la sobreexpresión de este tipo de enzima en BW-pDHA4.

Un dato curioso extraído de estos ensayos es que, en ausencia de la tioesterasa (BW-pLGR13), no se observa un efecto negativo sobre la síntesis de DHA respecto a los datos de cultivos en presencia de la tioesterasa (BW-pDHA4) (**Figura 17**). Esto podría indicar que la tioesterasa no es esencial para la liberación del ácido graso del complejo Pfa, tal y como sucede en *P. profundum* cuando se deleta la tioesterasa ORF6 (Oyola-Robles et al., 2014). Por tanto, la liberación del DHA se debe producir por otros mecanismos (Oyola-Robles et al., 2014; Yoshida et al., 2016) (**sección 1.2.4, "Síntesis de LC-PUFA"**)

Por tanto, sólo cabe concluir que ambas aproximaciones han sido una prueba de concepto con la intención de mejorar la síntesis y recuperación de DHA en este sistema. Sin duda, es necesario continuar caracterizando estas proteínas y sus propiedades físicas, químicas y enzimáticas antes de poder continuar con esta estrategia.

Por otro lado, dada la ineficiencia de las ambas aproximaciones descritas, una posible alternativa para incrementar la acumulación de DHA en la célula podría ser explotar los mecanismos endógenos de la propia bacteria hospedadora; es decir, mejorar la inserción del

DHA en los fosfolípidos o incrementar la cantidad de fosfolípidos totales en la célula. Existen cepas de *E. coli* con un mayor sistema membranosos (Carranza et al., 2017), en las que se podría introducir el sistema heterólogo Pfa. Esto permitiría incrementar el contenido lipídico total, y consecuentemente, el DHA total de la célula.

5.5. Evolución natural de un sistema de síntesis de DHA

El último de los objetivos tiene como reto conseguir una mejora general del sistema de producción de DHA; es decir, una optimización de los parámetros de crecimiento y producción como son la capacidad de síntesis de DHA, la velocidad de crecimiento de la bacteria, y la acumulación de DHA en la célula.

En este trabajo, se ha optado por llevar a cabo una evolución de las cepas. En una estrategia de evolución, se busca inducir la acumulación de mutaciones en el genoma de forma que se incremente la diversidad genética poblacional, esto se traduzca en una diversidad fenotípica poblacional.

Entre los distintos mutantes generados, es necesario seleccionar aquellos cuyo fenotipo sea de interés para los objetivos del experimento. Por ello, se ha realizado un primer ensayo en el que se ha investigado cuales son las condiciones que generan una ventaja selectiva a las bacterias capaces de sintetizar DHA. Utilizando conocimientos previos, se hipotetizó que una baja temperatura podría favorecer la presencia de DHA y otros LC-PUFA, ya que los LC-PUFA podrían jugar un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana en a esta temperatura (Yoshida et al., 2016), y porque es la temperatura óptima de síntesis de DHA en el sistema en estudio. Asimismo, mediante la explotación de la competición por sustrato de los dos sistemas de síntesis de ácidos grasos FAS y Pfa descrita previamente en el **apartado 4.1.5** de los resultados y argumentado en el **apartado 5.2** de la discusión, es previsible que aquellas cepas con mayor capacidad de sintetizar ácidos grasos mediante sistemas alternativos, como el DHA, crecerán más deprisa en condiciones de inhibición de la síntesis de ácidos grasos bien sea mediante el uso de cerulenina o la delección de *fabH*.

En el ensayo de competición descrito en el **apartado 4.4.1** de los resultados se testaron ambos parámetros, temperatura e inhibición parcial de FAS. Los resultados indican que aplicando unas condiciones que restrinjan la actividad de la FAS, por ende, el crecimiento o división de celular, favorecen la selección de células con mayor capacidad de producir ácidos grasos en estas condiciones.

En las condiciones descritas, la cerulenina inhibe el crecimiento celular de ambas cepas debido a que se disminuye la capacidad de sintetizar ácidos grasos, actividad que determina la

Discusión

velocidad de crecimiento y el tamaño celular (Yao et al., 2012). Es decir, posiblemente tan solo las células capaces de formar fosfolípidos de membrana pueden dividirse. Por ello, en las células portadoras del plásmido pDHA4, el crecimiento es ligeramente mayor debido a la presencia de un segundo sistema de síntesis de ácidos grasos, el sistema Pfa, que le permite sintetizar DHA e introducirlo en los fosfolípidos de membrana en ausencia de síntesis de otros ácidos grasos. Así, las células con el segundo sistema de síntesis de ácidos grasos tienen una ventaja frente a las células que tan solo contienen el sistema FAS. Es por ello que cabría esperar que, cuanto más activo sea el sistema Pfa y mayor cantidad de moléculas de DHA sintetice, mayor será su ventaja en condiciones ambientales que restrinjan la síntesis de ácidos grasos FAS.

Por tanto, se ha encontrado las condiciones óptimas para la forzar la autoselección de las cepas con mayor capacidad de síntesis de DHA.

6. CONCLUSIONES

- o Los promotores nativos de *M. marina* clonados en el plásmido pDHA4 presentan una expresión diferencial a distintas temperaturas, siendo la mayor expresión de estos genes a 15 °C.
- o La sustitución de los promotores nativos por promotores fuertes inducibles implica un incremento de la expresión, independiente de la temperatura. Este incremento de la cantidad de ARN mensajero supone un aumento de la cantidad de proteínas Pfa, lo que explica el incremento en la producción de DHA a 15 °C.
- o La ausencia de DHA a 25 °C se debe a una disminución de la actividad enzimática del complejo Pfa.
- o La fase óptima de producción de DHA es la fase exponencial debido a que el DHA se introduce en los fosfolípidos de membrana durante la división activa de las células.
- o La introducción de chaperoninas psicrofílicas en la célula mejora la capacidad metabólica de la célula a baja temperatura, incrementando la actividad enzimática mediante el correcto plegamiento tanto de las proteínas en la célula.
- o La delección de la cetosintasa FabH provoca una acumulación de sustrato que el complejo Pfa utiliza para la síntesis de DHA, en un mecanismo similar al modo de acción de la cerulenina. En esta situación, se alivia la competición por sustrato entre el sistema heterólogo Pfa y el sistema canónico FAS.
- o Las estrategias de secreción y acumulación de ácidos grasos no han conseguido incrementar el contenido de DHA de los cultivos.
- o Los ensayos de competición indican que la presencia del complejo Pfa, y, por ende, la síntesis de DHA, suponen una ventaja ecológica en condiciones en las que la ruta FAS está alterada. Esto se debe a la capacidad de las células que contienen la ruta metabólica heteróloga alternativa, Pfa, de sintetizar nuevos ácidos grasos a pesar del bloqueo de la ruta canónica.

7. REFERENCIAS

- Abedi, E., Sahari, M. A.** (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science & Nutrition*, 2(5), 443–63.
- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., Schenk, P. M.** (2012). Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 96.
- Alberts, A., Bell, R., Vagelos, P.** (1972). Acyl carrier protein. XV. Studies of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3190–3198.
- Allemann, M. N., Allen, E. E.** (2018). *Characterization and Application of Marine Microbial Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 605).
- Allen, E. E., Bartlett, D. H.** (2002). Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Microbiology*, 148, 1903–1913.
- Amiri-Jami, M., LaPointe, G., Griffiths, M. W.** (2014). Engineering of EPA/DHA omega-3 fatty acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), 3071–3080.
- Apt, K. E., Pfeifer, J. W., Hansen, J. M., Behrens, P.W., Zirkle, R., Stahl, T. L.** (2010). Patente internacional n^o. WO2010/107415 A1. Oficina de patentes de Estados Unidos.
- Armougom, F., Moretti, S., Poirot, O., Audic, S., Dumas, P., Schaeli, B., Notredame, C.** (2006). Espresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server), W604–W608.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Mori, H.** (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.0008.
- Battesti, A., Bouveret, E.** (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1048–1063.
- Battesti, A., Majdalani, N., Gottesman, S.** (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 189–213.
- Bell, M., Tocher, D.R.** (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: General pathways and new directions. In *Biomedical and Life Sciences* (pp. 211–236).
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Henderson, R. J., Dick, J. R., Crampton, V. O.** (2003). Altered fatty acid

- compositions in atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2793–2801.
- Bergler, H., Fuchsbichler, S., Högenauer, G., Turnowsky, F.** (1996). The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (FabI) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 689–94.
- Bianchi, A. C., Olazábal, L., Torre, A., Loperena, L.** (2014). Antarctic microorganisms as source of the omega-3 polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 1869–1878.
- Bjerga, G. E. K., Lale, R., Williamson, A. K.** (2016). Engineering low-temperature expression systems for heterologous production of cold-adapted enzymes. *Bioengineered*, 7(1), 33–8.
- Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F., Rawlings, R. R.** (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), 950–62.
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J., Cunnane, S. C.** (2009). α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80(2–3), 85–91.
- Burns, C. P., Luttenegger, D. G., Dudley, D. T., Buettner, G. R., Spector, A. A.** (1979). Effect of modification of plasma membrane fatty acid composition on fluidity and methotrexate transport in L1210 murine leukemia cells. *Cancer Research*, 39(5), 1726–32.
- Canhada, S., Castro, K., Perry, I. S., Luft, V. C.** (2017). Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutritional Neuroscience*, 1–10.
- Carranza, G., Angius, F., Iliaia, O., Solgadi, A., Miroux, B., Arechaga, I.** (2017). Cardiolipin plays an essential role in the formation of intracellular membranes in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(6), 1124–1132.
- Chan, D. I., Vogel, H. J.** (2010). Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal*, 430(1), 1–19.
- Cho, H., Cronan, J. E.** (1995). Defective export of a periplasmic enzyme disrupts regulation of fatty acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4216–9.
- Choi-Rhee, E., Cronan, J. E.** (2003). The biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*,

- 278(33), 30806–12.
- Clark, D. P., DeMendoza, D., Polacco, M. L., Cronan, J. E.** (1983). .beta.-hydroxydecanoyl thioester dehydrase does not catalyze a rate-limiting step in *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis. *Biochemistry*, 22(25), 5897–5902.
- Corsetto, P. A., Colombo, I., Kopecka, J., Rizzo, A. M., Riganti, C.** (2017). ω-3 long chain polyunsaturated fatty acids as sensitizing agents and multidrug resistance revertants in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2770.
- Costantini, L., Molinari, R., Farinon, B., Merendino, N.** (2017). Impact of Omega-3 fatty acids on the gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).
- Crawford, M. A., Golfetto, I., Ghebremeskel, K., Min, Y., Moodley, T., Poston, L., Schmidt, W.** (2003). The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. *Lipids*, 38(4), 303–315.
- Cronan, J. E., Birge, C. H., Vagelos, P. R.** (1969). Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 100, 601–4.
- Cronan, J. E., Thomas, J.** (2009). Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods in Enzymology*, 459, 395–433.
- D’Agnolo, G., Rosenfeld, I. S., Vagelos, P. R.** (1975). Multiple forms of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthetase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 250, 5289–94.
- D’amico, S., Marx, J.-C., Gerday, C., Feller, G.** (2003). Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 7891-96.
- Datsenko, K. A., Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.
- Davies, C., Heath, R. J., White, S. W., Rock, C. O.** (2000). The 1.8 Å crystal structure and active-site architecture of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Escherichia coli*. *Structure*, 8(2), 185–95.
- Davis, M. S., Solbiati, J., Cronan, J. E.** (2000). Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(37), 28593–8.
- de Swaaf, M. E., de Rijk, T. C., van der Meer, P., Eggink, G., Sijtsma, L.** (2003). Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by ¹³C labelling and desaturase inhibitor experiments. *Journal of Biotechnology*, 103(1), 21–9.

- Delong, E. F., Yayanos, A. A.** (1986). Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(4), 730–7.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Notredame, C.** (2011). T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl), W13–W17.
- Dillon, S. C., Bateman, A.** (2004). The Hotdog fold: wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. *BMC Bioinformatics*, 5, 109.
- Dirusso, C. C., Black, P. N., Weimar, J. D.** (1999). Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Progress in Lipid Research*, 38, 129–197.
- Dowhan, W.** (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why Are There So Many Lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 199–232.
- Edwards, P., Nelsen, J. S., Metz, J. G., Dehesh, K.** (1997). Cloning of the *fabF* gene in an expression vector and in vitro characterization of recombinant *fabF* and *fabB* encoded enzymes from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 402(1), 62–6.
- Elbahloul, Y., Steinbüchel, A.** (2010). Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered *Escherichia coli* strain harboring the p(Microdiesel) plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4560–4565.
- FAO** (2008). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO food and nutrition paper*, 91.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department; Fishery and Aquaculture Economics and Policy Division** (2010) State of World Fisheries and Aquaculture. FAO.
- Feller, G.** (2013). Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica*, 2013(512840), 1–28.
- Feng, Y., Cronan, J. E.** (2009). *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis: complex transcription of the *fabA* gene and *in vivo* identification of the essential reaction catalyzed by FabB. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29526–29535.
- Feng, Y., Cronan, J. E.** (2012). Crosstalk of *Escherichia coli* FadR with global regulators in expression of fatty acid transport genes. *PLoS ONE*, 7(9), e46275.
- Fernandez-Lopez, R., Del Campo, I., Revilla, C., Cuevas, A., de la Cruz, F.** (2014). Negative feedback and transcriptional overshooting in a regulatory network for horizontal gene

- transfer. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004171.
- Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Timmis, K. N.** (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1266–1267.
- Ferrer, M., Lünsdorf, H., Chernikova, T. N., Yakimov, M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2004). Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: life in the cold. *Molecular Microbiology*, 53(1), 167–182.
- Flock, M. R., Rogers, C. J., Prabhu, K. S., Kris-Etherton, P. M.** (2013). Immunometabolic role of long-chain omega-3 fatty acids in obesity-induced inflammation. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29(6), 431–445.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K.** (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829–839.
- Galano, J.-M., Lee, J. C.-Y., Gladine, C., Comte, B., Le Guennec, J.-Y., Oger, C., Durand, T.** (2015). Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of adrenic, docosahexaenoic, eicosapentaenoic and α -linolenic acids; bioactivities and potential use as biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 446–455.
- Garwin, J. L., Klages, A. L., Cronan, J. E.** (1980). Structural, enzymatic, and genetic studies of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases I and II of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11949–56.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–607). Totowa, NJ: Humana Press.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., Smith, H. O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345.
- Gigliotti, J. C., Davenport, M. P., Beamer, S. K., Tou, J. C., Jaczynski, J.** (2011). Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Food Chemistry*, 125(3), 1028–1036.
- Giner-Robles, L., Lázaro, B., de la Cruz, F., Moncalián, G.** (2018). *fabH* deletion increases DHA

- production in *Escherichia coli* expressing Pfa genes. *Microbial Cell Factories*, 17(88), 1–9.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4645–9.
- Gutstein, A. S., Copple, T.** (2017). Cardiovascular disease and omega-3s: Prescription products and fish oil dietary supplements are not the same. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(12), 791–801.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., Beckwith, J.** (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *Journal of Bacteriology*, 177(14), 4121–4130.
- Hart, A., Tjonneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Bergmann, M. M., Boeing, H., Kennedy, H.** (2009). Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: A nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut*, 58(12), 1606–1611.
- Harwood, J. L.** (1988). Fatty Acid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 101–138.
- Hauvermale, A., Kuner, J., Rosenzweig, B., Guerra, D., Diltz, S., Metz, J. G.** (2006). Fatty acid production in *Schizochytrium sp.*: Involvement of a polyunsaturated fatty acid synthase and a type I fatty acid synthase. *Lipids*, 41(8), 739–747.
- Hayashi, S., Satoh, Y., Ujihara, T., Takata, Y., Dairi, T.** (2016). Enhanced production of polyunsaturated fatty acids by enzyme engineering of tandem acyl carrier proteins. *Scientific Reports*, 6, 35441.
- Heath, R. J., Rock, C. O.** (1996). Roles of the FabA and FabZ beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratases in *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27795–801.
- Henry, M. F., Cronan, J. E.** (1991). *Escherichia coli* transcription factor that both activates fatty acid synthesis and represses fatty acid degradation. *Journal of Molecular Biology*, 222(4), 843–9.
- Ichihara, K., Fukubayashi, Y.** (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *The Journal of Lipid Research*, 51(3), 635–640.
- Jackowski, S., Jackson, P. D., Rock, C. O.** (1994). Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(4), 2921–8.

- Janßen, H. J., Steinbüchel, A.** (2014). Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 7.
- Jenke-Kodama, H., Sandmann, A., Müller, R., Dittmann, E.** (2005). Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Molecular Biology and Evolution*, 22(10), 2027–2039.
- Jenkins, D. J. A., Sievenpiper, J. L., Pauly, D., Sumaila, U. R., Kendall, C. W. C., Mowat, F. M.** (2009). Are dietary recommendations for the use of fish oils sustainable? *Canadian Medical Association Journal*, 180(6), 633–7.
- Jiang, H., Zirkle, R., Metz, J. G., Braun, L., Richter, L., Van Lanen, S. G., Shen, B.** (2008). The role of tandem acyl carrier protein domains in polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 130(20), 6336–6337.
- Joshi, V. C., Wakil, S. J.** (1971). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis: XXVI. Purification and properties of malonyl-coenzyme A—Acyl carrier protein transacylase of *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 143(2), 493–505.
- Kaliannan, K., Wang, B., Li, X.-Y., Kim, K.-J., Kang, J. X.** (2015). A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Scientific Reports*, 5, 11276.
- Kautharapu, K. B., Rathmacher, J., Jarboe, L. R.** (2013). Growth condition optimization for docosahexaenoic acid (DHA) production by *Moritella marina* MP-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(7), 2859–2866.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. E.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858.
- Kemena, C., Notredame, C.** (2009). Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the high-throughput era. *Bioinformatics*, 25(19), 2455–2465.
- Kennedy, E. P.** (1982). Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(4), 1092–5.
- Khlebnikov, A., Datsenko, K. A., Skaug, T., Wanner, B. L. B., Keasling, J. J. D.** (2001). Homogeneous expression of the PBAD promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity araE transporter. *Microbiology*, 147(12), 3241–3247.
- Lagarde, M.** (2008). Docosahexaenoic acid: Nutrient and precursor of bioactive lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(8), 673–678.

- Lai, C.-Y., Cronan, J. E.** (2004). Isolation and characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 186(6), 1869–78.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Walsh, C. T.** (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry Biology*, 3(11), 923–36.
- Lanza, V. F., de Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., Mora, A., Blanco, J., Coque, T. M., de la Cruz, F.** (2014). Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a New Method for Plasmid Reconstruction from Whole Genome Sequences. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004766.
- Lázaro, B.** (2016). Added-value oils in genetically engineered bacteria. Tesis doctoral. Universidad de Cantabria.
- Lázaro, B., Villa, J. A., Santín, O., Cabezas, M., Milagre, C. D. F., De La Cruz, F., Moncalián, G.** (2017). Heterologous expression of a thermophilic diacylglycerol acyltransferase triggers triglyceride accumulation in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(4), e0176520.
- Ledesma-Amaro, R., Dulermo, R., Niehus, X., Nicaud, J.-M.** (2016). Combining metabolic engineering and process optimization to improve production and secretion of fatty acids. *Metabolic Engineering*, 38, 38–46.
- Lee, J. H., O'Keefe, J. H., Lavie, C. J., Marchioli, R., Harris, W. S.** (2008). Omega-3 Fatty Acids for Cardioprotection. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(3), 324–332.
- Leibundgut, M., Maier, T., Jenni, S., Ban, N.** (2008). The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(6), 714–725.
- Lennen, R. M., Kruziki, M. A., Kumar, K., Zinkel, R. A., Burnum, K. E., Lipton, M. S., Pfleger, B. F.** (2011). Membrane stresses induced by overproduction of free fatty acids in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8114–28.
- Lennen, R. M., Politz, M. G., Kruziki, M. A., Pfleger, B. F.** (2013). Identification of transport proteins involved in free fatty acid efflux in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(1), 135–144.
- Li, D., Hu, X.** (2009). Fish and its multiple human health effects in times of threat to sustainability and affordability: are there alternatives? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 18(4), 553–63.
- Lin, H., Wang, Q., Shen, Q., Zhan, J., Zhao, Y.** (2013). Genetic engineering of microorganisms for

- biodiesel production. *Bioengineered*, 4(5), 292–304.
- Liu, H., Yu, C., Feng, D., Cheng, T., Meng, X., Liu, W., Xian, M.** (2012). Production of extracellular fatty acid using engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 11, 41.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O., Cronan Jr, J. E. C.** (1993). Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*., 57(3).
- Maier, T., Leibundgut, M., Boehringer, D., Ban, N.** (2010). Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(03), 373–422.
- Maloy, S. R., Ginsburgh, C. L., Simons, R. W., Nunn, W. D.** (1981). Transport of long and medium chain fatty acids by *Escherichia coli* K12. *Journal of Biochemistry*, 256(8), 3735–3742.
- McGuire, K. A., Siggaard-Andersen, M., Bangera, M. G., Olsen, J. G., von Wettstein-Knowles, P.** (2001). β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] Synthase I of *Escherichia coli* : Aspects of the Condensation Mechanism Revealed by Analyses of Mutations in the Active Site Pocket [†]. *Biochemistry*, 40(33), 9836–9845.
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., Lopes Da Silva, T.** (2009). *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: A review. *Journal of Applied Phycology*, 21(2), 199–214.
- Meng, X., Shang, H., Zheng, Y., Zhang, Z.** (2013). Free fatty acid secretion by an engineered strain of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 35(12), 2099–103.
- Metz, J. G., Kuner, J., Rosenzweig, B., Lippmeier, J. C., Roessler, P., Zirkle, R.** (2009). Biochemical characterization of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Schizochytrium*: Release of the products as free fatty acids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 472–478.
- Metz, J. G., Roessler, P., Facciotti, P., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Browse, J.** (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*, 293(5528), 290–293.
- Moche, M., Schneider, G., Edwards, P., Dehesh, K., Lindqvist, Y.** (1999). Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6031–4.
- Moncalián G., De La Cruz, F., Villa J.A., Lázaro B., Cabezas M.** (2012). Patente española Nº ES201200967A, Oficina Española de Patentes.
- Morita, N., Nishida, T., Tanaka, M., Yano, Y., Okuyama, H.** (2005). Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria. *Biotechnology Letters*, 27, 389–393.

- Morita, N., Tanaka, M., Okuyama, H.** (2000). Biosynthesis of fatty acids in the docosahexaenoic acid-producing bacterium *Moritella marina* strain MP-1. *Biochemical Society Transactions*, 28, 943–945.
- Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Liston, A M., Goldman, C. R.** (2000). A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature*, 403(6765), 74–77.
- My, L., Rekoske, B., Lemke, J. J., Viala, J. P., Gourse, R. L., Bouveret, E.** (2013). Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabHDG* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3784–3795.
- Napier, J. A.** (2002). Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: A novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends in Plant Science*, 7(2), 51–54.
- Navarro Llorens, J. M., Tormo, A., Martínez-García, E.** (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 476–495.
- Nichols, D. S.** (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 1–7.
- Nishida, T., Hori, R., Morita, N., Okuyama, H.** (2010). Membrane eicosapentaenoic acid is involved in the hydrophobicity of bacterial cells and affects the entry of hydrophilic and hydrophobic compounds. *FEMS Microbiology Letters*, 306(2), 91–96.
- Nyström, T.** (2004). Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol*, 58, 161–81.
- Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T., Watanabe, K., Morita, N.** (2007). Bacterial genes responsible for the biosynthesis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their heterologous expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 665–670.
- Orikasa, Y., Nishida, T., Hase, A., Watanabe, K., Morita, N., Okuyama, H.** (2006). A phosphopantetheinyl transferase gene essential for biosynthesis of n-3 polyunsaturated fatty acids from *Moritella marina* strain MP-1. *FEBS Letters*, 580(18), 4423–4429.
- Orikasa, Y., Nishida, T., Yamada, A., Yu, R., Watanabe, K., Hase, A., Okuyama, H.** (2006). Recombinant production of docosahexaenoic acid in a polyketide biosynthesis mode in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 28(22), 1841–1847.
- Orikasa, Y., Tanaka, M., Sugihara, S., Hori, R., Nishida, T., Ueno, A., Okuyama, H.** (2009). *pfaB* products determine the molecular species produced in bacterial polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 295(2), 170–176.
- Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V., Lange, C. M.** (2007).

Referencias

- Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(20), 3229–3233.
- Oyola-Robles, D., Rullán-Lind, C., Carballeira, N. M., Baerga-Ortiz, A.** (2014). Expression of dehydratase domains from a polyunsaturated fatty acid synthase increases the production of fatty acids in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 55, 133–139.
- Packaged facts** (2012). The Global Market for EPA/DHA Omega-3 Products. Market report.
- Peng, Y.-F., Chen, W.-C., Xiao, K., Xu, L., Wang, L., Wan, X.** (2016). DHA production in *Escherichia coli* by expressing reconstituted key genes of polyketide synthase pathway from marine bacteria. *PloS One*, 11(9), e0162861.
- Posfai, G., Plunkett, G., Fehér, T., Frisch, D., Keil, G. M., Umenhoffer, K., Blattner, F. R.** (2006). emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*, 312(5776), 1044–1046.
- Price, A. C., Choi, K. H., Heath, R. J., Li, Z., White, S. W., Rock, C. O.** (2001). Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin: Structure and mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6551–6559.
- Pu, S., Khazanehei, H., Jones, P. J., Khafipour, E.** (2016). Interactions between obesity status and dietary intake of monounsaturated and polyunsaturated oils on human gut microbiome profiles in the Canola Oil Multicenter Intervention Trial (COMIT). *Frontiers in Microbiology*, 7, 1612.
- Raetz, C. R., Newman, K. F.** (1979). Diglyceride kinase mutants of *Escherichia coli*: inner membrane association of 1,2-diglyceride and its relation to synthesis of membrane-derived oligosaccharides. *Journal of Bacteriology*, 137(2), 860–8.
- Raghukumar, S.** (2008). Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies. *Marine Biotechnology*, 10(6), 631–640.
- Reeve, C. A., Bockman, A. T., Matin, A.** (1984). Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 157(3), 758–63.
- Robert, X., Gouet, P.** (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324.
- Rock, C. O., Cronan, J. E.** (1996). *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(1), 1–16.

- Rodríguez-Guilbe, M., Oyola-Robles, D., Schreiter, E. R., Baerga-Ortiz, A.** (2013). Structure, activity, and substrate selectivity of the Orf6 thioesterase from *Photobacterium profundum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10841–8.
- Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., Jarboe, L. R.** (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18), 8317–27.
- Ruffing, A. M.** (2014). Improved free fatty acid production in cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as host. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2, 17.
- Ryan, J., Farr, H., Visnovsky, S., Vyssotski, M., Visnovsky, G.** (2010). A rapid method for the isolation of eicosapentaenoic acid-producing marine bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1), 49–53.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd editio). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Santín, O.** (2017). Structural and biochemical characterization of proteins involved in the synthesis of triglycerides and polyunsaturated fatty acids. Tesis doctoral. Universidad de Cantabria.
- Santín, O., Moncalián, G.** (2018). Loading of malonyl-CoA onto tandem acetyl carrier protein domains of polyunsaturated fatty acid synthases. *Journal of Biological Chemistry*.
- Santos-Merino, M. del C.** (2017). *Ingeniería metabólica de Synechococcus elongatus PCC 7942*. Tesis doctoral. Universidad de Cantabria.
- Scaiola, E., Liverani, E., Belluzzi, A.** (2017). The imbalance between n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease: a comprehensive review and future therapeutic perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2619.
- Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J., Levy, B. D.** (2014). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2), a016311.
- Sharp, R. P., Gales, B. J., Sirajuddin, R.** (2017). Comparing the impact of prescription omega-3 fatty acid products on low-density lipoprotein cholesterol. *American Journal of Cardiovascular Drugs*.
- Shimizu, K.** (2013). Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites*, 4(1), 1–35.
- Shin, K. S., Kim, S., Lee, S. K.** (2016). Improvement of free fatty acid production using a mutant acyl-CoA thioesterase I with high specific activity in *Escherichia coli*. *Biotechnology for*

- Biofuels*, 9, 208.
- Shulze, C. N., Allen, E. E.** (2011). Widespread occurrence of secondary lipid biosynthesis potential in microbial lineages. *PLoS ONE*, 6(5), e20146.
- Simopoulos, A. P.** (2011). Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and disease: Evolutionary aspects of diet. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 102, 10–21.
- Stark, K. D., Van Elswyk, M. E., Higgins, M. R., Weatherford, C. A., Salem, N.** (2016). Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research*, 63, 132–152.
- Strocchi, M., Ferrer, M., Timmis, K. N., Golyshin, P. N.** (2006). Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: Insights from rescue by cold-adapted chaperones. *PROTEOMICS*, 6(1), 193–206.
- Studier, F., Moffatt, B.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Subrahmanyam, S., Cronan, J. E.** (1998). Overproduction of a functional fatty acid biosynthetic enzyme blocks fatty acid synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4596–602.
- Sugihara, S., Orikasa, Y., Okuyama, H.** (2010). The *Escherichia coli* highly expressed entD gene complements the *pfaE* deficiency in a *pfa* gene clone responsible for the biosynthesis of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 307(2), 207–211.
- Tang, Y., Tsai, S. C., Khosla, C.** (2003). Polyketide chain length control by chain length factor. *Journal of the American Chemical Society*, 125(42), 12708–12709.
- Tilay, A., Annapure, U.** (2012). Novel simplified and rapid method for screening and isolation of polyunsaturated fatty acids producing marine Bacteria. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–8.
- Tocher, D.** (2009). Issues surrounding fish as a source of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 21(1), 13–16.
- Tocher, D. R.** (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184.
- Tocher, D. R.** (2015). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449, 94–107.
- Toomey, R. E., Wakil, S. J.** (1966). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XV. Preparation and general properties of beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase from

- Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 116(2), 189–97.
- Tsay, J. T., Oh, W., Larson, T. J., Jackowski, S., Rock, C. O.** (1992). Isolation and characterization of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(10), 6807–14.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Steven, S. E., Ohwada, K., Colwell, R. R.** (1998). A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS Microbiology Letters*, 165(2), 373–378.
- van Summeren-Wesenhagen, P. V., Marienhagen, J.** (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the plant polyphenol pinosylvin. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 840–849.
- Vielva, L., de Toro, M., Lanza, V. F., de la Cruz, F.** (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics*, 33(23), 3796–3798.
- Walsh, T. A., Bevan, S. A., Gachotte, D. J., Larsen, C. M., Moskal, W. A., Merlo, P. A. O., Metz, J. G.** (2016). Canola engineered with a microalgal polyketide synthase-like system produces oil enriched in docosahexaenoic acid. *Nature Biotechnology*, 34(8), 881–887.
- Wan, X., Peng, Y.-F., Zhou, X.-R., Gong, Y.-M., Huang, F.-H., Moncalián, G.** (2016). Effect of cerulenin on fatty acid composition and gene expression pattern of DHA-producing strain *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Microbial Cell Factories*, 15, 30.
- Watson, H., Mitra, S., Croden, F. C., Taylor, M., Wood, H. M., Perry, S. L., Hull, M. A.** (2017). A randomised trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. *Gut*, gutjnl-2017-314968.
- Watters, C., Iwamura, S., Ako, H., Deng, D., Biosciences, M., Resources, H., Feeds, A.** (2012). Nutrition considerations in aquaculture: the importance of omega-3 fatty acids in fish development and human health. *Foods and Nutrition*, FN-11(July), UH-CTAHR 1-7.
- Whittington, R. A., Planel, E., Terrando, N.** (2017). Impaired Resolution of Inflammation in Alzheimer's Disease: A Review. *Frontiers in Immunology*, 8, 1464.
- Wirtitsch, M., Roth, E., Bachleitner-Hofmann, T., Wessner, B., Sturlan, S.** (2009). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids enhance arsenic trioxide efficacy in arsenic trioxide-resistant leukemic and solid tumor cells. *Oncology Research*, 18(2–3), 83–94.
- Wynter, M. P., Russell, S. T., Tisdale, M. J.** (2004). Effect of n-3 fatty acids on the antitumour effects of cytotoxic drugs. *In Vivo*, 18(5), 543–7.
- Xie, D., Jackson, E. N., Zhu, Q.** (2015). Sustainable source of omega-3 eicosapentaenoic acid

- from metabolically engineered *Yarrowia lipolytica*: from fundamental research to commercial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(4), 1599–1610.
- Xie, J., Bogdanov, M., Heacock, P., Dowhan, W.** (2006). Phosphatidylethanolamine and monoglucosyldiacylglycerol are interchangeable in supporting topogenesis and function of the polytopic membrane protein lactose permease. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19172–8.
- Yao, Z., Davis, R. M., Kishony, R., Kahne, D., Ruiz, N.** (2012). Regulation of cell size in response to nutrient availability by fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), E2561–E2568.
- Yoshida, K., Hashimoto, M., Hori, R., Adachi, T., Okuyama, H., Orikasa, Y., Morita, N.** (2016). Bacterial long-chain polyunsaturated fatty acids: their biosynthetic genes, functions, and practical use. *Marine Drugs*, 14(5), 94.
- Zha, W., Rubin-Pitel, S. B., Shao, Z., Zhao, H.** (2009). Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 11, 192–198
- Zhang, W., Campbell, H. A., King, S. C., Dowhan, W.** (2005). Phospholipids as determinants of membrane protein topology. Phosphatidylethanolamine is required for the proper topological organization of the gamma-aminobutyric acid permease (GabP) of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26032–8.
- Zhang, Y.-M., Rock, C. O.** (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 222–233.
- Zhang, Y., Cronan, J. E.** (1998). Transcriptional analysis of essential genes of the *Escherichia coli* fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous *Salmonella typhimurium* gene cluster. *Journal of Bacteriology*, 180(13), 3295–303.
- Zhou, K., Zhou, L., Lim, Q. 'En, Zou, R., Stephanopoulos, G., Too, H.-P.** (2011). Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Molecular Biology*, 12, 18.
- Zhu, K., Zhang, Y.-M., Rock, C. O.** (2009). Transcriptional Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in *Escherichia coli* . *The Journal of biological chemistry*, 284, 34880-88.
- Zulstra, J. G., De Vries, E. G. E., Muskiet, F. A. J., Martini, L. A., Timmer-Bosscha, H., Mulder, N. H.** (1987). Influence of docosahexaenoic acidin vitro on intracellular adriamycin concentration in lymphocytes and human adriamycin-sensitive and -resistant small-cell lung cancer cell lines, and on cytotoxicity in the tumor cell lines. *International Journal of Cancer*, 40(6), 850–856.

8. PUBLICACIONES

9. ANEXOS

Anexo 1

Comprobación del vector pLGR13 por PCR y análisis de restricción:

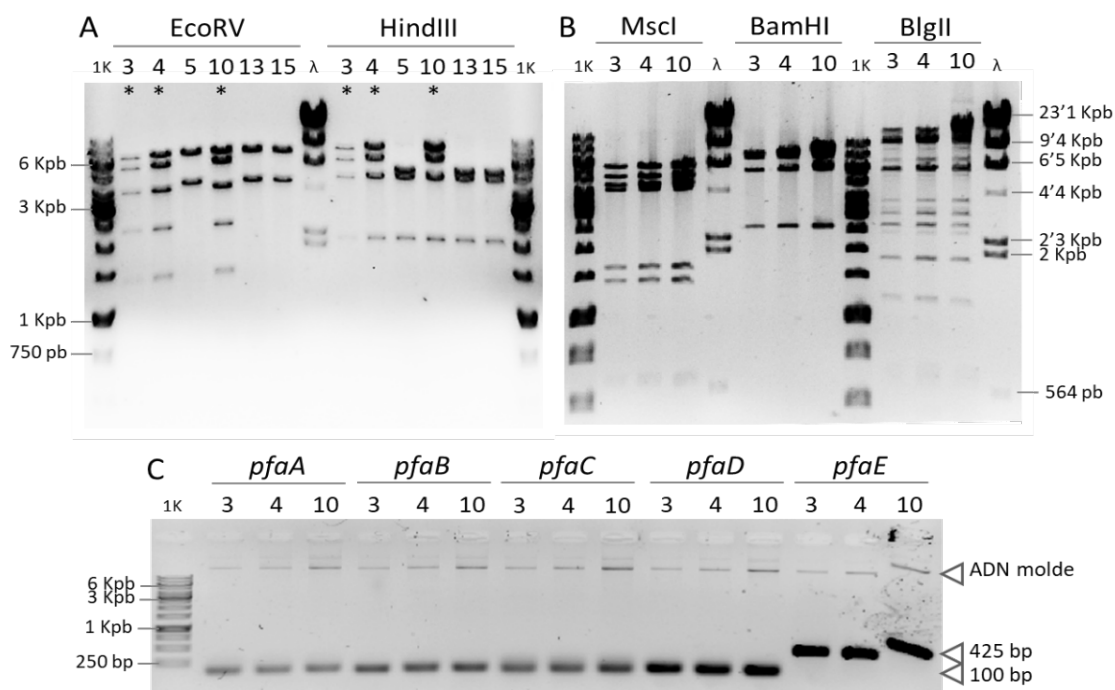


Figura suplementaria 1. Comprobación de distintos clones de pLGR13 mediante PCR y enzimas de restricción, previa a la secuenciación masiva. A) Análisis inicial de restricción con la enzima EcoRV (8 fragmentos: 8,3 Kpb, 6,8 Kpb, 4,5 Kpb, 2,5 Kpb, 1,4 Kpb, 797 pb, 483 pb, y 82 pb) y HindIII (4 fragmentos: 9,6 Kpb, 7,6 Kpb, 5,5 Kpb, y 2,2 Kpb). El asterisco indica el patrón de restricción correcto. B) Comprobación de los clones positivos 3, 4 y 10 por análisis de restricción utilizando MscI (6,5 Kpb, 5,5 Kpb, 4,7 Kpb, 4,4 Kpb, 1,6 Kpb, 1,4 Kpb, y 607 pb), BamHI (4 fragmentos: 8,3 Kpb, 7,7 Kpb, 6,2 Kpb, y 2,7Kpb), y BglII (9 fragmentos: 10,8 Kpb, 6,4 Kpb, 2,7 Kpb, 1,8 Kpb, 1,2 Kpb, 660 bp, 606 bp, 456 bp, y 306 bp). Se indican los pesos moleculares del marcador Generuler 1Kbp ladder (1K) y del marcador λ/HindIII (λ). C) Comprobación por PCR de la presencia de los 5 genes *pfa* en los clones 3, 4 y 10 de pLGR13 con los oligonucleótidos TG_pfaA_F y TG_pfaA_R (*pfaA*, 118 pb), TG_pfaB_F y TG_pfaB_R (*pfaB*, 101pb), TG_pfaC_F y TG_pfaC_R (*pfaC*, 96 pb), TG_pfaD_F y TG_pfaD_R (*pfaD*, 112 pb), y mm_pfaE_F y mm_pfaE_R (*pfaE*, 425 pb).

Anexo 2

Ensayos preliminares de KR en PfaA

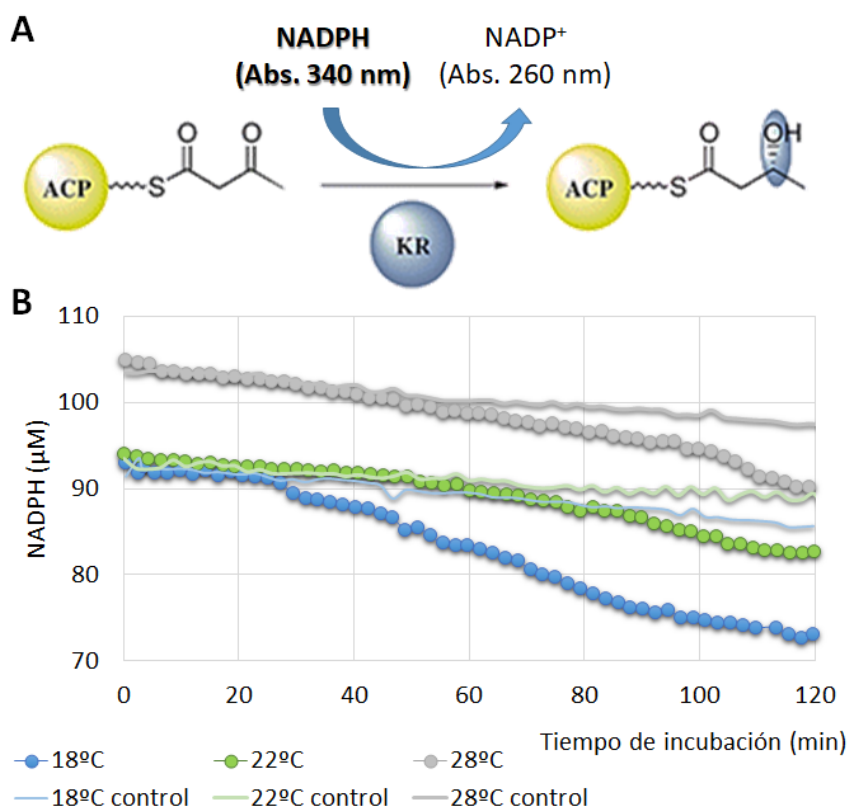


Figura suplementaria 2. Ensayo de actividad cetoreductasa de PfaA mediante medición espectrofotométrica de NADPH (BUSCAR PAPER). A) En este ensayo indirecto de actividad se utiliza la desaparición de absorbancia a 355nm cofactor NADPH en su forma reducida como monitorización de la reducción de grupos cetona a grupos hidroxilo mediante la acción de una cetoreductasa. En el caso de PfaA este dominio se encuentra en el extremo N-terminal de la cadena, y reduce el grupo cetónico del carbono 4 de la cadena creciente de ácido graso unido al dominio portador de acilos (ACP). B) Ensayo preliminar (una réplica) de actividad de PfaA a 18 °C, 22 °C y 28 °C durante 120 minutos, utilizando 50 nM de PfaA purificada resuspendida en un buffer fosfato (50 mM, 7,5 pH) suplementado con DTT (1mM) y EDTA (1mM). Los reactivos se añadieron en el tiempo 0 con las siguientes concentraciones: 100 μM de malonil-CoA, 50 μM acetil-CoA, 100 μM NADPH. En el gráfico se indica la concentración de NADPH calculada mediante una recta patrón de concentración frente a Absorbancia a 355nm.

Anexo 3

Variación del perfil de ácidos grasos de *E.coli* producido por una alteración en la iniciación de la síntesis de ácidos grasos.

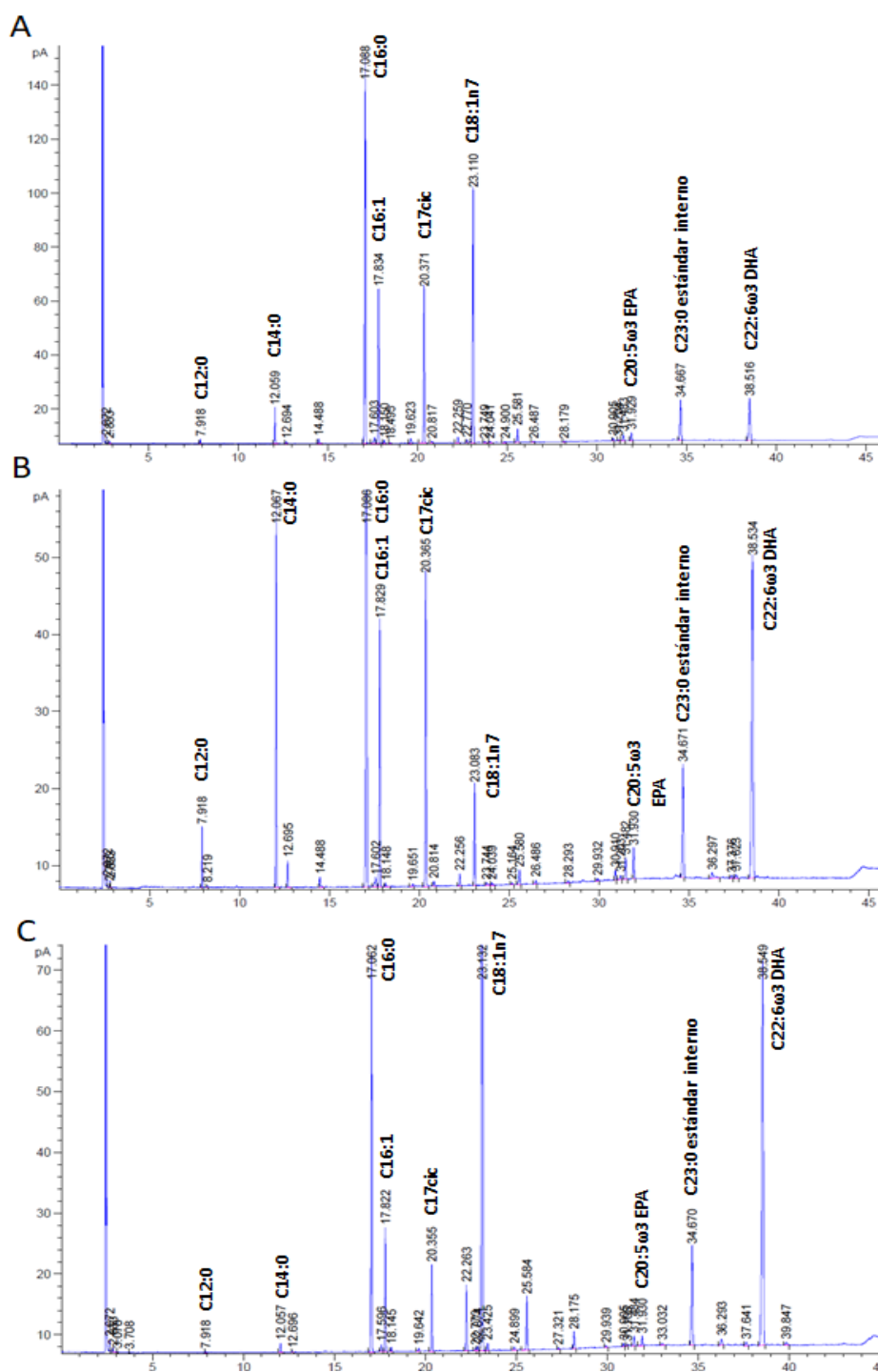


Figura suplementaria 3. Perfil de la composición de ácidos grasos de *E.coli* BW 27783 pDHA4 a 15 °C por cromatografía de gases. A) Condiciones control; B) en presencia de 2 μg/ml de cerulenina; C) cepa mutante $\Delta fabH$. Se indican los ácidos grasos mayoritarios de *E.coli* (C12:0 – ácido láurico; C14:0 – á. mirístico; C16:0 – á. palmítico; C16:1 – á. palmitoleico; C17:0c – derivado ciclopropano de 17 carbonos; C18:7 – á. cis-vaccénico; C20:5ω3 – á. eicosapentaenoico (EPA); C22:6 ω3 – á. docosahexaenoico (DHA)) y el estándar interno comercial C23:0 – á. tricosanoico.

Anexo 4

Extracción de muestras de raspado de sílice.

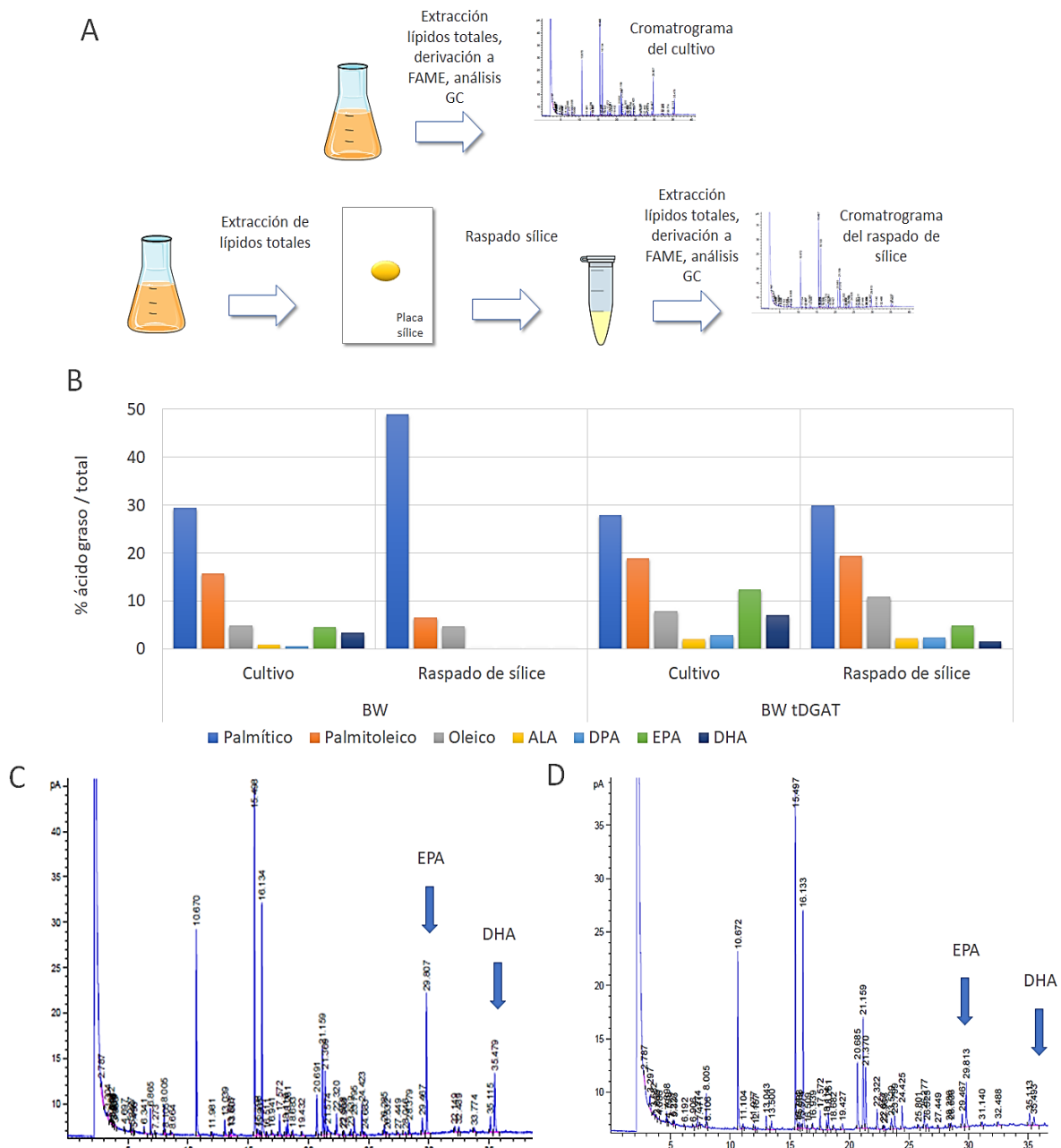


Figura suplementaria 4. Ensayo de eficiencia de extracción de ácidos grasos de una fase estacionaria de sílice. A) Esquema del proceso. Los ácidos grasos totales de una muestra se pueden extraer directamente del cultivo (superior), o de una placa de TLC tras separar las muestras. En este ensayo se ha depositado un extracto lipídico sobre una placa de sílice, y se ha raspado completamente sin previa separación de los lípidos. Ambos tipos de muestras se han derivado y analizado tal como se describe en Materiales y Métodos. B) Análisis de ácidos grasos de un cultivo de las cepas BW 27783 (BW) y BW 27783 transformada con el plásmido pLGR1(BW tDGAT) crecidas a 15 °C en medio M9 suplementado con FFA derivados de aceite de pescado. Se indican los ácidos grasos mayoritarios detectados. C-D) Cromatogramas representativos del proceso. Se muestran los cromatogramas correspondientes al de cultivo de BW tDGAT (C, BW tDGAT) y al de raspado de sílice de BW tDGAT (D, BW tDGAT). Las flechas indican la localización de la señal de EPA y DHA.