



**Universitat**  
de les Illes Balears

**Títol: Preparació de derivats de cobalamina i estudi de la seva interacció amb el ribocommutador de *Klebsiella Pneumoniae***

NOM AUTOR: Marc Servera Caldentey

**Memòria del Treball de Fi de Màster**

Màster Universitari de Ciència i Tecnologia Química (MCTE)  
(Especialitat/Itinerari de Química Biològica)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curs Acadèmic 2017-2018

*Data: 05 de setembre de 2018*

*Nom Tutor del Treball: Dr. Miquel Barceló Oliver*



## ÍNDEX

RESUM.....	3
1. INTRODUCCIÓ.....	4
1.1. Cobalamines.....	4
1.1.1. Cobalamines completes .....	5
1.1.2. Cobalamines incompletes .....	8
1.1.3. Transport de cobalamines: la proteïna <i>btuB</i> .....	11
1.2. Ribocommutadors .....	12
1.2.1. Ribocommutadors de B <sub>12</sub> .....	18
1.2.2. Ribocommutador <i>btuB</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	18
1.3. Proteïna <i>mCherry</i> i fluorescència.....	20
2. OBJECTIUS .....	22
3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL .....	23
3.1. Instrumentació.....	23
3.2. Reactius i dissolucions preparades.....	23
3.3. Síntesi de l'àcid cobíric.....	25
3.4. Purificació de l'àcid cobíric .....	26
3.5. Purificació de les fraccions .....	27
3.5.1. Cromatografia de capa fina (TLC) i mini-columnes .....	27
3.5.2. Anàlisis dels temps de retenció (R <sub>f</sub> ) .....	28
3.5.3. Cristal·lització.....	28
3.6. Preparació de cèl·lules químicament competents BL21 (DE3).....	29
3.7. Transformació del plasmidi pJP04 dins cèl·lules químicament competents ...	29
3.8. Mini-cultius amb cobalamines .....	30
3.9. Mesures de fluorescència .....	31
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	32
4.1. Hidròlisi de la vitamina B <sub>12</sub> .....	32
4.2. Experiments de fluorescència: observacions generals .....	35
4.3. Inhibició de la fluorescència .....	36
4.4. Discussió dels resultats .....	41
5. CONCLUSIONS .....	42
6. REFERÈNCIES .....	43

## RESUM

Els ribocommutadors són seqüències altament estructurades situades a l'extrem 5'-UTR de certs mRNA i tenen com a funció la regulació de l'expressió gènica, degut a un canvi conformacional provocat per la unió amb el seu metabòlit natural. Des de fa uns anys s'ha estudiat el ribocommutador de B<sub>12</sub> de *Klebsiella Pneumoniae* que presenta afinitat per l'adenosilcobalamina (Coenzim B<sub>12</sub>). Estudiar la seva interacció amb altres derivats de B<sub>12</sub> ajudarà a entendre millor el seu funcionament i seguir amb el seu estudi.

L'objectiu principal d'aquest TFM és realitzar la síntesi de l'àcid cobíric mitjançant la hidròlisi de la Vitamina B<sub>12</sub> i el seu estudi d'interacció amb el ribocommutador de B<sub>12</sub> de *Klebsiella Pneumoniae*, per tal de conèixer la importància dels lligands axials damunt la funció reguladora.

La síntesi de l'àcid cobíric es realitza mitjançant la hidròlisi en medi àcid de la Vitamina B<sub>12</sub>. Després de la hidròlisi, és necessari separar els diferents derivats de B<sub>12</sub> que s'obtenen; aquesta es realitza amb una columna cromatogràfica de sílice C18-RP, emprant un gradient H<sub>2</sub>O:acetonitril com a eluent. S'han identificat 4 derivats interessants: l'àcid dicianocobíric, l'àcid dicianoneocobíric, la dicianocobinamida i la dicianoneocobinamida, mitjançant NMR (ressonància magnètica nuclear, *nuclear magnetic resonance* en anglès) i HRMS (espectrometria de masses d'alta resolució, en anglès, *high resolution mass spectrometry*). Posteriorment, s'ha realitzat la mesura de la interacció entre el ribocommutador i els derivats de B<sub>12</sub> obtinguts mitjançant estudis *in vivo* amb *mCherry* (proteïna fluorescent). Aquests resultats es poden comparar amb els obtinguts usant cobalamines completes, per tal d'estudiar la importància del lligand apical inferior de les cobalamines.

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. Cobalamines

Els composts organometàl·lics són aquelles estructures que es caracteritzen per contenir com a mínim un enllaç entre carboni i un metall. Aquest tipus de composts solen ser poc habituals en sistemes biològics, tot i que presenten gran importància i tenen gran utilitat i aplicabilitat en química inorgànica, síntesi orgànica, catàlisi, etc. Ara bé, sí que existeix una família de composts organometàl·lics que conformen un grup important i fonamental en la química bioinorgànica, com són les cobalamines.

El terme cobalamines fa referència a la família de composts de cobalt derivats de la vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina, que es diferencien segons la naturalesa del seu lligand apical superior.<sup>1</sup>

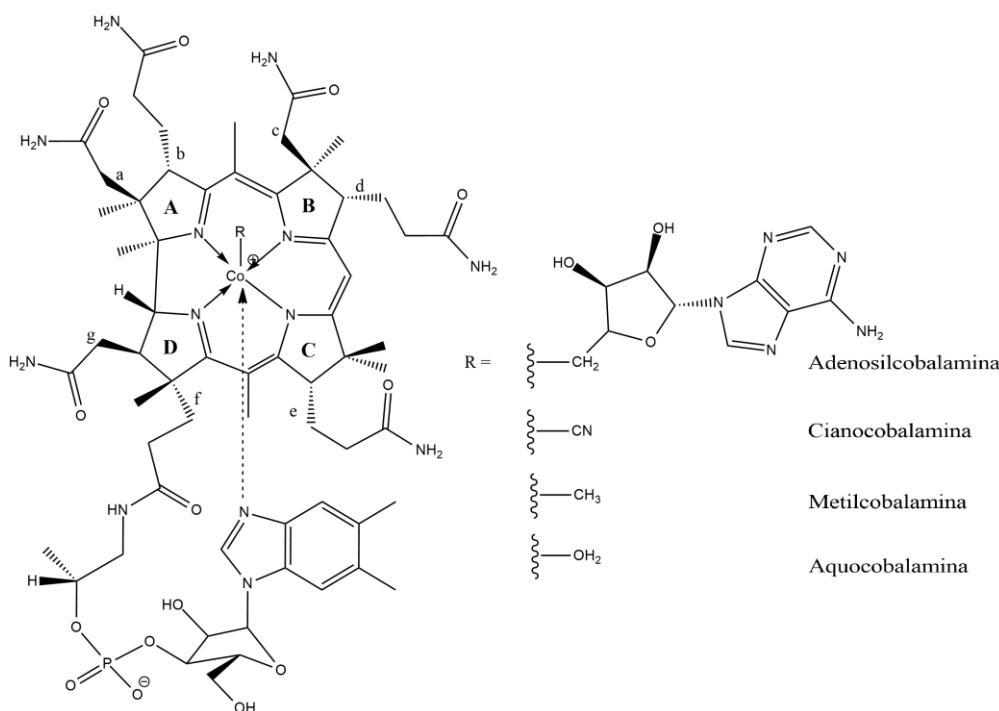
Al 1920, Whipple i col·laboradors<sup>2</sup> varen descriure l'èxit en el tractament de cans que patien una forma experimental d'anèmia mitjançant l'alimentació amb grans quantitats de fetge. Al mateix any, Minot i Murphy<sup>3</sup> mostraren que aquest mateix tractament era igualment efectiu en pacients amb anèmia perniciosa, ja que afavoria la regeneració dels glòbuls vermells dels pacients. Així i tot, varen fer falta uns 20 anys més de recerca (1948) per aïllar i identificar la substància activa: el factor anti-anèmia perniciosa o vitamina B<sub>12</sub>, que es trobava en concentracions al voltant d'1 ppm.<sup>4</sup> Aquesta vitamina, color vermell obscur, es va aïllar del fetge en forma cristal·lina per dos grups de forma quasi simultània als Estats Units d'Amèrica (Laboratori Merck) i a Gran Bretanya (Laboratori Glaxo). La seva estructura cristal·lina es va resoldre per difracció de raigs X de monocristall (juntament amb anàlisis químiques) per Dorothy Crowfoot Hodgkin, guardonada al 1964 amb el Premi Nobel per aquest treball.<sup>5</sup>

No va ser fins passat el 1956 que es va aïllar una de les formes biològicament actives de les cobalamines, el coenzim B<sub>12</sub> (o adenosilcobalamina) tant de fetge com de *Clostridium tetanomorphum*. Una segona forma activa biològicament de la vitamina B<sub>12</sub> es va detectar al plasma humà, i es va identificar com a metilcobalamina.<sup>6-8</sup>

Pel que fa a la presència del cobalt, s'ha de ressenyar que la seva funció ha de ser extraordinàriament específica ja que és l'element de la primera sèrie de transició menys abundant en l'escorça terrestre (tan sols uns 25 ppm),<sup>9</sup> després de l'escandi, i l'aigua de mar. De fet, la vitamina B<sub>12</sub> i els seus derivats són uns dels pocs exemples de complexos cinèticament làbils de Co(III).<sup>1,10</sup>

### 1.1.1. Cobalamines completes

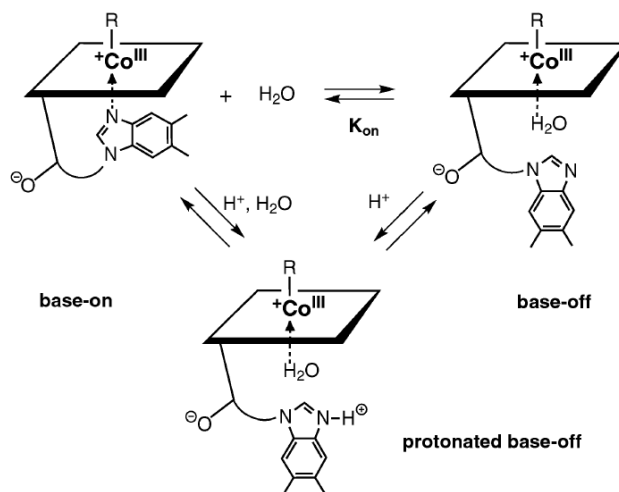
Estructuralment, els derivats de B<sub>12</sub> típics, també coneguts com corrinoides complets, estan conformats per diverses unitats estructurals úniques i complexes: un macrocicle de corrina que coordina el cobalt, el nucleòtid de 5,6-dimetilbenzimidazol (*dmbim*) que es coordina de nou al ió de cobalt d'una manera intramolecular i, un lligand apical superior que varia segons la cobalamina que considerem (Figura 1).<sup>11,12</sup>



**Figura 1.** Estructures químiques de la cobalamina i els seus derivats: adenosilcobalamina (AdoCbl o coezim B<sub>12</sub>), cianocobalamina (CNCbl o Vitamina B<sub>12</sub>), metilcobalamina (MeCbl) i aquacobalamina (H<sub>2</sub>OCbl). L'aquacobalamina presenta un lligand *aqua* neutre, que dona lloc a una molècula carregada positivament; per tant, sempre està acompanyat d'un contra-íó. Els anells de la corrina s'anomenen de A fins a D, i les cadenes laterals de propanamida de a fins a f.

Les cobalamines tenen un tetrapirrol similar a la porfirina (amb un àtom de carboni menys i un sistema  $\pi$  menys ric en electrons), la corrina, que és intrínsecament no planar i coordina el cobalt mitjançant els 4 nitrògens. El fet que tengui el sistema  $\pi$  menys estès ajuda a estabilitzar l'enllaç Co-C i, a més, resisteix l'acció reductora dels estats d'oxidació baixos del cobalt, com el Co(I). L'anell de corrina conté 7 substituents de tipus propanamida i 8 substituents de tipus metil als anells, que donen un major caràcter hidrofílic a la molècula i que faciliten la unió d'aquesta amb la proteïna. Un dels substituents propanamida està unit a una ribosa fosforilada a la posició 3' mitjançant un enllaç  $\alpha$ -sucre-nucleòtid al 5,6-dimetilbenzimidazol (*dmbim*). El *dmbim* bloqueja la

sisena posició de coordinació del cobalt, originant la conformació de *base on*. Ara bé, la protonació del nitrogen del nucleòtid provoca la dissociació d'aquest enllaç (Figura 2). A més, el *dmvim* també es pot trobar desplaçat per algun aminoàcid d'una proteïna o bé per una altra base nitrogenada, en el cas de la unió de la cobalamina a un àcid nucleic, presentant la conformació de *base off*.<sup>10,11,13</sup>



**Figura 2.** Derivats de B<sub>12</sub> complets com a "interruptors moleculars". La tendència a existir en la forma *base-on* (mitjançant la coordinació intramolecular del nucleòtid *dmvim*) depèn críticament de R.<sup>11</sup>

Pel que fa a la cinquena posició de coordinació del cobalt, pot estar ocupada per diferents substituents de naturalesa molt diversa, tal i com s'ha comentat anteriorment, donant lloc a les diferents espècies que formen la família de les cobalamines. Si aquest substituent és una adenosina unida pel carboni 5', formant un enllaç Co-C, tenim l'adenosilcobalamina (AdoCbl), també anomenat coenzim B<sub>12</sub> (formant un compost de tipus organometàl·lic molt sensible al llum). Si en lloc d'adenosina tenim un metil (formant també un enllaç Co-C sensible al llum), ens trobam amb la metilcobalamina (MeCbl). Són aquestes dues cobalamines les actives als organismes, formant part dels centres actius de diverses proteïnes.<sup>14,15</sup>

Ara bé, també formen part de la família de les cobalamines altres espècies que no solen presentar tanta activitat com les esmentades abans, però que si són absorbides i transportades dins els organismes, com la cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub>, l'aquocobalamina (H<sub>2</sub>O-Cbl) i la hidroxocobalamina (HO-Cbl) depenent de si el cinquè substituent és un grup cianur (CN<sup>-</sup>), una molècula d'aigua o un grup hidroxil respectivament.

Per tal de complir amb el principi d'electroneutralitat, les cobalamines són composts amb cobalt amb estat d'oxidació +III, ja que l'anell de corrina (desprotonat) aporta una càrrega negativa, igual que el radical R i el grup fosfat, tenint en total, un còmput de tres càrregues negatives. Per tant, les cobalamines són complexos pseudo-octaèdrics de Co(III) de baix espí. De totes maneres, l'aquocomplex i, en general, totes les cobalamines, es poden reduir amb bastanta facilitat a un complex de Co(II) o a un compost de Co(I). Aquestes reduccions es poden dur a terme a l'organisme per reductors biològics així com el NADH i el FAD, o per mètodes químics tals com la hidrogenació catalítica o amb acetat de crom (II).<sup>11</sup>

Les cobalamines tenen funcions a organismes que van des d'*Archaea* fins als humans; excepte que no estan presents a les plantes. Les cobalamines es caracteritzen per tenir, en general, un caràcter súper-nucleòfil,<sup>15</sup> podent dividir les seves funcions en tres categories diferenciades:<sup>16-18</sup>

- Transferència del grup metil en els processos de metanogènesi a *Archaea*, acetogènesi en bacteris anaerobis i síntesi de metionina en bacteris i mamífers.
- Generació de radical desoxiadenosil que catalitza la reducció de ribonucleòtids en molts bacteris, reordenaments d'aminoàcids en bacteris i reordenació de metilmalonil coenzim A en bacteris i mamífers. La generació del radical implica la forma coenzim de les cobalamines, en què la 5'-deoxiadenosina està unida al cobalt. Sobre els enzims en qüestió, l'enllaç carboni-cobalt s'obre homolíticament per donar lloc al radical.
- Eliminacions mitjançant diol deshidratasa i etanolamina amoni liasa.

Les cobalamines són sintetitzades gairebé exclusivament per bacteris, a més de ser produïdes en quantitats limitades per alguns llegums, com la soja, mentre que en els mamífers tenen l'estatus de vitamina. Per tant, la cobalamina ha de ser absorbida a partir d'aliments i després transportada activament a les cèl·lules. Tres proteïnes de transport diferents participen en aquest sofisticat procés: l'haptocorrina (HC, també coneguda com TCI), el factor intrínsec (IF) i la transcobalamina (TCII). Aquesta última promou l'absorció cel·lular de les cobalamines mitjançant endocitosis mediada pel receptor.<sup>19,20</sup>

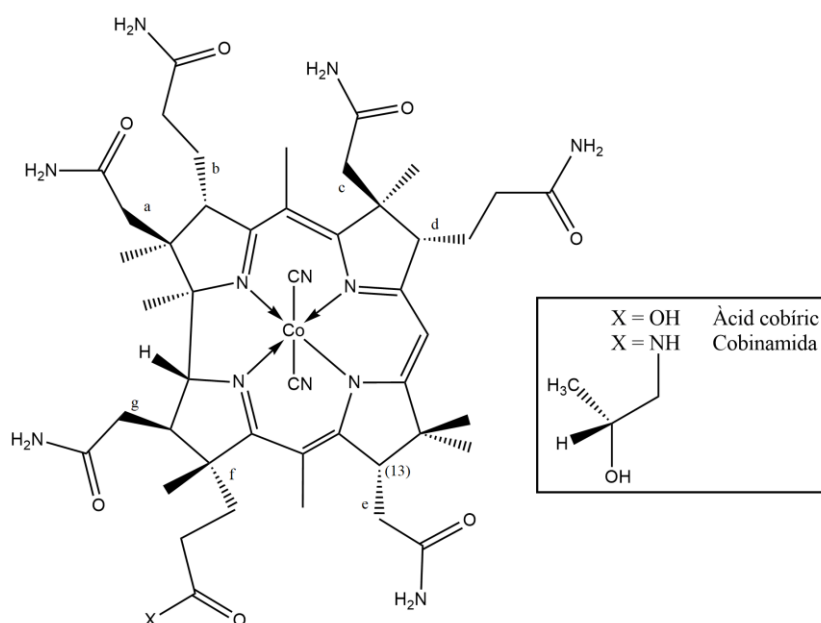
Als humans, la deficiència de la vitamina B<sub>12</sub> causa patologia a la medul·la òssia i el teixit nerviós. La determinació del mecanisme de la patologia ha estat problemàtica; en



primer lloc, la deficiència de B<sub>12</sub> no causa patologia de medul·la òssia en animals experimentals, la qual cosa suggereix que és única per als éssers humans. En segon lloc, ha estat especialment difícil poder determinar la seva funció al teixit nerviós i, de fet, encara no es coneix. Degut a les dificultats trobades, les interpretacions variades de les dades han donat lloc a teories conflictives.<sup>16</sup>

### 1.1.2. Cobalamines incompletes

Els corrinoïdes que no tenen la base nucleotídica es diuen corrinoïdes incompletes, i comprenen derivats tant naturals com artificials de la vitamina B<sub>12</sub>. Alguns dels exemples inclosos en aquest grup són la Co<sub>α</sub>,Co<sub>β</sub>-dicianocobinamida, un intermediari a la biosíntesi de la vitamina B<sub>12</sub>, i l'àcid Co<sub>α</sub>,Co<sub>β</sub>-dicianocobíric (Figura 3).<sup>19</sup>

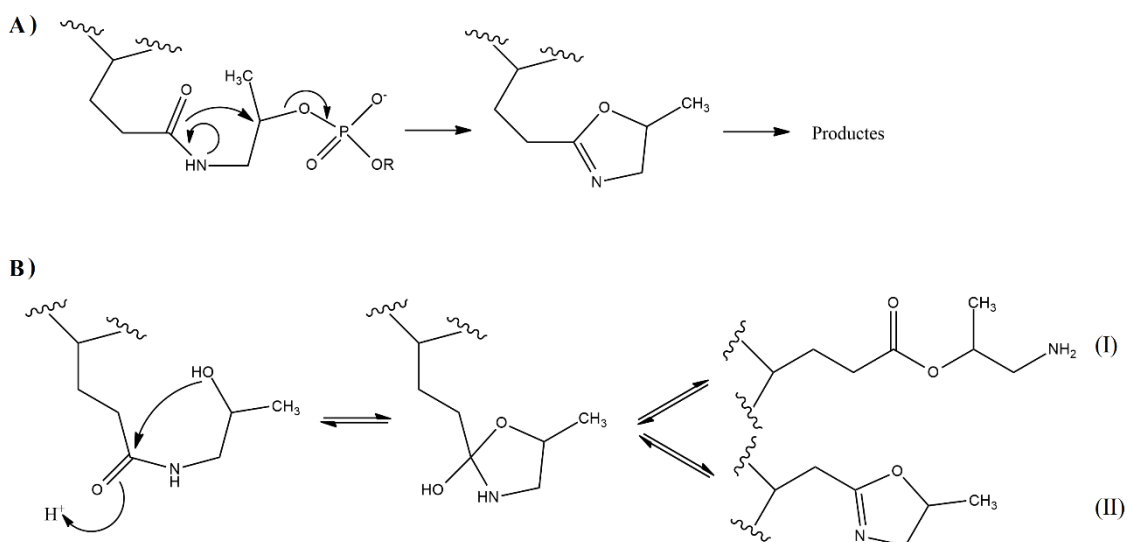


**Figura 3.** Estructura bàsica d'algunes de les cobalamines incompletes: àcid cobíric i cobinamida, ambdós en la seva forma diciano. L'àcid neocobíric i la neocobinamida també formen part d'aquest grup de composts; són els epímers C(13) de l'àcid cobíric i la cobinamida, respectivament. Les cadenes laterals de propanamida de *a* fins a *f*.

L'àcid cobíric (també conegut com a Factor V<sub>1a</sub>) és un compost d'interès degut a que és un intermediari a la síntesi total de la vitamina B<sub>12</sub> i també s'usa com a material de partida per a la síntesi química parcial de determinades modificacions de la vitamina que presenten una gran activitat antivitàmica.<sup>21</sup> Una font important d'aquest compost han estat fangs de depuradora; devers la dècada dels 60 però, es va trobar que, sota certes condicions hidrolítiques, l'àcid cobíric es pot obtenir directament de la vitamina B<sub>12</sub>.<sup>22</sup>

Les primeres dues síntesis totals d'àcid cobíric i el descobriment de les regles de Woodward-Hoffmann (sobre l'aromaticitat dels composts) van ser el resultat dels brillants i extensos estudis de Woodward i Eschenmoser,<sup>23,24</sup> tot i que diversos grups d'investigació han seguit treballant intentant millorar el procediment.<sup>25-28</sup>

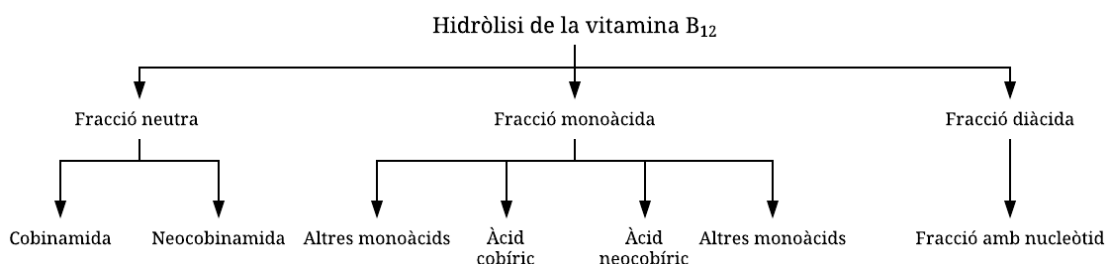
La hidròlisi de la vitamina B<sub>12</sub>, en condicions àcides o alcalines diluïdes no produeix generalment quantitats detectables d'àcid cobíric, presumiblement perquè les propionamides b, d i e són hidrolitzades preferentment. Tanmateix, sembla possible que l'amida f fos seleccionada durant la hidròlisi a través de l'associació del seu substituent N-β-hidroxiàlquil. S'han considerat dues maneres d'aconseguir-ho. La primera es pot formular com un desplaçament del fosfat assistit per l'amida (Figura 4A). La segona proposta va suposar l'ús de condicions altament àcides que es coneixen per conduir a la formació ràpida de la cobinamida. Es pensa que la participació del grup 2'-hidroxil amb la formació d'un intermedi fosfat 2',3'-cíclic es produeix aquí: la ruta mostrada a la Figura 4A és poc probable en condicions àcides ja que es forma l'1-aminopropan-2-ol amb retenció de la configuració. El subseqüent pas de la cobinamida en condicions molt àcides és particularment rellevant ja que, malgrat que aquestes condicions inhibeixen la hidròlisi de l'amida, se sap que afavoreixen la migració de l'acil de N→O a la N-β-hidroxiàlquilamida. Aquesta funció es produeix a la cadena lateral f de la cobinamida i es va preveure (Figura 4B) que es podrien establir condicions en les quals la hidròlisi de l'èster cobíric (I a la Figura 4B) a l'àcid cobíric es convertiria en una via important.<sup>29</sup>



**Figura 4.** Propostes de la hidròlisi selectiva de la cadena lateral f de la Vitamina B<sub>12</sub>: A) desplaçament del fosfat assistit per l'amida i B) participació del grup 2'-hidroxil.

En experiments preliminars es va estudiar el comportament de la vitamina B<sub>12</sub> amb una àmplia varietat de reactius àcids; l'àcid clorhídric concentrat en condicions molt definides s'ha establert com el millor reactiu per a la formació directa de l'àcid cobíric. Com era d'esperar, la reacció es complica amb la formació d'altres productes d'hidròlisi, així com també es complica amb la formació d'una segona sèrie de pigments. La cobinamida va donar el mateix patró de productes i, per tant, es considera un intermediari de la reacció.

A nivell preparatiu, la vitamina B<sub>12</sub> es tracta amb àcid clorhídric concentrat durant 18,5 minuts a 65 °C i els productes es fraccionen tal com s'indica a la Figura 5. Es forma una mescla de composts neutres, monoàcids (fracció majoritària) i diàcids i es separen els components mitjançant una columna cromatogràfica de fase reversa (C18-RP).<sup>29,30</sup> De fet, des de bon principi, les tècniques cromatogràfiques han permès als investigadors separar i aïllar derivats de la vitamina B<sub>12</sub> específics d'altres composts naturals o de mescles de diversos components. Aquestes tècniques segueixen tenint una gran contribució en l'estudi detallat de la biosíntesis de les cobalamines en microorganismes i dels mecanismes de reacció de les vies metabòliques dependents de cobalamines.<sup>31</sup>



**Figura 5.** Esquema de les diferents fraccions que es produeixen en la hidròlisi àcida de la vitamina B<sub>12</sub>.

La fracció d'àcid dicarboxílic s'associa amb composts que encara contenen la part nucleotídica de la vitamina B<sub>12</sub>. La fracció neutra conté dos components: la cobinamida, com s'esperava, i un compost més fosc i menys mòbil, que recorda una observació feta per Friedrich i Bernhauer anys enrere,<sup>32</sup> que va demostrar que el tractament de 5-hidroxibenzimidazolilcobamida amb àcid perclòric dona una mescla de cobinamida i un pigment neutre més fosc que van designar Factor Ia. Mitjançant la comparació de mostres es va observar que el pigment neutre més fosc obtingut a la hidròlisi àcida de la vitamina B<sub>12</sub> no es distingia del Factor Ia (més tard anomenat neocobinamida).

La fracció d'àcid monocarboxílic conté quatre components principals; de nou es produeixen en parells de pigments de color normal (vermell púrpura) i foscos (blau-

violeta). El component principal és l'àcid cobíric (aproximadament el 20% de rendiment), que no es distingeix d'una mostra autèntica en comparacions espectroscòpiques, electroforètiques i cromatogràfiques. Els altres tres components consisteixen en els tres components esperats, que es creu que són els monoàcids d'àcid propiònic a les cadenes laterals b, d, i e, respectivament.

Sembla que, en condicions altament àcides, s'han generat dues sèries de pigments, de les quals es pot considerar que la cobinamida i l'àcid cobíric són compostos primaris. Ara bé, es formen una sèrie de composts d'una sèrie diferent, alguns dels quals reaccionen de la mateixa manera que els composts primaris. Aquesta sèrie rep el nom de neo-sèrie, i conté composts tals com la neocobinamida i l'àcid neocobíric. Aquests dos composts són epímers del carboni 13 (Figura 3) de la cobinamida i l'àcid cobíric, respectivament.<sup>30</sup>

Tot i que la formació d'una segona sèrie de pigments ha fet que el procediment actual per a la preparació de l'àcid cobíric sigui menys atractiu que no si fos d'una altra manera, aquest és, de moment, el procediment més factible per la síntesi de l'àcid cobíric a petita escala.

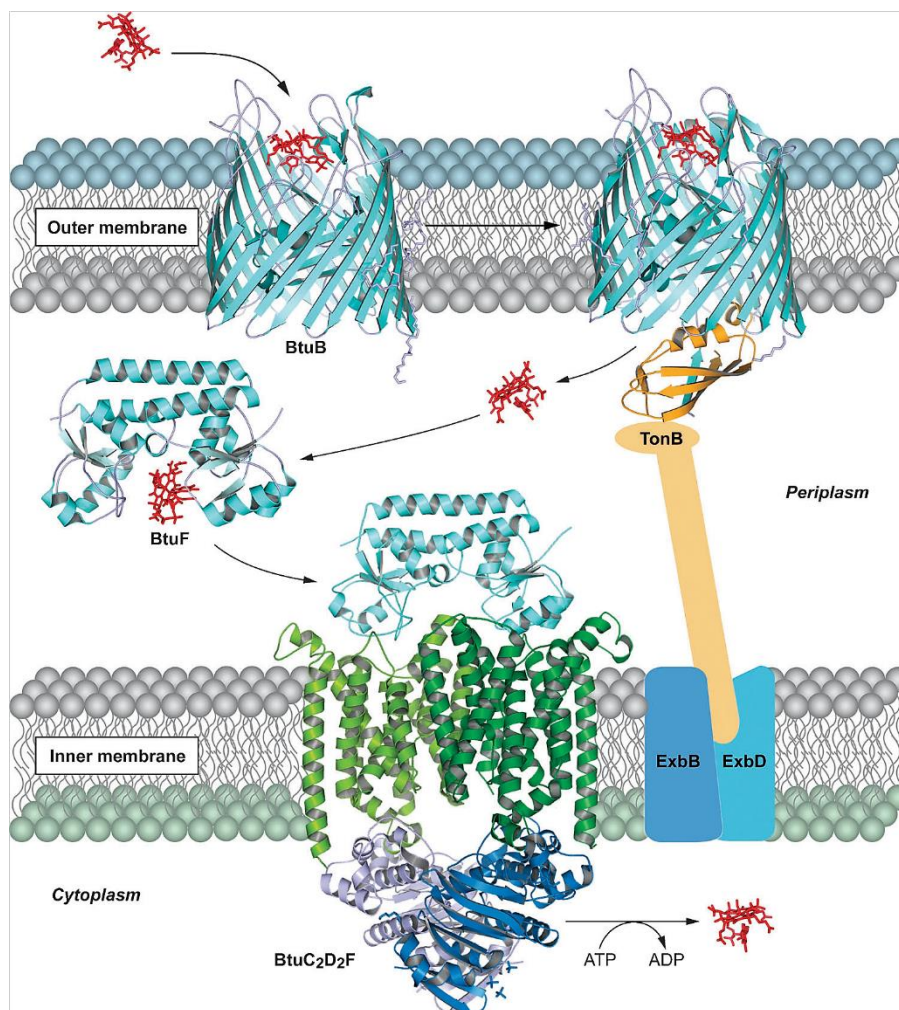
### 1.1.3. Transport de cobalamines: la proteïna *btuB*

Els bacteris Gram-negatius posseeixen sistemes de transport actiu especialitzats que tenen com a funció el transport de cofactors organometàl·lics, com les cobalamines, els sideròfors i les porfirines, a través de les seves membranes externes, ja que aquests són massa grans com per difondre eficaçment a través dels canals dels porus. Els components primaris de cada sistema de transport són un transportador de membrana externa i la proteïna transperiplàsmica *TonB* (que s'encarrega del transport actiu), que interactuen a través d'una seqüència conservada, la *Ton-box*. L'energia per a realitzar el transport de cobalamines es deu a la generació d'un potencial de protons de la membrana interna per l'acoblament a la proteïna *TonB*. Aquest grup de proteïnes de transport actiu dependent de *TonB* s'abreua com *TBDTs*.<sup>33-35</sup>

Les estructures de *TBDT* es componen de dos dominis, un domini globular N-terminal conservat i un barril  $\beta$ . Dins del barril es troba el domini N-terminal. El domini globular consta d'un nucli central de quatre làmines  $\beta$  connectades per bucles o bagues. La *Ton-box* conservada es troba a prop de l'obertura al periplasma del barril i precedeix el nucli globular conservat. Els *TBDT* uneixen els seus substrats utilitzant residus de bucles

d'obertura, des de les superfícies interiors de les làmines  $\beta$  a la paret del barril i des de bagues extracel·lulars del barril.<sup>36,37</sup>

El transport dels corrinoides depèn del sistema *B-twelve-uptake* (*btu*). El *btu* està compost per dos transportadors diferents: un encarregat del transport a través de la membrana externa, anomenat transportador *btuB*, i l'altre transportador que controla el trànsit de la membrana interna requerint energia, anomenat transportador *btuC<sub>2</sub>D<sub>2</sub>F*. *btuB* és la proteïna de membrana externa necessària per al transport actiu de vitamina B<sub>12</sub> i dels seus derivats en el periplasma. La síntesi d'aquesta proteïna transportadora de la membrana externa està regulada en resposta a la disponibilitat dels seus substrats.<sup>11,37</sup>



**Figura 6.** Sistema *B-twelve-uptake* complet. És el sistema d'absorció de cobalamines a bacteris Gram-negatius.<sup>11</sup>

## 1.2. Ribocommutadors

A qualsevol nivell de vida és imprescindible comptar amb diferents mecanismes per tal de mantenir la homeòstasi de l'organisme, el perfecte balanç de nutrients, metabòlits,

macromolècules biològiques i ions metàl·lics dins els límits adequats. Aquests mecanismes de bioregulació es solen classificar en tres grans grups, depenent del nivell on es produeix la regulació:<sup>38-40</sup>

- Nivell de transcripció: la proteïna reconeix el DNA, i activa l'àcid nucleic com a promotor o repressor.
- Nivell de post-transcripció: la proteïna reconeix l'RNA missatger i activa o reprimeix la síntesi de l'enzim o la proteïna de transport corresponent.
- Ribocommutador: pot actuar tant a nivell de traducció com de transcripció; més endavant es descriuen els mecanismes de forma detallada. És aquest l'únic nivell de regulació en el qual no hi ha cap proteïna reguladora que intervingui en el procés de bioregulació.

Així, queda palesa la importància no només de les proteïnes, sinó també dels àcids nucleics per ells mateixos en els mecanismes de bioregulació. D'ençà del 1958 en què Crick<sup>41</sup> anuncià el "Dogma Central de la Biologia Molecular", i la majoria de la comunitat científica interessada en la síntesi de proteïnes l'adoptà, s'acceptava que el flux d'informació genètica es limitava des del DNA a l'RNA i de l'RNA a proteïnes.<sup>42</sup> Tot i així, a partir dels anys 50, diversos descobriments relacionats amb els denominats virus RNA varen servir com a crítica a aquest dogma, qüestionant el rol exclusiu dels àcids nucleics a l'herència de la informació genètica. Dues de les fites més importants dins aquest camp varen ser el descobriment d'RNA com a material genètic del virus del mosaic del tabac (TMV)<sup>43</sup> i la caracterització de la DNA polimerasa dependent d'RNA aïllada del virus del sarcoma de Rous<sup>44</sup>. A més, durant les darreres dècades s'ha anat comprovant que l'RNA, a més de tenir com a funció el traspàs de la informació genètica des del DNA fins a les proteïnes, com sempre s'havia considerat, presenta una gran quantitat de funcions, com les dels RNAs no codificants,<sup>45</sup> entre els quals es troben els ribocommutadors, que representen una elegant forma de regulació.<sup>46,47</sup>

Els ribocommutadors (en anglès, *riboswitches*) són seqüències altament estructurades d'entre 35 i 250 nucleòtids (amb algunes excepcions més llargues) que es troben situades a l'extrem 5'-UTR (*untranslated region*, regió no traduïda) de certs mRNA. Aquests fragments de mRNA tenen com a funció la regulació de l'expressió gènica.<sup>48</sup> La unió de certs metabòlits a aquestes regions produeix un canvi conformacional a la

seva estructura que altera l'expressió del gen que codifica la resta del mRNA, exercint així el seu poder regulador.<sup>49,50</sup>

El gen que codifica el mRNA està relacionat de forma més o menys directa amb el metabòlit que s'uneix al ribocommutador que regula la seva expressió. Inicialment, es pensava que aquest tipus d'element regulador estava present únicament a organismes unicel·lulars, però hi ha cert tipus de ribocommutadors, com els de TPP, que estan àmpliament distribuïts i són presents a fongs i certes plantes.<sup>51</sup>

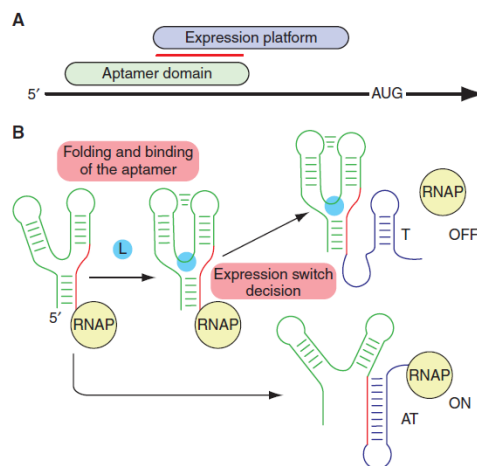
Actualment es coneixen un gran nombre de ribocommutadors que responen a metabòlits de naturalesa diversa, tals com: nucleobases d'adenina, guanina, hipoxantina, prequeosina i di-GMP cíclic; alguns aminoàcids com la lisina, la glutamina i la glicina i altres cofactors com  $Mg^{2+}$ , adenosilcobalamina (AdoCbl), tiamina pirofosfat (TPP), glucosamina-6-fosfat (GlcN6P), tetrahidrofolat (THF) i S-adenosilmetionina (SAM). En els darrers anys, s'ha proposat un nou ribocommutador que respon al MoCo (cofactor de molibdè), igual que un altre ribocommutador responent a níquel i cobalt metàl·lics (ribocommutador NiCo), entre altres que encara no tenen cap metabòlit assignat i sobre els quals s'estan realitzant nous estudis.<sup>12,52,53</sup>

La unió del metabòlit provoca un canvi conformacional generant una cavitat que resulta extremadament específica, que és capaç de distingir metabòlits estructuralment anàlegs. Per aconseguir-ho, el lligand és reconegut directament mitjançant enllaços d'hidrogen amb les bases nitrogenades i/o les riboses, juntament amb interaccions hidròfobes d'apilament (*stacking*), que justifica parcialment l'elevada afinitat entre els ribocommutadors i els metabòlits. Per altra banda, la inaccessibilitat del dissolvent al lloc d'unió entre el lligand i l'RNA implica que l'aptàmer ha d'adoptar una forma oberta i amb certa flexibilitat que permeti l'accés del lligand a la cavitat.<sup>54</sup> A continuació, es produeix un canvi conformacional que tanca la cavitat i encapsula el lligand. Aquest mecanisme d'unió a l'aptàmer s'anomena ajustament induït i és un fet comú a les reaccions en què un metabòlit s'uneix a l'RNA.<sup>51,55</sup> A més a més, els ribocommutadors també necessiten construir estructures moleculars suficientment complexes com per poder realitzar dues funcions: el reconeixement molecular del metabòlit i el posterior canvi conformacional. Per tant, com en la majoria d'RNAs, no es formen només estructures de doble hèlix amb aparellament tipus Watson-Crick, sinó que també hi ha aparellament de bases tipus Hoogsteen, forquilles, hèlixs i loops, a més

de la formació de *3 way (Y) junction* o *4 way junction*, on s'empaqueten diverses forquilles formant aquests patrons específics.<sup>51,56</sup>

Estructuralment, aquestes seqüències d'RNA reguladores es poden dividir en dos dominis funcionals diferents:<sup>57,58</sup>

- Aptàmer: és el domini al qual es produeix la unió amb el metabòlit. És la part dels ribocommutadors més conservada al llarg de l'evolució.<sup>59</sup> Aquest domini adopta una estructura tridimensional quan interacciona amb el metabòlit formant una cavitat capaç de discriminar de forma altament selectiva entre metabòlits semblants per donar una adequada resposta reguladora.
- Plataforma d'expressió: és la zona immediatament anterior a la informació genètica. Després del reconeixement molecular del metabòlit per part de l'aptàmer, es produeix una interacció entre els dos dominis del ribocommutador mitjançant l'aparellament de bases; és un interruptor estructural secundari que interfereix amb la maquinària transcripcional o translacional, aconseguint la regulació dels diferents processos. Hi ha una regió d'RNA compartida pels dos dominis del ribocommutador: és la seqüència de commutació. Aquesta seqüència és l'encarregada de dirigir el plegament que sofrirà l'RNA a una de les dues estructures exclusives de la plataforma d'expressió que representen els estats d'activació i desactivació del mRNA.

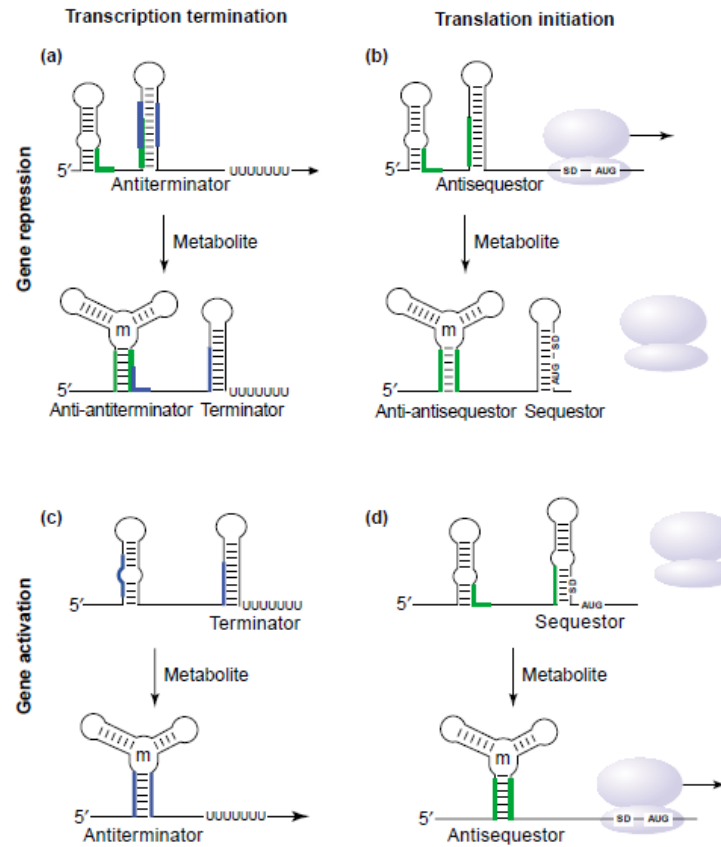


**Figura 7.** Esquema general i mecanisme general d'un ribocommutador qualsevol. (A) Elements estructurals del ribocommutador: aptàmer (verd), plataforma d'expressió (lila) i seqüència de commutació (vermell). (B) Quan el lligand (L, blau) s'uneix a l'aptàmer, l'RNA adopta un o altre plegament a la plataforma d'expressió. Així, s'aconsegueix regular l'expressió gènica.<sup>56</sup>



Com s'ha esmentat anteriorment, els ribocommutadors poden actuar mitjançant diversos mecanismes de regulació<sup>56,60</sup>, tot i que són dos els mecanismes més comuns involucrats en el control gènic:

- La inhibició prematura de la transcripció es produeix quan el metabòlit s'uneix al ribocommutador i causa canvis conformacionals a la plataforma d'expressió i a l'aptàmer. Aquests canvis conformacionals generen la formació d'un nou *loop* de terminació per aparellament de bases al mRNA sintetitzat fins al moment, que provoca l'alliberament de la cadena de DNA motlle per part de l'RNA polimerasa i causa la terminació prematura de la síntesi del mRNA (Figura 8a). També es pot donar el cas en què el segrest del *loop* de terminació (provocat per la unió ribocommutador-metabòlit) dona lloc a l'activació del gen (Figura 8c).
- La regulació de l'expressió gènica es pot dur a terme a nivell de la traducció del mRNA a proteïna. La unió del metabòlit produeix un canvi conformacional a l'aptàmer i al primer fragment de la plataforma d'expressió, generant un *pseudoknot* que controla l'accés del ribosoma al RBS (*ribosome binding site*, lloc d'unió del ribosoma) o seqüència de Shine-Dalgarno (SD), regulant la iniciació de la traducció (Figura 8b). En altres casos, la unió del metabòlit el que provoca és l'estabilització del *pseudoknot* amb la zona antisequestadora, deixant el RBS lliure i, per tant, s'activa la traducció de la proteïna (Figura 8d). Aquest mecanisme es podria utilitzar per regular la traducció dels mRNAs de longitud completa.



**Figura 8.** Mecanismes de regulació més habituals als ribocommutadors. En resposta al canvi de concentració de metabòlit controlen la terminació de la transcripció (a, c) o l'inici de la traducció (b, d). La unió del metabòlit (m) provoca un canvi conformacional que finalitza (a) o activa (c) la transcripció. A més, també pot provocar el segrest de la RBS (b) o el seu alliberament (d).<sup>60</sup>

Els ribocommutadors s'utilitzen pel control de nombrosos gens implicats a la biosíntesi i el transport de cofactors enzimàtics procariontics. Molts dels gens mediats per ribocommutadors s'espera que siguin essencials en la majoria de les condicions de creixement. Es preveu que la interferència amb la funció ribocommutadors produeixi una desestabilització dramàtica de les vies metabòliques vitals i, potser, la cessació del creixement. Per tant, sembla probable que els compostos que s'assemblin molt als metabòlits naturals siguin reconeguts pels ribocommutadors i causin una disminució de l'expressió gènica. Si aquesta alteració induïda per la regulació de l'expressió gènica és suficient, aquests compostos poden ser candidats a aplicacions antimicrobianes.<sup>61</sup> De fet, s'ha confirmat que alguns fàrmacs actuals actuen a nivell de ribocommutadors, com són la piritamina, que actua sobre el ribocommutador de TPP, la roseoflavina, que actua sobre el ribocommutador de FMN i també la L-aminoetil cisteïna (AEC) i la L-4-

oxalisina, que actuen sobre el ribocommutador de la lisina, inhibint la síntesi d'aquests aminoàcids i impedit el creixement del bacteri.<sup>62-65</sup>

### 1.2.1. Ribocommutadors de B<sub>12</sub>

Alguns fenòmens de control gènic que afecten al metabolisme de cobalamines no es poden explicar mitjançant la regulació per proteïnes. Ara bé, s'observa com el seu metabolisme sembla estar controlat pel propi coenzim B<sub>12</sub> mitjançant un procés d'inhibició sense la presència de cap factor proteic. Aquest mecanisme es pot explicar per l'acció dels ribocommutadors de B<sub>12</sub>.<sup>66</sup>

La família de ribocommutadors de cobalamines (també anomenats ribocommutadors de B<sub>12</sub>) es classifica en dos grups: un relacionat amb l'expressió del gen *btuB* i l'altre relacionat amb processos de fermentació de l'etanol, concretament en l'etapa de síntesi de l'etanolamina. El primer grup es divideix en dos subgrups, segons si al ribocommutador s'hi uneix l'adenosilcobalamina (AdoCbl) o l'aquocobalamina, tenint en comú un mateix nucli, molt conservat evolutivament.

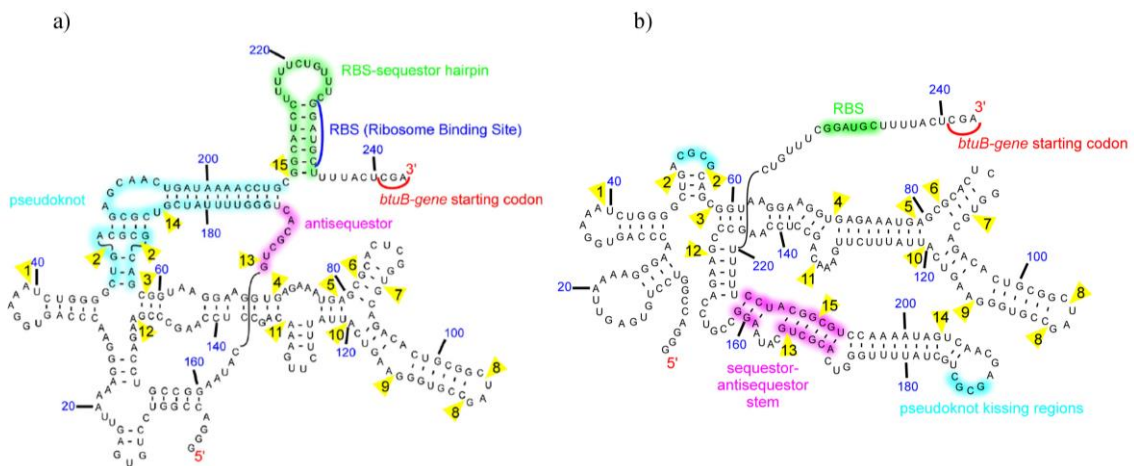
Generalment, el metabòlit al qual responen aquests ribocommutadors amb major afinitat és AdoCbl, encara que s'ha observat a certs organismes marins una major afinitat per l'aquocobalamina. Aquest fet és degut a la gran velocitat de fotòlisi de l'AdoCbl en aquestes condicions, provocant que aquest organismes hagin desenvolupat un mecanisme d'adaptació cap al metabòlit més abundant en aquest cas.<sup>67</sup>

Diferents anàlisis filogenètiques han indicat que els ribocommutadors del coenzim B<sub>12</sub> es troben àmpliament distribuïts tan a bacteris Gram-positius com a Gram-negatius. Generalment, els gens baix el control d'aquests ribocommutadors es troben involucrats en el transport de cobalamines, o associats a la ruta biosintètica del coenzim. Hi ha parts de la seqüència d'aquests ribocommutadors que es troben molt conservades evolutivament parlant, com l'anomenada *B<sub>12</sub>-box*.<sup>68</sup>

### 1.2.2. Ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* és un bacteri immòbil del tipus Gram-negatiu que es troba com a resident al tracte gastrointestinal i al sistema respiratori humà. En els darrers anys s'ha convertit en un important patògen en les infeccions nosocomials, convertint-lo en un objectiu interessant per a nous antibiòtics. A més, *K.pneumoniae* pertany a la mateixa branca filogenètica d'*E.coli* i *S.Typhimurium* (els quals ja s'han estudiat amb major profunditat), però representa un pas endavant en la seva diferenciació.<sup>69</sup>

Aquest patògen presenta, com molts altres bacteris, un ribocommutador que regula l'expressió del gen *btuB*. Aquest gen codifica la proteïna amb la qual comparteix nom. La seqüència del ribocommutador està formada per 243 nucleòtids i interacciona amb l'adenosilcobalamina amb elevada afinitat mitjançant el reconeixement entre l'aptàmer i el metabòlit amb interaccions tipus enllaç d'hidrogen i d'apilament. Com a conseqüència d'aquesta interacció es produeix un canvi conformacional en l'estructura de l'RNA permetent la interacció entre les zones anti-RBS i RBS. D'aquesta manera, queda segregada la zona d'unió al ribosoma, i es diu que el ribocommutador presenta la forma *gene-off* (Figura 9a), en què es produeix la inhibició de la traducció. Quan no hi ha derivats de cobalamines, el ribocommutador es troba amb la forma *gene-on*, en què no es produeix interacció entre el metabòlit i l'aptàmer. Així, queda la zona RBS lliure, degut a l'aparellament de la regió anti-RBS i anti-anti-RBS (*sequestor-antisequestor stem* a la Figura 9b), fent possible la unió dels ribosomes a l'RNA i, conseqüentment, el procés de traducció.<sup>67,68</sup>



**Figura 9.** Estructura secundària proposada per la conformació *gene-off* (a) i *gene-on* (b) del ribocommutador B<sub>12</sub> de la *Klebsiella pneumoniae*.<sup>68</sup>

Els estudis de la interacció del ribocommutador d'*E.coli* amb diferents derivats de cobalamina han estat essencials per a determinar quines interaccions tenen més rellevància. Les interaccions que es produeixen entre els substituents propanamida de l'anell de corrina i l'RNA són primordials pel *switch*. La modificació dels substituents apicals de l'anell de corrina pareix mostrar que els de la cara  $\beta$  (cara on s'uneix l'adenosina) són més essencials que els de la cara  $\alpha$  (cara on s'uneix el *dmbim*) i els lligands apicals voluminosos són indispensables per a una major afinitat del metabòlit amb el ribocommutador. La substitució de l'adenosina pel CN<sup>-</sup>, en el cas de la vitamina

B<sub>12</sub>, condueix a una disminució de la constant d'afinitat en tres ordres de magnitud. A més, mitjançant estudis *in-line probing*, s'ha pogut determinar que l'anell de corrina és determinant per produir la reestructuració de l'aptàmer del ribocommutador *btuB*.<sup>70</sup>

Mitjançant valoració calorimètrica isoterma (ITC, *isothermal titration calorimetry* en anglès) s'han pogut obtenir les variables termodinàmiques en l'associació de l'adenosilcobalamina amb el ribocommutador *btuB* tant de *E.coli* com de *K.pneumoniae*. S'ha trobat el valor de  $K_D = 250 \pm 40$  nM<sup>67</sup> pel ribocommutador de *E.coli*, comparable amb el de *K.pneumoniae*:  $210 \pm 8$  nM a 20 °C i  $530 \pm 57$  nM a 25 °C.<sup>68</sup>

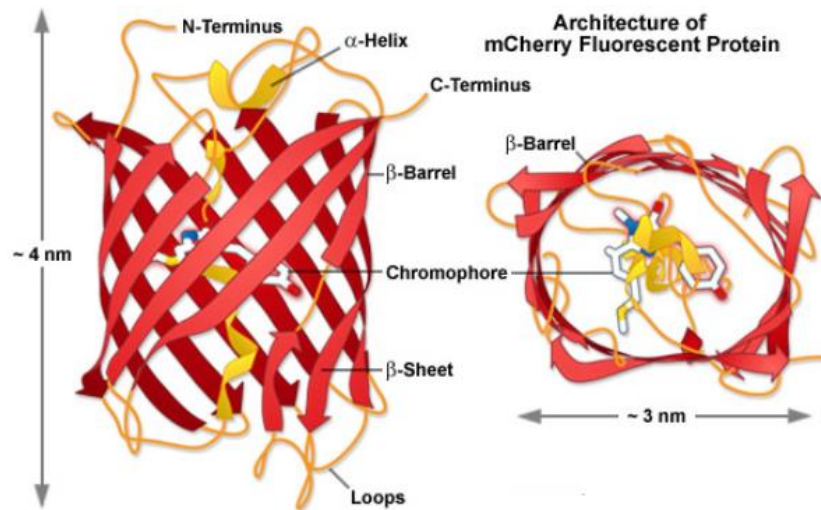
### 1.3. Proteïna *mCherry* i fluorescència

Les tècniques fluorimètriques són unes de les més importants pel que fa a la visualització de cèl·lules vives en temps real. Aquestes tècniques proporcionen una alta sensibilitat i gran versatilitat, minimitzant possibles danys que pogués patir la cèl·lula durant la investigació. Fins al moment totes les proteïnes fluorescentes de colors que van des de groc a vermell que s'han publicat fins ara són generalment tetràmers i sovint tòxiques.<sup>71</sup>

*mCherry* és una proteïna fluorescent *Anthozoa* monomèrica d'alt rendiment derivada d'una proteïna fluorescent (*DsRed*) de *Discosoma sp.* a través d'extenses mutagènesis. El primer monòmer real derivat de *DsRed* va ser *mRFPI*. El *mRFPI* ha demostrat ser bastant útil, però diverses de les seves propietats poden ser millorades. Les *mFruits*, incloent *mCherry*, són proteïnes fluorescentes monomèriques de segona generació que han millorat la brillantor i la fotoestabilitat en comparació amb la primera generació *mRFPI*. Per exemple, *mCherry* ofereix longituds d'ona més llargues, la major fotoestabilitat, la maduració més ràpida i excel·lent resistència al pH.<sup>72</sup>

L'estructura de barril  $\beta$  de les proteïnes fluorescentes d'*Anthozoa* és molt similar a les que es troben en les variants GFP (*green fluorescent proteins*, proteïnes fluorescentes verdes, molt usades en diferents àmbits) en termes de característiques i dimensions generals. A diferència de GFP, les proteïnes obtingudes d'*Anthozoa* presenten un barril amb geometria més el·líptica (Figura 9), potser degut al fet que la majoria de les proteïnes fluorescentes de tipus salvatge d'aquesta classe tenen, originalment, caràcter tetramèric. El cromòfor *mCherry* està situat prop de l'eix central del barril  $\beta$  en una porció de la  $\alpha$ -hèlix que travessa el centre de l'estructura. Es tracta, precisament, d'una modificació

indirecta de l'entorn del cromòfor, en comparació amb *DsRed*, el que produeix variants de color vermell intens com *mCherry*. *mCherry* presenta la seva absorció màxima a 587 nm i la seva màxima emissió a 610 nm.<sup>73,74</sup>



**Figura 10.** Estructura de la proteïna fluorescent *mCherry* (PDB: 2H5Q). Com es pot observar, el cromòfor es situa enmig del barril  $\beta$ .<sup>74</sup>

## 2. OBJECTIUS

Els diferents objectius que s'han establert pel present treball són:

1. Realitzar la síntesi de l'àcid cobíric mitjançant la hidròlisi àcida de la vitamina B<sub>12</sub> i la consegüent purificació.
  - 1.1. Separar correctament els diferents derivats de la vitamina B<sub>12</sub> que es produeixen en la seva hidròlisi mitjançant una columna cromatogràfica.
  - 1.2. Caracteritzar el màxim de bandes possibles de la columna cromatogràfica mitjançant les tècniques instrumentals de ressonància magnètica nuclear i espectrometria de masses d'alta resolució.
  - 1.3. Identificar correctament les fraccions que contenguin cobalamines incompletes.
2. Estudiar la importància del lligand apical inferior (dimetilbenzimidazol) en la interacció dels derivats de vitamina B<sub>12</sub> amb el ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae*, mitjançant estudis *in vivo* amb cultius cel·lulars d'*E. Coli* la proteïna fluorescent *mCherry*.
  - 2.1. Estudiar la capacitat de regulació *in vivo* de l'expressió gènica mitjançant mesures fluorimètriques, per tal de comprovar si el ribocommutador *btuB* es pot modular amb diferents derivats de cobalamines que no contenen el lligand apical inferior.
  - 2.2. Estudiar els punts de saturació del ribocommutador *btuB* de *K.pneumoniae* afegint diferents concentracions de derivats de B<sub>12</sub> a cultius cel·lulars anàlegs.
  - 2.3. Avaluar l'absorció de cobalamines en cèl·lules d'*E. Coli*.

### **3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Instrumentació**

Els cultius de bacteris es realitza a les instal·lacions de bioseguretat autoritzades (laboratori QI-114, edifici Mateu Orfila i Rotger). Les mostres s'incuben amb un Thermomixer Confort de Eppendorf, mentre que el xoc tèrmic es realitza amb un Heat Block de VWR. Per mesurar la concentració de les mostres i la dispersió òptica (OD600) dels cultius s'utilitza un espectrofotòmetre Ultrospec 700 de Ge Healthcare Life Sciences.

Per a la centrifugació de les mostres s'utilitzen les centrífugues refrigerades 5810R amb el rotor F45-6-30 (angle fix 45°, per a 6 tubs de 50 ml), i 5415R amb el rotor F45-24-11 (angle fix 45°, per a 24 tubs de 1.5-2 ml), de Eppendorf. Per concentrar les mostres s'usa un concentrador Vacuum Concentrator Plus de Eppendorf i un rotavapor R-300 de Buchi Switzerland amb bomba de buit V-300 de la mateixa marca.

Per esterifiltrar les dissolucions s'utilitzen filtres estèrils d'un sol ús, de poliestersulfona (PES) amb 0,2 µm de porus, amb embut incorporat (Top filtration unit de VWR i Steritop de Merck Millipore) o d'acetat de cel·lulosa (CA) de 0,2 µm de porus per acoblar a una xeringa (GE Healthcare Life Sciences). Per autoclavar el material i algunes de les dissolucions preparades s'usa l'autoclau Presoclave III 80.

El fluorímetre utilitzat és el Shimadzu Spectrofluorophotometer RF-5301 PC, amb cubetes de metacrilat adequades per fluorescència.

Les tècniques espectroscòpiques usades per la identificació i caracterització de les diferents cobalamines són la ressonància magnètica nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) Bruker Avance 300 i l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS, *high resolution mass spectrometry*) Q Exactive de Thermo Scientific, usant l'electrosprai (ESI) com a font d'ionització.

#### **3.2. Reactius i dissolucions preparades**

Els reactius utilitzats han estat adquirits de VWR, Merck, Prolabo, Alfa Aesar, Sigma Aldrich, Applichem i Amresco amb qualitat p.a., molecular biology, biochemica o superior i han estat usats sense purificacions addicionals. Totes les dissolucions estoc preparades s'autoclaven o esterifiltren abans de ser utilitzades i l'aigua que s'usa és ultrapura, de qualitat Tipus I, equivalent a Milli-Q, autoclavada i esterifiltrada. Tot el



material d'un sol ús que s'usa està esterilitzat i lliure d'RNAses i DNAses. El material reutilitzable sempre s'utilitza després de ser autoclavat 30 minuts a 131 °C.

Tota l'aigua que es fa servir durant la hidròlisi de la vitamina B<sub>12</sub> conté un 0,1 % de cianur potàssic (KCN) 0,1 M. Per fer-ho, a cada litre d'aigua que s'ha d'usar se li afegeix 1 mL de KCN 0,1 M prèviament preparat. Així, s'obté una dissolució de cianur potàssic 0,1 mM.

Pel creixement dels bacteris d'*Escherichia coli* s'usa medi de cultiu Lysogeny Broth (LB) de concentració 25 g/L. La dissolució s'autoclava durant 20 min a 121 °C i una vegada ha refredat fins a uns 50 °C s'hi afegeix l'antibiòtic corresponent. Pel que fa al cultiu en plaques de Petri, es prepara el mateix medi de cultiu LB 25 g/L i s'hi afegeixen 15 g/L d'Agar-Agar. De la dissolució autoclavada i amb el corresponent antibiòtic s'aboquen 25 ml de mescla dins cada placa de Petri i es deixa solidificar. Com antibiòtic s'usa ampil·lina 100 mg/mL, en proporció 1:1000 al medi de cultiu, tenint sempre una concentració final de 100 µg/mL.

Per la purificació de les cèl·lules químicament competents BL21 (DE3) es necessiten dos tampons, anomenats TBF I i TBF II. El tampó TBF I conté acetat potàssic (30 mM), RbCl (100 mM), MnCl<sub>2</sub> (50 mM) i CaCl<sub>2</sub> (10 mM) a pH = 5,8. Per evitar la precipitació del manganès en forma de MnO<sub>2</sub> cal dissoldre totes les sal menys el MnCl<sub>2</sub>. Seguidament s'ajusta el pH a 6,0 amb àcid acètic glacial. S'afegeix el MnCl<sub>2</sub> dissolt en aigua i s'ajusta el pH a 5,8. Finalment, s'ajusta el volum d'aigua i s'esterifiltra la dissolució. El tampó TBF II està format per MOPS (10 mM), RbCl (10 mM), CaCl<sub>2</sub> (75 mM) i un 15 % de glicerol. La dissolució final també s'esterifiltra.

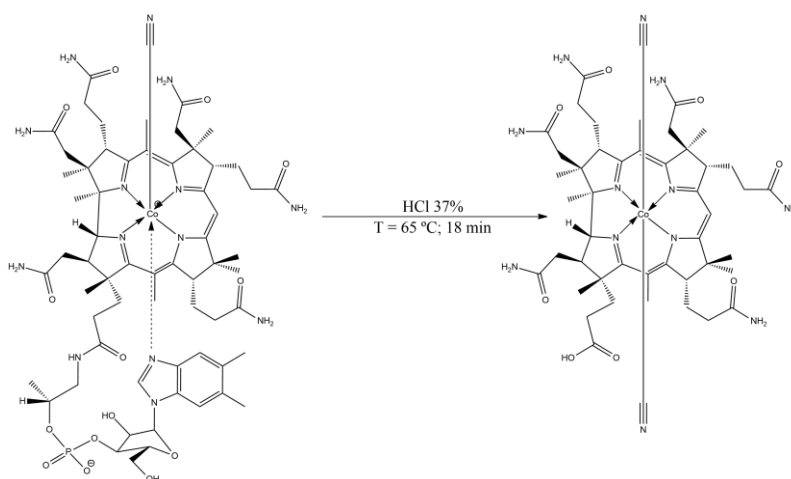
La solució 5X de sals M9 conté Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (64 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 g/L), NaCl (2,5 g/L) i NH<sub>4</sub>Cl (5 g/L). La quantitat necessària de cada sal es dissol en aigua MilliQ autoclavada 20 minuts a 121 °C.

Pel medi de cultiu *M9 supplemented*, la solució de sals M9 es dissol fins una concentració final 1X, i es suplementa amb els següents nutrients, prèviament esterilitzats per filtració abans d'usar-se: glucosa (0,4 %), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), CaCl<sub>2</sub> (100 µM), DL-alanina (100 µg/mL), L-arginina (22 µg/mL), glicina (100 µg/mL), L-histidina (22 µg/mL), L-leucina (20 µg/mL), L-isoleucina (20 µg/mL), L-metionina (20 µg/mL), L-proline (30 µg/mL), L-treonina (80 µg/mL), L-valina (40 µg/mL), L-lisina (88 µg/mL), L-cisteïna (22 µg/mL), L-fenilalanina (20 µg/mL), L-tirosina (20 µg/mL), L-triptòfan (20

$\mu\text{g/mL}$ ), L-serina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), L-asparagina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), L-glutamina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), L-àcid aspàrtic (100  $\mu\text{g/mL}$ ), L-àcid glutàmic (100  $\mu\text{g/mL}$ ), Niacina (1  $\mu\text{g/mL}$ ), pentotenat càlcic (1  $\mu\text{g/mL}$ ), piridoxina-HCl (1  $\mu\text{g/mL}$ ), tiamina-HCl (1  $\mu\text{g/mL}$ ), biotina (500 ng/mL), timidina (40  $\mu\text{g/mL}$ ), timina (40  $\mu\text{g/mL}$ ), uracil (40  $\mu\text{g/mL}$ ). Al medi de cultiu s'ha d'afegir ampicil·lina (100 mg/mL).

### 3.3. Síntesi de l'àcid cobíric

Per realitzar la síntesi de l'àcid cobíric se segueix el procediment descrit primerament per Bonnett, Godfrey i Redman<sup>29</sup>, i posteriorment millorat per Butler, Murtaza i Kräutler.<sup>30</sup> Es realitza una hidròlisi en medi àcid de la vitamina B<sub>12</sub> (Figura 11). Per tal de fer-ho, es pesen 0,5 g de vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) i es dissolen en 69 mL d'àcid clorhídric concentrat (37 %) dins la campana de gasos.



**Figura 11.** Esquema de la hidròlisi de la vitamina B<sub>12</sub> realitzada.

Es divideix el contingut en 5 tubs de vidre amb tap de tefló i es posen els tubs a un bany d'aigua a 65 °C durant 18,5 minuts amb agitació constant. És important controlar durant tot el procés la temperatura, per tal de que no augmenti bruscament. A mesura que la reacció avança el color vermell intens inicial es va tornant ataronjat.

Un cop ha finalitzat la reacció es transvasa el contingut dels 5 tubs de vidre a un embut de decantació que conté 350 mL d'aigua, dins la campana extractora de gasos. A continuació, es neutralitza l'àcid amb 70,5 g de NaHCO<sub>3</sub>. S'ha d'anar afegint molt lentament i s'ha d'eliminar la sobrepressió constantment degut a tot el diòxid de carboni produït per la reacció de neutralització. Quan s'ha afegit tot el bicarbonat la dissolució queda d'un color vermell intens.

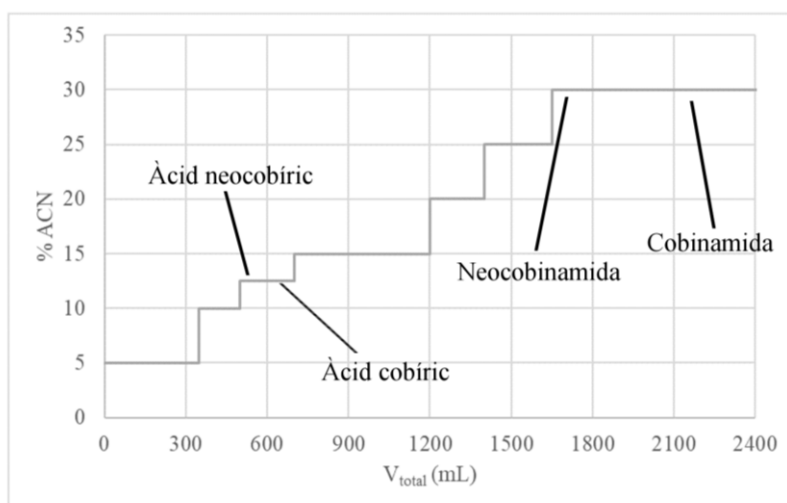
Seguidament, es rotavapora tot el contingut fins a l'aparició d'un sòlid blanc (clorur sòdic, provinent de la reacció de neutralització entre l'HCl i el NaHCO<sub>3</sub>). Es filtra en placa i es renta la sal (que presenta cert color vermell-rosat) amb metanol, fins a la desaparició del color. Es combina el metanol del rentat amb la mescla de reacció i es segueix rotavaporant, anant eliminant la sal (i rentant-la). Un cop eliminada tota la sal es duu la mescla de reacció a sequedat i es redissol amb la mínima quantitat (uns 10-15 mL) d'una dissolució 5 mM de cianur potàssic.

### 3.4. Purificació de l'àcid cobíric

La dissolució anterior conté diversos derivats de la vitamina B<sub>12</sub>, ja que la hidròlisi no és selectiva per l'amina del substituent f (Figura 1), sinó que també s'hidrolitzen altres amides. Per tal de separar les diferents cobalamines, es realitza una separació cromatogràfica amb una columna de sílice C18-RP (fase reversa) de 3 cm de diàmetre i uns 25 cm d'altura, usant una elució en gradient de H<sub>2</sub>O i acetonitril (ACN). A ambdós dissolvents se'ls hi afegeix un 0,1 % (v/v) d'una dissolució KCN 0,1M; així, es tenen dues dissolucions amb 0,1 mM de cianur potàssic.

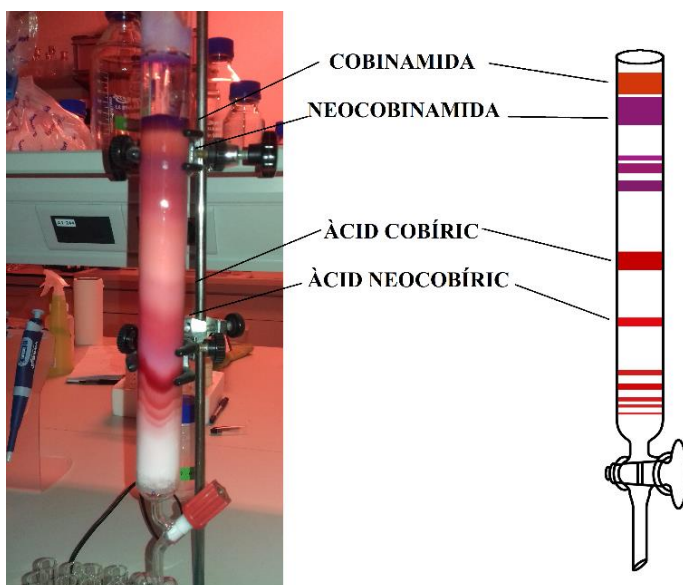
La columna s'acondiciona inicialment amb acetonitril i es renta primerament amb uns 20 mL d'una dissolució de KCN 0,1 mM. Seguidament s'introdueix la mostra (dissolta en aigua) i es fan passar 20 mL de la mateixa dissolució de KCN 0,1 mM.

L'elució es comença amb acetonitril al 5 % (+0,1 % KCN 0,1 M) fins a arribar a acetonitril al 30 % (+0,1 % KCN 0,1 M). A la Figura 12 es pot observar el gradient de concentració d'acetonitril usat durant l'elució.



**Figura 12.** Gradient de concentració d'acetonitril usat durant la columna cromatogràfica.

A mesura que es va fent passar acetonitril es van separant diverses bandes (Figura 13), algunes més fines i algunes més gruixudes, totes elles amb una coloració entre taronja, vermella, rosada i violeta o lila.



**Figura 13.** Fotografia (esquerra) i esquema (dreta) de la columna cromatogràfica C18-RP realitzada per separar els diferents derivats de B<sub>12</sub> obtinguts. S'indiquen a ambdues imatges les quatre cobalamines que s'intenten aïllar.

Es van recollint les diferents fraccions en tubs d'assaigs, s'ajunten els corresponents a la mateixa fracció en matrassos de fons rodó, s'afegeixen unes gotes d'àcid acètic glacial (per tal de transformar les formes diciano-cobalamines en aquaciano-cobalamines) i es rotavaporen fins a sequedat. El residu es redissol en la mínima quantitat (500-1000  $\mu\text{L}$ ) d'una dissolució de KCN 0,1 mM i es guarda dins tub Eppendorf a 4 °C.

### 3.5.Purificació de les fraccions

La primera passa que s'ha de realitzar per tal de rentar les mostres i purificar-les és dur-les a sequedat amb el concentrador, dissoldre-les amb 100  $\mu\text{L}$  d'una dissolució de KCN 0,1 mM i addicionar-hi 1100  $\mu\text{L}$  d'acetona. S'observa l'aparició d'un precipitat vermell intens i cristal·lí.

#### 3.5.1. Cromatografia de capa fina (TLC) i mini-columnes

Es realitza una cromatografia de capa fina (TLC) de sílice (fase normal) per tal de comparar una mostra d'àcid cobíric (obtingut pel procediment explicat anteriorment i identificat mitjançant NMR i HRMS) amb algunes de les altres fraccions, observant-se que algunes d'aquestes són una mescla de productes.

Per mirar de purificar correctament aquestes fraccions, es realitzen mini-columnnes de fase reversa (sílice C18-RP), obtenint una bona separació i també una elució correcta amb unes condicions semblants a la columna gran de C18-RP.

### 3.5.2. Anàlisis dels temps de retenció ( $R_f$ )

Un cop es tenen les diferents fraccions purificades, es fan estudis comparatius dels temps de retenció. S'agafen les fraccions problema (que encara no s'han pogut identificar correctament) i es comparen amb les fraccions ja identificades. S'introdueixen petites quantitats de cada una de les diferents fraccions en mini-columnnes de sílice C18-RP (dins pipetes Pasteur de vidre, Figura 14) i s'elueixen alhora amb acetonitril al 10 %, per tal de veure el seu temps de retenció i comparar les mostres problemes amb les referències.



**Figura 14.** Mini-columnnes C18-RP per l'anàlisi dels temps de retenció. S'observen 3 fraccions amb tonalitats més vermelloses corresponents a mesclades d'àcid cobíric i neocobíric. Les 2 fraccions més violetes es corresponen amb les cobinamides.

Es varen aconseguir aïllar i identificar l'àcid cobíric (MSC1), l'àcid neocobíric (MSC2), la cobinamida (MSC3) i la neocobinamida (MSC4), tots quatre en la forma diciano.

### 3.5.3. Cristal·lització

Un cop identificades les diferents fraccions, es tornen a rentar amb aigua i acetona tal i com s'ha descrit anteriorment. S'intenten cristal·litzar algunes de les mostres, dissolent-les en aigua i afegint-hi unes poques gotes d'acetona (fins aparició de terbolesa) però no s'obtenen cristalls suficientment bons com per fer anàlisi per raigs X de monocristall, només s'obté una pols poc cristal·lina. Es realitzen espectres de ressonància magnètica

nuclear (NMR) i d'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) per tal d'identificar les diferents fraccions.

### **3.6. Preparació de cèl·lules químicament competents BL21 (DE3)**

Es sembren a una placa amb medi de cultiu LB i agar una alíquota de cèl·lules BL21 (DE3) de *E.coli* i es deixa incubant tot el vespre a 37 °C. Posteriorment, es selecciona una colònia segons els criteris següents: han de ser petites i arrodonides, independents de les altres i presentar certa opacitat; s'addiciona en tubs de cultiu amb 6 mL de medi LB i es torna a incubar tota una nit a 37 °C i 210 rpm.

Al dia següent, es transvasen 500 µL del mini-cultiu dins 200 mL de LB i s'incuba a 37 °C i 210 rpm. Es va controlant la OD<sub>600</sub> (dispersió òptica a 600 nm, una mesura del creixement del cultiu) fins que arriba a 0,45-0,55. En aquest moment s'atura la incubació i es divideix el cultiu en 4 tubs de 500 mL estèrils i es centrifuga a 3000 rpm durant 10 minuts, descartant el sobrenedant. Seguidament, es resuspèn el precipitat amb 1 mL de TBF I i es combinen els 4 tubs en un. S'emplena aquest tub fins a 15 mL amb el mateix tampó i s'incuba en gel durant 1 hora.

Al cap d'aquest temps, es centrifuga el tub 10 minuts a 3000 rpm i es torna a descartar el sobrenedant, resuspenant la pellet amb 4 mL de TBF II. Finalment, es fan alíquotes i es congelen immediatament amb nitrogen líquid i es guarden a -80 °C.

### **3.7. Transformació del plasmidi pJP04 dins cèl·lules químicament competents**

El plasmidi pJP04 s'ha de transformar dins cèl·lules químicament competents BL21 (DE3) de bacteris *E. coli* prèviament preparades. Aquests tipus de cèl·lules tenen la capacitat d'integrar material genètic exogen (en aquest cas el plasmidi d'interès per l'estudi) mitjançant medis químics i créixer amb aquesta informació genètica. Per tal de conferir aquesta capacitat, les cèl·lules es modifiquen químicament mitjançant la utilització de tampons i sals que provoquen un xoc osmòtic, conferint-li una certa porositat a la membrana cel·lular que permet l'entrada del material genètic del plasmidi.

Per dur a terme la transformació, s'agafen 100 µL de bacteris químicament competents i s'hi addicionen 2 µL de plasmidi pJP04, agitant mitjançant cops suaus i incubats en gel durant 10 minuts. Posteriorment s'aplica un xoc tèrmic, sense agitació, durant 3 minuts a 37 °C, deixant de nou en gel durant 3 minuts. Amb aquest procediment s'aconsegueix que el plasmidi difongui cap a dins els bacteris i després tornar de nou a recuperar la integritat de les membranes de les cèl·lules. Seguidament, s'hi addicionen 500 µL de

medi de cultiu LB i s'incuba la mescla a 37 °C i 400 rpm durant 30 minuts. Es centrifuguen els tubs durant 2 minuts a 800 rpm i s'elimina part del sobrenedant deixant uns 50 µL dins, per tal de resuspendre les cèl·lules per la posterior sembra en placa. Es sembra una placa Petri de LB-Agar i ampicil·lina, en entorn inocu, amb els 50 µL repartits homogeniament, i s'incuba tot el vespre a 37 °C.

Després d'unes 20 hores, es compten les colònies de la placa (unes 1100) i es seleccionen les que tenen millor aspecte segons els criteris mencionats anteriorment. Cal dir que hi ha un excés de colònies a la placa. Per millorar-ho caldria disminuir la quantitat de cèl·lules sembrades, per tal de disminuir-ne la concentració.

Es seleccionen les colònies adequades amb una punta de pipeta i s'inoculen amb elles dins tubs de cultiu que contenen 6 ml de LB amb el corresponent antibiòtic. Aquests tubs s'incuben a 37 °C i 210 rpm tot el vespre.

### **3.8. Mini-cultius amb cobalamines**

Després del mini-cultiu amb LB, es centrifuguen els tubs durant 2 minuts a 1200 g, eliminant el sobrenedant i deixant eixugar uns minuts la pellet. Seguidament, es renta amb 2,2 mL de medi de cultiu suplementat M9: es redissol la pellet i es centrifuga amb les mateixes condicions abans esmentades. Es descarta el sobrenedant i es resuspèn la pellet amb 4,2 mL del mateix medi de cultiu suplementat.

S'inoculen tubs de cultiu que contenen medi M9 amb diferents concentracions de cobalamina amb 100 µl de bacteris (resuspensió dels bacteris amb medi M9). El volum total de cada tub de cultiu és de 4,1 ml (4000 µl de solució de cobalamina en medi M9 i 100 µl de bacteris). S'utilitza el medi M9 a causa de l'absència de cobalamines. Contràriament, el medi LB conté quantitats incertes de cobalamina a partir de l'extracte de llevat. La taula següent (Taula 1) mostra la concentració de cobalamina (vitamina B<sub>12</sub> (CNCbl), dicianocobinamida (MSC3) i dicianoneocobinamida (MSC4)), per a cada tub:

**Taula 1.** Concentració de les diferents cobalamines usades a cada tub de cultiu. A més dels 30 tubs indicats, s'incuba també un altre tub (Tub 0) amb concentració nul·la de cobalamina, per obtenir el blanc.

<b>Tub</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>[Vit B<sub>12</sub>] (µM)</b>	0,1	1	10	30	50	100	250	500	750	1000
<b>Tub</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>[MSC3] (µM)</b>	0,1	1	10	30	50	100	250	500	750	1000
<b>Tub</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>
<b>[MSC4] (µM)</b>	0,1	1	10	30	50	100	250	500	750	1000

### 3.9. Mesures de fluorescència

Després d'aquest temps, es transfereixen 3 ml de cada cultiu a les cubetes de fluorescència de plàstic i es mesura la dispersió òptica a 650 nm (OD<sub>650</sub>) amb un espectrofotòmetre. No es pot apreciar cap absorció ni emissió (de cobalamines o proteïna *mCherry*) a aquesta longitud d'ona; la dispersió dona una idea sobre la concentració cel·lular en el medi. S'intenta igualar els valors de dispersió afegint medi M9 o eliminant part cel·lular (les diferències en els valors de dispersió oscil·laven en un 5%).

Seguidament, es mesura la fluorescència. Les mostres s'exciten a 560 nm i es registra l'espectre d'emissió de 580 a 900 nm. La proteïna *mCherry* presenta la seva excitació màxima a 587 nm, però a mesura que l'espectre d'excitació es superposa amb l'espectre d'emissió, es decideix realitzar l'excitació a una longitud d'ona més baixa i minimitzar les interferències.



## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1. Hidròlisi de la vitamina B<sub>12</sub>

Després de la hidròlisi de la vitamina B<sub>12</sub> i les conseqüents separacions i purificacions s'han obtingut les següents cobalamines (Taula 2), amb els corresponents rendiments.

**Taula 2.** Cobalamines obtingudes juntament amb el seu rendiment.

Cobalamina	Massa obtinguda (mg)	Rendiment (%)
Dicianocobinamida (MSC3)	61,9	16,1
Dicianoneocobinamida (MSC4)	68,7	17,9

A més de les dues cobinamides, també s'han pogut identificar tant l'àcid dicianocobíric (MSC1) i l'àcid dicianoneocobíric (MSC2) mitjançant l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) i la ressonància magnètica nuclear (NMR). Ara bé, mentre la cobinamida es pot identificar pels seus espectres ESI-HRMS (Figura 15) i <sup>13</sup>C-NMR (Figura 16) com un compost únic, l'àcid cobíric s'obté com una mescla de diferents derivats de B<sub>12</sub> (Figura 17). Per tant, caldrien purificacions posteriors d'aquesta fracció per tal d'obtenir-ne el producte pur.

Pel que fa a l'àcid dicianoneocobíric, els seus espectres són iguals que els de l'àcid cobíric, fet comprensible si pensam que només és diferencien amb un carboni quiral. Per poder-lo identificar correctament hauríem d'obtenir el producte amb major puresa i els espectres de major resolució.

Es realitza l'assignació dels pics de l'espectre <sup>13</sup>C-NMR de la cobinamida, usant D<sub>2</sub>O com a dissolvent, referint a acetona residual (215,940 ppm, C=O): δ (ppm) 181,940 [1C, C(11)], 179,340 [1C, C(4)], 179,086 [1C, C(16)], 175,620 [1C, C(9)], 164,536 [1C, C(6)], 162,013 [1C, C(14)], 106,743 [1C, C(5)], 105,334 [1C, C(15)], 93,688 [1C, CH(10)], 84,039 [1C, C(1)], 76,044 [1C, C(19)], 59,849 [1C, CH<sub>2</sub>(176)], 59,201 [1C, C(17)], 57,401 [1C, CH(3)], 56,606 [1C, CH(8)], 54,110 [1C, CH(13)], 49,442 [1C, C(7)], 48,219 [1C, C(12)], 47,702 [1C, C(2)], 47,424 [1C, CH<sub>2</sub>(71)], 45,901 [1C, CH<sub>2</sub>(21)], 43,771 [1C, CH<sub>2</sub>(175)], 42,953 [1C, CH(18)], 39,899 [1C, CH<sub>2</sub>(32)], 35,588 [1C, CH<sub>2</sub>(171)], 35,239 [1C, CH<sub>2</sub>(181)], 33,159 [1C, CH<sub>2</sub>(82)], 32,949 [1C, CH<sub>2</sub>(132)], 32,221 [1C, CH<sub>2</sub>(172)], 31,781 [1C, CH<sub>3</sub>(12B)], 27,429 [1C, CH<sub>2</sub>(81)], 27,095 [1C, CH<sub>2</sub>(131)], 26,539 [1C, CH<sub>2</sub>(31)], 23,866 [1C, CH<sub>3</sub>(1A)], 22,713 [1C, CH<sub>3</sub>(7A)],

21.149 [1C, CH<sub>2</sub>(12A)], 19,991 [1C, CH<sub>3</sub>(17B)], 19,555 [1C, CH<sub>3</sub>(2A)], 18,783 [1C, CH<sub>3</sub>(51)], 18,312 [1C, CH<sub>3</sub>(151)].

Pel que fa a l'assignació de l'espectre ESI-HRMS, per l'àcid cobríic (C<sub>47</sub>H<sub>65</sub>CoN<sub>12</sub>O<sub>8</sub>): m/z 958,4348 ([M-CN<sup>-</sup> (Co<sup>III</sup>)]<sup>+</sup>, calculada per C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>CoN<sub>11</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 958,4350), 490,7120 ([M-CN<sup>-</sup>+Na<sup>+</sup>(Co<sup>III</sup>)]<sup>2+</sup>, calculada per C<sub>46</sub>H<sub>65</sub>CoN<sub>11</sub>NaO<sub>8</sub><sup>2+</sup>:490,7121).

Per la cobinamida (C<sub>50</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>13</sub>O<sub>8</sub>): m/z 1015,4926 ([M-CN<sup>-</sup> (Co<sup>III</sup>)]<sup>+</sup>, calculada per C<sub>49</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>12</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 1015,4928), 989,4894 ([M-2CN<sup>-</sup> (Co<sup>II</sup>)]<sup>+</sup>, calculada per C<sub>48</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>11</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 989,4897), 519,2412 ([M-CN<sup>-</sup>+Na<sup>+</sup>(Co<sup>III</sup>)]<sup>2+</sup>, calculada per C<sub>49</sub>H<sub>72</sub>CoN<sub>12</sub>NaO<sub>8</sub><sup>2+</sup>: 519,2410).

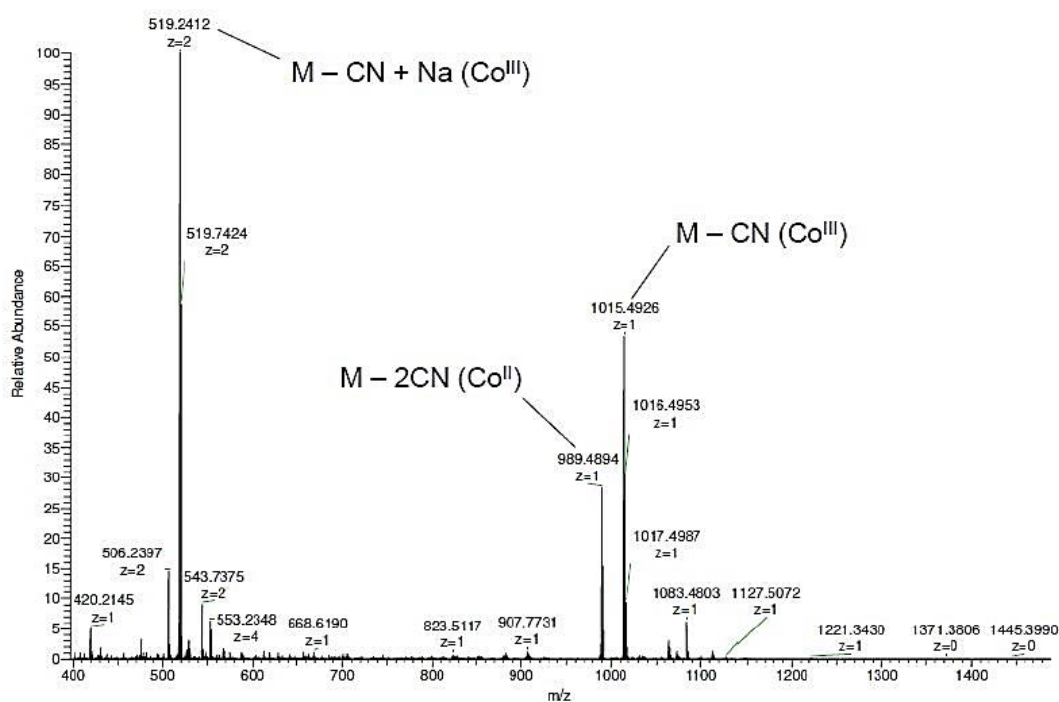


Figura 15. Espectre ESI-HRMS per la dicianocobinamida.

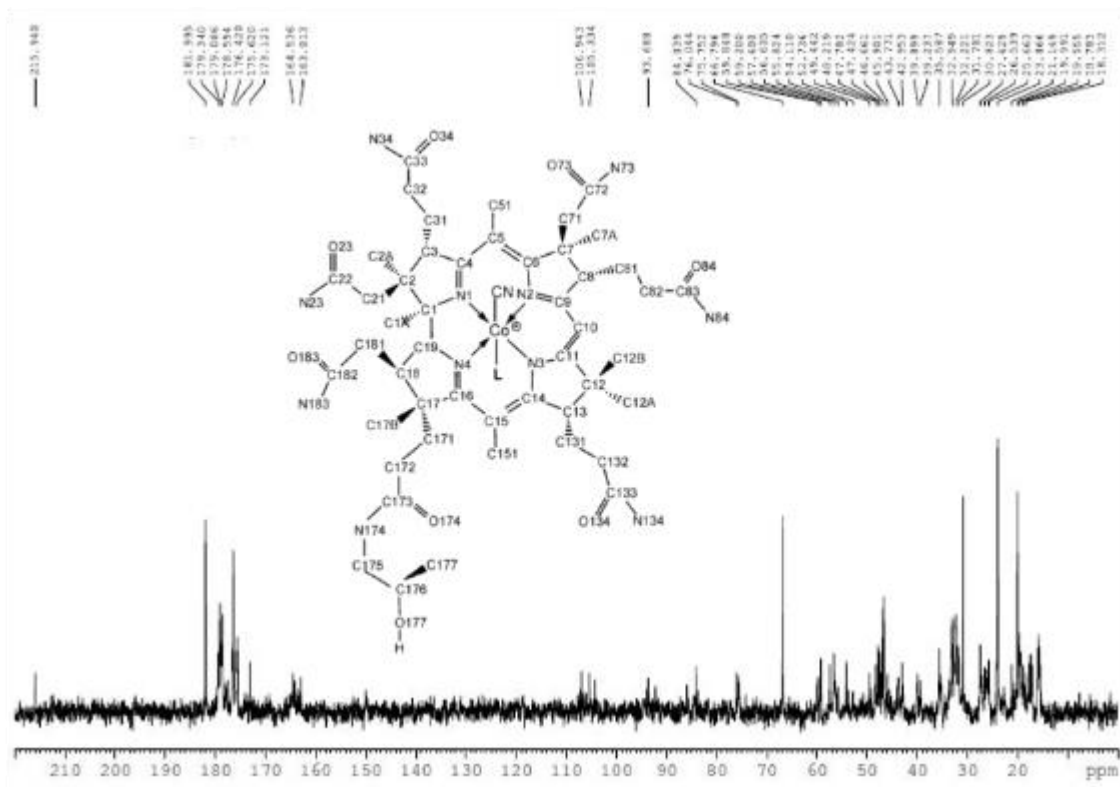


Figura 16. Espectre  $^{13}\text{C}$ -NMR per la dicianocobinamida.

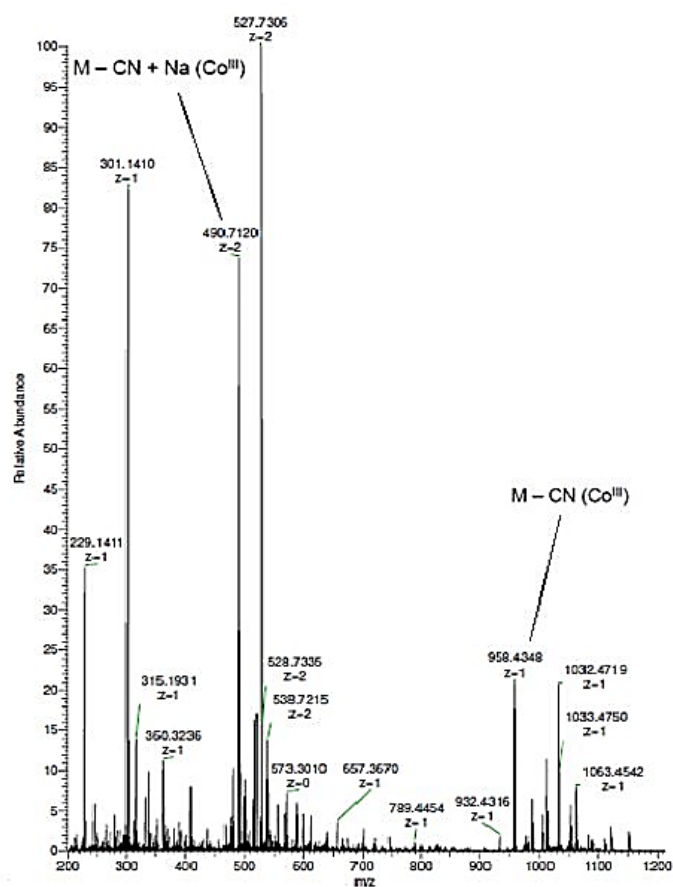
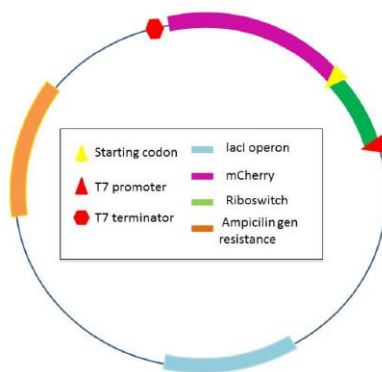


Figura 17. Espectre ESI-HRMS per l'àcid dicianocobíric.

#### 4.2. Experiments de fluorescència: observacions generals

S'ha pogut observar que les colònies transformades amb plasmidi pJP04 presenten un color rosat, fet que confirma, de forma qualitativa, que el plasmidi usat s'ha introduït correctament dins les cèl·lules químicament competents BL21 (DE3). Les senyals de fluorescència recollides confirmen que el responsable de la coloració rosada de les cèl·lules és el fluoròfor *mCherry*, ja que les cèl·lules s'han excitat a la longitud d'ona desitjada i presenten una intensitat de fluorescència màxima a 606 nm. Tenint en compte que, segons la bibliografia consultada, el màxim d'emissió de la proteïna *mCherry* és de 610 nm i que factors com el pH poden moure lleugerament el pic, el màxim d'emissió a 606 nm s'atribueix a la fluorescència de *mCherry*.

El plasmidi pJP04 (Figura 18) conté la seqüència del ribocommutador *btuB* que es vol estudiar juntament amb les cobalamines. La seqüència del ribocommutador *btuB* és seguida per la seqüència *mCherry*\* que substitueix la plantilla *btuB*. La substitució de la proteïna nativa amb aquesta proteïna de color permet detectar la regulació del ribocommutador amb un mètode fluorimètric. A més, també conté un gen de resistència a l'ampicil·lina i un promotor i un terminador de T7, juntament amb l'operó *lacI*, que permet l'activació de la síntesi de proteïnes mitjançant IPTG.



**Figura 18.** Disseny del plasmidi pJP04. A la imatge es ressalten alguns dels elements més importants.

A la Figura 19a-c, es pot observar com la intensitat de la fluorescència disminueix quan augmenten les concentracions de les cobalamines (tant de la cobinamina, com de la neocobinamida i la vitamina B<sub>12</sub>). La intensitat de la fluorescència depèn de la concentració del fluoròfor, que en aquest cas és la proteïna fluorescent *mCherry*.

\* S'agraeix al Prof. Roger Y. Tsien la cessió del plasmidi que contenia la seqüència original de la proteïna fluorescent *mCherry* emprada per a preparar aquest plasmidi pJP04

Ahora, la concentració d'aquesta proteïna depèn de la traducció gènica respectiva, que hauria de ser regulada per el ribocommutador *btuB*. Així, es pot afirmar que, en efecte, el ribocommutador regula l'expressió d'aquesta proteïna, ja que la intensitat de fluorescència disminueix quan augmenta la concentració de cobalamina.

A més, es poden observar diferències en la intensitat de la fluorescència per concentracions iguals de cadascuna de les cobalamines. La intensitat de la fluorescència disminueix més ràpidament per la cianocobalamina que no pas per les altres dues cobalamines provades (cobinamida i neocobinamida). De forma més clara, la senyal de intensitat de fluorescència per a concentracions iguals de cobalamina, és menor per la cianocobalamina. Aquest fet es pot deure a que la cianocobalamina interacciona amb una major afinitat amb el ribocommutador que no pas la cobinamida i la neocobinamida, probablement per la seva falta de lligand apical inferior, que com s'ha comentat abans, és important pel reconeixement del ribocommutador.<sup>70</sup>

### 4.3. Inhibició de la fluorescència

Degut a les diferències observades en la intensitat de la fluorescència, es decideix calcular el percentatge de inhibició de la fluorescència (%I) i, per tant, la inhibició de la síntesi de proteïnes (en el nostre cas, mesurant la inhibició de la síntesi de la proteïna fluorescent *mCherry*). El percentatge es calcula mitjançant la següent equació [1], basada en la intensitat de la fluorescència a 606 nm, on  $F_0$  és el senyal de intensitat de fluorescència per al cultiu cel·lular lliure de cobalamina i  $F$  és el senyal de intensitat de fluorescència per a cada mostra.

$$\%I = \frac{F_0 - F}{F_0} \cdot 100 \quad [1]$$

Els experiments s'han realitzat per duplicat, per tant, per a cada valor de concentració de cada una de les cobalamines existeixen dos valors de intensitat de fluorescència i, en conseqüència, dos valors de percentatge de inhibició (%I). La mitjana dels dos valors de %I i la seva corresponent desviació estàndard es calculen per tal de poder representar el percentatge de inhibició front el logaritme decimal (log) de la concentració de cobalamina (expressat en unitats nM), obtenint la corresponent corba sigmoïdal (Figura 19d). A les següents taules (Taulas 3, 4 i 5) es mostren les dades usades per poder fer la representació abans esmentada, suposant la mateixa captació per a totes les cobalamines.

**Taula 3.** Dades experimentals per la vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) usades per la representació de la Figura 19a. IF significa intensitat de fluorescència i SD, desviació estàndard (de les seves sigles en anglès, *standard deviation*).

[Vit B <sub>12</sub> ] (nM)	log [Vit B <sub>12</sub> ]	IF Exp 1	IF Exp 2	Inhibició			SD
				#1	#2	Mitjana	
0	0	204,7	204,2	0,0	0,0	0,0	0,0
100	2,0	206,1	207,3	-0,7	-1,5	-1,1	0,6
1000	3,0	200,9	200,9	1,9	1,7	1,8	0,1
10000	4,0	204,9	205,0	-0,1	-0,4	-0,2	0,2
30000	4,5	185,9	186,1	9,2	8,9	9,0	0,2
50000	4,7	166,4	166,1	18,7	18,7	18,7	0,0
100000	5,0	134,4	134,5	34,3	34,1	34,2	0,1
250000	5,4	40,6	40,7	80,1	80,1	80,1	0,1
500000	5,7	2,5	2,6	98,8	98,7	98,8	0,0
750000	5,9	4,3	4,4	97,9	97,8	97,9	0,0
1000000	6,0	5,0	5,1	97,5	97,5	97,5	0,0

**Taula 4.** Dades experimentals per la cobinamida (MSC3) usades per la representació de la Figura 19b. IF significa intensitat de fluorescència i SD, desviació estàndard (de les seves sigles en anglès, *standard deviation*). El valor marcat en vermell no es va fer servir degut a que es desviava molt de la corba.

[MSC3] (nM)	log [MSC3]	IF Exp 1	IF Exp 2	Inhibició			SD
				#1	#2	Mitjana	
0	0	204,7	204,2	0,0	0,0	0,0	0,0
100	2,0	239,8	240,0	-17,2	-17,5	-17,3	0,3
1000	3,0	190,4	190,6	7,0	6,7	6,8	0,2
10000	4,0	212,4	212,7	-3,8	-4,1	-4,0	0,2
30000	4,5	199,5	200,7	2,5	1,8	2,1	0,5
50000	4,7	187,7	188,3	8,3	7,8	8,0	0,4
100000	5,0	173,8	173,3	15,1	15,2	15,1	0,0
250000	5,4	161,8	162,0	20,9	20,7	20,8	0,2
500000	5,7	101,8	101,8	50,2	50,2	50,2	0,1
750000	5,9	85,5	85,6	58,2	58,1	58,2	0,1
1000000	6,0	64,7	64,7	68,4	68,3	68,4	0,0

**Taula 5.** Dades experimentals per la neocobinamida (MSC4) usades per la representació de la Figura 19c. IF significa intensitat de fluorescència i SD, desviació estàndard (de les seves sigles en anglès, *standard deviation*).

[MSC4] (nM)	log [MSC4]	IF Exp 1	IF Exp 2	Inhibició			SD
				#1	#2	Mitjana	
0	0	204,7	204,2	0,0	0,0	0,0	0,0
100	2,0	186,1	186,2	9,1	8,8	8,9	0,2
1000	3,0	201,5	201,1	1,5	1,5	1,5	0,0
10000	4,0	194,0	193,7	5,2	5,2	5,2	0,1
30000	4,5	184,7	185,1	9,8	9,4	9,6	0,3
50000	4,7	181,4	181,9	11,3	10,9	11,1	0,3
100000	5,0	170,0	170,5	16,9	16,5	16,7	0,3
250000	5,4	131,7	132,6	35,7	35,1	35,4	0,4
500000	5,7	105,1	104,9	48,7	48,7	48,7	0,0
750000	5,9	84,3	84,8	58,8	58,5	58,7	0,2
1000000	6,0	63,0	63,0	69,2	69,1	69,2	0,1

Seguidament, es realitza un ajustament de les dades considerant l'equació [2] d'una corba sigmoïdal, usant l'eina Solver del programa Microsoft Excel. Els valors més adequats d'a, b, c i d (Taula 6) es calculen minimitzant el valor de la suma d'errors quadrats. Cada error quadrat és  $(y_{est}-y)^2$ , on  $y_{est}$  és el valor estimat per a y de la corba i y és la mitjana del percentatge de inhibició calculat a partir de dades experimentals.

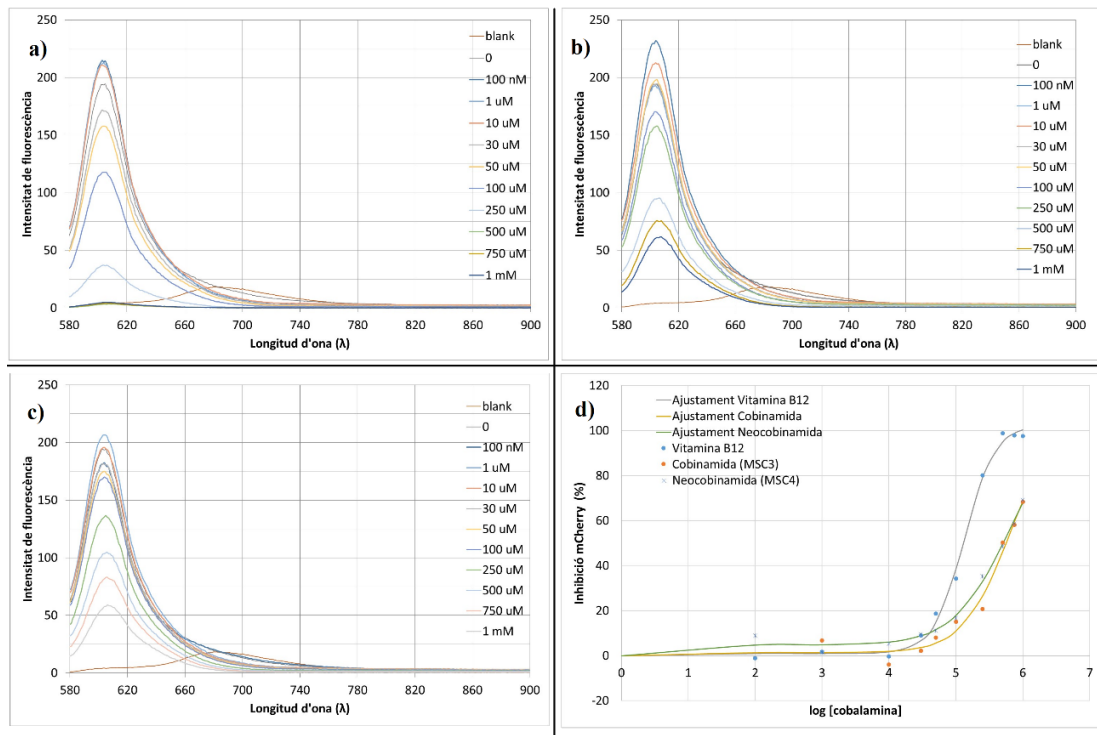
$$y = \frac{a}{1 + e^{b+cx}} + d \quad [2]$$

**Taula 6.** Valors de a, b, c i d més apropiats per l'ajustament de les corbes sigmoïdals per a cada cobalamina.

	Vitamina B <sub>12</sub>	Cobinamida	Neocobinamida
a	-101,5	-106,5	-103,0
b	-22,4	-16,5	-13,8
c	4,4	2,9	2,4
d	102,5	107,8	107,8

Amb les equacions resultants després d'haver ajustat la corba per a les dades experimentals de cada cobalamina, es pot calcular la concentració de cobalamina a la qual es produeix un 50% de inhibició ( $y=50$ ) per a cada cobalamina, usant l'equació [3]:

$$x' = [\text{cobalamina}] = \frac{10^{\frac{\ln\left(\frac{a}{y-d}-1\right)-b}{c}}}{1000} \mu\text{M} \quad [3]$$



**Figura 19.** Espectre d'emissió de les cèl·lules BL21 d'*E.Coli* que contenen el plasmidi pJP04 després de 8 hores d'incubació amb diferents concentracions de cianocobalamina (a), cobinamida (b) i neocobinamida (c). Les mostres s'excitaren a 560 nm. (d) Representació del percentatge d'inhibició de *mCherry* front el logaritme decimal de la concentració de cobalamina (nM). Els punts es corresponen amb els valors experimentals, mentre que les línies es corresponen amb l'ajustament de les dades a una corba sigmoïdal.

Seguidament, per conèixer l'interval de confiança dels valors calculats, la desviació estàndard d'aquesta mesura es calcula per propagació de la variància (equació 4). La desviació estàndard de l'ajust (dels valors estimats  $y$ ) es calcula fent l'arrel quadrada de la divisió del valor per la suma d'errors quadrats per  $n-1$ . Es va considerar que la incertesa deguda a la estimació de  $y$  era l'única incertesa variable que suposava el càlcul de la concentració de cobalamina.



$$\sigma_{x'}^2 \approx \sigma_{y_{estimada}}^2 \cdot \left( \frac{\partial x'}{\partial y_{estimada}} \right)^2 \quad [4]$$

Així, mitjançant la següent equació [5] es pot calcular l'interval de confiança per a la concentració de cada cobalamina:

$$\sigma_{x'} = \sqrt{\sigma_{y_{estimada}}^2 \cdot \left( \frac{-a \cdot \ln(10)}{1000 \cdot c} \cdot \frac{1}{\left(\frac{a}{y-d} - 1\right) \cdot (y-d)^2} \cdot 10^{\frac{\ln\left(\frac{a}{y-d} - 1\right) - b}{c}} \right)^2} \mu M \quad [5]$$

Per tant, d'acord amb aquests càlculs, les concentracions de cobalamina per tal d'assolir el 50% d'inhibició de la síntesi mCherry són  $[CNCb]_{50} = 128 \pm 8 \mu M$ ,  $[MSC3]_{50} = 563 \pm 68 \mu M$  i  $[MSC3]_{50} = 508 \pm 45 \mu M$ .

**Taula 7.** Inhibició (Y), inhibició estimada ( $Y_{est}$ ) i els respectius errors quadràtics i la desviació estàndard usades per calcular l'interval de confiança de la concentració de les diferents cobalamines i l'ajust sigmoidal.

Vitamina B <sub>12</sub>			Cobinamida			Neocobinamida		
Y	Y <sub>est</sub>	Error quadràtic	Y	Y <sub>est</sub>	Error quadràtic	Y	Y <sub>est</sub>	Error quadràtic
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
-1,1	1,0	4,6	0,0	1,4	2,0	8,9	4,8	17,3
1,8	1,0	0,5	6,8	1,4	29,1	1,5	4,9	11,2
-0,2	1,8	4,1	-4,0	2,0	35,5	5,2	6,1	0,9
9,0	6,7	5,3	2,1	3,7	2,5	9,6	8,9	0,4
18,7	14,8	15,3	8,0	5,7	5,6	11,1	11,6	0,2
34,2	38,4	17,0	15,1	11,0	17,3	16,7	17,9	1,4
80,1	78,9	1,4	20,8	26,4	31,4	35,4	32,9	5,8
98,8	94,9	15,2	50,2	46,1	16,6	48,7	49,6	0,9
97,9	98,8	0,9	58,2	59,4	1,5	58,7	60,3	2,9
97,5	100,3	7,9	68,4	68,6	0,0	69,2	67,8	1,9
<b>Suma errors quadràtics</b>		72,1	<b>Suma errors quadràtics</b>		141,5	<b>Suma errors quadràtics</b>		42,9
<b>SD</b>		3,0	<b>SD</b>		4,0	<b>SD</b>		2,3

#### 4.4. Discussió dels resultats

Com hem comentat anteriorment, les concentracions de cobalamina necessàries per a una inhibició de la síntesi de *mCherry* del 50% ( $[CNCbl]_{50} = 128 \pm 8 \mu\text{M}$ ,  $[MSC3]_{50} = 563 \pm 68 \mu\text{M}$  i  $[MSC3]_{50} = 508 \pm 45 \mu\text{M}$ ) confirmen que l'expressió de proteïna s'inhibeix abans per la cianocobalamina que no pas per la cobinamida i la neocobinamida. Aquestes diferències es poden deure a que la interacció entre el ribocommutador i la vitamina B<sub>12</sub> és més forta que no pas amb les cobinamides, probablement degut a la presència o no del lligand apical inferior.

Quan interaccionen la cianocobalamina i el ribocommutador *btuB*, els enllaços d'hidrogen es formen principalment gràcies als grups acetamida i propionamida de la corrina i la majoria de les interaccions van der Waals es produeixen amb l'anell de corrina i les seves cadenes laterals. La diferència entre la vitamina B<sub>12</sub> i les cobinamides és bàsicament la presència o no, respectivament, del lligand apical inferior, el dimetilbenzimidazol. Així, inicialment, les interaccions d'enllaç d'hidrogen i van der Waals no es veurien excessivament modificades, serien anàlogues, sent les diferències d'afinitat degudes, probablement a la presència o no del lligand apical inferior. Per tant, probablement, el fet de presentar o no aquest lligand apical inferior afecta considerablement a la interacció entre la cobalamina i el ribocommutador i, per tant, al canvi de *gene-on* a *gene-off* d'aquest darrer.

A més, en el cas de la neocobinamida, hi ha un carboni quiral diferent al de la cobinamida. Ara bé, els resultats entre la cobinamida i la neocobinamida no són excessivament diferents, fet que fa pensar que la diferència en la quiralitat del carboni número 13 no és rellevant per la realització del *switch* del ribocommutador. És a dir, existeix una certa flexibilitat pel que fa a la integritat espacial de la corrina, ja que el canvi d'estereoquímica d'un carboni no varia l'afinitat del ribocommutador per la cobalamina. En canvi, quan es canvia algun dels grups amida de les cadenes laterals de la corrina per un grup àcid, sí que s'observen canvis significatius en l'afinitat amb el ribocommutador,<sup>70</sup> degut a les diferències que existeixen entre un grup àcid i un grup amida (capacitat de formació d'enllaços d'hidrogen, electronegativitat, etc.).

## 5. CONCLUSIONS

Les conclusions extretes de la present memòria del treball de fi de màster es poden resumir en:

1. La hidròlisi en medi àcid de la vitamina B<sub>12</sub> es va realitzar de forma satisfactòria.
2. Es varen separar els diferents composts obtinguts mitjançant una columna cromatogràfica C18-RP, obtenint, en alguns casos, uns rendiments similars als bibliogràfics i es varen identificar mitjançant HRMS i NMR tres cobalamines diferents: l'àcid cobíric, la cobinamida i la neocobinamida.
3. Es va avaluar la regulació *in vivo* del ribocommutador *btuB* de *Klebsiella pneumoniae* amb diferents cobalamines mitjançant mesures de fluorescència.
4. Les mesures de fluorescència es varen realitzar amb tres cobalamines diferents: la vitamina B<sub>12</sub>, la cobinamida i la neocobinamida. Totes tres cobalamines mostren la mateixa tendència: a major concentració de cobalamina, menor és la intensitat de fluorescència. Per tant, queda confirmat que les diferents cobalamines activen el ribocommutador *btuB* de *K.pneumoniae* bloquejant l'expressió gènica.
5. L'absorció de cobalamina a les cèl·lules d'*E.coli* es va avaluar comparant els valors del 50% de la inhibició entre cobalamines, mostrant que la captació de cianocobalamina és més efectiva que la de les cobinamides, quedant palesa la importància del lligand apical inferior.
6. És necessari seguir amb les investigacions per tal de conèixer amb major profunditat la interacció entre el ribocommutador *btuB* i les diferents cobalamines i quins altres factors estan implicats en la interacció *in vivo*, així com esclarir millor com es realitza l'absorció i quins factors hi estan relacionats.

## 6. REFERÈNCIES

- (1) Vallet, M.; Faus, J.; García-España, E.; Moratal, J. *Introducción a la química bioinorgánica*, 1st ed.; Editorial Síntesis, 2003.
- (2) Robscheit, F. S.; Hooper, C. W.; Whipple, G. H. *Am. J. Physiol.* **1920**, 3, 236.
- (3) Minot, G. R.; Murphy, W. P. *J. Am. Med. Assoc.* **1926**, 87, 470.
- (4) Reisner, E. H. *Bull N Y Acad Med* **1949**, 25 (7), 429.
- (5) Hodgkin, D. C.; Kamper, J.; MacKay, M.; Pickworth, J.; Trueblood, K. N.; White, J. G. *Nature* **1956**, 178 (4524), 64.
- (6) Barker, H. A.; Weissbach, H.; Smyth, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, 44 (11), 1093.
- (7) Weissbach, H.; States, U.; Service, P. H.; Fi-, T. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235 (1).
- (8) Toohey, J. I.; Barker, H. A. *J. Biol. Chem.* **1961**, 236 (2), 560.
- (9) Taylor, S. R. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1964**, 28, 1273.
- (10) Casas, J. S.; Moreno, V.; Sánchez, Á.; Sánchez, J. L.; Sordo, J. *Química bioinorgánica*; Editorial Síntesis, 2002.
- (11) Gruber, K.; Puffer, B.; Kräutler, B. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (8), 4346.
- (12) Giedyk, M.; Goliszewska, K.; Gryko, D. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (11), 3391.
- (13) Bernhauer, K.; Müller, O.; Wagner, F. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1964**, 3 (3), 200.
- (14) Halpern, J. *Science (80-. )*. **1985**, 227 (4689), 869.
- (15) Jensen, K. P.; Ryde, U. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107 (38), 7539.
- (16) Toohey, J. I. *BioFactors* **2006**, 26, 45.
- (17) Mancia, F.; Keep, N. H.; Nakagawa, A.; Leadlay, P. F.; McSweeney, S.; Rasmussen, B.; Bösecke, P.; Diat, O.; Evans, P. R. *Structure* **1996**, 4 (3), 339.
- (18) Drennan, C. L.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4 (6), 919.
- (19) Zelder, F. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (74), 14004.
- (20) Girard, C. L.; Berthiaume, R.; Stabler, S. P.; Allen, R. H. *Arch. Anim. Nutr.* **2009**, 63 (5), 379.
- (21) Heinrich, H. C.; Gabbe, E. E. *Klin. Woch* **1965**, 43, 196.
- (22) Godfrey, J.; Redman, D. G.; Bonnett, R. *Chem. Commun.* **1965**, No. 548, 466.
- (23) Woodward, R. B. *Pure Appl. Chem.* **1973**, 33, 145.

- (24) Eschenmoser, A.; Wintner, C. *Science* (80-. ). **1977**, 196 (4297), 1410.
- (25) Mulzer, J.; Riether, D. *Org. Lett.* **2000**, 2 (20), 3139.
- (26) Mulzer, J.; Riether, D. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (34), 6197.
- (27) Wang, H.; Jacobi, P. A. *Arkivoc* **2010**, No. 4, 15.
- (28) Riether, D.; Mulzer, J. *European J. Org. Chem.* **2003**, No. 1, 30.
- (29) Bonnett, R.; Godfrey, J. M.; Redman, D. G. *J Chem Soc* **1969**, 8, 1163.
- (30) Butler, P. A.; Murtaza, S.; Kräutler, B. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2006**, 137 (12), 1579.
- (31) Lindstrand, K.; Stahlberg, K.-G. *Acta Med. Scand.* **1963**, 174 (6), 665.
- (32) Friedrich, W.; Bernhauer, K. *Z. Naturforsch* **1954**, 9, 685.
- (33) Chimento, D. P.; Kadner, R. J.; Wiener, M. C. *J. Mol. Biol.* **2003**, 332 (5), 999.
- (34) James, K. J.; Hancock, M. A.; Gagnon, J. N.; Coulton, J. W. *Biochemistry* **2009**, 48 (39), 9212.
- (35) Cadieux, N.; Barezzi, N.; Bradbeer, C. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (48), 34921.
- (36) Lundrigan, M. D.; Köster, W.; Kadner, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88 (4), 1479.
- (37) Chimento, D. P.; Mohanty, A. K.; Kadner, R. J.; Wiener, M. C. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10 (5), 394.
- (38) Roy, D.; Steyer, G. J.; Gargasha, M.; Stone, M. E.; Wilson, L. *Curr Opin Struct Biol.* **2009**, 292 (3), 342.
- (39) Gilston, B. A.; Wang, S.; Marcus, M. D.; Canalizo-Hernández, M. A.; Swindell, E. P.; Xue, Y.; Mondragón, A.; O'Halloran, T. V. *PLoS Biol.* **2014**, 12 (11).
- (40) Serganov, A.; Patel, D. J. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8 (10), 776.
- (41) Crick, F. H. C. *Symp. Soc. Exp. Biol. XII* **1958**, 193.
- (42) Watson, J. D. *Molecular Biology of the Gene*; Benjamin, W. A., Ed.; New York (USA), 1965.
- (43) Fraenkel-Conrat, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 882.
- (44) Baltimore, D. *Nature* **1970**, 226 (1209–1211).
- (45) Carthew, Richard W. and Sontheimer, E. J. *Cell* **2009**, 136 (4), 642.
- (46) Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R. *Nature* **2002**, 419 (6910), 952.
- (47) Winkler, W. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (25), 15908.

- (48) Tucker, B. J.; Breaker, R. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15* (3 SPEC. ISS.), 342.
- (49) Wakeman, C. A.; Winkler, W. C.; Iii, C. E. D. **2010**, *32* (9), 415.
- (50) Vitreschak, A. G.; Rodionov, D. A.; Mironov, A. A.; Gelfand, M. S. *Trends Genet.* **2004**, *20* (1), 44.
- (51) Edwards, B. A. L.; Batey, R. T. *Nat. Educ.* **2010**, *3* (9), 1.
  
- (52) Breaker, R. R. *RNAs Worlds: From life's origins to diversity in gene regulation*; Atkins, J. F., Gestelnd, R. F., Cech, T. R., Eds.; Cold Spring Harbor laboratoty press, 2011.
- (53) Furukawa, K.; Ramesh, A.; Zhou, Z.; Weinberg, Z.; Vallery, T.; Winkler, W. C.; Breaker, R. R. *Mol. Cell* **2015**, *57* (6), 1088.
- (54) Sussman, D.; Wilson, C. *Structure* **2000**, *8* (7), 719.
- (55) Wachter, A. *Trends Genet.* **2014**, *30* (5), 172.
- (56) Garst, A. D.; Edwards, A. L.; Batey, R. T. *Cold Spring Harb. Lab. Press* **2011**, 79.
- (57) Aboul-ela, F.; Huang, W.; Abd Elrahman, M.; Boyapati, V.; Li, P. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2015**, *6* (6), 631.
- (58) Bastet, L.; Dubé, A.; Massé, E.; Lafontaine, D. A. *Mol. Microbiol.* **2011**, *80* (5), 1148.
- (59) Barrick, J. E.; Breaker, R. R. *Genome Biol.* **2007**, *8* (11), R239.
- (60) Nudler, E.; Mironov, A. S. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29* (1), 11.
- (61) Winkler, W. C.; Breaker, R. R. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 1024.
- (62) Sudarsan, N.; Cohen-Chalamish, S.; Nakamura, S.; Emilsson, G. M.; Breaker, R. R. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (12), 1325.
- (63) Cressina, E.; Chen, L.; Abell, C.; Leeper, F. J.; Smith, A. G. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (1), 157.
- (64) Blount, K. F.; Breaker, R. R. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (12), 1558.
- (65) Blount, K. F.; Wang, J. X.; Lim, J.; Sudarsan, N.; Breaker, R. R. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (1), 44.
- (66) Nou, X.; Kadner, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (13), 7190.
- (67) Johnson Jr, J. E.; Reyes, F. E.; Polaski, J. T.; Batey, R. T. *Nature* **2012**, *492* (7427), 133.

- (68) Palou-Mir, J.; Musiari, A.; Sigel, R. K. O.; Barceló-Oliver, M. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *160*, 106.
- (69) Ko, W. C.; Paterson, D. L.; Sagnimeni, A. J.; Hansen, D. S.; Von Gottberg, A.; Mohapatra, S.; Casellas, J. M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K. P.; McCormack, J. G.; Yu, V. L. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8* (2), 160.
- (70) Gallo, S.; Oberhuber, M.; Sigel, R. K. O.; Kräutler, B. *ChemBioChem* **2008**, *9* (9), 1408.
- (71) Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. *Nature* **2002**, *3*, 906.
- (72) Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E.; Tsien, R. Y. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (12), 1567.
- (73) Shu, X.; Shaner, N. C.; Yarbrough, C. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J. *Biochemistry* **2006**, *45* (32), 9639.
- (74) <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/anthozoa/fps.htm#fruits>.