



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Ingeniería de proteínas fluorescentes y aplicaciones de localización celular en microorganismos termófilos



TESIS DOCTORAL

Yamal Al-ramahi González

Madrid 2013

Memoria presentada por Yamal Al-ramahi González para optar al grado de Doctor en Microbiología por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. Aurelio Hidalgo Huertas y el Dr. José Berenguer Carlos en el departamento de Biología Molecular.

Madrid 2013.

“Tú perseveraste en el empeño. Eso fue lo que te trajo la buena suerte”, le dijo el instructor de piano a la niña al darle el lazo verde de la buena suerte. Desde entonces, siempre que tocaba el piano, la pequeña llevaba puesto el lazo verde, porque le recordaba que era su propio esfuerzo lo que le traía la buena suerte.

Elizabeth Koda-callan,

El lazo de la suerte, 1990.

Nadie puede silbar solo una sinfonía. Es necesaria una orquesta.

Halford E. Luccock,

365 ventanas, 1943

Afortunadamente, durante el trabajo de investigación para defender esta tesis, he compartido mi tiempo con personas que directa o indirectamente, con sus aportaciones o muestras de apoyo, dentro o fuera del laboratorio, han contribuido de forma positiva a su realización y a las que quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar estoy muy agradecido a mis directores de tesis, Dr. Aurelio Hidalgo y Dr. José Berenguer, por acogerme en su laboratorio, por guiarme, enseñarme, dedicarme el tiempo necesario y por esforzarse en que las cosas no sólo se hagan sino que además se entiendan.

Esther y Mariajo merecen un especial agradecimiento por estar siempre dispuestas a ayudar en lo que haga falta. También estoy agradecido a los demás compañeros de laboratorio: Akbar, Alba, Ángel, Carlos Bricio, Carlos Bayón, Carolina, Eliana, Eloy, Marcos, María Luisa, Noé, Laura y Leticia.

Agradezco la ayuda técnica de Verónica, Maite, Ángeles, Irene y Carlos del SMOC, de Silvia y Berta del servicio de Citometría de flujo, de Margarita Menéndez del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) y los plásmidos cedidos por Olga, Renata y Julie.

Gracias a compañeros y amigos como Ana, Anita, Juncal, Guille, Leticia, María, Miguel Ángel, Vero, Xabi y Paloma.

Gracias a mis padres, a mis hermanos Ismael y Daniel y a Ciri y Miguel por estar siempre dispuestos a ayudar y por cuidar tan bien de sus nietos. Estoy infinitamente agradecido a Naima, Ismael y Ana, por ser mi mayor fuente de felicidad y por vuestra paciencia.

Por último, doy las gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme la beca BES-2007-14924.

Yamal Al-ramahi González,

Madrid, 2013.

ÍNDICES

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS.....	IX
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROTEÍNAS FLUORESCENTES.....	1
1.1.1. Estructura de la GFP.....	2
1.1.2. El cromóforo de avGFP y su entorno.....	3
1.1.3. RFPs: proteínas fluorescentes con espectros de emisión en torno al rojo.....	4
1.1.4. Estructura del cromóforo de las RFPs y sus transformaciones.....	5
1.1.5. Aplicaciones de las proteínas fluorescentes.....	6
1.1.5.1. Uso de proteínas fluorescentes como molécula testigo.....	7
1.1.5.2. Localización basada en el uso de proteínas fluorescentes.....	7
1.1.5.3. Estudios de interacción basados en proteínas fluorescentes.....	7
1.1.5.4. Sensores basados en proteínas fluorescentes.....	8
1.1.5.5. Aplicaciones basadas en la inactivación por luz asistida por el cromóforo (CALI).....	9
1.1.6. Diseño de proteínas fluorescentes mediante ingeniería de proteínas.....	11
1.2. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	14
1.2.1. MÉTODOS DE MUTAGÉNESIS.....	15
1.2.1.1. Métodos no recombinantes.....	15
1.2.1.2. Métodos de recombinación.....	17
1.2.1.2.1. Métodos de recombinación <i>in vitro</i>	18
1.2.1.2.1.1. Métodos de recombinación que dependen de la homología entre fragmentos.....	19
1.2.1.2.1.2. Métodos de recombinación que no dependen de homología entre fragmentos.....	19
1.2.1.2.2. Métodos de recombinación <i>in vivo</i>	20
1.2.3. Métodos de detección: selección y cribado (screening).....	20
1.3. EXTREMÓFILOS Y TERMÓFILOS.....	23
1.3.1. Los microorganismos termófilos como fuente de termozimas.....	24
1.3.1.2. Termoestabilidad de proteínas.....	24

1.3.2. Los termófilos como modelo de estudio.....	25
1.3.3. Experimentación con termófilos.....	26
1.3.4. El genero <i>Thermus</i>	26
1.3.4.1. Hábitats donde se encuentran.....	28
1.3.4.2. Ultraestructura de envolturas bacterianas en el género <i>Thermus</i>	29
1.3.4.3. Metabolismo.....	30
1.3.4.4. <i>Thermus thermophilus</i>	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1. MATERIALES.....	39
3.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	39
3.2.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas.....	39
3.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	39
3.2.3. Transformación de <i>Thermus thermophilus</i>	40
3.3. MÉTODOS MOLECULARES.....	40
3.3.1. Manipulación de ácidos nucleicos.....	40
3.3.2. Manipulación de proteínas.....	43
3.3.2.1. Purificación de proteínas.....	43
3.3.2.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	44
3.3.2.3. Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western-blot</i>	45
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
3.5. MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN.....	47
4 RESULTADOS.....	51
4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DERIVADAS DE SGFP.....	51
4.1.1 Obtención de variantes de color mediante diseño racional.....	51
4.1.2 Expresión y purificación de mutantes de proteínas fluorescentes termoestables.....	52
4.1.3 Caracterización espectral.....	53
4.1.4. Termoestabilidad.....	55

4.1.4.1. Variación de la intensidad de emisión fluorescente frente al aumento de temperatura.....	55
4.1.4.2. Grado de recuperación de la emisión fluorescente.....	58
4.1.4.3. Desactivación térmica a 80 °C.....	59
4.1.4.4. Resistencia a ciclos intermitentes de 95 °C y 30 °C.....	59
4.1.4.5. Valoración de la termoestabilidad mediante dicroísmo circular.....	60
4.1.5. Diferencias en el rendimiento cuántico de las variantes proteicas purificadas.....	62
4.1.6. Expresión de variantes de sGFP en <i>Thermus thermophilus</i> HB27.....	63
4.1.7. Estudio de microorganismos termófilos mediante la segmentación por colores.....	66
4.1.8. Localización <i>in vivo</i> de proteínas mediante su fusión a testigos termoestables.....	67
4.1.9. FRET.....	71
4.1.9.1. Prueba de la viabilidad del FRET en <i>T. thermophilus</i>	72
4.1.9.2. Modelos basados en FRET para detectar la interacción entre proteínas en <i>T. thermophilus</i>	72
a. Modelo de interacción entre elementos del “Sistema CRISPR-Cas”.....	73
b. Modelo de interacción entre DnrS y DnrT.....	74
c. Modelo de interacción entre proteínas implicadas en la quimiotaxis en <i>Thermotoga maritima</i>	75
4.2. OBTENCIÓN DE VARIANTES DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE mCHERRY FUNCIONALES EN <i>Thermus thermophilus</i>	76
4.2.1. Obtención de genotecas de mutantes de mCherry mediante epPCR.....	76
4.2.2. Selección de variantes termoestables mediante THR.....	79
4.2.3. Mejora de la maduración del cromóforo en mCherry.....	81
4.2.5. Observación de la fluorescencia de mutantes de mCherry <i>in vivo</i>	83
5. DISCUSIÓN.....	87
6. CONCLUSIONES.....	115

7. BIBLIOGRAFÍA.....	119
8. ANEXO I.....	133
Anexo I.I. Tablas anexas.....	133
Anexo I.II. Figuras anexas.....	143

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Porcentajes de identidad de secuencia en las especies de <i>Thermus</i>	27
Tabla 4.1. Reemplazos puntuales de interés.....	51
Tabla 4.2. Temperatura de fusión basada en la curva de desactivación de la fluorescencia.....	57
Tabla 4.3. Porcentajes de fluorescencia al final del experimento de recuperación a 30 °C.....	58
Tabla 4.4. Temperatura de fusión basada en dicroísmo circular (T_m^{CD}).....	61
Tabla 4.5. Valores de rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f).....	63

Tablas del anexo I.I

Tabla I. Cepas empleadas en este trabajo.....	133
Tabla II. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	133
Tabla III. Plásmidos construidos en este trabajo.....	134
Tabla IV. Oligonucleótidos empleados.....	135
Tabla V. Medios de cultivo.....	135
Tabla VI. Soluciones y tampones.....	136
Tabla VII. Antisueros empleados para <i>western-blot</i> en este trabajo.....	136
Tabla VIII. Productos comerciales.....	137
Tabla IX. Equipos utilizados.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras de introducción

Figura 1.1. Diagrama de la topología del plegamiento en la proteína GFP.....	2
Figura 1.2. Modelo estructural de la avGFP y de su cromóforo.....	3
Figura 1.3. Principales transformaciones químicas de cromóforos de RFPs.....	6
Figura 1.4. Esquema de las principales aplicaciones de las proteínas fluorescentes.....	10
Figura 1.5. Mapa de mutaciones.....	12
Figura 1.6. Reemplazos en la sGFP respecto a la avGFP.....	13
Figura 1.7. Métodos de ingeniería de proteínas.....	22
Figura 1.8. Límites de tolerancia de microorganismos en función de la temperatura.....	23
Figura 1.9. Taxonomía del <i>Phylum Deinococcus-Thermus</i>	28
Figura 1.10. Ultraestructura de envolturas bacterianas en <i>T. aquaticus</i>	29

Figuras de resultados

Figura 4.1. Alineamiento de secuencias.....	52
Figura 4.2. Tinción con azul de Coomassie.....	53
Figura 4.3. Espectros de absorción y emisión.....	55
Figura 4.4. Resultado de los ensayos de termoestabilidad basados en fluorescencia.....	57
Figura 4.5. Gráfica de recuperación de la fluorescencia.....	58
Figura 4.6. Comparación de la desactivación térmica a 80 °C de sIFP y sGFP.....	59
Figura 4.7. Ciclos frío/calor.....	59
Figura 4.8. Espectros de elipticidad molar.....	60
Figura 4.9. Estimación de termoestabilidad basada en dicroísmo circular.....	61
Figura 4.10. Rendimiento cuántico.....	62
Figura 4.11. Expresión de mutantes de <i>sgfp</i> en <i>Thermus thermophilus</i> HB27.....	64
Figura 4.12. Caracterización poblacional mediante citometría de flujo.....	65
Figura 4.13. Imágenes de <i>T. thermophilus</i> segmentadas por colores.....	66
Figura 4.14. Evidencia de la expresión de fusiones a testigos termoestables.....	67

Figura 4.15. Localización de CasB mediante su unión a sE1FP, sIFP y sV2FP en cada caso.....	68
Figura 4.16. Localización de proteínas del complejo Cas.....	69
Figura 4.17. Seguimiento de la localización de casB <i>in vivo</i>	70
Figura 4.18. Solapamiento de espectros.....	71
Figura 4.19. Señal FRET: métodos empleados.....	71
Figura 4.20. FRET con el modelo de unión donador-aceptor.....	72
Figura 4.21. Verificación del tamaño de DNA.....	74
Figura 4.22. Seguimiento de la producción de fusiones a proteínas fluorescentes mediante <i>Western blot</i>	75
Figura 4.23. Tasas de reemplazo resultantes de las distintas mezclas de epPCR.....	76
Figura 4.24. Transiciones y transversiones en función de la concentración de Mn ²⁺	77
Figura 4.25. Distribución de transiciones y transversiones según la clase de reemplazo de nucleótido.....	78
Figura 4.26. Distribución de los reemplazos en la secuencia primaria de mCherry.....	79
Figura 4.27. Diversidad química de los aminoácidos reemplazantes.....	79
Figura 4.28. Efecto de la concentración de kanamicina en el número de colonias por placa.....	80
Figura 4.29. Maduración del cromóforo en mCherry.....	81
Figura 4.30. Observación mediante <i>scanner</i> de fluorescencia.....	82
Figura 4.31. Secuencias de mutantes de mCherry.....	83
Figura 4.32. Microscopía mediante segmentación automática por colores.....	83

Figuras del anexo I.II

Figura A.I.II.1. Funciones derivada.....	143
---	-----

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

avGFP	proteína fluorescente verde de <i>Aequorea victoria</i> (<i>Aequorea victoria green fluorescent protein</i>).
B-FIT	test iterativo del factor B (<i>B factor iterative test</i>).
BP	paso de banda (<i>band pass</i>).
BSA	albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>).
CALI	inactivación por luz asistida por el cromóforo (<i>chromophore assisted light inactivation</i>).
CAST	test combinatorial saturante del centro activo (<i>combinatorial active site saturation test</i>).
CD	dicroísmo circular (<i>circular dichroism</i>).
CheA ^{p1p2}	fragmento de la proteína CheA que comprende sus dominios p1 y p2.
CLERY	mejora combinatorial de genotecas mediante recombinación en levaduras (<i>combinatorial library enhancement by recombination in yeast</i>).
DNA	ácido desoxiribonucleico (<i>desoxiribonucleic acid</i>).
DO _λ	densidad óptica medida con una longitud de onda de λ nm.
ddH ₂ O	agua doblemente destilada.
DMSO	dimetil sulfóxido.
DOGS	mezcla de genes con oligonucleótidos degenerados (<i>degenerate oligonucleotide gene shuffling</i>).
DsRed	proteína fluorescente roja de <i>Discosoma striata</i> (<i>Discosoma striata red fluorescent protein</i>).
eCFP	proteína fluorescente cian mejorada (<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>).
eGFP	proteína fluorescente verde mejorada (<i>enhanced green fluorescent protein</i>).
ε _λ	coeficiente de extinción molar.
EosFP	proteína fluorescente Eos (<i>Eos fluorescent protein</i>).
epPCR	PCR propensa a error (<i>error prone PCR</i>).
eYFP	proteína fluorescente amarilla mejorada (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>).
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>).

ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
FACS	clasificación de células basada en la activación por fluorescencia (<i>fluorescence activated cell sorting</i>).
FRET	transferencia Förster de energía resonante (<i>Förster resonance energy transfer</i>).
GFP	proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>).
Grx	glutaredoxina.
HTS	Cribado de alto rendimiento (<i>high-throughput screening</i>).
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido.
ISM	mutagénesis saturante iterativa (<i>iterative saturation mutagenesis</i>).
ISOR	incorporación de oligonucleótidos sintéticos mediante el re-ensamblaje de genes. (<i>incorporating synthetic oligonucleotides via gene reassembly</i>).
ITCHY	truncado incremental para la creación de enzimas híbridas (<i>incremental truncation for the creation of hybrid enzymes</i>).
Kan ^r	resistente al antibiótico Kanamicina.
LB _{agar}	medio de cultivo Luria Bertani con Agar.
LB _{Kan30}	medio de cultivo Luria Bertani con kanamicina a una concentración final de 30 mg·L ⁻¹ .
LB _{agar;Kan30}	medio de cultivo Luria Bertani con agar y con kanamicina a una concentración final de 30 mg·L ⁻¹ .
mCherry	proteína fluorescente Cherry monomérica (<i>monomeric Cherry</i>).
mFruit	proteínas fluorescentes Fruit monoméricas (<i>monomeric Fruit</i>).
mEos2	proteína fluorescente Eos2 monomérica (<i>monomeric Eos2</i>).
mKO	variante monomérica de la proteína fluorescente Kusabira Naranja (<i>monomeric Kusabira Orange</i>).
mIrisFP	proteína fluorescente Iris monomérica (<i>monomeric Iris fluorescent protein</i>).
mNeptuno	proteína Neptuno monomérica (<i>monomeric Neptuno</i>).
mOrange	proteína Orange monomérica (<i>monomeric Orange</i>).
mRouge	proteína Rouge monomérica (<i>monomeric Rouge</i>).
MSD-SM	mutagénesis saturante en varias posiciones (<i>multisite directed saturation mutagenesis</i>).

mTagBFP	proteína fluorescente azul monomérica (<i>monomeric blue fluorescent protein</i>).
Orp1	tiolperoxidasa Orp1.
PAmCherry	Proteína fluorescente Cherry monomérica y fotoactivable (<i>photoactivated monomeric Cherry</i>).
PATagRFP	proteína fluorescente Tag roja y fotoactivable (<i>photoactivated Tag red fluorescent protein</i>).
PAmKate	proteína Kate monomérica y fotoactivable (<i>photoactivated monomeric Kate</i>).
pb	pares de bases.
PDB	banco de datos de proteínas (<i>protein data bank</i>).
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>).
PMT	tubo fotomultiplicador (<i>photomultiplier tube</i>).
ProSAR	relación de la estructura proteica con la actividad (<i>protein structure activity relationship</i>).
PVDF	fluoruro de polivinilideno (<i>polyvinylidene fluoride</i>).
RACHITT	generación aleatoria de quimeras en moldes transitorios (<i>random chimeragenesis on transient templates</i>).
rpm	revoluciones por minuto.
rDNA	cDNA obtenido a partir de rRNA (RNA ribosómico).
RFPs	proteínas fluorescentes rojas (<i>red fluorescent proteins</i>).
ROS	especie de oxígeno reactivo (<i>reactive oxygen species</i>).
roGFP	proteína fluorescente verde sensible al estado redox.
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (<i>sodic dodecil sulfate polyacrilamide agarose gel electrophoresis</i>).
sGFP	proteína fluorescente verde con capacidad de plegamiento mejorada (<i>superfolder green fluorescent protein</i>).
<i>sgfp</i>	gen que codifica la proteína sGFP.
SHIPREC	recombinación de proteínas independiente de homología de secuencias (<i>sequence homology-independent protein recombination</i>).
SIGNAL	generación de genotecas de quimeras ordenadas independiente de secuencia (<i>sequence-independent generation of chimera-ordered library</i>).

ABREVIATURAS

SM	mutagénesis saturante (<i>saturation mutagenesis</i>).
SOC	caldo super óptimo con represión por catabolito (<i>super optimal broth with catabolite repression</i>).
StEP	proceso de extensión escalonada (<i>staggered extension process</i>).
TAE	tampón tris-acetato con EDTA.
TB _F	medio de cultivo <i>Thermus broth</i> elaborado con agua mineral Fontjaraba.
TB _{F-agar}	medio de cultivo TBF suplementado con agar.
Ti	reemplazo de nucleótido mediante transición.
Ti/Tv	razón entre transversión y transición.
T _m ^{CD}	temperatura de fusión basada en dicroísmo circular
T _m ^f	temperatura a la que ocurre la pérdida del 50% de la fluorescencia inicial.
TRITC	isotiocianato de tetrametil rodamina (<i>tetramethyl rhodamine isothiocyanate</i>).
Tv	reemplazo de nucleótido mediante transversión.
U.V.	Ultravioleta.

ABSTRACT

ABSTRACT

Fluorescent proteins are the basis of powerful tools that provide solutions for the study of physiological processes and for the development of biotechnological applications. The green fluorescent protein was first discovered fifty years ago by Shimomura, who isolated it from the jellyfish species *Aequorea victoria* and performed its first characterization. Since then, great knowledge has been achieved on its structure and the mechanisms for fluorescence emission. By means of protein engineering and the discovery of new fluorescent protein variants from homolog species, such as DsRed from *Discosoma striata*, a broad “color palette” has been developed and the number of applications has been rapidly increasing. With few exceptions, known fluorescent proteins are suitable as nontoxic and noninvasive, easily diffusing probes to study different biological models ranging from bacterial organisms to mammals.

There is special interest in the application of these fluorescent proteins for the study of *Thermus thermophilus*. This thermophilic species is excellent as model organism for basic and applied research. Unlike other organisms, it grows easily in the laboratory, acquires exogenous DNA with extraordinary efficiency by natural competence and the ease of its enzymes and multiprotein complexes to crystallize makes it a good choice for structural biology studies. *T. thermophilus* is a suitable host for the production of thermozymes, for the thermostabilization of thermolabile proteins and it is an excellent model for the study of the respiratory metabolism and its regulation. Despite being so interesting, there is still a shortage of tools to study the physiology of thermophiles and its regulation, especially in comparison to other models such as *Escherichia coli*.

The aim of our work was to expand the “color palette” suitable for use in *T. thermophilus* in order to circumvent the existing limitations for the study and application of this microorganism. On one hand, a rational design based on the existing knowledge of avGFP color variants was carried out to obtain cyan, cyan-green, green and yellow thermoestable variants from the existing superfolder GFP, whose suitability for use in *T. thermophilus* has been recently proven. By means of this, fourteen variants were obtained and their spectral and thermostability properties were characterized. The suitability of these superfolder fluorescent protein variants for use at high temperature in vivo was proven by means of expression in *T. thermophilus*. Finally, models to localize proteins in vivo based on the obtained superfolder fluorescent protein variants, were developed. On the other hand, a method of directed molecular evolution by random mutagenesis of existing mCherry followed by screening for enhanced chromophore maturation derivatives was developed. This allowed the isolation of three candidates that then were expressed in *T. thermophilus* to obtain fluorescent microscopy images. Our results with the design and characterization of sGFP variants and screening of mCherry derivatives evidence potential to broaden the spectrum of the thermostable fluorescent protein palette and its future applications.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROTEÍNAS FLUORESCENTES

Las proteínas fluorescentes se encuentran entre los fluoróforos más empleados como base para el estudio de procesos fisiológicos y para el desarrollo de potentes herramientas biotecnológicas. Se conoce su existencia en celentéreos del grupo de los Hidrozoos como *Aequorea*, *Obelia* y *Phialidium* y del grupo de los Antozoos como *Renilla*. La mayoría de proteínas fluorescentes en el rango del azul, verde o amarillo que se emplean hoy día son derivados de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (avGFP), obtenidos mediante ingeniería de proteínas (Olenych *et al.*, 2007). La proteína fluorescente verde de *A. victoria* fue descubierta hace cincuenta años por Shimomura (Shimomura *et al.*, 1962). Desde entonces se ha avanzado mucho en el estudio de su estructura y el conocimiento del mecanismo responsable de la emisión de fluorescencia (Heim *et al.*, 1994). Se ha desarrollado una amplia “paleta” de colores y el número de éxitos en su aplicación crece de forma rápida y constante (Stepanenko *et al.*, 2011). Las proteínas fluorescentes, en la diversa gama de colores en que existen, han sido útiles en el estudio de organismos desde bacterias (Biteen *et al.*, 2008) hasta plantas superiores (Ckurshumova *et al.*, 2011) y mamíferos (Livet *et al.*, 2007). Son sondas, codificadas genéticamente, carentes de toxicidad, no invasivas, que difunden fácilmente y que al poderse sintetizar *in vivo* eluden barreras propias de las técnicas histológicas tradicionales como la posible impermeabilidad de las membranas de separación.

La GFP de *A. victoria* (avGFP) fue la primera en ser descrita, aislada y caracterizada. Esta proteína posee unas propiedades que se han podido relacionar con su estructura y que reflejan la enorme plasticidad de la que derivan muchas de sus aplicaciones. Tiene un espectro de absorción con un máximo principal a 395 nm y un máximo local a 475 nm, siendo respectivamente los coeficientes de extinción molar aproximados de $30\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $7\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Phillips, Jr., 1997). El máximo de emisión es a 508 nm. La excitación prolongada de esta proteína conduce a una disminución del máximo de excitación a 395 nm y un aumento recíproco en el máximo de excitación a 475 nm. Este efecto de conversión es especialmente evidente al irradiar la avGFP con luz ultravioleta. Los dos estados correspondientes a las dos principales bandas de absorción pueden interconvertirse rápidamente en el estado excitado y la presencia de un efecto isotópico implica movimiento de protones en dicha conversión (Chattoraj *et al.*, 1996; Lossau *et al.*, 1996). El espectro de fluorescencia de GFP cristalina es casi idéntico al de la proteína en solución acuosa (Perozzo *et al.*, 1988) por lo que la obtención de su estructura tridimensional ayudó a explicar la generación de la fluorescencia en la proteína madura y el mecanismo de formación autocatalítica del cromóforo.

1.1.1 Estructura de la GFP

La GFP se cristalizó por primera vez en 1974 y los patrones de difracción se describieron en 1988. Sin embargo, su estructura no se resolvió por primera vez hasta 1996. Estudios basados en otras formas cristalinas y en mutantes obtenidos mediante reemplazos sobre la secuencia original permitieron profundizar más en su descripción (Tsien, 1998). La estructura del monómero de GFP consta de un barril- β regular con 11 cadenas en el exterior del cilindro, enhebradas por una α -hélice que lo atraviesa longitudinalmente (fig. 1.1 y fig. 1.2). El cilindro tiene un diámetro de unos 30 Å y una longitud de unos 40 Å. En el interior del cilindro se encuentra el cromóforo, formando parte de un segmento irregular de α -hélice (fig. 1.2). Pequeñas secciones de la α -hélice forman unas tapas hacia el final de los cilindros. A este motivo, con una única α -hélice dentro de un cilindro uniforme de lámina- β se le consideró un nuevo tipo de plegamiento al que se llamó “*beta-can*” (Phillips, Jr., 1997). Las once láminas- β se disponen en una estructura casi simétrica. Ésta es tan regular que las moléculas de agua forman filas alrededor de la superficie del cilindro. En el interior, junto al cromóforo, las moléculas de agua se disponen de forma estructurada mediante su interacción con los grupos polares presentes. Esta estructura tan empaquetada podría contribuir a la protección del cromóforo aportando estabilidad y resistencia a la pérdida de plegamiento causada por el calor o los agentes desnaturalizantes (Phillips, Jr., 1997). La estructura en las regiones correspondientes a los residuos 1 y 230-238 no se resolvió debido a su elevado desorden. Estas regiones se corresponden con el máximo grado de deleción amino-terminal o carboxilo-terminal que aún permiten la emisión de fluorescencia por parte del polipéptido parcial resultante (Dopf y Horiagon, 1996; Kim y Kaang, 1998).

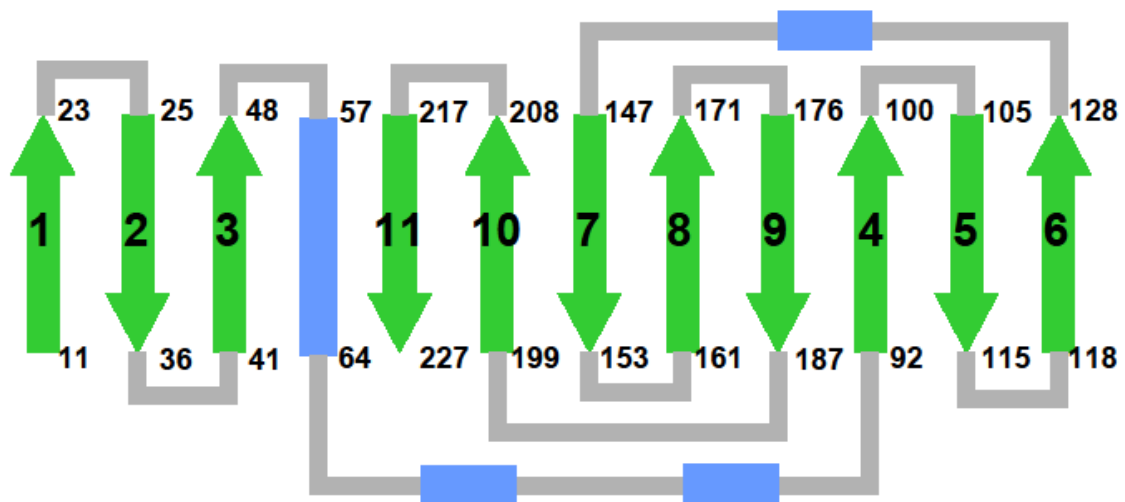


Figura 1.1. Diagrama de la topología del plegamiento en la proteína GFP. Se muestran las cadenas de lámina- β en color verde (numeradas del 1 al 11), las hélices- α en azul y los fragmentos de conexión en color gris. Se indica el número de posición en la secuencia en la que cada una de las estructuras secundarias principales empieza y acaba. A excepción de las interacciones entre las cadenas 1 y 6, las cadenas antiparalelas dan lugar a la formación de un barril muy compacto (Yang, *et al.*, 1996; modificado).

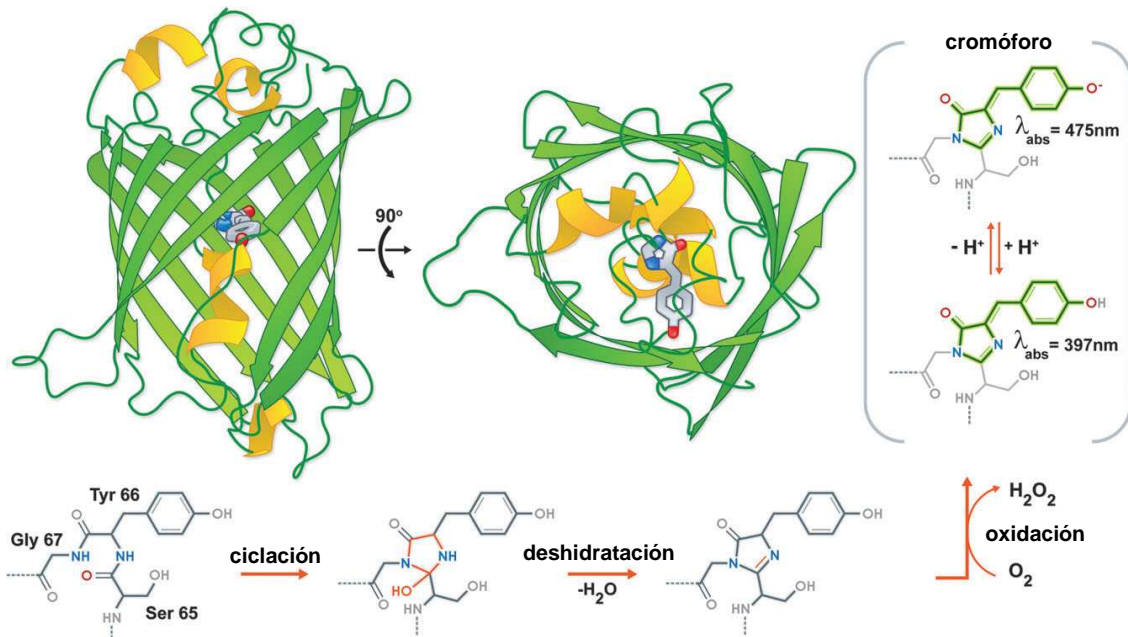


Figura 1.2. Modelo estructural de la avGFP y de su cromóforo. Se muestran vistas perpendiculares de la estructura de avGFP, indicándose el cromóforo en representación de “palillos”. Se indica el mecanismo de formación del cromóforo. Nótese la necesidad de O_2 para la maduración total del cromóforo y la existencia de un equilibrio dinámico entre dos formas iónicas del mismo en su estado maduro y funcional (Frommer *et al.*, 2009).

1.1.2. El cromóforo de avGFP y su entorno

El cromóforo es un segmento de proteína y es la estructura responsable de la emisión fluorescente por parte de la misma. En la avGFP el cromóforo es una *p*-hidroxibenziliden-imidazolinona formada a partir de los residuos Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ en la proteína nativa mediante su modificación postraduccional. El mecanismo consta de varios pasos (fig. 1.2). Inicialmente la GFP se pliega en una conformación muy parecida al estado nativo. Posteriormente se forma la imidazolinona mediante un ataque nucleófilo de la amida de la Gly⁶⁷ sobre el carbonilo del residuo de Ser⁶⁵ seguido de una reacción de deshidratación. Finalmente, en el paso limitante, es necesaria la presencia de oxígeno molecular para que éste deshidroge el enlace α - β del residuo Tyr⁶⁶ conjugando así su grupo aromático de forma con la imidazolinona. El resultado es un sistema resonante de electrones- π que explica las propiedades espectrales de la proteína. Este último estado del cromóforo es el único en el cual absorbe energía y la libera mediante emisión fluorescente. El proceso por el que se origina su conformación activa no requiere cofactores ni enzimas y es aparentemente autocatalítico aunque como hemos visto debe tener lugar en condiciones de aerobiosis, pues el oxígeno molecular es indispensable para que adquiera su estado activo mediante la oxidación de Tyr⁶⁶. La conversión es termosensible, con una caída en el rendimiento en proteína con actividad fluorescente frente al total de GFP, especialmente por encima de 30 °C (Lim *et al.*, 1995). Aunque el motivo formado por los aminoácidos Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ es muy común en la naturaleza, no suele generar fluorescencia. Los estudios de mutagénesis sugieren que de los tres residuos que forman el cromóforo, la

Gly⁶⁷ es crítica en su formación por ser el mejor nucleófilo en este tipo de ciclaciones, gracias a que presenta un impedimento estérico mínimo, y porque está conservada en todos los mutantes de GFP que mantienen la fluorescencia, no conociéndose ninguna proteína fluorescente que carezca de la Gly⁶⁷ (Cubitt *et al.*, 1995; Delagrave *et al.*, 1995).

1.1.3 RFPs: proteínas fluorescentes con emisión en torno al rojo

Tras descubrir la avGFP se diseñaron, a partir de ella, variantes con espectros de emisión azul, cian, verde y amarillo (Tsien, 1998). El descubrimiento de proteínas similares en corales y anémonas carentes de bioluminiscencia demostró que los motivos proteicos descritos para avGFP son comunes a muchos organismos. El total de proteínas fluorescentes disponible comprende espectros de emisión en casi todo el espectro visible (Olenych *et al.*, 2007). A diferencia del gran número de proteínas fluorescentes cian, verde y amarillo desarrolladas, el número de variantes con emisión naranja o roja (550 nm-650 nm) es mucho menor. La mayoría derivan de DsRed, una proteína aislada de la anémona *Discosoma striata* (Clase Antozoos) (Matz *et al.* 1999) y, a diferencia de las proteínas de medusa, sus cromóforos son muy variables (Shkrob *et al.*, 2005). Aunque no es correcto, se suele hacer referencia a todas las proteínas naranjas y rojas como “red fluorescent proteins” (RFPs).

Las proteínas naranjas derivan de especies de coral y emiten entre ~550 y 580 nm. Entre ellas, “monomeric Kusabira Orange” (mKO) es la más fotoestable y la mejor para experimentos de imagen de larga duración. “Kusabira Orange” forma tetrámeros, se obtuvo de *Fungia concinna* y fue el resultado de añadir 10 residuos al extremo Amino-terminal y hacer mutagénesis dirigida. Absorbe a 548 nm y emite a 559 nm. mKO se obtuvo tras 20 reemplazos en esta proteína, dotándola de un brillo similar al de eGFP, un coeficiente de extinción molar elevado y mejor fotoestabilidad que cualquier proteína fluorescente (Karasawa *et al.* 2004). Otra variante, TurboRFP, se obtuvo de la anémona *Entacmaea quadricolor* como un dímero cuya mutagénesis aleatoria dio lugar a una variante de maduración rápida, alta fotoestabilidad, brillo y resistencia al pH. Nuevos ciclos de mutagénesis aleatoria y diseño racional dieron lugar a TagRFP, con buenas propiedades fotofísicas y buen funcionamiento como proteína de fusión en células de mamífero, pero con valores de fotoestabilidad todavía pendientes de precisar (Merzlyak *et al.*, 2007; Shaner *et al.*, 2007).

Las proteínas fluorescentes rojas son de especial interés para experimentos con varios colores y porque su mayor longitud de onda de excitación conlleva menor fototoxicidad y permite profundizar más en el estudio de tejidos. Para su detección bastan los filtros comúnmente disponibles para TRITC o Texas Red y lámparas de neón, de bajo coste. Las proteínas de coral, como DsRed, son una excelente opción. Por un lado, tienen el inconveniente de no estar del todo optimizadas, ya que son tetrámeros obligados, su fluorescencia aparece muy lentamente y ocurre a través de un estado intermedio con emisión predominantemente verde, lo cual da problemas al usar sondas de varios colores o hacer

FRET debido al solapamiento de espectros. Sin embargo, tienen la ventaja de madurar eficientemente a 37 °C y de ser susceptibles a mejoras como el aumento de su tasa de maduración, reducción o eliminación de la tendencia a formar agregados y aumento de su fluorescencia mediante ingeniería de proteínas (Olenych *et al.*, 2007).

La serie “mFruit” está compuesta por proteínas fluorescentes monoméricas derivadas de DsRed, con propiedades físicas diversas que abarcan espectros de absorción y emisión entre el amarillo y el rojo lejano. Entre las mejores de la serie destaca mCherry, cuyo máximo de emisión es a 610 nm, su intensidad de fluorescencia ronda el 75 % de la de eGFP y es muy fotoestable y por lo tanto, muy útil para capturar imágenes durante largos períodos de tiempo. La serie “mFruit” junto con mKO y TagRFP completan la región entre las proteínas derivadas de medusa y las proteínas oligoméricas de coral rojo comercializadas actualmente. Aunque algunas proteínas “mFruit” carecen del brillo y fotoestabilidad necesarios para algunos experimentos, su existencia sugiere que se pueden obtener sondas monoméricas brillantes y estables en todo el espectro visible (Shaner *et al.*, 2007).

1.1.4 Estructura del cromóforo de las RFPs y sus transformaciones

Las principales reacciones químicas que dan lugar a fluorescencia en las RFPs, dependen, al igual que ocurre en derivados de avGFP, de tres aminoácidos que forman el cromóforo y del entorno próximo a este. La configuración del cromóforo de DsRed, *cis*-planar, es la estructura predominante en la mayoría de proteínas naranjas o rojas. Sin embargo, hay al menos otros dos motivos, *trans*-planar y *trans*-no planar, definidos sobre la base de estudios de difracción de rayos-X (Pettersen *et al.*, 2003; Beddoe *et al.*, 2003).

La formación de los cromóforos tipo DsRed (fig. 1.3, 5a y 6a) puede ocurrir mediante autocatálisis post-traducciona l de un monómero azul tipo mTagBFP (fig. 1.3, 4) o ser inducida irradiando con luz violeta, como en las variantes fotoactivables PAmcherry, PATagRFP y PAmKate. Los cromóforos tipo DsRed pueden existir en estado neutro (fig. 1.3, 5b y 6b) o aniónico (fig. 1.3, 5a y 6a) convirtiéndose uno en otro según el pH y mediante transferencia de protones en estado excitado. La ciclación del grupo N-acilimina genera cromóforos naranjas tipo mOrange, mKO (fig. 1.3, 10) o tipo zFP538 (fig. 1.3, 9). La formación del cromóforo tipo zFP538 implica la rotura del esqueleto molecular. Mediante irradiación de alta potencia, en el caso de mKate, HcRed y DsRed, se demostró la fotoconversión del cromóforo tipo DsRed (fig. 1.3, 5a y 6a) en el tipo GFP (fig. 1.3, 12). La conversión inversa, “enrojecimiento”, ocurre en varias GFPs mediante autocatálisis o inducción con agentes oxidantes. A diferencia del cromóforo tipo GFP, la iluminación de cromóforos tipo mOrange o mKO (fig. 1.3, 10) genera especies en el rojo lejano (fig. 1.3, 11) y rojo (fig. 1.3, 5a) respectivamente. Los espectros desplazados hacia rojo lejano del cromóforo 7 de la figura 1.3, observados en mRouge, E2-crimson, mNeptuno y TagRFP657 son el resultado de enlaces de hidrógeno, el empaquetamiento e interacciones entre residuos hidrofóbicos que rodean al cromóforo tipo

1. INTRODUCCIÓN

DsRed (Subach *et al.*, 2011; Stepanenko *et al.*, 2011). El cromóforo tipo Kaede (fig. 1.3, 14) es típico del estado rojo de proteínas verde-rojo fotoconvertibles como Kaede, EosFP, mEos2, mlrisFP, Dendra2, mKikGR y mClavGRs, mientras en su estado verde el cromóforo es tipo GFP (fig. 1.3, 12). Su formación requiere un residuo de His en la posición 65, limitando sus posibles transformaciones químicas.

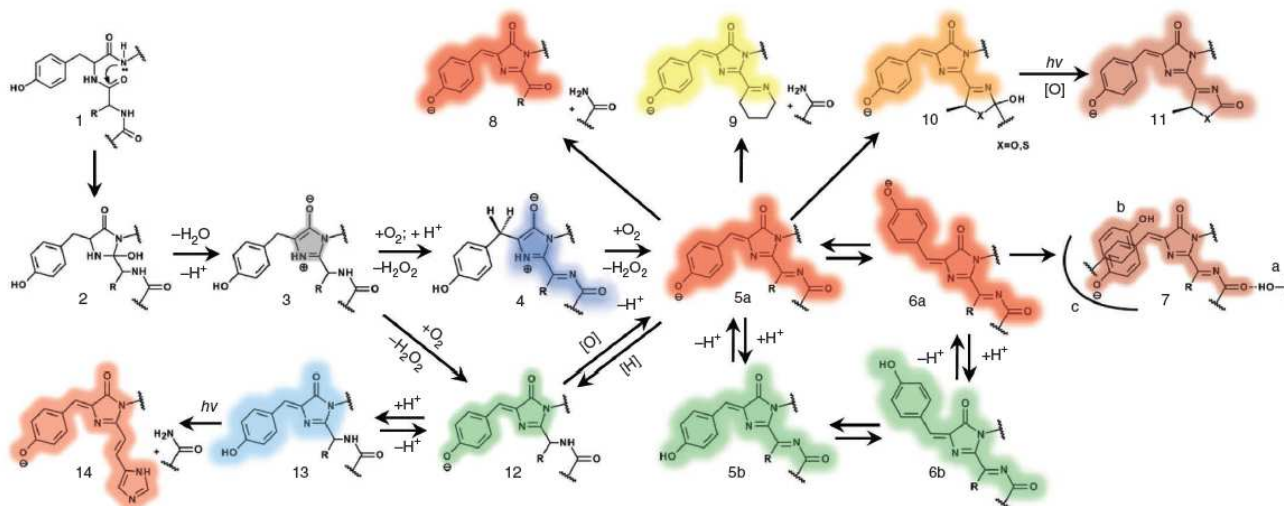


Figura 1.3. Principales transformaciones químicas de cromóforos de RFPs. El color de sombreado de las estructuras corresponde con la emisión fluorescente del cromóforo. El sombreado gris se refiere al estado no fluorescente, [H] denota reducción y [O] oxidación. El estado cromático (estructuras 5, 10 y 13) no ocurre necesariamente por isomerización *cis-trans* del cromóforo pero puede resultar de modificaciones en torno al cromóforo de la misma isoforma que disminuye el rendimiento cuántico. $h\nu$ representa la irradiación con fotones (Subach *et al.*, 2011).

1.1.5. Aplicaciones de las proteínas fluorescentes

El clonaje del gen de la avGFP (Prasher *et al.*, 1992) y la demostración de que su expresión en organismos heterólogos genera fluorescencia (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye y Tsuji, 1994) supuso el mayor avance desde el punto de vista aplicado. Se demostró que toda la información necesaria para la síntesis postraduccional del cromóforo está contenida en el gen y no se necesita ninguna enzima específica de la medusa. Aunque existen otras especies proteicas capaces de emitir fluorescencia, su cromóforo está formado por cofactores como las lumazinas o las flavinas, cuya correcta inserción en la apoproteína es una dificultad que las sitúa lejos de poder competir con los derivados de avGFP (Tsien, 1998).

La aplicación de las proteínas fluorescentes suele basarse en capturar y analizar imágenes o en el uso de otros sistemas, como la citometría de flujo, capaces de detectar la fluorescencia. El modo en que se emplean para obtener información se puede clasificar en distintas categorías.

1.1.5.1. Uso de proteínas fluorescentes como molécula testigo

El uso de proteínas fluorescentes como testigos suele consistir en clonar un gen que codifica una proteína fluorescente fusionándolo a otro gen o aguas abajo de un promotor, de modo que la aparición de fluorescencia pone de manifiesto la expresión del gen o el promotor (fig. 1.4a). Puede servir como método cuantitativo ya que si la proteína fluorescente que se usa como testigo es funcional, la intensidad de fluorescencia obtenida es directamente proporcional al número de moléculas de proteínas de fusión que se han expresado (Pédelacq *et al.*, 2006).

1.1.5.2. Localización basada en el uso de proteínas fluorescentes

Se puede conocer la localización de una proteína *in vivo* expresándola como proteína de fusión a una proteína fluorescente (fig. 1.4b). El desarrollo de técnicas de microscopía basadas en la localización de proteínas fluorescentes es constante. Recientemente, se incorporó la variable temporal a la localización espacial a través de la variante “timer DsRed-E5NA” que, en 36 h, madura desde la forma protonada de un fluoróforo verde hasta un fluoróforo rojo (Verkhusha *et al.*, 2004). Esta conversión casi no se ve afectada por el pH, la fuerza iónica de la solución o la concentración de proteína. De este modo, la relación de fluorescencia verde:rojo permite estimar la antigüedad de la DsRed-E5 producida, facilitando así la visualización de la dinámica de la actividad de un promotor y la localización de zonas de tejido de mayor antigüedad (Mirabella *et al.*, 2004). Algunas proteínas fluorescentes pueden alternar entre dos estados reversibles, con máximos de absorción y/o emisión distintos, mediante la incidencia de luz a distintas longitudes de onda y son la base de las técnicas de “microscopía de superresolución” (Biteen *et al.*, 2008). Otras sufren cambios estructurales irreversibles dando lugar a mayor intensidad de fluorescencia a una longitud de onda específica. Sus aplicaciones incluyen el trazado de conexiones en tejidos, el estudio de la difusión de proteínas y técnicas de microscopía de superresolución (Betzig *et al.*, 2006).

1.1.5.3. Estudios de interacción basados en proteínas fluorescentes

La resolución espacial de la microscopía óptica es insuficiente para determinar si dos proteínas co-localizan en un compartimento celular o si existe una interacción real entre ambas. Afortunadamente, existen métodos basados en proteínas fluorescentes, con una resolución mucho mayor (entre 2-5 Å), cuya señal es un fiel reflejo de la interacción entre proteínas.

La complementación fluorescente bimolecular se basa en la reconstrucción de una proteína fluorescente que actúa como testigo. Para ello, se expresan fusiones de dos proteínas, candidatas a interactuar, con mitades complementarias de una proteína fluorescente, de modo que la interacción de las primeras reconstruye la proteína fluorescente de modo funcional. Este hecho se evidencia mediante una señal fluorescente (fig. 1.4d). La complementación es irreversible y, por lo tanto, refleja la asociación de las proteínas diana en

1. INTRODUCCIÓN

el momento de la formación del complejo y no cualquier cambio posterior debido a competición de equilibrios. Además, la formación de los complejos de las proteínas que interaccionan es más rápida que la reconstrucción de la proteína fluorescente, con lo cual es ésta última interacción la que depende de la primera y no al revés (Hu *et al.*, 2002; Valencia-Burton *et al.*, 2007). A menudo, las distintas complementaciones presentan espectros distintos a las proteínas fluorescentes originales, siendo una herramienta analítica más para discernir interacciones entre diferentes proteínas en sistemas de imagen con suficiente resolución espectral (fig. 1.4e; Hu y Kerppola, 2003).

El fenómeno FRET (*Förster resonance energy transfer*) es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia mediante desactivación no radiante (debida a la interacción tipo dipolo-dipolo) acoplada desde un fluoróforo donador excitado a un fluoróforo aceptor no excitado (fig. 1.4c). El resultado es una emisión fluorescente por parte del aceptor. Dicha transferencia depende inversamente de la potencia sexta de la distancia entre fluoróforos (Förster, 1948; Mitra *et al.*, 1996), por lo que sólo se verifica a distancias menores de 10 nm entre fluoróforos y sólo si el espectro de emisión del donante solapa parcialmente con el espectro de absorción del receptor. La expansión de la “paleta” de proteínas fluorescentes ha permitido crear varios pares FRET. El par más usado es eCFP (o su variante Cerulean) con eYFP (o sus variantes Citrine o Venus), aunque también se ha utilizado el par Zafiro/mOrange (Shaner *et al.*, 2004) e incluso es posible un triple FRET que revele interacciones ternarias en un único complejo (Galperin *et al.*, 2004).

La versatilidad de los métodos para detectar interacciones proteína-proteína continúa creciendo. Entre ellos, se ha propuesto un método combinado que consiste en la reconstrucción de fragmentos de proteína fluorescente implicados en un par FRET que permita detectar interacciones ternarias. En este caso, tendríamos complementación bimolecular fluorescente de un componente del par FRET que, una vez reconstruido, interaccionaría con el segundo componente (fig. 1.4f).

1.1.5.4. Sensores basados en proteínas fluorescentes

El uso de proteínas fluorescentes como sensores deriva de su sensibilidad a las condiciones del medio. Por un lado, los sensores *moduladores del cromóforo* son aquellos en los que un cambio estructural no covalente altera la fluorescencia de una proteína fluorescente. Algunos ejemplos son los sensores de pH, haluros y potencial redox (Sankaranarayanan y Ryan, 2000; Llopis *et al.*, 1998), en los que la parte sensible es el cromóforo o una parte del barril- β (fig. 1.4g). Un ejemplo de la utilidad de estos sensores es el uso de las llamadas “pHluorinas” en para seguir la dinámica de vesículas de exocitosis y su reciclaje. Las pHluorinas son mutantes de GFP cuyas propiedades varían en función de los cambios en la acidez del medio en el que se encuentran. Tras su unión a proteínas de la membrana vesicular, continúan por la vía de secreción o por la vía sináptica, sirviendo como molécula testigo de la

transmisión en botones sinápticos individuales y de la fusión y secreción de gránulos de secreción individuales. Para la conversión de GFP en este tipo de sensores hicieron falta reemplazos que facilitaran la alternancia entre confórmeros o que acoplasen los cambios masivos de pH a cambios en el ambiente electrostático del cromóforo. Según su respuesta frente a los cambios de pH se definieron dos tipos de variantes de pHluorinas. Por un lado, las *pHluorinas ratiométricas* muestran un cambio reversible en su espectro de emisión entre pH 7,5 y 5,5 mermando el máximo de absorción a 410 nm y aumentando el máximo a 470 nm con el aumento de la acidez. Por otro lado, las *pHluorinas eclípticas* muestran una caída en los valores de absorción, especialmente en el máximo a 410 nm, con el aumento de acidez (Miesenböck *et al.* 1998).

Por otro lado, otro tipo de sensores se basa en propagar un cambio de conformación desde un dominio sensible acoplado a un dominio de proteína fluorescente, como en las proteínas fluorescentes sensibles a voltaje (Gautam *et al.*, 2009) y los sensores de Ca^{2+} tipo G-CaMP (fig. 1.4h; Akerboom *et al.*, 2009). Un ejemplo de la utilidad de este tipo de sensores es el cartografiado cuantitativo *in vivo* del estado de oxidación del glutatión y de los niveles de H_2O_2 en compartimentos subcelulares a lo largo del desarrollo y envejecimiento de un animal (Albrecht *et al.*, 2011). Este cartografiado se basó en el uso de derivados de roGFP, una GFP sensible al estado redox que permite descifrar el balance redox del glutatión y los niveles de H_2O_2 dentro de la célula (Hanson *et al.*, 2004). La fusión de la variante roGFP2 a la glutaredoxina (Grx) o a la tiol-peroxidasa (Orp1) aumenta su sensibilidad para medir el estado redox del glutatión o los niveles de H_2O_2 respectivamente, basada en la alternancia entre los máximos de absorción del estado reducido (488 nm) y el oxidado (405 nm) de la roGFP2 debida a modificaciones covalentes (Tormos y Chandel, 2011). En estos casos, los cambios en la fluorescencia suelen deberse a cambios en la protonación del cromóforo. Otros sensores se basan en generar una señal FRET mediante dos proteínas fluorescentes que actúan como par FRET cuando un cambio conformacional de la parte sensible favorece las condiciones de cercanía y orientación necesarios para que exista el fenómeno (Zhang *et al.*, 2002).

1.1.5.5. Aplicaciones basadas en la inactivación por luz asistida por el cromóforo (CALI).

La fototoxicidad de eGFP y otras variantes es prácticamente despreciable en comparación a los marcadores químicos, presuntamente debido a que el entramado proteico apantalla al cromóforo y evita la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Surrey *et al.*, 1998). Sin embargo, existe una variante de proteína fluorescente, "KillerRed", que genera ROS tras ser irradiada con luz verde. Su actividad se basa en la existencia de un canal de agua que conecta el cromóforo con el exterior, llevando O_2 hacia el cromóforo y ROS hacia el exterior. Se demostró su utilidad para matar selectivamente, mediante la aplicación de luz verde, transformantes de *E. coli* que expresan "KillerRed". Entre las aplicaciones de esta proteína destacan la muerte selectiva de células eucariotas en cultivos que expresan

1. INTRODUCCIÓN

“KillerRed” dirigida a la mitocondria (muerte por vía apoptótica) o a la membrana y la inactivación por luz mediada por el cromóforo (CALI) de proteínas de interés, tanto *in vitro* como *in vivo*, fusionadas a “KillerRed”. Se prevé que las técnicas basadas en CALI con “KillerRed” serán una buena alternativa para el estudio del desarrollo o la inmunología de organismos e incluso el estudio del cáncer y su tratamiento mediante terapia fotodinámica, basada en la inducción de la muerte celular de forma selectiva en células tumorales (Bulina *et al.*, 2006).

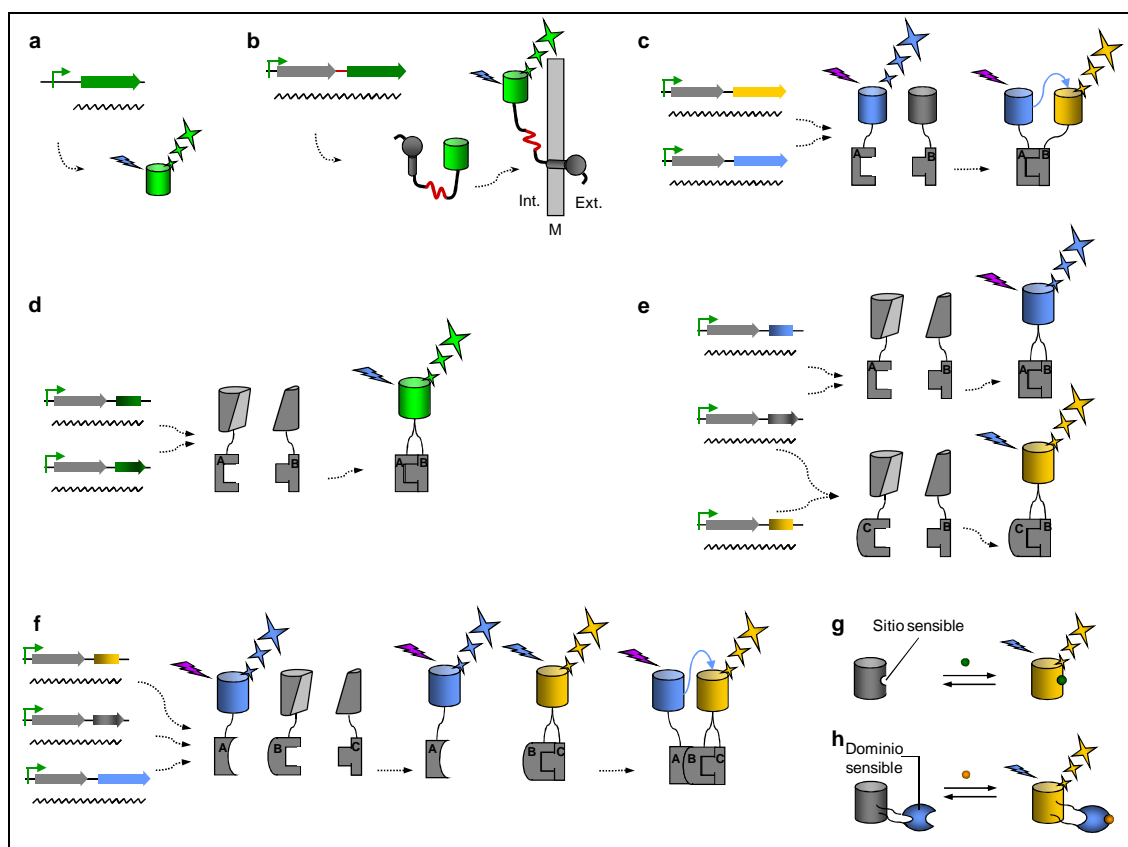


Figura 1.4. Esquema de las principales aplicaciones de las proteínas fluorescentes. Uso como testigos de *expresión* (a) o de *localización*, en este caso mediante fusión a una proteína que es integral de membrana (b). Estudio de la *interacción* basado en FRET (c), en la complementación bimolecular fluorescente, reconstruyendo una proteína fluorescente de un color (d), empleando distintas combinaciones de forma simultánea pudiendo dar lugar a distintos colores (e) o combinando la complementación bimolecular fluorescente y el FRET (f). Finalmente está representado el uso de *sensores* en los que el sitio sensible forma parte directamente de la proteína fluorescente (g) o la sensibilidad se basa en la transmisión de cambios de conformación acoplados desde un dominio sensible fusionado a una proteína fluorescente (h). Los barriles representan proteínas fluorescentes y su color denota el de la proteína que representan, cian, verde o amarillo y gris, si no emite fluorescencia. Las flechas gruesas representan los genes cuya expresión da lugar a las proteínas en las figuras a-f, su expresión desde el promotor se representa por una flecha verde con ángulo recto y el tamaño relativo del mensajero se representa por una línea negra ondulada. La región roja en la figura “b” representa la región flexible de unión entre proteínas. La esfera verde en la figura “g” representa un haluro y la esfera naranja en la figura “h” representa un catión como el Ca^{2+} . Para mayor detalle en todas las figuras consultar el texto. (a) y (b) basadas en Cava *et al.*, 2008, (c)-(f) daptadas de Shyu y Hu, 2008 y (g) y (h) adaptadas de Zhang *et al.*, 2002.

1.1.6. Diseño de proteínas fluorescentes mediante ingeniería de proteínas

Los trabajos de mejora y adaptación de las proteínas fluorescentes, basados en mutagénesis al azar o en diseño racional sobre el modelo estructural de GFP, han aportado en muchos casos información suficiente para relacionar los reemplazos con su función. Estos estudios permiten, como ejemplo relacionado con nuestro trabajo, predecir la manera de manipular las propiedades espectrales de una proteína fluorescente mediante los reemplazos pertinentes. Los cambios locales en torno al cromóforo que resultan de estos reemplazos, incluyen residuos de aminoácidos con carga neta, redes de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en la matriz proteica. Estas modificaciones pueden desplazar los máximos de absorción o emisión hacia el azul o el rojo hasta 40 nm. Los cambios más significativos suelen atribuirse a diferencias en la estructura covalente y la extensión de orbitales π conjugados en el cromóforo (Shaner *et al.*, 2007).

La comparación de variantes resultantes de la mutagénesis de GFP permite hacer algunas observaciones (fig. 1.5 A). En los derivados de avGFP, aproximadamente el 75 % de los reemplazos que dan lugar a proteínas funcionales con alguna modificación en sus propiedades espectrales, de plegamiento o de tendencia a formar dímeros, se sitúan en la región correspondiente a la hélice central o en las cadenas β 7, 8 y 10. Por lo general, los reemplazos que afectan a las propiedades espectrales ocurren cerca de la hélice central que contiene al cromóforo. En contraposición, las mutaciones que afectan a la capacidad de plegamiento se reparten por toda la secuencia primaria de la proteína. A diferencia de lo que ocurre con los derivados de avGFP, las mutaciones necesarias para cambiar las propiedades espectrales en el caso de las proteínas derivadas de DsRed no se concentran en una región concreta sino que se distribuyen a lo largo de toda la secuencia (fig. 1.5 B) (Shaner *et al.*, 2007).

1. INTRODUCCIÓN

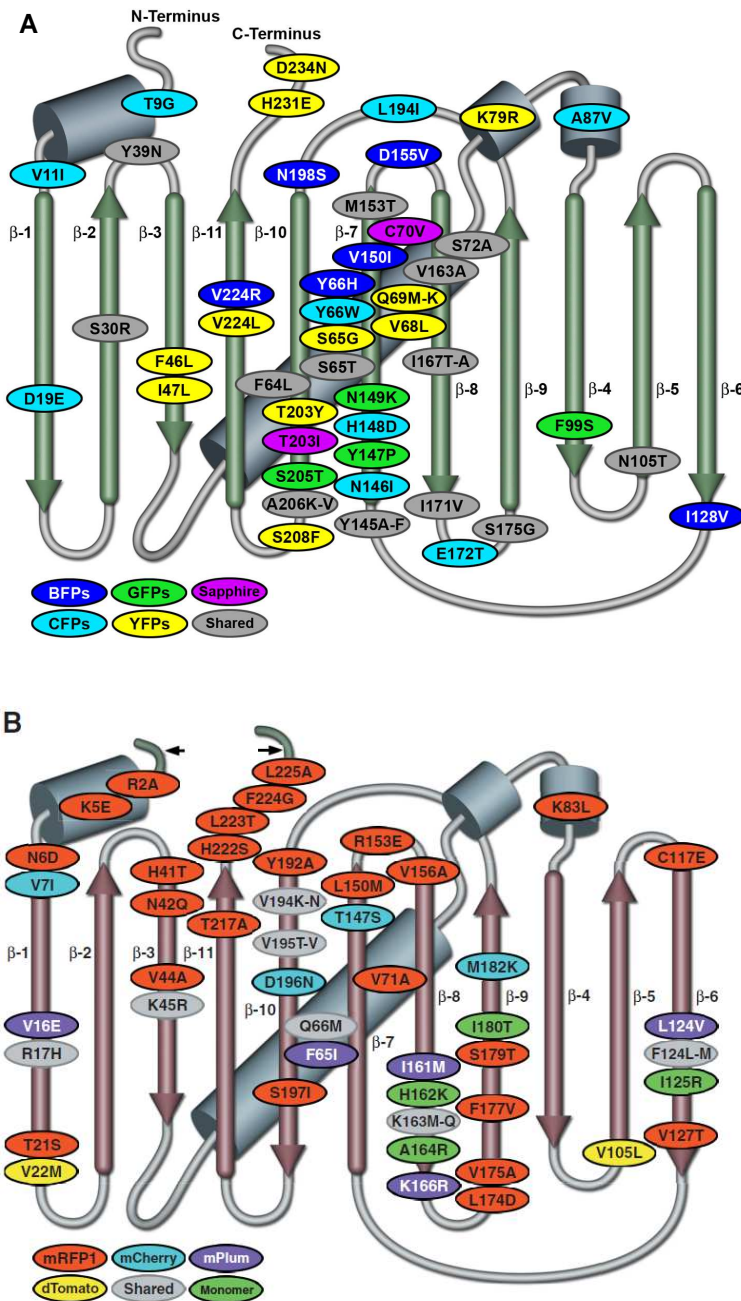


Figura 1.5. Mapa de mutaciones. **A:** mapa de mutaciones de la GFP de *Aequorea* donde se indican los reemplazos sobre el esquema topológico de la proteína. Las flechas de color verde representan láminas β , numeradas y con la punta hacia el extremo carboxilo terminal. Las hélices α se representan con cilindros grises. Los reemplazos se muestran con un código de color según las variantes a que correspondan. BFPs (azul), CFPs (cian), GFPs (verde), YFPs (amarillo), Zafiro (violeta), plegamiento, comunes y que dan lugar a monómeros (gris). Casi el 75% de las mutaciones están en la hélice central y en las láminas beta 7, 8 y 10. Por lo general, las mutaciones que implican cambios espectrales están cerca de la hélice central que contiene al cromóforo, mientras las relacionadas con el plegamiento están por toda la secuencia. Muchos reemplazos típicos de cian y amarilla introducidos cerca de los extremos tuvieron lugar durante la mutagénesis de CyPet e YPet. Varias mutaciones implicadas en el plegamiento características de sGFP (S30R, Y39N, F99S y N105T) están lejos del cromóforo. El reemplazo monomerizante A206K es útil en todos los derivados de avGFP que se conocen, pero es sustituido por A206V en sGFP y eBFP2. **B:** mapa de mutaciones sobre DsRed mostrando reemplazos sobre el esquema topológico. Las láminas- β son flechas rojizas con la punta hacia el extremo Carboxilo terminal, mientras que las hélices alfa son cilindros grises. Las extensiones amino y carboxilo terminales debidas a la adición de aminoácidos derivados de GFP para mejorar la fusión se muestran con sombreado verdoso. Las mutaciones llevan un código de color según las variantes a que se refieren: mRFP1 (rojo), mCherry (cyan), mPlum (violeta), dTomato (amarillo), mutaciones monomerizantes (verde) y compartidas (gris). Nótese que a diferencia del núcleo de mutaciones que rodean el cromóforo de las variantes de GFP de *Aequorea*, las mutaciones de proteínas fluorescentes rojas se distribuyen a lo largo de la secuencia. Figura adaptada de Shaner *et al.*, 2007.

Una variante interesante como punto de partida para obtener derivados termoestables con propiedades espectrales modificadas, es la proteína sGFP (Pédrelacq *et al.*, 2006). Cuando se expresa a 37 °C en *E. coli*, su fluorescencia es insensible al plegamiento deficiente de las proteínas con las que se fusiona y directamente proporcional al nivel total de expresión, independientemente de la solubilidad de la fusión. Gracias a su estructura, la sGFP es mejor testigo mediante fusión a proteínas. En total, sGFP contiene las mutaciones *cyc1e-3* (F99S, M153T y V163A) y las correspondientes a eGFP (F64L y S65T), es decir, correspondientes a la variante frGFP y además seis mutaciones adicionales (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V y

A206V) (fig. 1.6). Las últimas seis mutaciones citadas reducen la interferencia con el plegamiento de distintas formas. S30R e Y39N son las principales responsables de la mejora en la robustez del plegamiento, cinética de replegamiento y resistencia a la desnaturalización. La mutación S30R media la formación de una red electrostática extendida. En su formación participan cinco residuos correspondientes a los aminoácidos E¹¹⁵ (S5), R¹²² (S6), E¹⁷ (S1) y R³⁰ (+) y E³² (S2) (fig. 1.6 d). Un enlace de hidrógeno entre el oxígeno de cadena lateral del residuo D36 y el NH de la cadena lateral de N39 compacta el bucle entre las cadenas β 2 y 3. Esto probablemente contribuye a formar una estructura de α -hélice 3_{10} en la vuelta entre las cadenas β 2 y 3 (fig. 1.6 c). Los reemplazos Y145F e I171V reducen la interferencia de plegamiento. Los reemplazos N105T y A206V introducen como sustituyentes dos de los aminoácidos con mayor tendencia a formar láminas β , se exponen al solvente y se ubican en láminas- β que a su vez tienen láminas- β a cada lado (fig. 1.6 b).

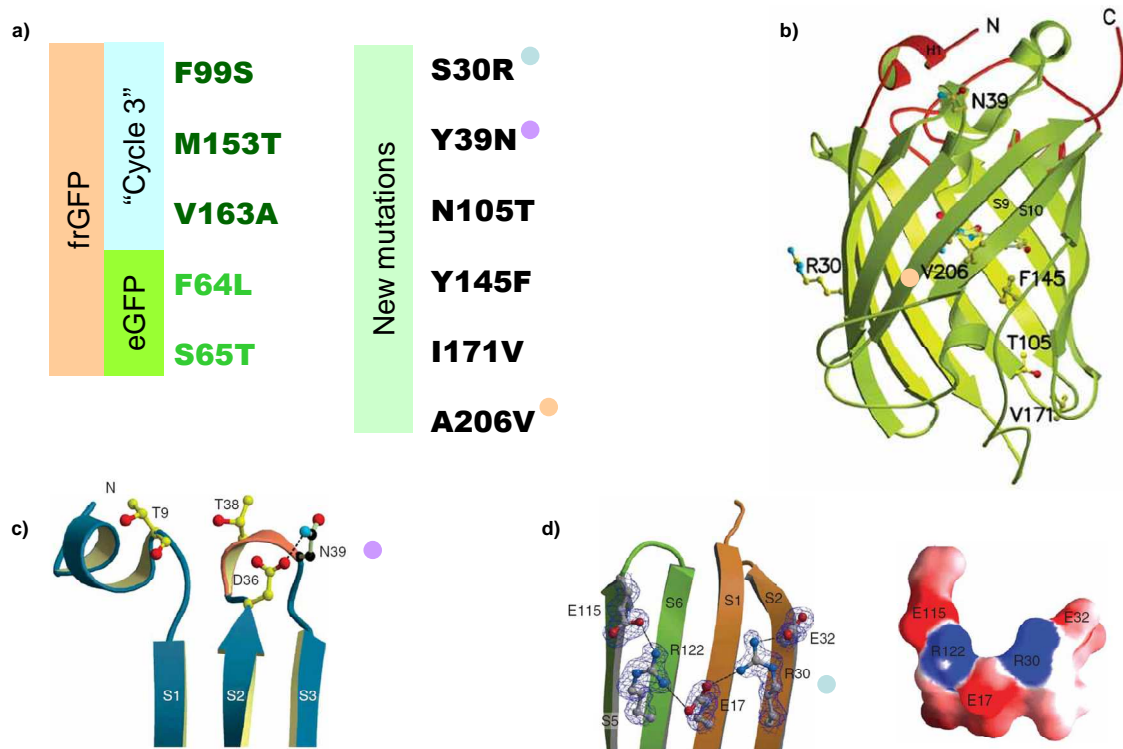


Figura 1.6. Reemplazos en la sGFP respecto a la avGFP y la relación estructura-función de algunos de ellos. (a) sGFP contiene 11 reemplazos respecto a la variante avGFP; (b) estructura de la sGFP destacándose los seis reemplazos introducidos respecto a la variante frGFP, de la cual deriva; (c) región del esqueleto de la sGFP en torno al aminoácido N39, donde destaca la formación de un enlace de hidrógeno, entre un oxígeno de la cadena lateral de D36 y el NH de la cadena lateral de N39, que junta el lazo y favorece la formación de la estructura de α -hélice 3_{10} en el giro entre las cadenas β S2 y S3; (d) diagrama de lazos (izquierda) y la superficie electrónica (derecha) de la región cercana al aminoácido de la posición 30 de la sGFP. La mutación S30R en sGFP media la formación de una red electrostática extensa que involucra a los residuos de los aminoácidos E115 (S5), R122 (S6), E17 (S1), R30 (+) y E32 (S2). Tomado de Pédelacq *et al.*, 2006 y modificado.

1.2. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

La ingeniería de proteínas consiste en alterar la secuencia de una proteína existente para adecuar sus propiedades a unas determinadas condiciones de uso (fig. 1.7 a; Kazlauskas y Bornscheuer, 2009; Lutz y Bornscheuer, 2009). En su comienzo, la ingeniería de proteínas consistió exclusivamente en el *diseño racional*, basado en la información estructura-función obtenida a partir de modelos moleculares. Su objetivo es predecir las alteraciones estructurales necesarias para conseguir los cambios deseados en la proteína de interés (fig. 1.7 b; Bornscheuer *et al.*, 2012). La *evolución dirigida* es una alternativa basada en generar multitud de variantes proteicas mediante cambios aleatorios y obtener, mediante cribado o selección, las variantes portadoras de mejoras de interés (fig. 1.7 c; Farinas, 2001).

Con ambas alternativas se modifica el DNA que codifica una proteína. La traducción de este DNA alterado da lugar a nuevas variantes de dicha proteína, generalmente con el objetivo de hacerla más estable, modificar sus propiedades espectrales, mejorar su reactividad con un sustrato o extender su mecanismo de acción. Se suelen requerir varios de estos criterios a la vez y esto dificulta su diseño, obligando a modelar múltiples propiedades de la proteína con diseño racional o a basar el cribado en múltiples criterios durante la evolución dirigida. El diseño racional no es posible sin conocer la estructural o las bases moleculares del mecanismo de acción y la evolución dirigida genera muchas variantes, es compleja y requiere mucho tiempo y trabajo. En la práctica, suelen combinarse ambas aproximaciones para reducir el tamaño de la genoteca mediante la denominada "*evolución dirigida focalizada*" (Park *et al.*, 2005; Morley y Kazlauskas, 2005). Con diseño racional se limitan los cambios a regiones concretas sobre las que se incorporan mutaciones al azar para encontrar los cambios que producen mutantes con las propiedades deseadas (fig. 1.7 c). La elección de localizaciones para mutagénesis aleatoria depende de las propiedades a mejorar y de la información disponible. Aunque la mayoría de estrategias suelen conducir a alguna mejora en cualquier caso, elegir la más adecuada puede mejorar los resultados y reducir el esfuerzo (Bornscheuer y Kazlauskas, 2011).

Entre los aspectos que más han influido en la ingeniería de proteínas destaca el gran desarrollo de métodos bioinformáticos aplicados al *diseño racional* y a la *evolución dirigida focalizada*. Los alineamientos de las secuencias de grandes familias de enzimas y la búsqueda de homologías permiten identificar proteínas con actividades catalíticas similares, conduciendo a nuevos y potentes biocatalizadores. Esta información puede servir para reconstruir biocatalizadores más promiscuos (Khersonsky *et al.*, 2006; Khersonsky y Tawfik, 2010). Los alineamientos de múltiples secuencias también permiten identificar los aminoácidos más comunes en cada posición (secuencia consenso) y los reemplazos de aminoácidos que dan lugar a funciones enzimáticas estables. Estos datos facilitan el diseño de genotecas de pequeño tamaño para encontrar biocatalizadores con mejoras en su estabilidad, función

catalítica y estereoselectividad (Jochens y Bornscheuer, 2010; Kuipers *et al.*, 2010; Polizzi *et al.*, 2006; Vazquez-Figueroa *et al.*, 2008).

Paralelamente a los avances en ingeniería de proteínas basados en secuencias, las estrategias basadas en la estructura se han beneficiado del rápido aumento del número de estructuras proteicas depositadas en el *RCSB Protein Data Bank* (<http://www.pdb.org>). El repertorio disponible ha crecido más de 450 % en la última década hasta alcanzar más de 77000 estructuras proteicas. Esto facilita el diseño racional de proteínas y su evolución porque el alineamiento estructural de proteínas relacionadas ayuda a identificar similitudes y diferencias que guían el diseño de las genotecas de mutantes (Bornscheuer *et al.*, 2012). El ejemplo más representativo del potencial que aportan los procedimientos asistidos por métodos computacionales es el de la aplicación de un algoritmo computacional (Zanghellini *et al.*, 2006) que permitió modelar centros activos que estabilizan, *in silico*, el estado de transición del sustrato a producto, para crear nuevas enzimas capaces de catalizar incluso reacciones como, la eliminación Kemp, para la que no existe ningún catalizador natural (Röthlisberger *et al.*, 2008).

1.2.1. Métodos de mutagénesis

Se pueden aplicar diversos métodos de mutagénesis para crear variantes proteicas a partir de una proteína parental. Estos incluyen **métodos no recombinantes**, siendo el más común el reemplazo de uno o varios aminoácidos en posiciones dispersas de la proteína (Chen y Arnold, 1993) o centradas en regiones cuya modificación, con mayor probabilidad conseguirá una mejora (Reetz *et al.*, 2006), aunque pueden ser tan originales como la permutación circular, que cambia la localización de los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína, dejando el resto de la secuencia intacta (Qian y Lutz, 2005) y **métodos recombinantes** como el intercambio de secciones homólogas o de dominios (fig. 1.7).

1.2.1.1. Métodos no recombinantes

Cuando no existe información que relacione la secuencia de la proteína con su función, suelen elegirse métodos para introducir reemplazos aleatorios en sitios al azar, *in vitro* mediante PCR propensa a error (epPCR) o *in vivo* empleando cepas cuyos sistemas de reparación de DNA son defectuosos (Wong *et al.*, 2006). Aunque son métodos sencillos, dan lugar a genotecas sesgadas o incompletas (Wong *et al.*, 2006b). Por un lado, la incorporación de nucleótidos de forma errónea tiene mayor probabilidad de ocurrir entre una A y una T que entre una G y una C, siendo el intercambio de una A y una C el menos probable. Las transversiones, es decir, el reemplazo de una purina de dos anillos por una pirimidina de un único anillo, son poco probables porque suponen un cambio estructural demasiado grande. Por otro lado, algunos reemplazos necesitan cambiar un nucleótido en el codón y otros requieren dos cambios, lo cual es mucho menos probable (Shivange *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2007).

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que estas limitaciones hacen que muchas posibles variantes estén ausentes, los métodos de reemplazo aleatorios en sitios al azar han dado lugar a la mejora de numerosas proteínas (Carr *et al.*, 2005). En ocasiones, estas mejoras se consiguen añadiendo varias mutaciones de forma iterativa, paso a paso. El método requiere que cada reemplazo dé lugar a una mejora, ignorando los posibles efectos cooperativos. Tras reemplazar un único aminoácido de la proteína, se escoge una variante, con una mutación beneficiosa, que sirve como parental en la siguiente ronda de mutagénesis y cribado. Los pasos se repiten cíclicamente y en cada uno se identifica una variante ligeramente mejor que la anterior (Chen y Arnold, 1993). Este enfoque asume que cada reemplazo contribuye parcialmente a la mejora. Sin embargo, muchas veces los reemplazos actúan de forma cooperativa. En tal caso, la mejora paso a paso en ciclos iterativos reduciría la probabilidad de detectar la mejor variante posible, aunque esta probabilidad aumenta si se siguen múltiples rutas (Reetz y Sanchis, 2008).

Cuando existe información secuencia-función a nivel de proteína, pueden llevarse a cabo reemplazos aleatorios en localizaciones seleccionadas de un modo racional. Como ejemplo, la modificación de los residuos del centro activo de una enzima que se encuentran próximos al sustrato conducirán, con mayor probabilidad que los residuos distantes, a grandes mejoras en la propiedad de interés (Morley y Kazlauskas, 2005). Así, se reduce el tamaño de la genoteca y, por lo tanto, el esfuerzo dedicado al *screening*.

Uno de los métodos más importantes para conseguir reemplazos aleatorios en sitios seleccionados es la mutagénesis saturante (**SM**), que consiste en reemplazar aleatoriamente aminoácidos en una o varias posiciones determinadas en la secuencia primaria de una proteína. Suele hacerse con codones NNK (N=A, T, G o C; K=G o T) que dan lugar a 32 posibles codones para codificar 20 aminoácidos, de manera que 12 de los codones son degenerados. Alternativamente, el uso de codones NDT (D= G, A o T) genera 12 codones que codifican 12 aminoácidos distintos (Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Arg, Ser y Gly). Aunque omite ocho posibles aminoácidos, esta última alternativa suprime codones repetidos y constituye una mezcla equilibrada de aminoácidos polares y apolares, alifáticos y aromáticos y con carga negativa y positiva a la vez que excluye la mayoría de aminoácidos estructuralmente similares. Para asegurar con una probabilidad mayor al 95 % que se hayan cribado todas las posibles variantes generadas, hay que rastrear un número de clones varias veces mayor que el de alternativas distintas que potencialmente existen (Reetz *et al.*, 2008).

Hay dos alternativas principales basadas en SM. Por un lado, el **CASTing** (*Combinatorial Active-site Saturation Test*) consiste en mutar mediante reemplazos aleatorios una o varias posiciones que a nivel estructural se encuentran en torno al centro activo. Si se escogen varias posiciones se asume que es más probable que dos aminoácidos próximos se comporten de forma cooperativa (Reetz *et al.*, 2006). Por otro lado, el método **B-FIT** (*B Factor*

Iterative Test), consiste en elegir los sitios de la proteína cuya modificación implica cambios en su rigidez y someterlos a SM. La elección de estos sitios se basa en la relación directa entre rigidez y termoestabilidad. La rigidez local es inversamente proporcional a la magnitud representada mediante el “factor B”, que indica el grado de desplazamiento de las densidades electrónicas de los átomos respecto a su posición de equilibrio (Reetz *et al.*, 2006). Sea cual sea el criterio utilizado para elegir las posiciones en las que se harán los reemplazos, el método de SM puede ser utilizado de forma iterativa para mutar varias posiciones, recibiendo entonces el nombre de *mutagénesis saturante iterativa (ISM)*.

El aumento en el número de individuos de la genoteca que mantienen la función de interés puede conseguirse descartando las proteínas inestables o mal plegadas sobre la base del concepto de **deriva génica neutral**. Algunas mutaciones al azar mantenidas a nivel poblacional por efecto de la deriva génica pueden afectar a propiedades de la proteína distintas a la función principal, que permanece intacta o se altera mínimamente. El origen y permanencia a nivel poblacional de estos mutantes se llama *deriva neutral* y afecta a propiedades que no están sometidas a una presión de selección. Las genotecas de “mutaciones neutrales” son colecciones de variantes que mantienen su función original prácticamente inalterada. Asumiendo que la mayoría de mutantes con mutaciones múltiples son inestables, la selección de variantes que mantienen su función original asegura que las proteínas están bien plegadas (Bloom *et al.*, 2007; Gupta y Tawfik, 2008).

La estrategia para acotar el número de opciones resultantes de las genotecas portadoras de mutaciones múltiples puede estar basada en métodos estadísticos como **ProSAR** (*protein structure activity relationship*), que es un método basado en la contribución de cada aminoácido a la mejora que se busca. Consiste en generar variantes con diversos reemplazos, de modo que las variantes con algún reemplazo en común se comparan con el fin de revelar si dicha sustitución es o no estadísticamente beneficiosa. En la siguiente ronda se combinan reemplazos beneficiosos, se descartan los deletéreos y se introducen nuevos reemplazos (Fox *et al.*, 2007).

Por otro lado, el abordaje **genómico** puede ayudar a introducir reemplazos múltiples que mejoren una propiedad como la termoestabilidad. Comparando múltiples proteínas homólogas se obtiene una secuencia consenso que contiene los aminoácidos más abundantes en cada posición. La conservación de aminoácidos en ciertas posiciones a lo largo de la evolución se relaciona con su contribución a la estabilidad (Lehmann *et al.*, 2000, Lehman y Wyss, 2001; Lehmann *et al.*, 2002). Los alineamientos múltiples permiten correlacionar reemplazos e identificar redes de residuos funcionalmente relacionados. Después puede comprobarse su efecto en una proteína de partida (Jochens y Bornscheuer, 2010; Terao *et al.*, 2006).

1.2.1.2. Métodos de recombinación

En la naturaleza, la recombinación del DNA es importante para la supervivencia y evolución de los seres vivos. Aunque es uno de los mecanismos de reparación de genes dañados también permite aumentar la diversidad genética de una determinada población (Zhao y Zha, 2004). El proceso de recombinación puede ser imitado en el laboratorio (fig. 1.7 c), *in vitro* o *in vivo*, con el objetivo de introducir cambios a nivel de proteína que conduzcan a la mejora de una o varias propiedades de interés biotecnológico (Arnold, 1999).

1.2.1.2.1. Métodos de recombinación *in vitro*.

Pueden establecerse dos subcategorías dentro de este grupo, los métodos que precisan homología de secuencia entre los fragmentos que se van a recombinar y los métodos que conducen a una recombinación independientemente de la homología entre fragmentos.

1.2.1.2.1.1. Métodos de recombinación que dependen de la homología entre fragmentos.

El método conocido como *in vitro DNA shuffling* fue el primer método de recombinación *in vitro*. Consiste en fragmentar aleatoriamente múltiples genes homólogos, recombinarlos mediante PCR para dar lugar a una reserva de quimeras y, finalmente, identificar las variantes de interés mediante cribado o selección (Stemmer, 1994). Para que este método funcione, los genes de partida, generalmente, deben tener entre sí un mínimo del 70 % de identidad de secuencia ya que el entrecruzamiento se limita a secuencias idénticas incluidas en regiones con elevada homología. La variación de esta técnica, llamada *family shuffling*, parte de genes de la misma familia (Cramer *et al.*, 1998; Kikuchi *et al.*, 1999). **DOGS** (*degenerate oligonucleotide gene shuffling*) permite controlar los niveles relativos de recombinación entre fragmentos y reduce la presencia de genes parentales al final del proceso. Se basa en amplificar, con cebadores degenerados, fragmentos equivalentes de cada gen, combinarlos en relaciones molares variables y ligarlos entre sí (Gibbs *et al.*, 2001).

Aunque con ligeras variaciones respecto a la técnica original, existen otros métodos de recombinación *in vitro* que requieren homología entre las secuencias que se recombinan. **RACHITT** (*random chimeragenesis on transient templates*) consiste en fragmentar genes homólogos, emparejarlos con la secuencia de un gen homólogo no digerido, que servirá de molde transitorio para rellenar los huecos y ligar los fragmentos. Tras eliminar el molde transitorio y amplificar el producto resultante se obtiene la genoteca final (Coco *et al.*, 2001). **StEP** (*staggered extensión process*) consiste en una PCR, en la que las etapas de hibridación y extensión son muy cortas, para elongar, sucesivamente y de forma escalonada, fragmentos de DNA. En cada ciclo, los fragmentos crecientes se aparean con moldes distintos y continúan extendiéndose hasta dar lugar a una reserva de genes quiméricos. Esto se repite hasta que se completa la longitud del gen (Zhao *et al.*, 1998; Zhao y Zha, 2006). **ISOR** (*Incorporating*

synthetic oligonucleotides via gene reassembly) consiste en la digestión, mediante DNasaI, del producto de amplificación de un gen diana, su posterior mezcla con cebadores sintéticos portadores de mutaciones de interés, su reensamblaje mediante DNA polimerasa dando lugar a un producto que se vuelve a amplificar mediante PCR (Herman y Tawfik, 2007).

OSCARR (*one-pot simple cassette randomisation and recombination*) es un gran ejemplo para ilustrar la versatilidad que pueden tener los métodos de ingeniería de proteínas, al aunar las ventajas de distintos enfoques en una única técnica. Mediante OSCARR (Hidalgo *et al.*, 2008), se adopta una estrategia de *evolución dirigida focalizada* que permite obtener reemplazos de forma aleatoria en uno o varios sitios de la secuencia primaria de la proteína parental, incluso en regiones que no fueron accesibles mediante epPCR convencional. Pero además, al estar basada en una PCR en la que se usan megacebadores, permite obtener genotecas con productos de recombinación entre las distintas regiones que ya fueron mutadas.

1.2.1.2.1.2. Métodos de recombinación que no dependen de homología entre fragmentos.

Con estos métodos se pretende superar la limitación que supone la necesidad de homología entre fragmentos y el sesgo en la genoteca. **ITCHY** (*incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*) da lugar a genotecas combinatoriales, es independiente de homología entre secuencias de DNA y consigue variantes con recombinación en cualquier punto del gen. Los puntos de recombinación se determinan por el tiempo de digestión parcial de cada gen con exonucleasa III (Ostermeier *et al.*, 1999a, Ostermeier *et al.*, 1999b). Una versión más rápida, **THIO-ITCHY**, determina esos puntos añadiendo, en localizaciones aleatorias del gen, nucleótidos con α -fosfotioato en una reacción previa a la digestión con exonucleasa III, que una vez que alcanza el nucleótido marcado, no puede continuar la digestión (Lutz *et al.*, 2001a). Respecto al *DNA shuffling*, esto es una ventaja ya que aumenta enormemente el acceso al espacio combinatorial posible. A diferencia del *DNA shuffling*, ITCHY da lugar a genotecas en las que cada miembro resulta de un único entrecruzamiento. Puede conseguirse el entrecruzamiento múltiple con procesos iterativos de ITCHY o mediante **SCRATCHY**, que es la aplicación de *DNA shuffling* a genotecas de ITCHY (Lutz *et al.*, 2001b).

Aunque existen otras alternativas, como **SHIPREC** (*sequence homology-independent protein recombination*), el resultado es semejante al de ITCHY ya que sólo hay un único punto de recombinación por molécula y su posición depende de la longitud de secuencias producidas por digestión parcial (Sieber *et al.*, 2001). Sin embargo, alternativas basadas en PCR, como **SIGNAL** (*sequence-independent generation of a chimera-ordered library*) permiten dividir varios genes en módulos elegidos por el investigador y combinables entre sí (Jézéquel *et al.*, 2008).

In Vitro Exon Shuffling es un método combinatorial de fragmentos de genes basado en el método natural de creación de nuevas combinaciones de exones mediante recombinación de intrones. Consiste en amplificar exones mediante PCR que posteriormente servirán como

1. INTRODUCCIÓN

cebadores, reensamblándose de forma combinatorial con ayuda de una polimerasa. Permite controlar la estequiometría de los dominios en la genoteca y aumentar la diversidad de la misma mediante inserción, delección o cambios en el orden de los exones. No depende de la homología entre los fragmentos a recombinar y permite la creación de genotecas para obtener proteínas ensambladas *de novo* (Kolkman y Stemmer, 2001).

Frame shuffling permite obtener genotecas de proteínas artificiales. Se basa en el uso de una polimerasa de baja fidelidad, termotolerante y de unión laxa al DNA, que cambia los marcos de lectura de los productos sintetizados respecto al molde original. Genera mezclas de fragmentos a partir de los distintos marcos de lectura posibles (Kashiwagi *et al.*, 2006).

1.2.1.2.2. Métodos de recombinación *in vivo*

Algunos organismos modelo, como la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, tienen una elevada frecuencia de recombinación y son fáciles de manejar en el laboratorio. Esto permite aprovecharlas para llevar a cabo una recombinación homóloga *in vivo* de genes de una misma familia dando lugar a genotecas de elevada diversidad (Bulter y Alcalde, 2003). Durante la recombinación *in vivo* los mecanismos de corrección de errores de la célula previenen la aparición de mutaciones adicionales (Cherry *et al.*, 1999). Un sistema similar basado en el empleo de *Escherichia coli* recibe el nombre de *Random chimeragenesis by heteroduplex* (Volkov *et al.*, 1999). Se ha empleado con éxito una estrategia de *family shuffling* mixta, CLERY (*combinatorial library enhancement by recombination in yeast*), mediante recombinación *in vitro* basada en PCR y recombinación *in vivo* y expresión en levadura (Abecassis *et al.*, 2000).

1.2.3. Métodos de detección: selección y cribado (**screening**)

El paso crítico para la obtención final de los productos de interés a partir de las genotecas generadas es el método de detección. Éste, permite distinguir la variante de interés de todas las demás y recuperarla. Existen dos tipos principales: métodos de **selección** y métodos de **screening** o cribado (último paso en las secciones b, c y d de la figura 1.7).

La **selección** se basa en dotar al organismo hospedador de una ventaja vinculada, de algún modo, a la proteína con las propiedades que se pretende seleccionar. Esta ventaja, le permite sobrevivir o crecer de forma favorable ante una determinada presión de selección. En estas condiciones, los organismos que posean la característica deseada son fácilmente distinguibles. Aunque suelen ser métodos específicos y difíciles de optimizar, cuando se ponen a punto permiten rastrear genotecas de más de 10^6 clones (Arnold y Volkov, 1999).

Los métodos de **screening** o cribado son más versátiles, permitiendo adecuar las condiciones experimentales para satisfacer el criterio deseado (Zhao y Arnold, 1997). Sin embargo, suele requerir mucho trabajo y el número de clones abarcable es limitado. Suele

basarse en métodos colorimétricos (detección de la absorbancia) o fluorimétricos (emisión de fluorescencia) con límites de detección, respectivamente, de 10^{-7} g·mL⁻¹ y entre 10^{-8} y 10^{-10} g·mL⁻¹ (Salazar y Sun, 2003). El *screening* en fase sólida suele basarse en métodos cualitativos como la visualización de halos en torno a colonias o el color en el interior celular (Turner, 2003). Sin embargo, también se han descrito métodos en fase sólida, como la medición de la actividad enzimática con sustratos fluorogénicos adsorbidos a placas con gel de sílice, que permiten basar el cribado en procedimientos cualitativos y cuantitativos, al permitir el uso de lectores de fluorescencia en formato de multi-ensayo (Babiak y Reymond, 2005). En cualquiera de los casos, la ayuda con sistemas automatizados permite analizar mayor número de clones (Babiak y Reymond, 2005; Turner, 2003). El *screening* en fase líquida facilita el análisis cuantitativo. Generalmente, implica la transferencia de colonias aisladas a placas en formato de multipocillo, para obtener microcultivos que expresan las variantes de proteína y, en el caso de proteínas intracelulares, su posterior lisis (Salazar y Sun, 2003). La inclusión del tipo parental en las mismas condiciones que los clones de la genoteca en cada placa, mejora la uniformidad y fiabilidad de los datos al disponer cada placa de su propio estándar (Zhao *et al.*, 1999). La actividad se cuantifica mediante espectroscopía o mediante cromatografía de alto rendimiento (Goddard y Reymond, 2004).

El desarrollo de técnicas para el cribado de actividades enzimáticas es constante, siendo las reacciones con sustratos cromogénicos o fluorogénicos especialmente aptas para *screening* de alto rendimiento, HTS o *high throuput screening* (Wahler y Reymond, 2001; Goddard y Reymond, 2004; Williams *et al.*, 2004). Entre los métodos de cribado más prometedores que se han desarrollado se encuentran los métodos basados en la compartimentalización *in vitro* (Tawfik y Griffiths, 1998). Este procedimiento permite la creación de compartimentos, cada uno de los cuales puede contener células enteras que producen una enzima de interés o incluso únicamente un gen con los complementos enzimáticos y los sustratos necesarios para su autoexpresión *in vitro*. A veces, estas dos alternativas pueden acoplarse a la obtención de productos fluorescentes permitiendo utilizar FACS para el cribado (Aharoni *et al.*, 2005). Además, la compartimentalización *in vitro* tiene la ventaja de que reduce la difusión de enzima y de producto fluorescente, aumentando su concentración y dando lugar a una mayor relación señal/ruido, algo muy útil en los casos en los que la concentración de la enzima de interés o de su producto es muy crítica (Aharoni *et al.*, 2005).

En los casos en los que no es posible establecer una relación entre la actividad enzimática y un producto cromogénico o fluorogénico, se puede recurrir a métodos alternativos como el registro de cambios físico-químicos como el pH o la temperatura (Connolly y Sutherland, 2000); el uso de marcadores isotópicos o los métodos basados en *fingerprinting* de enzimas y los microarrays (Joo *et al.*, 1999; Farinas *et al.*, 2001).

1. INTRODUCCIÓN

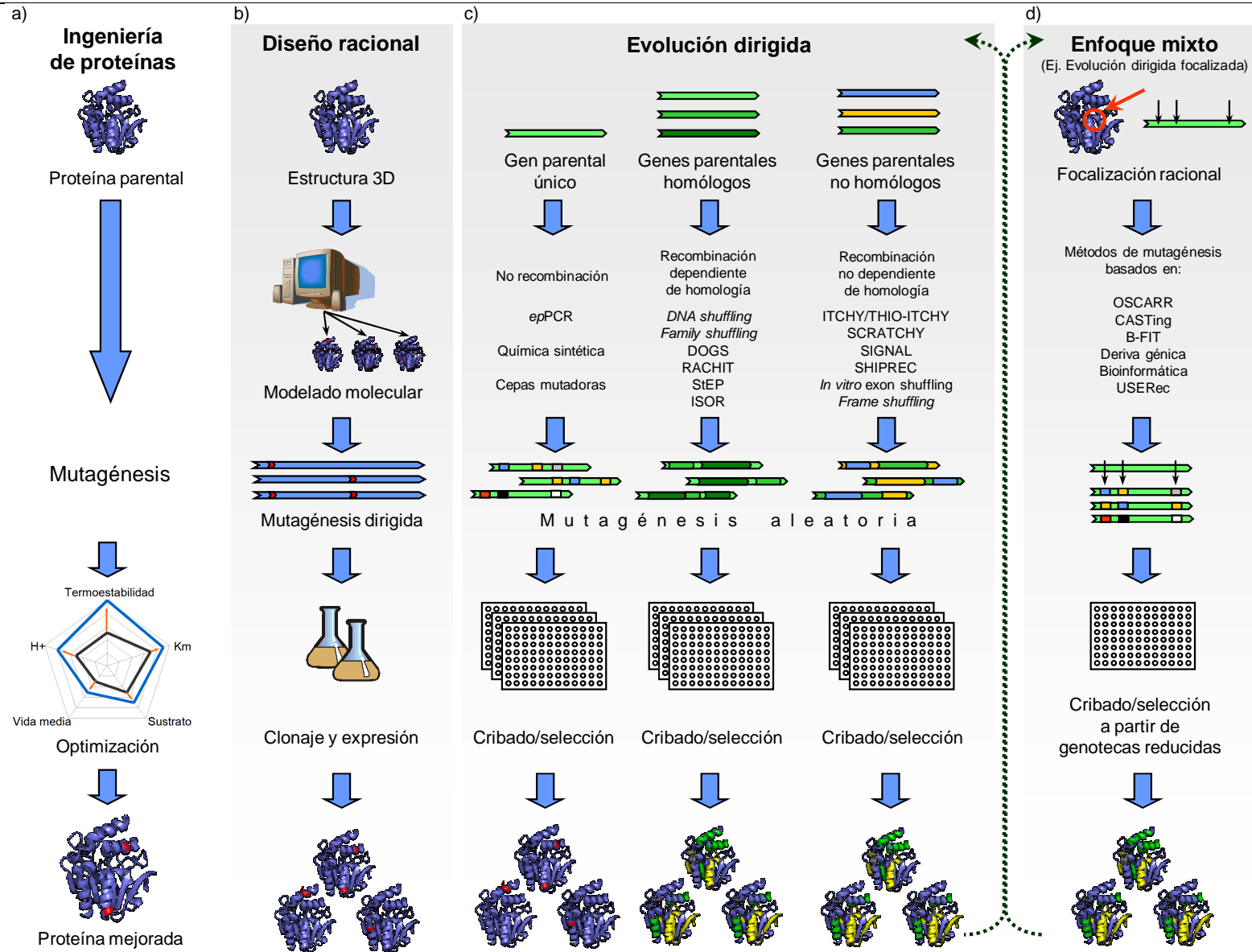


Figura 1.7. Métodos de ingeniería de proteínas. Se muestran los diagramas de trabajo del procedimiento general, "a", el diseño racional, "b", diseño aleatorio mediante mutagénesis al azar, "c", y el enfoque mixto o semiracional, "d". Los procedimientos en "c" y "d" pueden ser iterativos.

1.3. EXTREMÓFILOS Y TERMÓFILOS

Los procariotas pueden adaptarse a un inmenso rango de condiciones fisicoquímicas existentes en nuestro planeta. Se encuentran en ambientes tan dispares como las fuentes hidrotermales en las zanjas oceánicas del Océano Pacífico, el hielo de Antártida o las profundidades de la litosfera. Entre ellos se encuentran los microorganismos extremófilos, capaces de proliferar en condiciones alejadas de las que, según nuestro punto de vista antropocéntrico, se definieron como “normales”. Un planteamiento más global no basa la definición de los caracteres de extremofilia en la percepción del ambiente como atípico, sino en la existencia de una biodiversidad escasa en ese ambiente. Los caracteres considerados pueden ser diversos como la acidez del medio, basicidad, alta presión, alta concentración de sales, nivel de radiación o temperatura. Según su tolerancia a un determinado rango de temperaturas existen organismos psicrófilos, mesófilos y termófilos (Figura 1.3.1). Los psicrófilos incluyen los organismos que crecen a menos de 15 °C. Los ambientes por debajo de esa temperatura incluyen la mayor parte de agua marina y oceánica donde la biodiversidad es inmensa. Sin embargo, los ambientes con temperaturas superiores a 50 °C, donde podríamos encontrar microorganismos termófilos, son poco abundantes (Cava *et al.*, 2009).

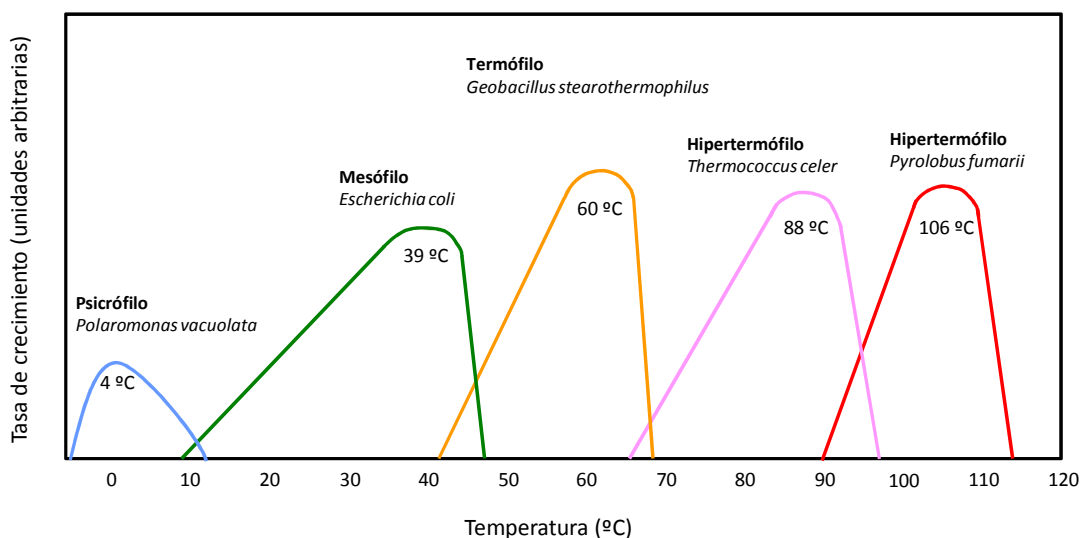


Figura 1.8. Límites de tolerancia de microorganismos en función de la temperatura (Madigan *et al.*, 2009).

Dentro de los termófilos hay tres categorías según su tolerancia u óptimos de crecimiento a determinadas temperaturas. Los *termófilos moderados* proliferan óptimamente entre 50 °C y 60 °C (aunque pueden crecer por debajo de 50 °C) e incluyen especies pertenecientes a géneros con representantes de carácter mesófilo como *Bacillus* o *Clostridium*. Los *termófilos extremos* no crecen a menos de 50 °C, su óptimo de crecimiento ronda los 70 °C y sólo incluye procariotas. Los *hipertermófilos* incluyen pocos grupos pertenecientes a los Dominios *Archaea* y *Bacteria* cuyo óptimo de crecimiento supera los 85 °C (Cava *et al.*, 2009). Estos organismos, por su adaptación y gran resistencia a temperaturas elevadas, son especialmente interesantes como objeto de estudio y aplicación.

1.3.1. Los microorganismos termófilos como fuente de termozimas

Entre los microorganismos termófilos, destaca especialmente el modo en que sus macromoléculas se adaptaron para funcionar a temperaturas tan elevadas. Los óptimos de actividad de muchas de sus enzimas coinciden con su temperatura óptima de crecimiento, lo que condujo a llamarlas “termozimas”. La capacidad, por parte de estas “termozimas”, de resistir temperaturas elevadas se asoció con la resistencia al efecto de agentes desnaturalizantes, siendo ambas propiedades de enorme interés industrial (Li *et al.*, 2005; Vieille y Zeikus, 2001). La aplicación de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* en la PCR y técnicas derivadas, originó un repentino avance del conocimiento biológico que supone un excelente ejemplo de la aplicación biotecnológica de las termozimas y su importancia (Mullis, 1990).

La producción de algunas termozimas puede hacerse en organismos heterólogos mesófilos. Sin embargo, se estima que el porcentaje de marcos de lectura abiertos que se podría expresar obteniendo proteínas estables y con un plegamiento adecuado en un organismo como *Escherichia coli* es menor del 20 % (Jenney y Adams, 2008). Por lo tanto, parece más adecuado producir las proteínas termoestables en hospedadores filogenéticamente próximos al organismo del que provienen.

1.3.1.2. Termoestabilidad de proteínas

El aumento de la estabilidad de una proteína puede referirse a estabilidad frente a solventes orgánicos, agentes oxidantes u otros compuestos o a estabilidad a alta temperatura (termoestabilidad). Esta resulta del balance entre fuerzas (inter- e intramoleculares) que favorecen conformaciones plegadas frente a las que estabilizan conformaciones desplegadas. Aunque los cambios en las condiciones del disolvente desplazarán este balance, el cambio de la estructura de la proteína mediante ingeniería de proteínas permite adecuar este balance a nuevas condiciones de uso (Bornscheuer y Kazlauskas, 2011).

El plegamiento de una proteína es esencial para su función. Para conseguir que sea termoestable conviene conocer qué mecanismos favorecen dicha propiedad. La temperatura es un factor desestabilizante y conduce a que las proteínas que no tienen las adaptaciones necesarias no se pliegan adecuadamente. Además, una proteína que adquirió su conformación funcional a una temperatura dada, se desnaturaliza a temperaturas mayores si no posee las adaptaciones necesarias para mantener su función en las nuevas condiciones. Las adaptaciones para funcionar a elevadas temperaturas se pueden identificar mediante la comparación de proteínas termoestables con sus homólogas no termoestables (Blake *et al.*, 1991; Auerbach *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1998).

Por un lado, las proteínas termoestables suelen tener mayor **número de interacciones** intermoleculares e intramoleculares a través de enlaces de hidrógeno (Vogt *et al.*, 1997), enlaces salinos (Karshikoff y Ladenstein, 2001), interacciones hidrofóbicas (Goodenough y Jenkins, 1991), enlaces disulfuro (Matsumura *et al.*, 1989) o enlaces metálicos coordinados (Vieille *et al.*, 2001; Kataeva *et al.*, 2003). La diferencia de energía libre entre el estado plegado y desplegado determina la estabilidad conformacional de la proteína y ronda los 40 kJ·mol⁻¹. La introducción de sólo dos de las interacciones citadas contribuye con hasta 50 kJ·mol⁻¹ para estabilizar la conformación plegada, aumentando significativamente la termoestabilidad de la proteína (Daniel y Cowan, 2000). Por otro lado, existen **modificaciones conformacionales**, como el aumento de la rigidez (Li *et al.*, 2005), la compactación del empaquetamiento (Russell *et al.*, 1997), la reducción de la entropía de desplegamiento por acortamiento de los bucles y reemplazo de aminoácidos con alta entropía conformacional por otros más rígidos (Pal y Chakrabarti, 1999; Li *et al.*, 2005), el descenso de la tensión conformacional (Vieille *et al.*, 1996) y la presencia de hélices- α más estables (Facchiano *et al.*, 1998), que contribuyen a la termoestabilidad

Una vez conocidos los mecanismos responsables de la termoestabilidad, estos se pueden emular para conseguir variantes termoestables a partir de proteínas que no son termoestables. Esta adaptación puede estar basada en la estabilización de la forma plegada añadiendo interacciones específicas, introduciendo mutaciones basadas en homólogos más termoestables o la predicción a partir de modelos moleculares del plegamiento (Guerois *et al.*, 2002). A partir de la estructura de rayos-X se pueden determinar las regiones más flexibles de una proteína plegada e identificar, mediante mutagénesis aleatoria sobre ellas, aminoácidos que las estabilizan (Reetz *et al.*, 2010). Por otro lado, se puede estabilizar una proteína desestabilizando las conformaciones desplegadas. Como ejemplo, la introducción de prolina (un residuo rígido) o la eliminación de glicina (un residuo flexible) limitan la libertad de las conformaciones desplegadas y las desestabilizan. Finalmente, la sustitución de aminoácidos no conservados con residuos conservados puede aumentar la estabilidad (Lehman *et al.*, 2000).

1.3.2. Los termófilos como modelo de estudio

El género *Thermus* es un modelo extraordinariamente útil en la obtención de información biológica por tres motivos principales:

- Sus proteínas cristalizan con mayor facilidad que las de mesófilos y psicófilos, por ello la elección de termófilos extremos para los estudios de biología estructural es frecuente. Las estructuras en alta resolución del ribosoma 70 S (Yusupov *et al.*, 2001), la DNA polimerasa bacteriana (Selmer *et al.*, 2006; Severinov, 2000) y el complejo respiratorio I (Sazanov y Hinchliffe, 2006) se obtuvieron antes a partir de especies de *Thermus* que de *E. coli*.

1. INTRODUCCIÓN

- La mayoría de microorganismos termófilos pertenecen a las ramas más antiguas de los árboles filogenéticos de arqueas y bacterias basados en rDNA 16S y otras moléculas. Esto respalda la hipótesis de su proximidad al último antecesor común en Arqueas o Bacterias, por lo que su estudio revelará los rasgos característicos de la vida ancestral (da Costa *et al.*, 2006).
- Los genomas de estos organismos suelen ser menores de 2,5 Mpb y en ellos se encuentran muy pocos parálogos por lo que son buenos candidatos para estudiar la función de sus genes mediante el aislamiento de mutantes (Cava *et al.* 2009).

1.3.3. Experimentación con termófilos

A pesar del gran interés que tienen los organismos termófilos existen pocos modelos fácilmente manejables en el laboratorio. Esto se debe, principalmente, a problemas relacionados con su crecimiento a altas temperaturas, la necesidad de condiciones anaeróbicas, porque lleven a cabo un metabolismo quimiolitotrófico de bajo rendimiento (Vieille y Zeikus, 2001) o por la necesidad de combinar varios caracteres extremos de temperatura, basicidad y alta concentración de sales para poder crecer (Mesbah *et al.*, 2007). Hasta ahora, la manipulación genética se ha limitado prácticamente a cinco especies de arqueas (*Sulfolobus solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *Pyrococcus furiosus*, *P. abyssi* y *Thermococcus kodakaraensis*) y dos de bacterias (*Thermotoga neapolitana* y *Thermus thermophilus*). El modelo más efectivo en el caso de Arqueas es *Thermococcus kodakaraensis* (Sato *et al.*, 2003). Entre las bacterias termófilas extremas, aunque se intentaron manipular cepas de *Thermotoga maritima* (Yu y Noll, 1997; Yu *et al.*, 2001), *T. thermophilus* es el modelo más adecuado para la manipulación genética y como hospedador en la producción de termozimas (Hidalgo *et al.*, 2004) o en la selección de mutantes termoestables mediante evolución dirigida (Chautard *et al.*, 2007).

1.3.4. El genero *Thermus*

El género *Thermus* engloba ocho especies descritas (Tabla 1.1). La similitud de secuencia del rDNA 16 S entre las cepas tipo de cada especie está entre 91,2 y 96,4 %. Dentro de cada especie la similitud de secuencias rDNA 16S supera generalmente el 99 % (Chung *et al.*, 2000). Los caracteres fenotípicos de la mayoría de especies de este género se solapan y es cada vez más difícil diferenciar nuevas especies respecto a las que ya están descritas. Por otro lado, la diversidad de cepas de la misma especie es inmensa y fácilmente verificable a través de las diferencias en la composición de ácidos grasos (da Costa *et al.*, 2001).

Tabla 1.1. Porcentajes de identidad de secuencia en las especies de *Thermus*.

Especie	Identidad de secuencia rDNA 16S (%)	Referencias
<i>T. aquaticus</i>	98,9-99,7	Brock y Freeze, 1969
<i>T. thermophilus</i>	99,4-100	Oshima e Imahori, 1974; Manaia <i>et al.</i> , 1994
<i>T. filiformis</i>	99,2-99,9	Hudson <i>et al.</i> , 1987
<i>T. Brockianus</i>	99,9-100	Williams <i>et al.</i> , 1995
<i>T. oshimai</i>	99,8-100	Williams <i>et al.</i> , 1996
<i>T. scotoductus</i>	98,7-99,9	Kristjanson <i>et al.</i> , 1994
<i>T. antranikianii</i>	99,9-100	Chung <i>et al.</i> , 2000
<i>T. igniterrae</i>	99,9-100	Chung <i>et al.</i> , 2000

Todas las cepas del género *Thermus* son bacterias Gram-negativas con alta tasa de crecimiento en condiciones aeróbicas. Pueden crecer entre 45 y 83 °C situándose sus temperaturas óptimas de crecimiento en condiciones experimentales entre 62 y 75 °C. No necesitan aminoácidos específicos o vitaminas pero sí algunos oligoelementos como Fe²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ o Cu²⁺ (Brock, 1978). Algunas cepas pueden usar óxidos de nitrógeno o metales para crecer mediante respiración anaeróbica. La mayoría de cepas son amarillas o naranjas debido a la presencia de carotenoides en sus membranas. Tienen forma de bacilos delgados, que en fase de crecimiento exponencial en medio rico tienden a formar filamentos con septos que se separan mediante fisión binaria, principalmente al llegar a la fase estacionaria. En medio rico con poca agitación tienden a formar estructuras multicelulares conocidas como “cuerpos rotundos” (Kraepelin y Grävenstein, 1980). No se conoce la existencia de cepas móviles en este género (da Costa, 2006).

Se aíslan mediante inoculación en medio *Thermus* (TB), medio basal salino Castenholz D (Castenholz, 1969) con extracto de levadura y triptona (Williams y da Costa, 1992; ver materiales y métodos de esta memoria). Excepto algunas cepas, especialmente las de mayor similitud con *T. thermophilus* HB8, el crecimiento de la mayoría de cepas de *Thermus* se inhibe a concentraciones de materia orgánica superiores al 1 % (Oshima y Yamakawa, 1974). La mayoría de cepas de *Thermus* se conservan durante un mes a 4 °C, si se cultivaron en placas de medio TB, y varios años a -80 °C en medio líquido con glicerol al 15 % (v/v).

Varios estudios basados en rRNA 16S y secuencias de proteínas apoyan una relación estrecha entre las especies de *Thermus* y las del género *Deinococcus*. Según este planteamiento se crearía una rama filogenética independiente, el Filo *Deinococcus-Thermus* (Figura 1.9). La posición evolutiva de esta rama todavía no está muy clara ya que inicialmente se propuso que el Filo *Deinococcus-Thermus* sería, después de *Thermotoga* y *Aquifex*, de los más antiguos del Dominio Bacteria (Woese, 1987). Comparaciones más recientes a nivel de proteómica y de la composición de las membranas (Gupta, 2000) junto con el estudio de los genomas de *Deinococcus* y *Thermus* sitúan al grupo en una posición intermedia entre Gram-positivas y Gram-Negativas (Omelchenko *et al.*, 2005; Ciccarelli *et al.*, 2006).

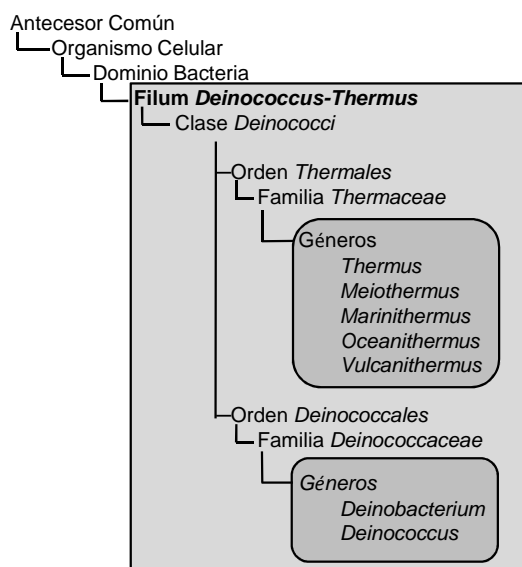


Figura 1.9. Taxonomía del *Phylum Deinococcus-Thermus*.

1.3.4.1. Hábitats donde se encuentran

Las cepas del género *Thermus* se aíslan generalmente a partir de áreas hidrotermales con la temperatura del agua entre 55-70 °C y pH entre 5,0-10,5 (da Costa *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la dispersión, pueden aparecer en zonas geotérmicas de gran temperatura y bajo pH o en fuentes de agua fría (Williams y da Costa, 1992). La primera especie de *Thermus* se aisló de **áreas hidrotermales** del parque nacional de Yellowstone y Pacheteaus Calistoga en California (Brock y Freeze, 1969). Desde entonces, el descubrimiento de cepas incluidas en el género y el conocimiento de la diversidad de sus adaptaciones ha sido creciente y dependiente de la diversidad de ambientes en los que se encuentran. Las cepas aisladas de **afloramientos calientes** de agua marina de poca profundidad (Islandia) subrayan el carácter halotolerante del género. La mayoría de cepas aisladas de estos afloramientos crecen más rápido en medios sin sales añadidas. Sin embargo, a diferencia de los aislados de medios continentales, que no toleran más de un 1 % de NaCl (Kristjansson *et al.*, 1986; Hudson *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1989; Manaia *et al.*, 1994), pueden crecer en concentraciones de NaCl de hasta el 3-6 %. El aislamiento de cepas a partir de áreas **geotérmicas abisales** (cresta Media del Océano Atlántico y la cuenca de Guaymas en el Golfo de California) desvela su barotolerancia ya que se encuentran incluso a 3500 m de profundidad bajo el agua marina, condiciones en las que la presión ronda las 350 atmósferas de magnitud (Marteinsson *et al.*, 1995; Marteinsson *et al.*, 1999). Las especies del género *Thermus* se encuentran incluso en **medios antropogénicos** de carácter termal (Brock y Freeze, 1969) como arroyos contaminados con agua derivada de cañerías de agua caliente (Ramaley y Hixson, 1970), sistemas de agua caliente (Brock y Boylen, 1973), pilas de compostaje (Beffa *et al.*, 1996) o la superficie de una roca a 60 °C en una mina de oro a 3200 m (Kieft *et al.*, 1999).

1.3.4.2. Ultraestructura de envolturas bacterianas en el género *Thermus*

Las especies de *Thermus* tienen una envoltura celular (figura 1.10) formada por una *membrana plasmática* y una pared celular con una delgada *capa interna* de peptidoglicano densa a los electrones conectada con una *capa externa* ondulada mediante invaginaciones a intervalos irregulares (figura 1.10-b). Existe un *espacio intermedio*, poco denso a los electrones, entre las capas interna y externa de la pared (figura 1.10-a). Varias cepas muestran ocasionalmente unas estructuras, visibles al microscopio con contraste de fases o mediante microscopía electrónica de transmisión, conocidas como “cuerpos rotundos” (figura 1.10-c). Esta morfología consiste en varias células unidas por una capa externa común de la pared delimitando un amplio espacio entre las células que engloba (Brock y Edwards, 1970).

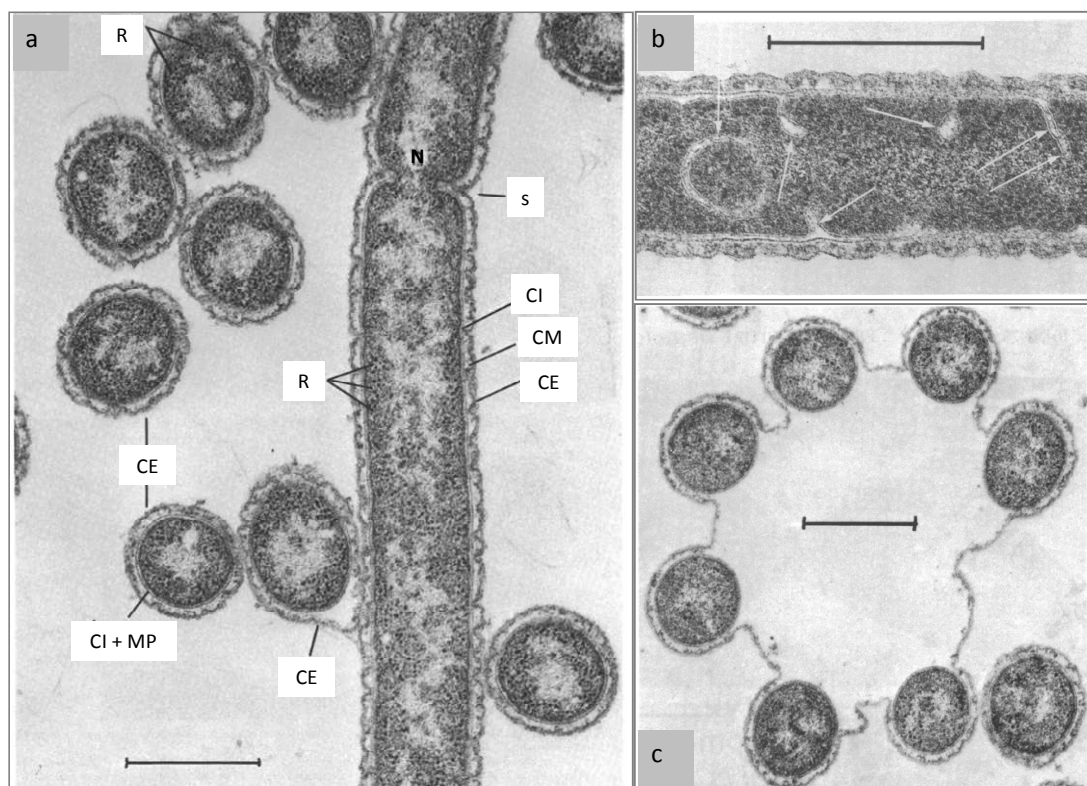


Figura 1.10. Ultraestructura de envolturas bacterianas en *T. aquaticus*. En “a” se muestran vistas longitudinal, transversal y oblicua de células, revelando el nucleoplasma (N) con finas y densas fibrillas de DNA, rodeadas por el citoplasma, que contiene numerosos ribosomas (R). La envoltura celular consta de una membrana plasmática (MP) y una pared con una capa externa densa (CE), una capa intermedia poco densa (CI) y una capa interna densa (CI). Nótese la formación de un surco en células en división. Donde dos células están en contacto, la capa externa de la pared (CE) se ha separado de la capa interna (CI) que permanece adherida a la membrana plasmática. En “b”, se ponen de manifiesto fracciones de un bacilo que muestran invaginaciones de la membrana plasmática (flechas). En “c”, se muestra la sección transversal de ocho bacilos, siete de los cuales están conectados mediante la capa externa de su pared celular, formando una estructura anular. Las barras indican 0,5 μm . Tomado de Brock y Edwards, 1970.

El peptidoglicano de las cepas del género *Thermus* contiene L-ornitina como diaminoácido y glicilglicina como puente interpeptídico (Merkel *et al.*, 1978; PasK-Hughes y Williams, 1978). Esta clase de peptidoglicano también es característica de *Meiothermus* y

1. INTRODUCCIÓN

Deinococcus (Hesel *et al.*, 1986; Embley *et al.*, 1987; Sharp y Williams, 1988). La principal quinona respiratoria de todas las cepas de los géneros de la familia *Thermaceae* es la menaquinona 8. La presencia de Ornitina y menaquinona 8 corrobora la relación entre *Thermaceae* y *Deinococcus*.

1.3.4.3. Metabolismo

Las cepas del género *Thermus* obtienen carbono y energía a partir de carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos pero ninguna cepa fermenta. Las especies de *Thermus* llevan a cabo un metabolismo respiratorio siendo muchas de las cepas aerobias estrictas. Algunas, son capaces de crecer en condiciones anaerobias usando el nitrato como aceptor de electrones y otras reducen el nitrito (Hudson *et al.*, 1989; Santos *et al.*, 1989; Manaia *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 2000). Otros aceptores terminales de electrones acoplados al crecimiento son NO_3^- , Fe(III) y S^0 pudiendo reducir incluso Mn(IV), Co(III), Cr(VI) y U(VI). Aunque la mayoría son quimiorganotróficas, algunas de las cepas son quimilitheterotrofas facultativas (Kieft *et al.*, 1999; Skirnisdottir *et al.*, 2001).

La mayoría de cepas de *Thermus* forman, debido a la producción de pigmentos, colonias amarillentas de intensidad variable. La mayoría de cepas de *Thermus* presentes en ambientes antropogénicos mantenidos en oscuridad son incoloras y carecen de pigmentos (Marteinson *et al.*, 1995). En algunos casos, la producción de pigmentos es un carácter inestable que no revierte tras su pérdida espontánea. La producción de carotenoides en oscuridad carece de función y es energéticamente cara, mientras que en ambientes iluminados ofrece una ventaja competitiva al proteger de los efectos de la radiación. Frente a las cepas silvestres de las que provienen o los mutantes que producen menos cantidad de carotenoides, los mutantes que producen mayor cantidad de carotenoides, aunque presentan menor tasa de crecimiento a temperaturas superiores al óptimo, resisten mucho más la radiación ultravioleta (Hoshino *et al.*, 1994; Tabata *et al.*, 1994).

1.3.4.4. *Thermus thermophilus*

De todas las especies del género, cobra especial importancia *T. thermophilus* gracias a que es un excelente organismo modelo para la investigación básica y aplicada. A diferencia de otros, *T. thermophilus* crece fácilmente en el laboratorio, puede adquirir DNA exógeno mediante un mecanismo de competencia natural extraordinariamente eficiente y suele ser el organismo elegido para estudios de biología estructural gracias a la facilidad con la que cristalizan sus enzimas y complejos multiproteicos. *T. thermophilus* es un hospedador adecuado para producir termozimas, para termoestabilizar proteínas termosensibles y es un excelente modelo para el estudio del metabolismo respiratorio y su regulación. Aunque se están desarrollando algunos marcadores moleculares termoestables, como los genes de

resistencia a antibióticos, las herramientas disponibles para estudiar su fisiología y su regulación son escasas, especialmente si se compara con modelos como *E. coli* (Cava *et al.* 2009).

La mayoría de cepas de la especie *T. thermophilus* son halotolerantes y crecen en medio con extracto de levadura y hasta el 6 % de NaCl. Su principal soluto compatible es la trehalosa, aunque también el manosilglicerato contribuye al balance osmótico durante el estrés salino (Silva *et al.*, 2003). Todas las cepas aisladas de ambientes termales salinos y algunas cepas aisladas de áreas geotérmicas continentales son de la especie *T. thermophilus* y son halotolerantes (da Costa *et al.*, 2001b; da Costa, 2006). *T. thermophilus* HB8 y todas las cepas filogenéticamente próximas a esta cepa resisten la presencia de nutrientes orgánicos en el medio de cultivo mejor que la mayoría del resto de cepas del género *Thermus* (Oshima e Ymakawa, 1974).

Las cepas HB8 y HB-27 tienen una capa proteica superficial cristalina, la capa-S, que consta principalmente de una proteína de 100 kDa designada como P100 ó SlpA (Castón *et al.*, 1988; Faraldo, *et al.*, 1992; Olabarria, *et al.*, 1996; Fernandez-Herrero, *et al.*, 1997). Su genoma tiene genes homólogos relacionados con la oxidación del azufre, lo que indica que *T. thermophilus* HB27 podría obtener energía de compuestos de azufre reducidos (Henne *et al.*, 2004).

La mayor parte de información genómica acerca del género *Thermus* proviene de la secuenciación de cepas de la especie *T. thermophilus*. Hasta ahora, las secuencias disponibles del género *Thermus* son la de *T. thermophilus* HB27 (Henne *et al.*, 2004), *T. thermophilus* HB8 (Oshima e Imahori, 1974) y SG0.5JP17-16 (Lucas *et al.*). El genoma de *T. thermophilus* consta de un cromosoma de 1,8 Mpb y un megaplásmido de unas 230 Kpb. Ambos tienen entre el 60-66 % de G+C (Rainey y da Costa, 2001) y contienen muy pocas duplicaciones génicas (Henne *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, parece factible utilizar los métodos de ingeniería de proteínas que sirvieron para ampliar el uso de proteínas fluorescentes en microorganismos mesófilos con el fin de obtener variantes termoestables de proteínas fluorescentes para extender su aplicación en el microorganismo termófilo *Thermus thermophilus*. Partiendo de esta hipótesis general se plantea la consecución de los siguientes objetivos particulares:

1. Crear variantes termoestables de proteínas fluorescentes con espectros de emisión de color azul, verde y amarillo introduciendo los reemplazos necesarios en la secuencia primaria de la variante sGFP. Estos reemplazos serán elegidos mediante un diseño racional basado en las descripciones que ya han sido publicadas.
2. Caracterizar *in vitro* las propiedades espectrales y de termoestabilidad de las variantes de proteína fluorescentes termoestables obtenidas, incluyendo sGFP y sus derivados.
3. Expresar las variantes termoestables de proteína fluorescente en el microorganismo termófilo *Thermus thermophilus* y caracterizar su comportamiento *in vivo*.
4. Desarrollar y aplicar modelos para la localización de proteínas *in vivo* y el estudio de su interacción.
5. Desarrollar una estrategia para obtener variantes de la proteína fluorescente mCherry mediante diseño aleatorio y optimizar un método para la selección o cribado de las variantes termoestables.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Los materiales empleados en este trabajo están resumidos en las tablas del Anexo I. La Tabla I recoge las cepas empleadas, la Tabla II los plásmidos utilizados, la Tabla III los plásmidos empleados que se construyeron en este trabajo. En la Tabla IV se recogen los oligonucleótidos empleados, en la Tabla V los medios de cultivo, en la Tabla VI las soluciones y los tampones, en la Tabla VII los antiseros, la Tabla VIII recoge los productos comerciales más relevantes, como los compuestos de uso general, los antibióticos, las enzimas de restricción y otras enzimas de modificación del DNA, marcadores de peso molecular, Kits comerciales empleados, material general de laboratorio y software relevante. Finalmente, en la Tabla IX aparece la descripción de los equipos utilizados.

3.2. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1. Crecimiento y conservación de cepas bacterianas

La incubación de cepas derivadas de *Thermus thermophilus* en medio líquido se hizo en medio TB_F, o TB_F con antibiótico/s, a 60-70 °C en agitación a 180 rpm, sin superar 1/5 del volumen del recipiente. La incubación de dichas cepas sobre medio sólido TB_{F-agar}, o TB_{F-agar} con antibiótico/s, se hizo en posición invertida en cámara húmeda a 60-70 °C. La conservación de cepas de interés se hizo en forma de sedimento celular congelado a -20 °C.

El crecimiento de cepas de *E. coli* en medio líquido se hizo a 37 °C en medio rico LB (o LB con antibiótico), sin superar 1/5 del volumen total del recipiente y con agitación a 180 rpm. El crecimiento en medio sólido se hizo sobre placas de LB_{agar} o LB_{agar} con antibiótico, en posición invertida a 37 °C. La conservación de cepas de *E. coli* se hizo en suspensión celular al 20 % (v/v) de glicerol en tubos de rosca para conservación a -80 °C (CryotubeTM, NuncTM).

3.2.2. Transformación de *Escherichia coli*

Para cada transformación se añadieron 5 µL de ligación o 50-100 ng de DNA de plásmido (sin superar nunca un volumen de 5 µL) a 50 µL de células competentes previamente descongeladas en hielo. Se mezcló con suavidad y se incubó en hielo 20 min. Se traspasaron los tubos a 42 °C durante 90 s y se metieron de nuevo en hielo durante 5 min. Se añadieron 200 µL de medio SOC a cada transformación y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 h si la siembra posterior era en LB con ampicilina, higromicina o tetraciclina, o durante 2 h si la siembra posterior fue en LB_{kan30}. Las placas se incubaron a 37 °C.

Alternativamente se transformaron células de *E. coli* electrocompetentes. Para ello se añadió entre 0,5 y 5 µL del plásmido de interés (sin superar 300 ng) a 50 µL de células

3. MATERIALES Y MÉTODOS

electrocompetentes. Se incubaron en hielo 20 min y se pasó la mezcla a cubetas para electroporación de 2 mm de sección frías. Se dio una descarga de 2500 V durante 5 ms en el electroporador *Easyject Plus D2000* (EquiBio). Se enfrió la mezcla en hielo, se le añadieron 0,6 mL de SOC para traspasarlo a un tubo de 1,5 mL (Eppendorf). Se incubó a 37 °C durante 1 h para siembras posteriores en LB con ampicilina, higromicina o tetraciclina, o durante 2 h para siembras posteriores en LB_{kan30}. Las placas se incubaron a 37 °C.

3.2.3. Transformación de *Thermus thermophilus*

La transformación de cepas de *T. thermophilus* se hizo mediante *competencia natural* (Koyama *et al.*, 1986). Se preparó un cultivo líquido inicial que se dejó crecer hasta alcanzar la fase estacionaria. Con una fracción de este cultivo se preparó un nuevo cultivo con una DO₅₅₀ igual a 0,05 que se dejó crecer hasta alcanzar una DO₅₅₀ igual a 0,3. Cada transformación se hizo con 0,6 mL de este cultivo a los que se añadió entre 100 y 300 ng de plásmido (de un tipo o mezcla de dos tipos). Se dejó crecer en agitación 4 h y se sembró en medio sólido con antibiótico/s.

Cuando fue necesario, se transformó *T. thermophilus* mediante *electroporación*. Para ello se preparó un cultivo de DO₅₅₀ igual a 0,5. Se sedimentaron las células de una fracción de V mL de dicho cultivo en frío mediante centrifugación. Se lavaron 2 veces con (0,5·V) mL de glicerol al 10% (v/v). Se resuspendieron las células en (V·10⁻²) mL de glicerol al 10% (v/v). Para cada transformación se añadió entre 50 y 300 ng de plásmido a 0,1 mL de estas células. Se mantuvo en hielo 20 min. Se sometió la mezcla a una corriente de 2500 V durante 5 ms en cubetas de 2 mm de sección, con ayuda de un electroporador *Easyject Plus D2000* (EquiBio). Se recogió el contenido tras añadir 0,6 mL de TB_F, se incubó 4 h en agitación y se sembró en medio sólido.

3.3. MÉTODOS MOLECULARES

3.3.1. Manipulación de ácidos nucleicos

Purificación de plásmidos: los plásmidos se obtuvieron a partir del sedimento de 5 mL de células de cultivo en fase estacionaria. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se empleó el kit *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), basado en la lisis alcalina, posterior neutralización de la mezcla, adherencia del DNA de interés a filtros adsorbentes, lavado del DNA plasmídico y elución final del mismo en _{dd}H₂O a 65 °C.

Mutagénesis dirigida: cada mezcla de reacción en un volumen final de 50 μL contenía 5 μL de Tampón 10X con MgSO_4 , 1 μL de mezcla de dNTPs (0,025 M cada uno), 50 pmol de cada cebador, 20 ng de DNA molde, 1 μL de DMSO y 2,5 U de *PfuPlus polymerase* (EURx). Se preparó en hielo y se introdujo en un termociclador con el programa adecuado (4 min a 95 °C, 18 ciclos (30 s a 95 °C, 60 s a 55 °C, 2 min·kpb⁻¹ de secuencia a 68 °C) y 10 min a 68 °C). Se añadió 1 μL de *DpnI* o de *Fast Digest^R DpnI* (Fermentas) a cada producto de PCR y se incubó a 37 °C 15 min o 60 min respectivamente según el tipo de enzima. De cada mezcla se usaron 5 μL para transformar células competentes de *E. coli*. Se comprobó la obtención de los mutantes de interés mediante secuenciación y posterior análisis.

Secuenciación de DNA: las muestras se enviaron a servicios de secuenciación. Cada plásmido de interés se purificó y se preparó una fracción de 15 μL a 100 ng· μL^{-1} en agua destilada. En caso necesario se incluyó el cebador de interés a 5 mM de concentración final. Se secuenció mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) que utiliza marcadores fluorescentes “BigDyeTM Terminators” (Applied Biosystems) para detectar fragmentos de DNA en electroforesis capilar.

Electroforesis de fragmentos de DNA: la separación de fragmentos de DNA para su análisis o purificación se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, 1% ó 3% (p/v) según el rango de interés. Se incluyó bromuro de etidio en el gel y se usó tampón TAE 1X como electrolito.

Limpieza de DNA: tanto los productos de reacción de PCR como las bandas de interés que aparecían en el gel de agarosa correspondientes a plásmidos de topología linear u otros fragmentos de interés, se purificaron siguiendo las indicaciones del kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) y se obtuvieron finalmente mediante elución en $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$.

Reacción de ligación: se preparó la mezcla de ligación con 0,5 μL de *T4 DNA ligase* (Promega), 50-100 ng de vector, la cantidad necesaria de inserto para una relación molar entre 3:1 y 6:1 inserto-vector, 1 μL del tampón de la enzima y se ajustó el volumen final de reacción a 10 μL . La mezcla se incubó 16 h a 4 °C.

Clonaje direccional de derivados de *sgfp* en vectores de expresión inducible en *E. coli*: en cada caso se obtuvo el amplicón de interés mediante PCR con los cebadores XFPs_Nde_fw y XFPs_Hind_rv y con una mezcla 3:1 de polimerasas *Tth polymerase* (Biotools) y *Pfu polymerase* (Biotools) respectivamente. Se procedió a la comprobación en gel y limpieza del amplicón. Se realizó una digestión doble con endonucleasas *NdeI* (Fermentas) y *HindIII* (Fermentas) del amplicón obtenido por un lado y del vector pET28b(+) por otro lado. Se desfosforilaron los extremos del vector con *Antarctic Phosphatase* (NEB), se inactivó la enzima y se limpió el DNA resultante, mediante el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

(Promega). Se hizo la reacción de ligación entre vector desfosforilado y amplicón digerido. De cada producto de ligación se usaron 5 μ L para transformar células competentes de *E. coli*.

Construcción de fusiones tipo *casx-sxfl* en derivados de pMHPnqo: se obtuvo el gen *casA* por amplificación mediante PCR a partir del plásmido Topo-*casA* y posterior digestión del amplicón con *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas). Para la preparación del resto de insertos se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* JM110 con DNA de los plásmidos portadores de cada uno de los genes *casB*, *casD* ó *casE*, flanqueados por dianas *NcoI* y *Clal*. Se hicieron minipreps partiendo del cultivo de colonias aisladas. Se digirió el plásmido obtenido con las enzimas *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas) y los fragmentos producto de la digestión se separaron mediante electroforesis. Se cortó la banda portadora del gen de interés y se limpió con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Se obtuvo, mediante miniprep, DNA de vectores pMHPnqo-*sxfl*, se digirieron con *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas), se desfosforilaron con *Antarctic Phosphatase* (NEB) y se limpiaron con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Los insertos obtenidos se ligaron con el vector preparado. Se transformaron 5 μ L de cada ligación en células *E. coli* DH5 α competentes.

Construcciones *cheA^{p1p2}-sxfl*, *cheX-sxfl* y *cheY-sxfl* en derivados de pMHPnqo y de pMKPnqo: se digirieron los plásmidos pMHPnqo-*casB-sifp* y pMHPnqo-*casB-se,fp*, extraídos de *E. coli* JM110, mediante *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas). Se resolvió mediante electroforesis y se obtuvo el DNA de la banda de interés. Se desfosforilaron sus extremos con *Antarctic Phosphatase* (NEB). Se amplificaron los fragmentos génicos correspondientes a los dominios p1 y p2 de CheA (aminoácidos 1-264) y se amplificaron los genes completos *cheX* y *cheY* de *Thermotoga maritima*, se sometieron a digestión con *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas) y se inactivaron las enzimas. Se ligaron cada uno de los 3 insertos con cada uno de los 2 vectores. Se transformaron 5 μ L de cada producto de ligación en células *E. coli* DH5 α competentes.

Clonaje de *cas-sxfl* en pMKPnqo: se obtuvieron plásmidos tipo pMHPnqo-*cas-sxfl*. Se liberó el inserto de interés mediante digestión doble con *NcoI* (Fermentas) y *HindIII* (Fermentas). Se sometió a electroforesis y las bandas de interés, portadoras de la fusión *cas-sxfl*, se cortaron y limpiaron con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Se preparó vector pMKPnqo por digestión de pMKPnqo-sGFP con *NcoI* (Fermentas) y *HindIII* (Fermentas) y se desfosforilaron sus extremos con *Antarctic Phosphatase* (NEB). Se llevó a cabo la ligación entre los fragmentos *cas-sxfl* y el vector pMKPnqo.

Construcción de fusiones *dnrS-sxfl* y *dnrT-sxfl* en derivados de pMHPnqo: el gen *dnrS* se amplificó mediante PCR, usando como molde el plásmido pET28-regA. Se limpió con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) el amplicón obtenido y se digirió con las enzimas *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas). Para obtener *dnrT* se hizo una miniprep de

pMHP*nqo-dnrT-scfp* contenido en *E.coli* JM110. El plásmido obtenido se digirió con *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas) y se resolvió mediante electroforesis. La banda de correspondiente a 654 pb se cortó y limpió con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Se preparó vector pMHP*nqo-sgfp* mediante digestión con *NcoI* (Fermentas) y *Clal* (Fermentas) y se desfosforilaron sus extremos con *Antarctic Phosphatase* (NEB). Con los insertos y vectores preparados según lo descrito se hicieron las ligaciones de pMHP*nqo-sgfp* con *dnrT* por un lado y con *dnrS* por otro. Se transformó *E. coli* DH5 α con 5 μ L de cada producto de ligación.

Clonaje de *dnrS-sxfp* y *dnrT-sxfp* en pMK184 y pMH185: los plásmidos de interés, derivados tipo pMHP*nqo-dnrS-sxfp* y pMHP*nqo-dnrT-sxfp*, se obtuvieron por miniprep con el kit *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) a partir de cepas *E. coli* JM110 en las que se introdujo previamente mediante transformación bacteriana. Se liberó el inserto de interés mediante digestión doble con *XbaI* (Fermentas) y *HindIII* (Fermentas). Se sometió a electroforesis y las bandas de ~2200 pb y 1436 pb respectivamente, portadoras de las fusiones *dnrS-sxfp* y *dnrT-sxfp*, se cortaron y limpiaron con el kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Se introdujeron los vectores pMK184 y pMH185 en *E. coli* JM110 mediante transformación bacteriana. Se purificaron y digirieron con *XbaI* (Fermentas) y *HindIII* (Fermentas). Se desfosforilaron sus extremos con *Antarctic Phosphatase* (NEB). Se llevaron a cabo por un lado las ligaciones del vector pMK184 preprado con el inserto *dnrS-sxfp* y con el inserto *dnrT-sxfp*. Por otro lado se hizo la ligación del vector pMH185 preparado con el inserto *dnrS-sxfp* y con el inserto *dnrT-sxfp*. Se transformó *E. coli* DH5 α con 5 μ L de cada producto de ligación.

3.3.2. Manipulación de proteínas

3.3.2.1. Purificación de proteínas

Inducción de la producción de proteína en *E. coli* y sedimentación de células: a partir de la cepa de interés se aislaron colonias por agotamiento de siembra sobre placas de LB_{agar;Km30} que se incubaron en posición invertida entre 12 y 16 h a 37 °C. Se tomó una colonia representativa de cada cepa y se inoculó en 2 mL de LBKm30. Se incubó a 37 °C en condiciones de aireación 12-16 h. Se tomó 1 mL de este preinóculo y se añadió a 99 mL de LBkm30 en un matraz Erlenmeyer sin superar nunca 1/5 del volumen total del recipiente. Se incubó aproximadamente 1,5 h a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO₅₉₅=0,5. Se añadió IPTG (Sigma) hasta una concentración final de 0,5 mM. Tras 5-6 h más a 37 °C en agitación, se introdujo el matraz en abundante hielo. Se sedimentó el contenido celular del total de cultivo mediante centrifugación en tubo durante 20 min a 3000·g a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante se conservaron los sedimentos a -20 °C hasta su posterior uso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del lisado de células: se resuspendió el sedimento de cada tubo en 10 mL de *tampón fosfato* a 4 °C. Se sometió a ruptura mediante ultrasonidos durante 15 min con una frecuencia de 0,6 Hz y una amplitud de 50 % en el modo de pulsación intermitente con la sonda *Sartorius Labsonic® M* (Sartorius). Se vertió el lisado resultante en tubos de ultracentrifugación con tapones de rosca bien cerrados. Se centrifugó a 20000-g durante 20 min a 4 °C en la centrífuga Avanti J-25 (Beckman coulter). Al terminar se introdujo cada tubo inmediatamente en hielo.

Cromatografía de afinidad: para cada lote de lisado de células se utilizaron 2 mL de resina *TALON® Cellthru.Resin* (Clontech). Se lavó con 40 mL de *tampón de equilibrado* frío a un flujo de 1 mL·min⁻¹. Se añadió toda la suspensión con lisado de células sobre la columna y se incubó con agitación suave a 4 °C durante 20-30 min. Se descartó el eluido, se lavó la columna con 40 mL de *tampón de lavado con imidazol*, se añadieron 2-3 mL de *tampón de elución*, se dejó reposar 2 min y se recogió lentamente en un tubo introducido en hielo. Se continuó de la misma manera la elución hasta completar el tubo de recogida con 10 mL de eluato en frío.

Concentración, lavado y conservación del extracto de proteína pura: se lavaron con *tampón fosfato* un tubo de 50 mL y un filtro de concentración del kit *Centrifugal filter units Ultracell R-10K* (Millipore). Se colocó el filtro en el tubo y se añadió en él el volumen eluyente del último paso de la cromatografía. Se completó la capacidad del filtro con *tampón fosfato* frío y se centrifugó 15 min a 3000-g a 4 °C. Se volvió a rellenar con *tampón fosfato* frío y se centrifugó 15 min a 3000-g a 4 °C. Se volvió a rellenar con *tampón fosfato* y se centrifugó a 3000-g a 4 °C durante el tiempo necesario para que el volumen final de concentrado estuviese entre 0,3 y 0,5 mL. Se recogió la totalidad del concentrado. De cada lote se guardó una fracción a 0,05 mL para la estimación de la concentración de proteína y para la evaluación de su pureza y calidad mediante SDS-PAGE. Al resto de concentrado se le añadió la cantidad de glicerol 85 % necesaria para alcanzar una concentración final 50 % (v/v) y se conservó a -20 °C.

3.3.2.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas se hizo en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Inicialmente se calentó cada muestra 10 min a 95 °C en 1X *tampón de carga Laemmli* y se centrifugó 5 min a 14000 xg. Las fracciones sobrenadante se introdujeron en pocillos de un gel de poliacrilamida con fase de concentración al 4% (p/v) y fase de separación al 12% (p/v) (Laemmli y Favre, 1973). Se reservó al menos 1 pocillo en cada gel para el marcador de tamaño de proteínas. Se sometió a electroforesis inmerso en el electrolito hasta conseguir la separación deseada. Si el gel se iba a usar para la inmunodetección se continuó con el protocolo de *Western blot*. Si por el contrario era el punto final del análisis se introdujo en 20 mL de *solución de tinción* durante 2 h, se lavó con agua destilada y se introdujo

en *solución de desteñir* hasta alcanzar el contraste adecuado entre las bandas azules de proteína teñida y el fondo.

3.3.2.3. Inmunodetección de proteínas mediante *Western-blot*

Las muestras de interés, incluyendo el marcador preteñido, se separaron mediante SDS-PAGE según el protocolo anterior. Se apilaron desde el ánodo hacia el cátodo, superpuestas en capas, 3 láminas de papel Whatman 3MM (GE-Healthcare) humedecidas en *tampón de transferencia*; una membrana de PVDF (*Immobilon-Transfer Membrane*, Millipore), con superficie y forma equivalente al gel de poliacrilamida de interés, humedecida primero en *metanol* (2 min) y después en *tampón de transferencia* (5 min); la membrana de poliacrilamida y sobre esta última 3 láminas de papel Whatman 3MM (GE-Healthcare) humedecidas en *tampón de transferencia*. Se replicó el gel original sobre la membrana de PVDF, *Immobilon-Transfer Membrane* (Millipore), mediante la migración de las proteínas con carga aparente negativa hacia el ánodo por transferencia eléctrica ($2 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$) transversal al empaquetado. Terminada la transferencia se bloqueó la replica en PVDF, *Immobilon-Transfer Membrane* (Millipore), mediante mezcla suave junto con 10 mL de *solución de bloqueo* durante 15 min a temperatura ambiente o 12-16 h a 4 °C. Se sustituyó la solución de bloqueo por 10 mL de TBS-T con anticuerpo primario. Se mezcló suavemente 1 h, se lavó 3 veces con 10 mL de TBS-T durante 5 min, se sustituyó la solución por TBS-T con anticuerpo secundario y se dejó 1 h en mezcla suave. Se lavó 3 veces con 10 mL de TBS-T durante 5 min de mezcla suave y se incubó la membrana en oscuridad 2 min en *solución de revelado*. Se reveló en oscuridad mediante exposición a una película fotosensible *Curix RP-2 Plus Medical X-ray film* (AGFA-Healthcare).

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Estimación de la concentración de proteínas y ácidos nucleicos: La estimación de la concentración de DNA en solución se hizo a partir de 1 μL en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) según las recomendaciones del fabricante, utilizando como muestra blanco el medio en el que se disolvió el DNA. En el caso de proteína soluble, la estimación se hizo según el método de Bradford, empleando como colorante indicador *Biorad protein assay* (Biorad) siguiendo las indicaciones del fabricante y midiendo los valores de absorbancia a 600 nm en un lector de placas Fluostar Optima (BMG-Labtech). La recta de referencia para la interpolación de los valores de concentración de proteína problema se hizo con diluciones de BSA.

Medidas generales de fluorimetría: los espectros de absorción y emisión se obtuvieron en un fluorímetro *Aminco Bowman® Luminescence Spectrometer* (SLM-Aminco) a la temperatura requerida (30 ó 70 °C). La proteína de interés se diluyó en 3 mL de agua MilliQ o

3. MATERIALES Y MÉTODOS

tampón fosfato y se introdujo en una cubeta de cuarzo con agitación magnética. Para cada proteína se hizo el ajuste automático del voltaje del tubo fotomultiplicador (PMT) y se obtuvieron por triplicado primero los espectros de excitación y después de emisión siguiendo las indicaciones del fabricante. La recta $F=X \cdot C$ se obtuvo, por triplicado, mediante la medición de la fluorescencia de diluciones seriadas, habiéndose ajustado inicialmente el PMT con la de mayor concentración y atemperando la muestra en agitación magnética antes de cada medición.

Obtención de curvas de termoestabilidad basada en fluorescencia: las curvas de termoestabilidad de cada proteína se obtuvieron en un termociclador de tiempo real *Rotor-Gene™ 6000* (Corbett Life Science). Se midió la fluorescencia de cada proteína a partir de 3 réplicas de 25 μL con optimización automática de la ganancia. El programa de temperatura consistió en 220 s a 30 $^{\circ}\text{C}$, rampa de 30-95 $^{\circ}\text{C}$ de 1 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ tras lo cual se mantuvo a 30 $^{\circ}\text{C}$. Las medidas de fluorescencia se tomaron cada minuto en la rampa y cada 6 s tras alcanzar de nuevo los 30 $^{\circ}\text{C}$. Para la medida de la resistencia a ciclos de calentamiento y enfriamiento se sostuvo la temperatura 220 s a 30 $^{\circ}\text{C}$ y se midió la fluorescencia al final de cada paso en ciclos alternos de 1 min a 95 $^{\circ}\text{C}$ y 2 min a 30 $^{\circ}\text{C}$. La medida de resistencia a 80 $^{\circ}\text{C}$ a lo largo del tiempo se hizo 220 s a 80 $^{\circ}\text{C}$, tras los que se sostuvo la temperatura a 80 $^{\circ}\text{C}$ midiéndose la fluorescencia cada 6 s.

Dicroísmo circular: se registraron los espectros de dicroísmo circular en el UV-cercano mediante un espectropolarímetro Jasco-810 equipado con un recipiente Peltier-termostatizado. Las medidas se hicieron a concentraciones de proteína entre 0,5 y 1,2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ con la solución en una cubeta de 10 mm de ancho. Se registraron los espectros basados en la media de cuatro repeticiones. Tras restar la contribución del tampón, los datos brutos se convirtieron en elipticidad molar. Se monitoreó la desnaturalización térmica midiendo los cambios de elipticidad a dos longitudes de onda distintas, representativas de la contribución por parte de las cadenas laterales aromáticas (276-285 nm) y el cromóforo (404-509 nm), a medida que la temperatura se elevaba desde 30 $^{\circ}\text{C}$ hasta 95 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 60 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-1}$. Para estimar los valores de T_m^{CD} a partir estos datos, se calculó con el software Prism la derivada, se sometió dos veces a suavizado de orden cero y media móvil de 5 datos, el resultado se sometió al mismo tipo de derivación y suavizado de nuevo para obtener la segunda derivada del primer bloque original de datos. Los puntos de corte de la segunda derivada con el eje de ordenadas, junto con la interpretación de las gráficas originales de elipticidad sirvieron para estimar los valores de T_m^{CD} .

Citometría de flujo: para la caracterización poblacional de las cepas de *T. thermophilus* se prepararon cultivos tanto de las poblaciones fluorescentes como del control a una DO_{550} igual a 0,05 y se dejó crecer hasta alcanzar una DO_{550} igual a 0,2. Se sedimentaron mediante centrifugación suave 2 mL, se lavaron, con PBS 1X filtrado, mediante centrifugación y se resuspendieron en 200 μL de PBS 1X filtrado. Con la ayuda del citómetro *BD FACSCanto II*

Flow Cytometer (Becton Dickinson), tras establecer los parámetros con la población control, se hicieron histogramas de (nº de células)/(intensidad de fluorescencia) con las muestras de cada uno de los colores.

Métodos de cribado: las cepas de *E. coli* portadoras de las variantes de color termoestables derivadas de sGFP se seleccionaron mediante la visualización de colonias aisladas en medio sólido iluminadas con rayos U.V. Para la búsqueda de las cepas de *T. thermophilus* portadoras de las variantes termoestables de mCherry se sembraron genotecas obteniendo colonias aisladas en medio sólido. Se utilizó el scanner de fluorescencia *Typhoon 9410 scanner* (GE Healthcare) en el modo de fluorescencia, con el filtro 610 nm BP y laser a 532 nm estableciendo el plano focal a 3 mm del lector. Las colonias de *T. thermophilus* con intensidad de fluorescencia mayor que las de la placa utilizada como control (que expresa la variante parental de la proteína mCherry) se consideraron positivas. Como control negativo se usó *T. thermophilus* transformado con el plásmido pNCK.

3.5. MICROSCOPIA Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Preparación de las muestras para su observación en microscopios: se observaron muestras de cultivos de *T. thermophilus* de interés que crecieron en condiciones de aireación hasta una DO_{550} igual a 0,2 en el caso de cepas portadoras de derivados de pMHnqo y derivados de pMKnqo o en condiciones de cultivo en fase estacionaria en el caso de portadores de derivados de pMK184, pMH185 o derivados de pNCK. Para ello se pusieron 20 μ L del cultivo de interés sobre un portaobjetos con una fina película sólida de agarosa al 1 % (p/v) en agua destilada. En los casos necesarios se fijó previamente la muestra añadiendo *formaldehído* (Merck) hasta una concentración final de 0,1-0,5 % (v/v) y atemperado.

Captura de imagen digital en el microscopio: se tomaron imágenes digitales de secciones-Z mediante equipos de microscopía confocal (Tabla IX del anexo) empleando el objetivo de inmersión de 63X/1.4 NA en el caso del confocal *Zeiss LSM510 META* y el objetivo de inmersión 100X/1.3 en el resto de equipos. Se utilizaron los parámetros adecuados para cumplir los criterios de Nyquist para el tratamiento de imágenes. En los casos necesarios las imágenes se procesaron mediante deconvolución basada en el programa Huygens 3.2 para el sistema operativo Linux (Scientific Volume Imaging B.V). El diseño final de imágenes se hizo con el programa Fiji (Wayne Rasband National Institute of Health, USA).

Cálculo de FRET basado en "Sensitized Emision": se prepararon las muestras utilizando células sin ser fijadas. El equipo utilizado fue el "Sistema FRET" (ver Tabla IX del anexo), compuesto por un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma C9100-02 (Hamamatsu), con cambio ultrarrápido de filtros y pletina motorizada (Marzhauser). Tras optimizar las condiciones de adquisición de imágenes, se tomaron cinco

3. MATERIALES Y MÉTODOS

imágenes con cada uno de los canales para el azul, amarillo y FRET con cada uno de los transformantes que expresan una única fusión. Los promedios de datos de magnitud de intensidad de fluorescencia de estas imágenes sirvieron para calcular los factores $A = ((\text{Intensidad canal FRET})/(\text{intensidad canal YFP}))$ y $B = ((\text{Intensidad canal FRET})/(\text{intensidad canal CFP}))$. Se adquirieron imágenes de un mínimo de diez campos de muestras de la cepa donde se expresan simultáneamente las dos fusiones a las proteínas sujeto de estudio. La adquisición para cada campo se hizo con los tres canales. El cálculo de la señal amarilla debida a FRET se hizo con cada una de estas imágenes considerando los factores A y B calculados con anterioridad para cada lote de imágenes de cada tipo de transformante según el modelo empleado. Para ello se hizo el cálculo, con ayuda de *Metamorph*, de acuerdo a la igualdad “Señal FRET” = (señal bruta del canal FRET) - (A x (señal del canal YFP)) - (B x (señal del canal CFP)).

Cálculo de FRET basado en “Acceptor Photobleaching”: este procedimiento consistió en la obtención de imágenes del transformante que coexpresa ambas fusiones a la vez. Se utilizó el equipo “Zeiss Multifotón LS510 Vertical” o el equipo “Zeiss Multifotón LSM710 Invertido” (ver Tabla IX del anexo). Se adquirieron imágenes de sendos campos en los que se capturó el canal azul y el amarillo. Tras esta captura se agotó la fluorescencia amarilla mediante la incidencia del láser hasta quedar próxima al 15-20 % de la inicial. Se tomó de nuevo la imagen con los dos canales y se comprobó la existencia o no de un aumento de intensidad de fluorescencia azul como indicador de la existencia de un fenómeno de FRET en el estado previo a la desactivación de la proteína amarilla.

4. RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DERIVADOS DE sGFP.

4.1.1 Obtención de variantes de color mediante diseño racional: mutagénesis dirigida sobre el gen *sgfp* (*Superfolder Green Fluorescent Protein*)

El primer bloque de trabajo se centró en la ampliación de la paleta de colores termoestable disponible mediante *diseño racional*. Para ello se introdujeron las mutaciones que originan cambios en las propiedades espectrales y la maduración del fluoróforo de la variante eGFP en la secuencia del gen *sgfp*, que codifica la “*Superfolder Green Fluorescent Protein*”. De este modo se obtuvieron 13 secuencias génicas diferentes derivadas de la parental correspondiente a *sgfp*. La secuencia primaria de los productos de estos 14 genes se detalla en la figura 4.1. La tabla 4.1 recoge las mutaciones relacionadas con el cambio de color en eGFP. Su interés reside en su valía como base para la consecución de los resultados descritos en este apartado. Además en la tabla 4.1 se detalla cuáles de estas sustituciones puntuales de aminoácidos fueron necesarias para el reajuste de las propiedades espectrales de las proteínas resultantes de nuestro trabajo.

Tabla 4.1: Reemplazos puntuales de interés. Se muestra una lista de reemplazos presentes en las variantes derivadas de avGFP, que fueron fundamentales en nuestro trabajo.

Proteína derivada	Mutaciones críticas para el fenotipo en mesófilos	Propiedad alterada	Referencia bibliográfica	Mutaciones sobre el esqueleto de sGFP que fueron necesarias para el cambio de color.	Variante termoestable obtenida en este trabajo
eBFP	F64L/Y66H/Y145F/V163A	espectro emisión	Tsien, 1998	Y66H	sBFP
CFP (cyan FP)	Y66W	espectro emisión	Tsien, 1998; Pedelacq <i>et al.</i> , 2006	Y66W	sCFP
Cerulean	Y66W/S72A/Y145A/H148D	intensidad absorción y emisión	Rizzo <i>et al.</i> , 2004	Y66W/S72A	sE ₁ FP
				Y66W/S72A/Y145A/H148D	sE ₂ FP
CGFP (cyan-green FP)	Y66W/T203Y	espectro emisión	Sawano <i>et al.</i> , 2000	Y66W/T203Y	sCGFP
RSGFP4	F64M/S65G/Q69L	absorción a 489 nm	Yang <i>et al.</i> , 1996		
eGFP (enhanced GFP)	F64L/S65T	emisión, ionización del cromóforo	Cramer <i>et al.</i> , 1995		
Emerald EmGFP	S65T/S72A/N149K/M153T/I167T	plegamiento	Tsien, 1998		
frGFP (folding reporter GFP)	F64L/S65T/F99S/M153T/V163A	plegamiento	Waldo <i>et al.</i> , 1999		
mGFP	A206K/L221K/F223R	suprime dimerización	Zacharias <i>et al.</i> , 2002	A206K	sM ₁ FP
				A206K/L221K/F223R	sM ₂ FP
sGFP (superfolder GFP)	F64L/S65T/S30R/Y39N/N105T/Y145F/I171V/A206V	plegamiento y termoestabilidad	Pedelacq <i>et al.</i> , 2006		sGFP
T-Sapphire	T203I/Q69M/C70V/V163A/S175G	espectro excitación y emisión, plegamiento	Zapata-Hommer <i>et al.</i> , 2003	T203I	sS ₁ FP
				T203I/Q69M/C70V	sS ₂ FP
YFP (yellow FP)	S65T/S72A/T203Y	espectro emisión	Tsien <i>et al.</i> , 1998; Pedelacq <i>et al.</i> , 2006	T203Y	sYFP
Venus	S65T/S72A/F46L/M153T/V163A/S715G/T203Y	intensidad emisión y plegamiento	Nagai <i>et al.</i> , 2002.	F46L/T203Y	sV ₁ FP
				S72A/F46L/T203Y	sV ₂ FP
Citrine	V68L/Q69M /T203Y	intensidad emisión	Nagai <i>et al.</i> , 2002.	V68L/Q69M /T203Y	sIFP
Photoactivatable GFP	T203H	propiedades espectrales	Patterson y Lippincott-Schwartz, 2002	T203H	sPAFP
RFP		espectro emisión	Patterson y Lippincott-Schwartz, 2002		
ratiometric pHluorin	S202H/E132D/S147E/N149L/N164I/K166Q/I167V/R168H/L220F	dependencia pH	Miesenböck <i>et al.</i> , 1998		
ecliptic pHluorin	S147D/N149Q/T161I/S202F/Q204T/A206T	dependencia pH	Miesenböck <i>et al.</i> , 1998		

4. RESULTADOS

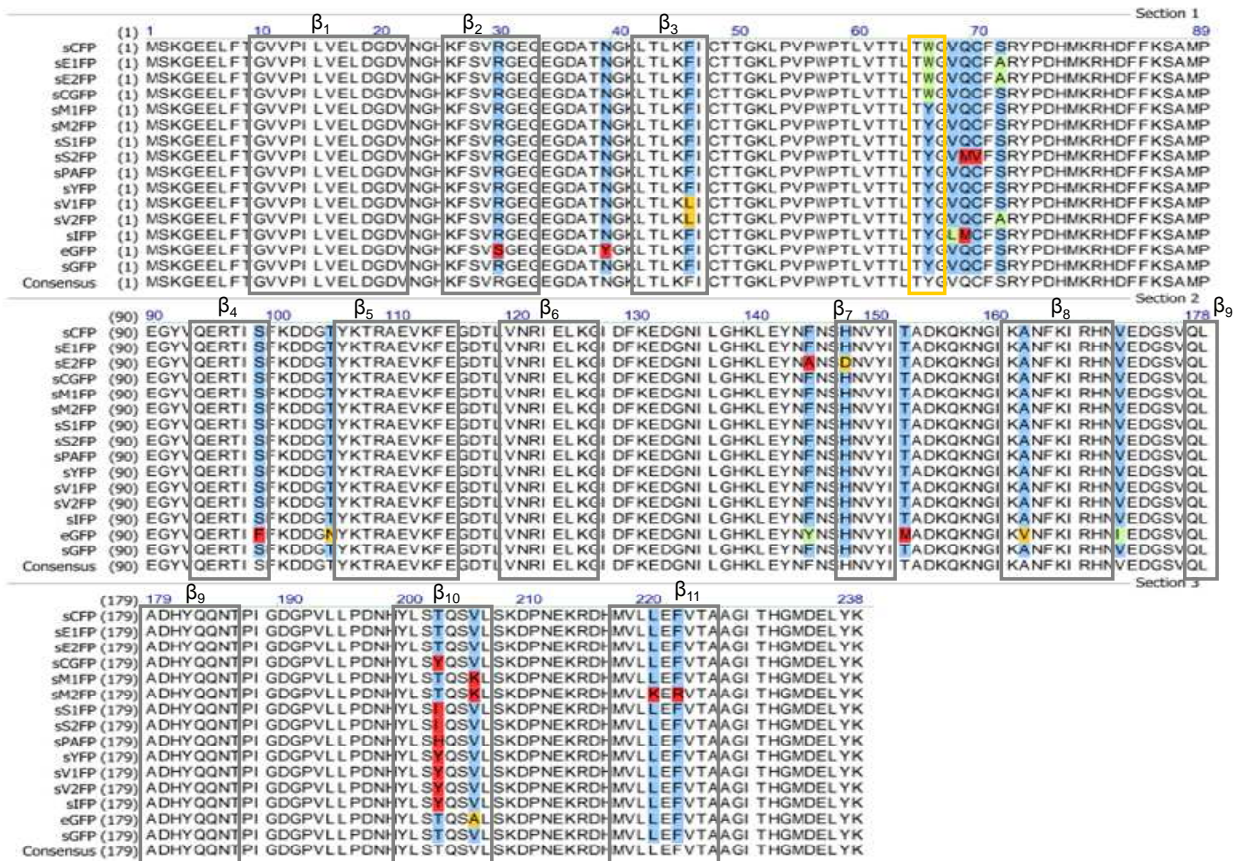


Figura 4.1. Alineamiento de secuencias. Secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los mutantes conseguidos mediante mutagénesis dirigida comparadas entre sí y con eGFP. Se han subrayado las posiciones de los reemplazos que fueron necesarios para lograr los reajustes espectrales perseguidos. Se resaltan con rectángulos de color gris las regiones correspondientes a lámina beta y con un rectángulo amarillo la región del cromóforo. El color de subrayado denota el grado de conservación del aminoácido respecto al de la misma posición en sGFP. Rojo, no similar; azul, conservativo; verde, similar; anaranjado, levemente similar.

4.1.2 Expresión y purificación de mutantes de proteínas fluorescentes termoestables

Para obtener proteína pura se empleó *E. coli* BL21 (DE3) como hospedador de construcciones de cada uno de los 14 genes que codifican las variantes termoestables de proteína fluorescente. Este sistema permitió expresar proteínas de interés con un rendimiento alto mediante la fusión de cada una de ellas a 6 histinas consecutivas en la posición amino-terminal permitiendo su purificación mediante cromatografía de afinidad.

La eficacia y el grado de pureza en la obtención de las 14 proteínas fue puesta de manifiesto mediante electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida (SDS-PAGE). La figura 4.2 muestra el resultado de la tinción de este tipo de gel. En el carril donde se introdujo una fracción de cada uno de los eluidos de interés se observa una única banda con el tamaño esperado de unos 27 kDa. Este resultado revela en todos los casos una pureza y rendimiento suficientes para continuar los ensayos posteriores de caracterización.

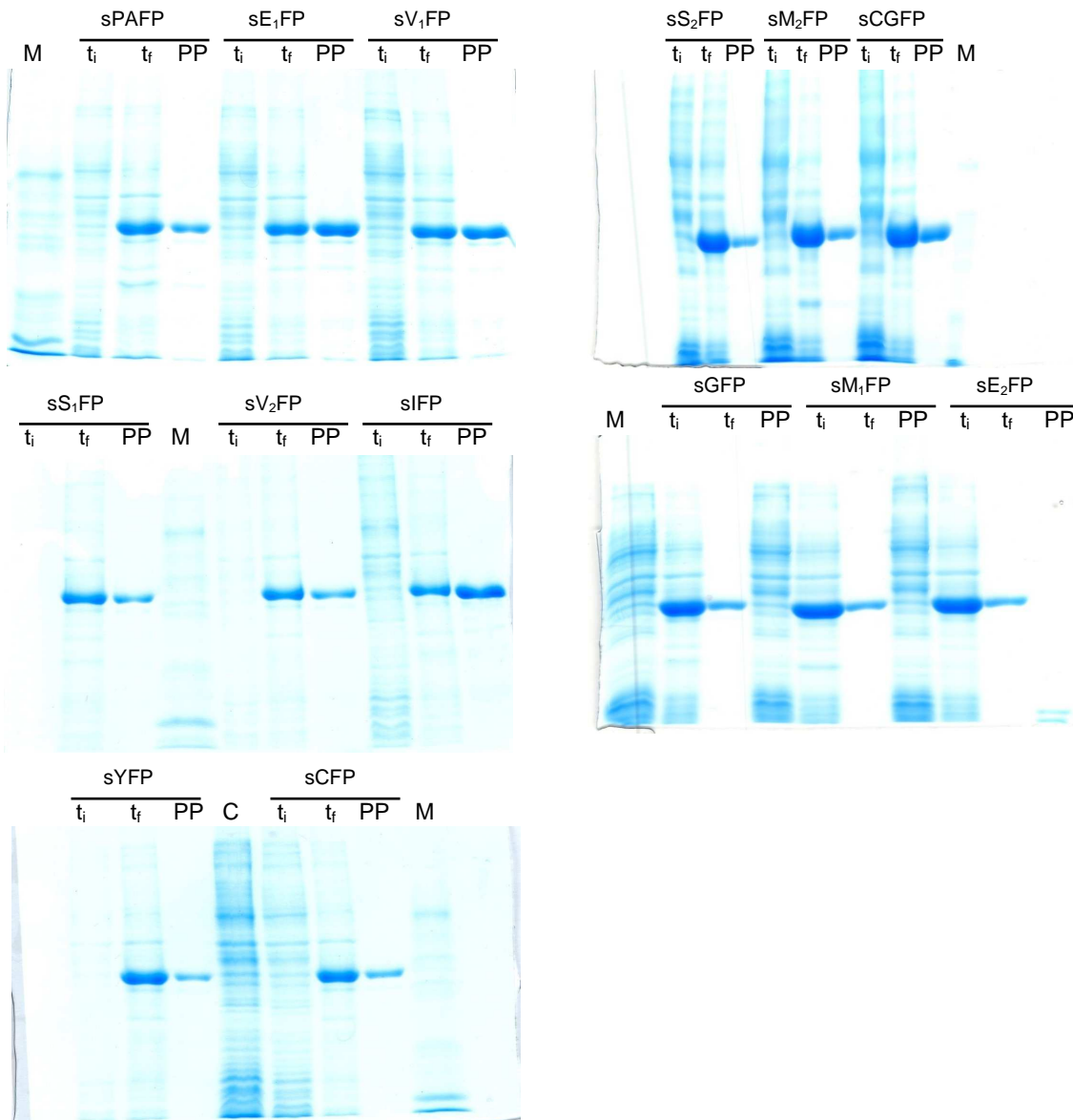


Figura 4.2. Tinción con azul de Coomassie. Cada gel es el resultado de analizar, mediante la técnica de SDS-PAGE, el nivel de obtención de las proteínas de interés y su cantidad relativa en la solución. El examen de los pasos en la purificación de cada una de las variantes producidas revela los niveles de obtención de las proteínas de interés en las distintas fases, t_i , tiempo inicial de la inducción, t_f , tiempo final de la inducción en el cultivo y PP, proteína pura y concentrada a partir del eluido de la columna de afinidad en su último paso. M, carril con marcador de peso molecular.

4.1.3 Caracterización espectral

Se obtuvieron tres réplicas de los espectros de absorción y emisión correspondientes a cada tipo de proteína analizada en un rango de longitudes de onda entre 300 y 650 nm y se promediaron para la obtención de las gráficas definitivas (figura 4.3). Estos datos sirvieron para registrar las longitudes de onda a la que la excitación y la emisión son máximas para cada proteína (tabla 4.3). Los espectros obtenidos en los 14 casos desvelan la robustez de las propiedades espectrales de las proteínas analizadas frente a temperaturas tan elevadas como 70 °C. Para todas estas variantes los espectros de absorción y emisión a 30 °C y a 70 °C son

4. RESULTADOS

prácticamente idénticos salvo mínimas variaciones que apenas llegan a escasos nm de desplazamiento en el mayor de los casos. Los espectros a 30 °C y 70 °C de cada una de las proteínas dadas prácticamente solapan entre si en la mayoría de casos, especialmente en las variantes de color amarillo. La comparación de los espectros de absorción y emisión con el de la proteína parental, sGFP, y entre sí desvela el efecto que tienen, a nivel de propiedades espectrales, las sustituciones de aminoácidos sobre la secuencia de sGFP.

Las variantes de color **cian/cerúleo** sCFP, sE₁FP y sE₂FP tienen espectros de **absorción** con una forma muy parecida. Presentan un máximo de absorción con longitud de onda de 451 nm en los tres casos tanto a 30 °C como a 70 °C a excepción de la variante sCFP cuyo máximo de excitación a 30 °C es con longitud de onda de 452 nm.

La variante **azul-verdosa**, sCGFP, muestra un espectro de **absorción** muy afilado y estrecho con un máximo a 469 nm tanto a 30 °C como a 70 °C. El efecto a 70 °C es prácticamente despreciable y consiste únicamente en un ligerísimo levantamiento en forma de meseta en el lado izquierdo y un ligerísimo levantamiento del hombro derecho. El máximo de absorción es 469 nm a ambas temperaturas. El espectro de **emisión** es afilado, asimétrico a la derecha y con un ligero hombro. El efecto a 70 °C únicamente conlleva un cambio de 2 nm en el máximo hacia el rojo y un ligerísimo levantamiento de la curva en el lado derecho.

Entre las variantes **verdes** encontramos dos tipos de perfiles de **absorción**. El primero corresponde con las proteínas sGFP, sM₁FP y sM₂FP. Estas tienen tres máximos de absorción (463, 469 y 483 nm). El segundo tipo es el correspondiente a las proteínas zafiro sS₁FP y sS₂FP. Estas tienen un espectro de absorción en el cual aparece una pequeña banda hacia los 400 nm y en el cual ya no aparecen tres máximos de absorción bien marcados. Estos han evolucionado hacia una forma más aguda y diferenciada del máximo a 503 nm y la conversión de los máximos a (469 nm y 483 nm) en pequeños hombros. A 70 °C ocurre una ligerísima caída de los 2 primeros máximos en el caso de la proteína parental y las monoméricas y una ligerísima bajada de la colina a 400 nm en el caso de las variantes zafiro siendo los cambios respecto a 30 °C prácticamente despreciables en todos los casos. Respecto al espectro de **emisión** que estas variantes muestran es más agudo y estrecho que el de sCFP, sE₁FP y sE₂FP. A este respecto, el perfil de emisión de las proteínas zafiro es aún más estrecho y agudo que el de sGFP, sS₁FP y sS₂FP. El valor al que se obtienen los máximos de emisión de estas variantes se desplaza ligeramente hacia el rojo (+4 nm, +2 nm, +5 nm, +2 nm, +1 nm respectivamente para sGFP, sM₁FP, sM₂FP, sS₁FP y sS₂FP). Sin embargo, de forma global, la desviación del espectro de emisión a 70 °C respecto al obtenido a 30 °C es despreciable.

El espectro de **absorción** de las proteínas **amarillas** corresponde en gran medida al obtenido con las variantes zafiro pero desplazado hacia el rojo y con la desaparición de la colina que aparecía en la primera región hacia el azul en aquellas. Las diferencias provocadas por el aumento de la temperatura sobre la forma global de estos espectros son prácticamente despreciables con desplazamientos de los máximos de absorción de -3 nm, 0 nm, -2 nm, 0 nm

y +2 nm para sPAFP, sYFP, sV₁FP, sV₂FP y sIFP respectivamente. Los espectros de **emisión** obtenidos constan de un único máximo que corresponde a un máximo de emisión bien definido. El aumento de la temperatura tiene un efecto despreciable sobre el espectro de emisión siendo los perfiles obtenidos a ambas temperaturas prácticamente superponibles con una desviación nula del máximo de emisión salvo en el caso de la variante sIFP que sufre un desplazamiento de +2 nm a 70 °C respecto a 30 °C.

Se puede destacar alguna observación basada en lo expuesto en los párrafos anteriores. Los espectros de sCGFP pueden considerarse una transición mixta entre el de los obtenidos con las cian/ceúleo y las verdes. Los espectros de las variantes zafiro pueden considerarse un perfil mixto entre el obtenido por sGFP y las amarillas. De forma global se percibe una tendencia al estrechamiento y mayor definición de los máximos de absorción y emisión y una convergencia de los mismos a medida que las propiedades espectrales se desplazan hacia el rojo.

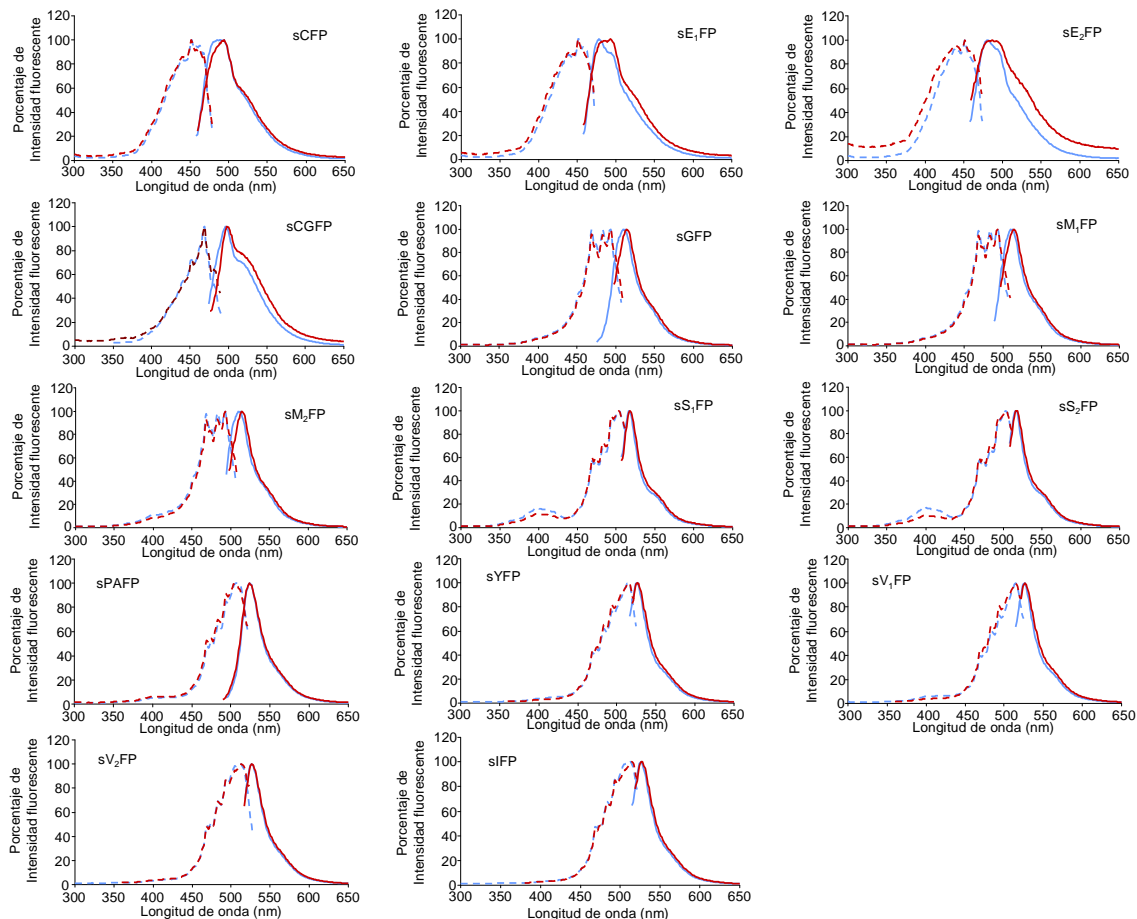


Figura 4.3: Espectros de absorción y emisión. Se muestran los espectros de absorción, en forma de línea de trazo discontinuo, y emisión, líneas de trazo continuo, de las proteínas purificadas en este trabajo. Los valores de intensidad de fluorescencia absorbida o emitida que se muestran son relativos en forma de porcentaje respecto al máximo de cada caso. El color azul corresponde a los espectros obtenidos a 30 °C y el rojo al de los obtenidos a 70 °C.

4.1.4. Termoestabilidad

4.1.4.1. Variación de la intensidad de emisión fluorescente frente al aumento de temperatura.

Se midió la variación de intensidad de fluorescencia frente al aumento de temperatura en las mismas condiciones para cada proteína y por triplicado. La representación del promedio de dichos valores refleja unas cinéticas de desactivación que se pueden agrupar según la similitud de las propiedades espectrales de las variantes analizadas (figura 4.4). Por otro lado, desvelan diferencias de termoestabilidad respecto a la proteína parental sGFP.

En el perfil de desactivación de las **variantes amarillas** se distinguen dos fases (figura 4.4a). La *fase I*, desde los 30 °C hasta 80 °C, 85 °C y cerca de 90 °C para sPAFP, sV₂FP y sIFP respectivamente. En ella se conserva casi toda la capacidad de emitir fluorescencia. Seguidamente, la *fase II* continúa hasta 88 °C, 90 °C y 95 °C respectivamente con sPAFP, sV₂FP y sIFP, temperaturas a las que la intensidad de fluorescencia es de 0%.

En el caso de las **proteínas verdes** (figura 4.4b), la *fase I* abarca desde 30 °C a 80 °C en sS₁FP y sS₂FP y hasta los 85 °C en sM₁FP y sM₂FP. En ella disminuye paulatinamente la intensidad de fluorescencia. Sigue la *fase II* hasta los 90 °C donde la intensidad de fluorescencia es 0%. En ella la fluorescencia disminuye cada vez más rápido con la temperatura, un hecho reflejado por una acentuación de la pendiente en este último tramo.

El perfil de la **proteína sCGFP** se divide en tres fases. En la *fase I*, que llega hasta 36 °C apenas cambia la intensidad de fluorescencia. En la *fase II*, que abarca desde 36 °C hasta 78 °C, la intensidad de fluorescencia registrada disminuye. La tercera fase, *fase III*, abarca la caída en la intensidad de fluorescencia de 78 °C hasta 85 °C, donde la fluorescencia es de 0%.

El perfil del grupo de **proteínas azules** consta de una primera fase, *fase I*, que comprende desde 30 °C a 75 °C aproximadamente. La segunda fase, *fase II*, en el caso de la variante sCFP comprendería el tramo desde 75 °C hasta alcanzar 80 °C, temperatura a la que la intensidad de fluorescencia registrada toma el valor cero y en el caso de sE₁FP y sE₂FP esta fase comprendería desde los 75 °C hasta los 85 °C.

Sobre la base de lo expuesto en los cuatro párrafos anteriores, podemos destacar que las curvas de termoestabilidad adquieren una **complejidad** mayor a medida que los máximos de las propiedades espectrales de absorción y emisión se desplazan hacia una longitud de onda más corta. En relación a la cinética de desactivación podemos clasificar las curvas obtenidas según una **desactivación monofásica** en el caso de las amarillas o **desactivación bifásica** en el caso de las verdes, sCGFP, sCFP, sE₁FP y sE₂FP.

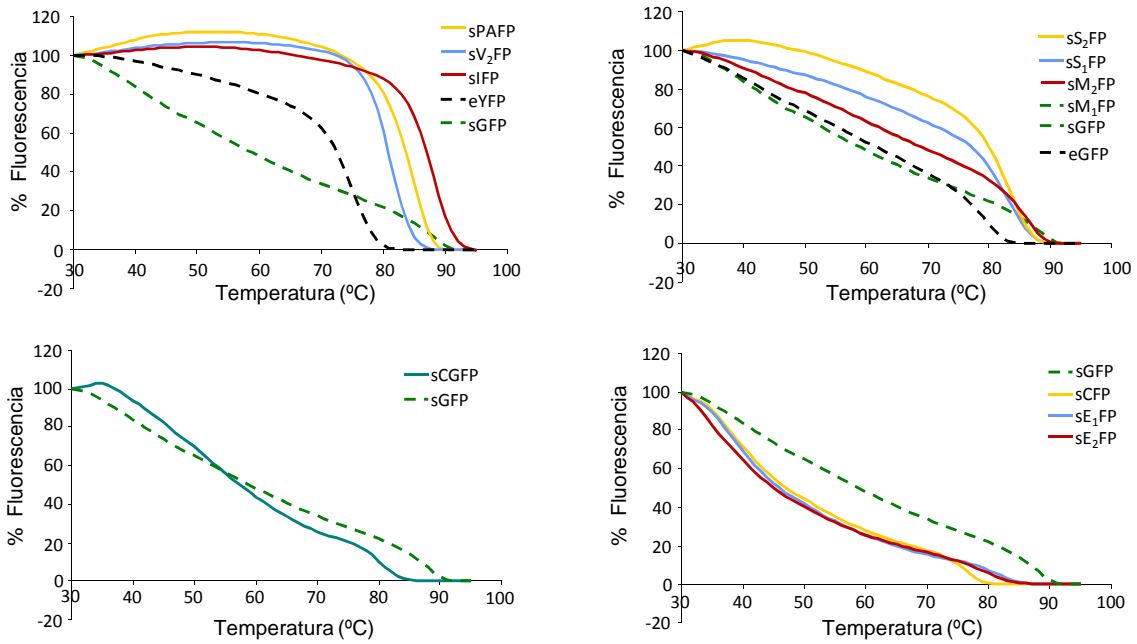


Figura 4.4. Resultado de los ensayos de termoestabilidad basados en fluorescencia. Cada mutante se expuso a un gradiente positivo de temperatura de 30 °C a 95 °C a una velocidad de 1 °C·min⁻¹.

4.1.4.2. Grado de recuperación de la emisión fluorescente

Como continuación al experimento que rindió los resultados del apartado anterior, se obtuvieron las curvas de recuperación de la fluorescencia para cada una de las variantes. Esto se consiguió en cada caso exponiendo la fracción de proteína sometida al gradiente de temperatura descrito en el apartado anterior, a una temperatura estable de 30 °C. La figura 4.5 recoge el perfil obtenido con cada una de las tres proteínas cuyo porcentaje de fluorescencia recuperado fue mayor al logrado por la proteína parental. Destaca el caso de la variante termoestable sS₂FP en el que dicho valor supera el 80%, esto es el doble del conseguido por la variante parental, sGFP, siendo ambas proteínas de color verde.

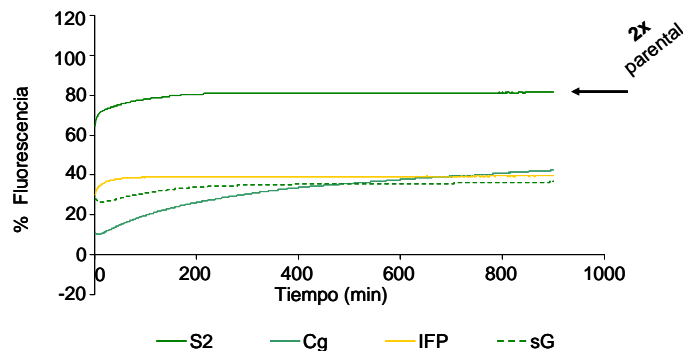


Figura 4.5. Gráfica de recuperación de la fluorescencia. Se muestra la recuperación tras el ensayo de termoestabilidad.

4. RESULTADOS

Atendiendo al perfil de recuperación se distingue un aumento más rápido en el caso de las variantes verde y amarilla siendo la dinámica de recuperación de la variante azul-verdosa, sCGFP, más lenta y prolongada en el tiempo. Los porcentajes absolutos de recuperación se recogen en la tabla 4.3 y corresponden al final del experimento. Estos se obtuvieron tras promediar los datos de tres replicas con cada proteína.

Tabla 4.3. Porcentajes de fluorescencia al final del experimento de recuperación a 30 °C

Variante	Fluorescencia recuperada (%)
sE ₁ FP	17,2
sE ₂ FP	26,5
sCGFP	42,3
sGFP	36,5
sM ₁ FP	34,5
sM ₂ FP	36,2
sS ₁ FP	12,2
sS ₂ FP	81,4
sPAFP	0,9
sYFP	0,7
sV ₂ FP	19,6
sIFP	39,5

4.1.4.3. Desactivación térmica a 80 °C

La incubación de una fracción de cada proteína a 80 °C desveló que la desactivación a lo largo del tiempo de las variantes en estudio sigue un modelo exponencial de dos fases. La figura 4.6, donde se representa el comportamiento de dos variantes estudiadas en este trabajo, desvela una tolerancia mayor por parte de sIFP que la parental sGFP. Estas diferencias de termoestabilidad a 80 °C son congruentes con los valores de T_m^f obtenidos con ambas proteínas. En este caso, la fracción de solución con sIFP tarda unas cinco veces más en perder el 50% de su intensidad de fluorescencia frente al caso de sGFP. En concreto, sGFP pierde la mitad de su intensidad de fluorescencia inicial a los 14 minutos, tiempo en el que sIFP todavía conserva el 85% de su fluorescencia inicial. La intensidad de fluorescencia de la variante sIFP no desciende hasta el 50% de su valor inicial hasta pasados 75 min.

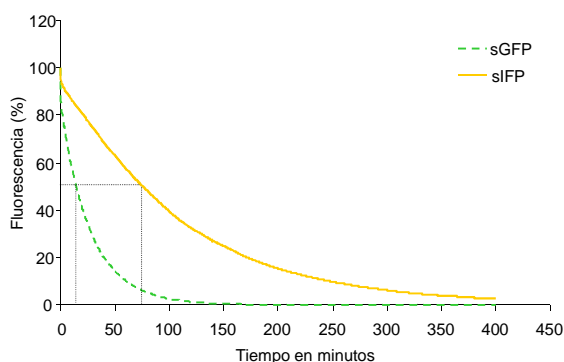


Figura 4.6. Comparación de la desactivación térmica a 80 °C de sIFP y sGFP.

4.1.4.4. Resistencia a ciclos intermitentes de 95 °C y 30 °C

La respuesta a los ciclos de calentamiento y enfriamiento intermitente a 95 °C y 30 °C fue distinto para las distintas variantes estudiadas. La figura 4.7 muestra un ejemplo en el que sS₂FP recupera un 20 % más de la fluorescencia inicial que lo que lo hace sGFP. De manera que sS₂FP tarda más ciclos en perder la mitad de la fluorescencia inicial.

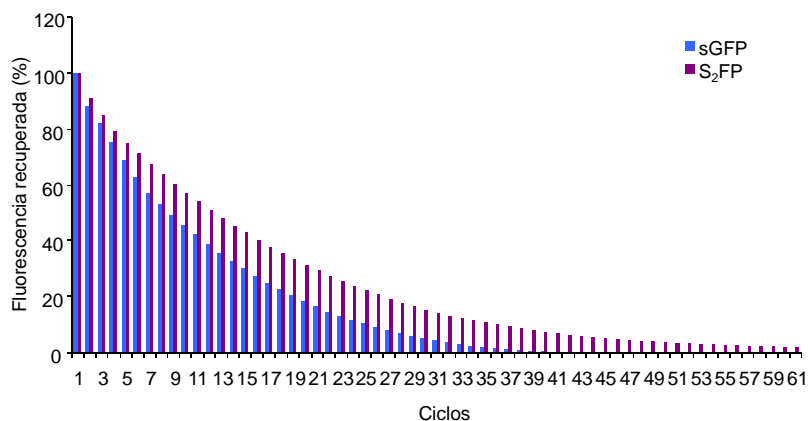


Figura 4.7. Ciclos frío/calor. Intensidad de fluorescencia emitida que muestran las variantes termoestables de proteína fluorescente sGFP y sS₂FP frente a los ciclos intermitentes de calentamiento a 95 °C y enfriamiento a 30 °C.

4.1.4.5. Valoración de la termoestabilidad mediante dicroísmo circular

Cuando la luz polarizada circularmente pasa a través de un medio circularmente dicroico, la diferencia en el grado de absorción de las dos componentes circulares modifica los radios de los círculos trazados por los vectores eléctricos que la definen. La combinación de estas dos ondas opuestas polarizadas circularmente da lugar a luz polarizada elípticamente. Cuando los vectores eléctricos de las dos componentes circulares van en el mismo sentido, la suma de sus magnitudes es el eje mayor de la elipse, mientras que cuando van en sentidos opuestos la resta de sus magnitudes nos da el valor del eje menor de la elipse. La relación entre ambos ejes es la tangente de un ángulo θ al que se denomina elipticidad. El carácter quiral de las proteínas, hace que su interacción con la luz polarizada circularmente hacia la derecha o hacia la izquierda sea distinta (Neumann y Snatzke, 1990). En la región del ultravioleta cercano (250-350 nm), los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de Trp, Tyr, y Phe. Gracias a que la asimetría en estos grupos se debe exclusivamente a su entorno y a que estos residuos se encuentran distribuidos en toda la proteína, estos espectros son un reflejo de la conformación global de la proteína. Las señales en esta región son muy sensibles a los cambios en la conformación (Fasman, 1996).

Como resultado de nuestro trabajo se obtuvieron por un lado los espectros de elipticidad molar, $[\theta]$, para las variantes sE₂FP, sGFP y sYFP (figura 4.8). Los resultados muestran que existen diferencias en los espectros obtenidos, de modo que puede asignarse un

4. RESULTADOS

tipo de espectro a cada proteína en función del cromóforo que contenga. La longitud de onda a la cual $[\theta]$ es máxima, próximo a 280 nm, es aproximadamente el mismo en las tres variantes. Sin embargo, existen diferencias en los valores mínimos locales de $[\theta]$ según se trate de un cromóforo tipo indol (sE₂FP), un cromóforo predominantemente tipo anión fenolato (sGFP) o un cromóforo tipo anión fenolato con sistema de electrones π apilados (sYFP). En concreto, los mínimos locales a longitudes de onda de 441 nm, 492 nm y 404 nm corresponden al efecto predominante por parte del cromóforo en sE₂FP, sGFP y sYFP respectivamente.

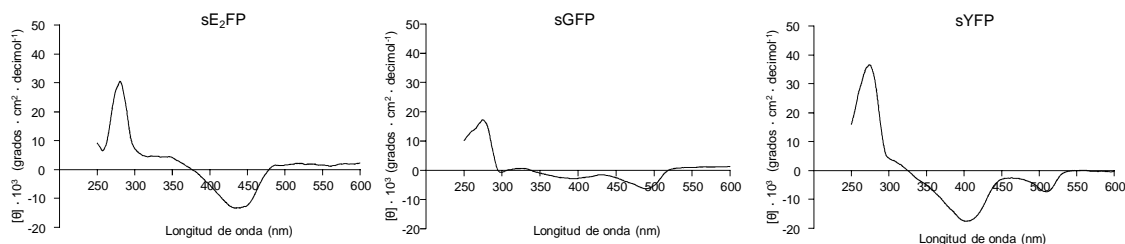


Figura 4.8. Espectros de elipticidad molar. Se muestra el valor de la elipticidad molar, $[\theta]$, en función de la longitud de onda del haz de luz incidente en cada una de las tres variantes de proteína fluorescente termoestable. Los espectros se corrigieron con respecto a un blanco de tampón fosfato 50 mM pH 7.5

Por otro lado, la variación en la elipticidad original de un haz de luz polarizada (con una longitud de onda mayor que 250 nm) que atraviesa una solución salina en la que se encuentra disuelta una variante de proteína fluorescente termoestable, refleja su grado de asimetría. La variación en el grado de asimetría en función de la temperatura refleja los cambios conformacionales de la proteína desde su estado nativo hacia su estado totalmente desnaturado (figura 4.8). En nuestro trabajo, se obtuvieron dos perfiles con cada proteína, uno corresponde a la pérdida de asimetría por parte de la proteína de forma global, con valores de θ predominantemente positivos, y otro, que corresponde a la pérdida de asimetría por parte del cromóforo, con valores de θ predominantemente negativos (figura 4.9).

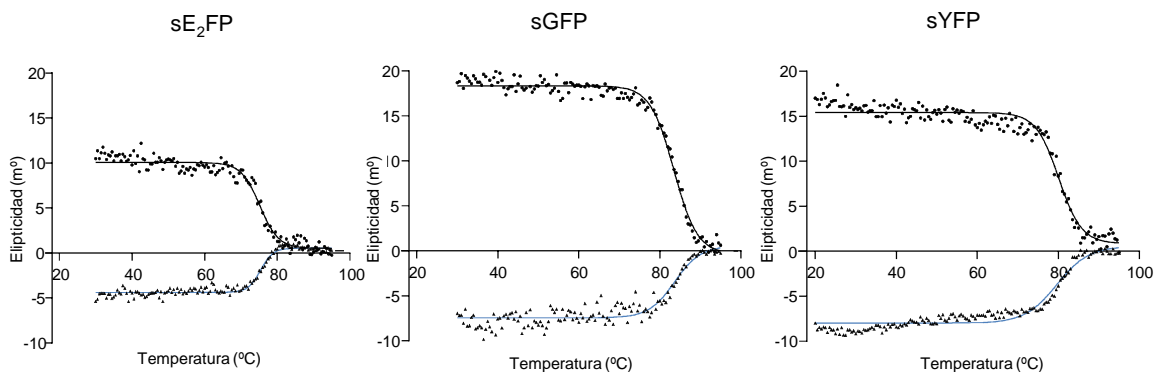


Figura 4.9. Estimación de termoestabilidad basada en dicroísmo circular. Se muestran los resultados de la elipticidad frente al aumento de temperatura en tres variantes termoestables, con cromóforos de distinto tipo, obtenidas en este trabajo. En cada caso, los puntos, a los que se ajusta la curva de color negro, corresponden con la elipticidad debida al barril- β y los triángulos, a los que se ajusta una curva azul, corresponden con la elipticidad debida al cromóforo.

Como resultado se aprecia que la elipticidad a la longitud de onda de mayor absorbancia por parte del cromóforo sigue una cinética similar a la de la estructura global de la proteína a la que pertenece. Este hecho se pone de manifiesto por el aspecto casi especular que adopta la representación de la variación de la elipticidad con ambas longitudes de onda a la vez frente al aumento de temperatura (figura 4.9).

Los datos de variación de θ con la temperatura sirvieron para estimar la temperatura de fusión T_m^{CD} . Estos datos basados en dicroísmo circular revelan que los valores de T_m^{CD} del cromóforo y la estructura global de la proteína son casi iguales (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Temperatura de fusión basada en dicroísmo circular (T_m^{CD}).

Proteína	T_m^{CD} (°C)	
	Estructura de β -can	Cromóforo
sE ₂ FP	75,5	76
sGFP	84	84
sYFP	81	80,5

4.1.5. Diferencias en el rendimiento cuántico

La emisión fluorescente toma un valor de intensidad F directamente proporcional a la potencia del haz de excitación absorbido por la muestra en una cubeta de cuarzo. La ley que describe este hecho se resume en la ecuación $F = K' \cdot (P_0 - P)$. La potencia del haz incidente en la solución se representa por P_0 , siendo P la potencia del haz después de recorrer una distancia b a través del medio. K' es una constante que depende de la eficacia cuántica del proceso fluorescente. Escribiendo la ley de Beer de la forma $P/P_0 = 10^{-\epsilon bc}$ podemos obtener la absorbancia, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ siendo ϵ la absorptividad molar de las moléculas fluorescentes. Sustituyendo en la primera ecuación obtenemos que $F = K' \cdot P_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon bc})$. Es posible, mediante operaciones matemáticas, convertir esta ecuación en $F = 2,3 \cdot K' \cdot \epsilon \cdot b \cdot c \cdot P_0$ cometiendo un error despreciable. Si consideramos la potencia del haz inicial P_0 constante podremos representarla de la forma $F = K \cdot c$. Si la concentración, c , de las especies emisoras es suficientemente baja para que la absorbancia sea menor de 0,05, la representación de la variación de potencia fluorescente emitida por la especie fluorescente en función de su concentración en la solución, será una recta. Esto permite usar el valor de la pendiente de las rectas obtenidas con las distintas proteínas fluorescentes para comparar su **rendimiento cuántico de fluorescencia** (ϕ_f), siendo $\phi_f = (\text{número de moléculas que emiten fluorescencia})/(\text{número de moléculas excitadas})$. En ausencia de los efectos de *autoamortiguación* y *autoabsorción* los datos obtenidos se ajustan muy bien a una recta.

4. RESULTADOS

Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, se obtuvieron las rectas de ajuste a las intensidades de fluorescencia en función de la concentración con las que se estimaron, mediante sus pendientes, los valores de \square_f con cada una de las proteínas fluorescentes termoestables de nuestro trabajo. En la figura 4.10 se representan las rectas obtenidas con las variantes sE₂FP, sGFP y sYFP. En comparación a la proteína parental, sGFP, se observa un mayor \square_f en la variante sYFP a 30 °C y a 70 °C reflejado por su mayor pendiente. Ocurre lo contrario con sE₁FP que estudiada en ambas condiciones da lugar a una pendiente menor que la de sGFP.

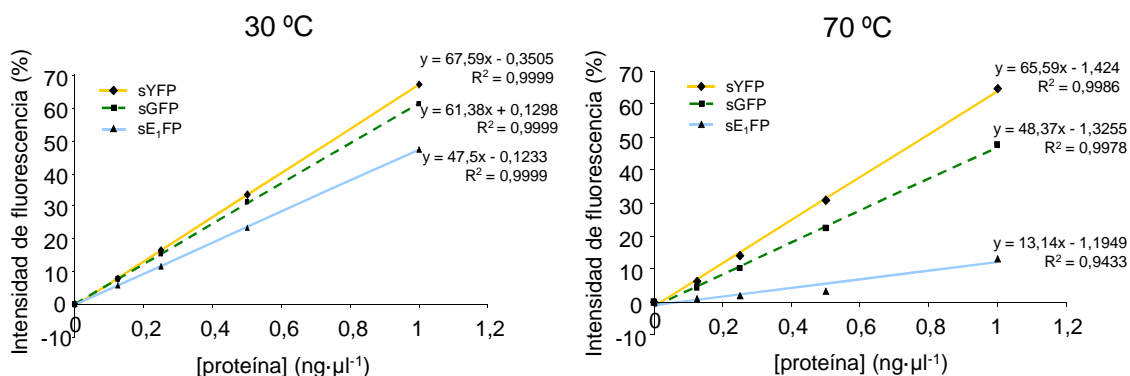


Figura 4.10. Rendimiento cuántico. Representación gráfica de las rectas empleadas para su estimación en el caso de las variantes de proteína fluorescente termoestable sE₂FP, sGFP y sYFP obtenidas en nuestro trabajo.

Los resultados de la estimación de \square_f con cada una de las proteínas fluorescentes termoestables obtenidas en nuestro trabajo se recogen en la tabla 4.5. Estos resultados se obtuvieron con cada proteína a dos temperaturas distintas: a 30 °C y a 70 °C.

Tabla 4.5. Valores de rendimiento cuántico de fluorescencia (\square_f)

Variante	\square_f a 30 °C	\square_f a 70 °C
sCFP	0,545	0,415
sE ₁ FP	0,475	0,131
sE ₂ FP	0,532	0,297
sCGFP	0,555	0,388
sM ₁ FP	0,575	0,482
sM ₂ FP	0,600	0,536
sS ₁ FP	0,542	0,579
sS ₂ FP	0,564	0,587
sGFP	0,614	0,484
sPAFP	0,583	0,560
sV ₁ FP	0,667	0,610
sV ₂ FP	0,611	0,596
sYFP	0,676	0,656
sIFP	0,576	0,592

4.1.6. Expresión de variantes de sGFP en *Thermus thermophilus* HB27

Cada variante génica que codifica una de las 14 proteínas obtenidas como resultado de este trabajo (apartado 4.1) se clonó en el vector bifuncional *pMHPnqo* y se construyeron derivados equivalentes en el vector bifuncional *pMKPnqo* portadores de las variantes *se₁fp*, *se₂fp*, *sv₁fp*, *sv₂fp* y *sifp*. Cada una de estas construcciones se usó para transformar *T. thermophilus* HB27, cepa en la que cada gen derivado de *sgfp* se expresó bajo el control del promotor *Pnqo*. Se estimó, sobre la base de los resultados obtenidos mediante *Western blot* (figura 4.11.a), que el máximo de producción de las proteínas codificadas por dichos genes ocurre cuando el cultivo alcanza una DO_{550} igual a 0,2. Por lo tanto, se verificó la producción de todos los derivados de sGFP cuando los cultivos de los transformantes de interés en cada caso alcanzaron una DO_{550} igual a 0,2. El resultado de su análisis mediante *Western blot* revela buenos niveles de producción en todos los casos (figura 4.11.b, 4.11.c y 4.11.d).

El análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia permitió verificar la funcionalidad de todas las variantes proteicas *in vivo*. En la figura 4.11 pueden encontrarse los resultados de la técnica de *Western blot* citados anteriormente y las fotografías capturadas en la observación al microscopio. Estas revelan la ausencia de efectos tales como la formación de cuerpos de inclusión, la degradación de la proteína de interés, la anulación de su actividad o cualquier otro fenotipo que denote algún deterioro en la funcionalidad *in vivo* de las proteínas heterólogas expresadas.

4. RESULTADOS

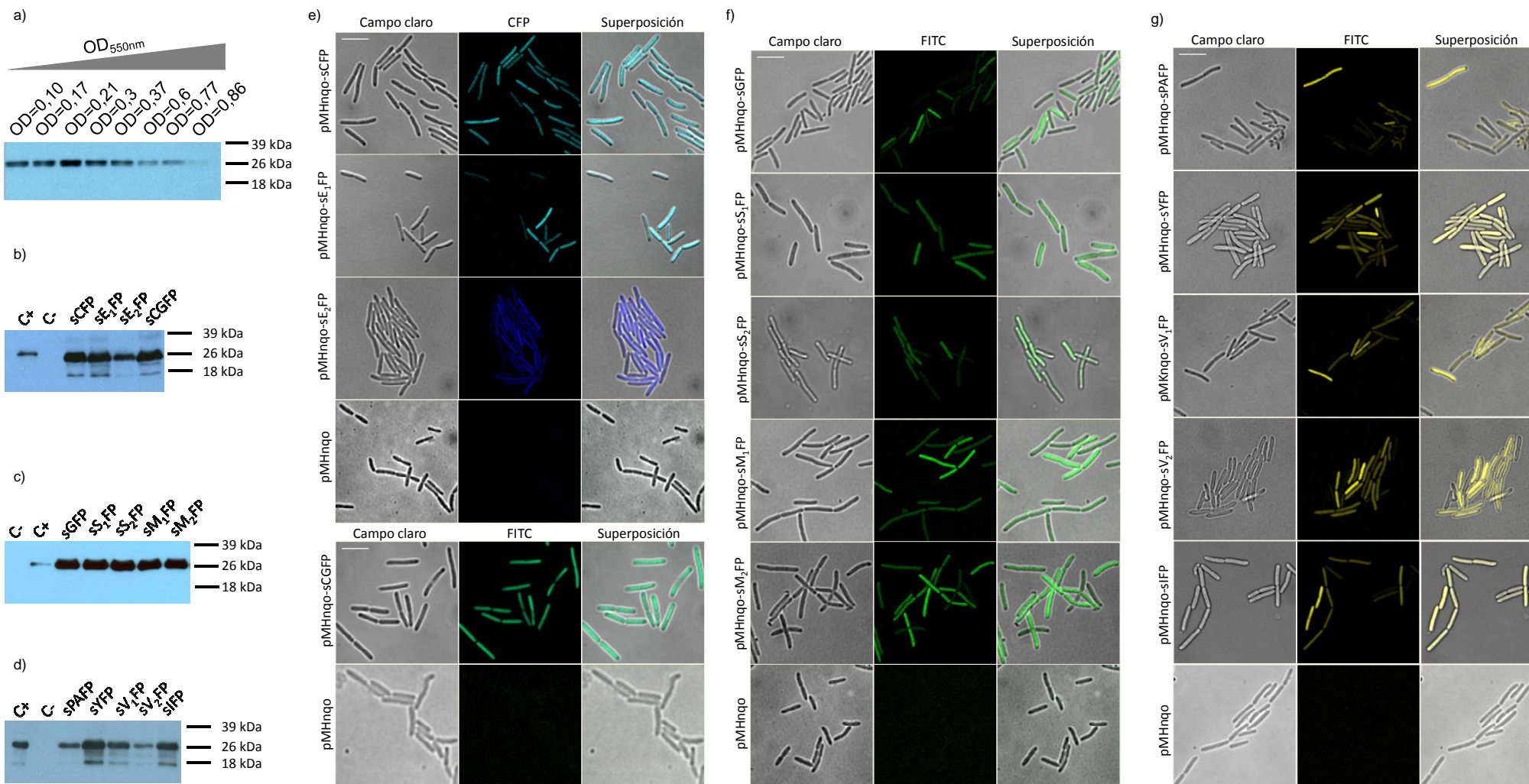


Figura 4.11. Expresión de mutantes de *sgfp* en *T. thermophilus* HB27. (a) variación del nivel de producción de sIFP, modulada por la acción sobre el promotor *Pnqo* y puesta de manifiesto por la variación de intensidad de revelado, en función de la fase de crecimiento del cultivo (medida mediante la OD₅₅₀); (b-d), resultado de *Western blot* de la expresión de cada una de las variantes de proteína fluorescente termoestable en los cultivos a OD₅₅₀=0,2, empleados para microscopía. Se muestran las imágenes de microscopía confocal de cada uno de los transformantes que expresan una variante de proteína fluorescente termoestable obtenida y clonada bajo el control de *Pnqo* (a, b y c). Para cada uno de los campos al microscopio confocal, se muestra, de izquierda a derecha, la imagen obtenida con el canal de fluorescencia correspondiente según el caso, la imagen de campo claro y la superposición de la fluorescencia y campo claro. La barra de escala es común para toda la serie y corresponde a 5µm.

Además de comprobarse la expresión de cada variante con *Western blot* y mediante microscopía confocal, se quiso conocer, dada la heterogénea intensidad de fluorescencia obtenida entre las distintas bacterias de un mismo campo, la distribución del porcentaje de células de cada población según la intensidad de fluorescencia que emiten. Para ello se utilizó un citómetro de flujo *BD FACSCanto II* (Becton Dickinson), registrándose el número de eventos y la intensidad de fluorescencia que emite cada célula. Los resultados obtenidos con las variantes sE₁FP, sGFP y sIFP se indican en la figura 4.12. Su interpretación revela que la distribución poblacional es simétrica con las cepas que expresan sE₁FP o sIFP mientras en las poblaciones que expresan la variante sGFP existe una ligera asimetría hacia valores más bajos de intensidad de fluorescencia. De los tres tipos de cultivo, los mayores valores de intensidad de fluorescencia media poblacional se registraron en los que expresan sIFP y los mínimos con la variante sE₁FP.

El grado de solapamiento de la población que adquiere fluorescencia respecto a la población control en cada uno de los canales es máximo en cultivos que expresan sE₁FP, moderado en los que expresan sGFP y mínimo en los que expresan sIFP. Como resultado de esto, los porcentajes de eventos considerados como positivos, es decir, con una fluorescencia claramente distinguible de la que correspondería a la población control (en nuestro caso, cualquier célula con una intensidad de fluorescencia mayor que la del 99,9 % menos intenso que da la población control negativo), es el 15,5 % de la población que expresa sE₁FP, 75,9 % de la población que expresa sGFP y el 99,1 % de la población que expresa sIFP. De estos tres casos, las poblaciones que expresan sIFP son las que mejor se distinguen de la población utilizada como control negativo (figura 4.12).

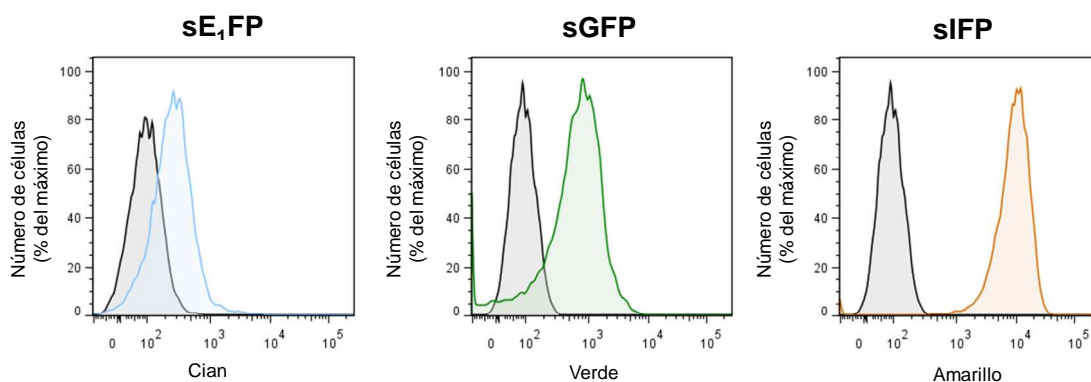


Figura 4.12. Caracterización poblacional mediante citometría de flujo. Se expone cada una de las distribuciones poblacionales de cepas que expresan sE₁FP, sGFP o sIFP, representadas como porcentaje de células que muestran una determinada intensidad de fluorescencia en el canal para color cian, verde o amarillo respectivamente. En las tres gráficas la distribución delimitada por una línea de color negro es del cultivo control negativo (*T. thermophilus* HB27 con vector que no expresa proteína fluorescente) en cada uno de los canales.

4.1.7. Estudio de microorganismos termófilos mediante la segmentación por colores

Una vez comprobada la expresión funcional de las distintas variantes de proteína fluorescente por separado, se quiso comprobar la viabilidad de su uso de forma combinada para su estudio mediante microscopía confocal de fluorescencia. La primera prueba consistió en visualizar y distinguir en un mismo campo, células que expresan una variedad de proteína fluorescente termoestable de un color frente a otras que expresan otra variedad de un color distinto (figura 4.13). Por otro lado, se pudo distinguir la expresión de dos variantes de proteínas fluorescentes termoestables de colores distintos *in vivo* de forma simultánea en la misma célula. En concreto se comprobó la expresión simultánea de la variante termoestable de cerulean (sE₁FP) y la variante termoestable de Citrine (sIFP) en un caso y la expresión simultánea de sE₁FP y sGFP en otro caso. Mediante estos tres experimentos pudo segmentarse la señal según el color producido y se distinguieron por partes tantos patrones como colores se utilizaron en cada caso (figura 4.13).

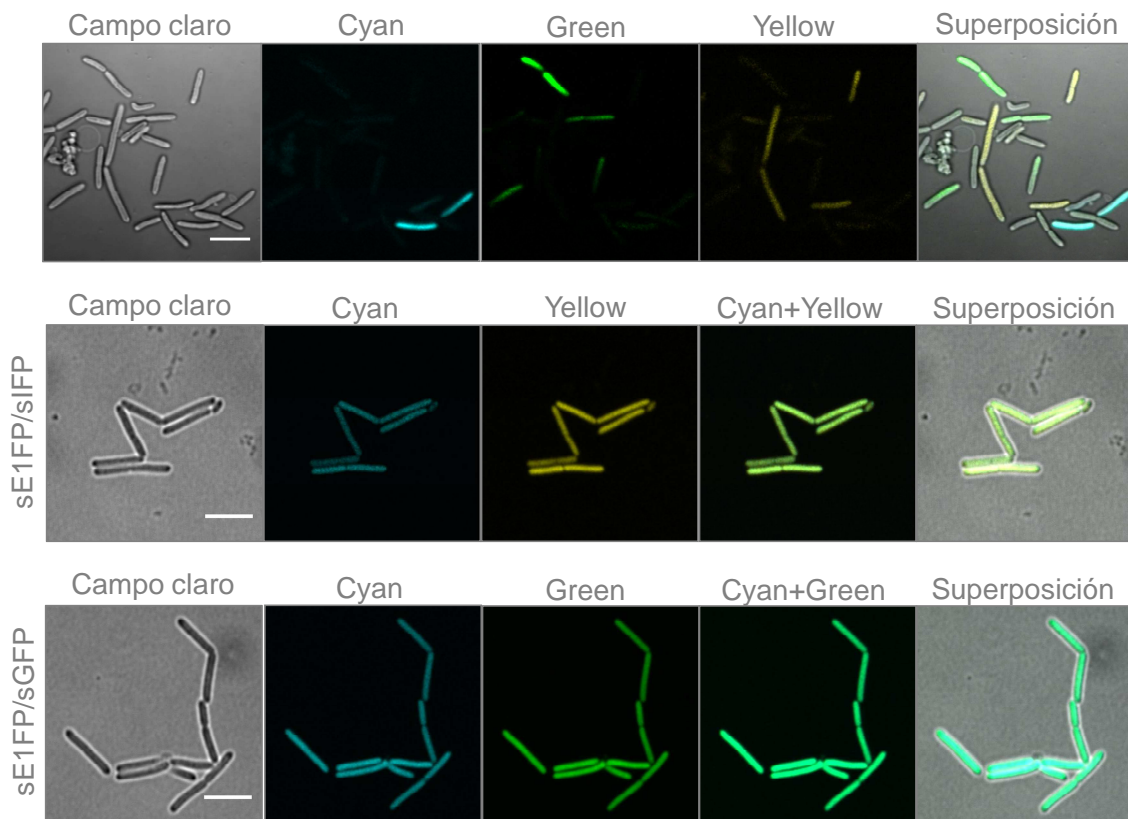


Figura 4.13. Imágenes de *T. thermophilus* adquiridas mediante microscopios confocales y segmentadas por colores. En las imágenes de la primera fila se muestra la segmentación de tres colores distintos en la adquisición de un único campo. En la segunda y tercera fila se muestra la segmentación en azul y amarillo en el primer caso y en azul y verde en el segundo caso. De izquierda a derecha en las tres filas se exponen la imagen de campo claro, cada uno de los canales utilizados y finalmente la superposición de todas las imágenes (en la primera fila) y en la segunda y tercera fila, además, la superposición primero de los dos canales y finalmente del campo claro y los dos canales fluorescentes. La barra de escala que aparece en la primera imagen de cada serie corresponde a 5 μm .

4.1.8. Localización *in vivo* de proteínas mediante su fusión a testigos termoestables

Se verificó la utilidad de proteínas fluorescentes termoestables como moléculas testigo para revelar la localización de proteínas de interés. Como modelo se utilizaron las proteínas asociadas a CRISPR que forman el “complejo Cas”, parte del sistema descubierto recientemente que constituye un mecanismo de defensa en el que el complejo Cas de proteínas, junto con determinadas regiones de DNA que actúan como guía, sirven para aportar una inmunidad adquirida por parte de las células frente a DNA exógeno (proveniente de virus, plásmidos conjugantes o elementos transponibles). Dado que pueden formar complejos en los que las proteínas interaccionan entre sí, su empleo como proteína de fusión a nuestros testigos termoestables cumplirá una doble función. Por un lado, servirá para validar la utilidad de las proteínas fluorescentes termoestables que hemos desarrollado como moléculas testigo para revelar su localización *in vivo*. Por otro lado, gracias a que las proteínas del complejo Cas son capaces de interaccionar entre sí de forma muy estrecha, servirán en un apartado posterior de nuestro trabajo para verificar la utilidad de nuestros testigos termoestables como pares FRET en la demostración de la interacción proteína-proteína *in vivo*.

En un primer paso, tras disponer de las construcciones necesarias a nivel de DNA, se comprobó la expresión de fusiones en *T. thermophilus* mediante *Western blot* (figura 4.14) y la funcionalidad de las moléculas testigo mediante microscopía confocal.

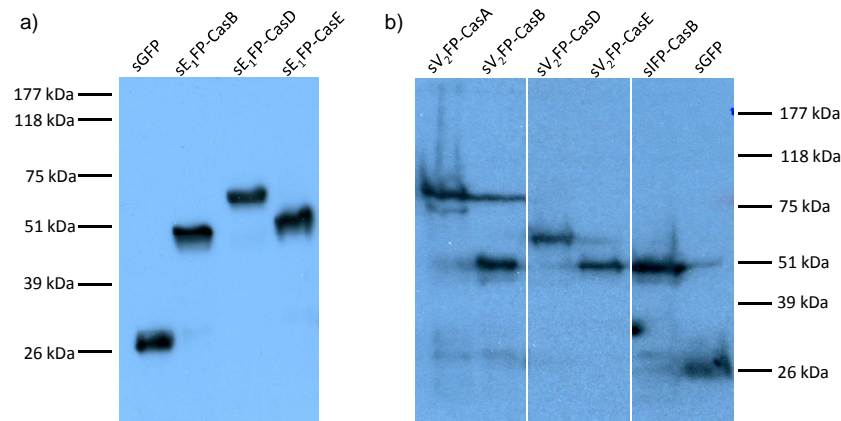


Figura 4.14. Evidencia de la expresión de fusiones a testigos termoestables. Se muestran los resultados de *Western blot* que ponen de manifiesto (a) la expresión de sE₁FP a CasB, CasD y CasE, y (b) la expresión de proteínas termoestables de la franja de emisión amarilla fusionadas a CasA, CasB, CasD y CasE.

Se comprobó si la proteína fluorescente elegida como testigo tenía algún efecto en el patrón de localización obtenido, expresando cada una de las fusiones *sv₂fp*, *sifp* y *se₂fp* a *casB* en *T. thermophilus*. Los resultados muestran que su utilidad *in vivo* es independiente de la proteína fluorescente empleada como testigo y que los patrones de localización de las fusiones se mantienen a pesar de las diferencias entre los testigos empleados (fig. 4.15).

4. RESULTADOS

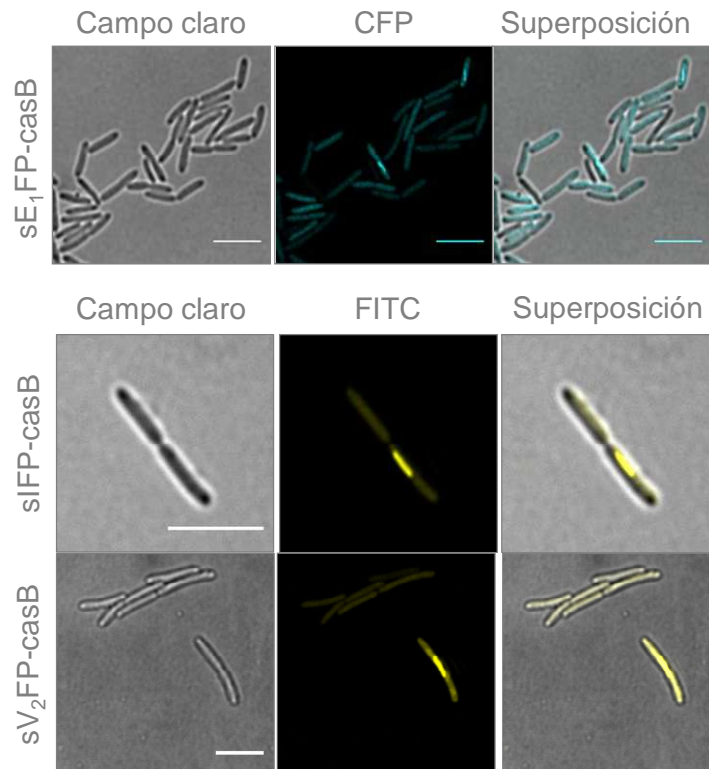


Figura 4.15. Localización de CasB mediante su unión a sE₁FP, sIFP y sV₂FP en cada caso. Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

Por otro lado, la expresión de fusiones de *sv₂fp* o *sifp* a *casA*, *casB*, *casD* y *casE* permitió conocer la localización de cada una de ellas en la bacteria. Esto se comprobó obteniendo los transformantes de *T. thermophilus* HB27 portadores de las fusiones de interés, que se inocularon en los respectivos cultivos hasta alcanzar una DO₅₅₀ igual a 0,2, confirmándose mediante *Western blot* (figura 4.14.b) y mediante la observación al microscopio confocal. Las fotografías capturadas en este último paso se muestran en la figura 4.16. Los patrones de localización obtenidos con cualquiera de las tres proteínas testigo empleadas mediante su fusión a CasB son similares, indicando que no existen diferencias respecto al uso de las distintas moléculas testigo para la localización de CasB

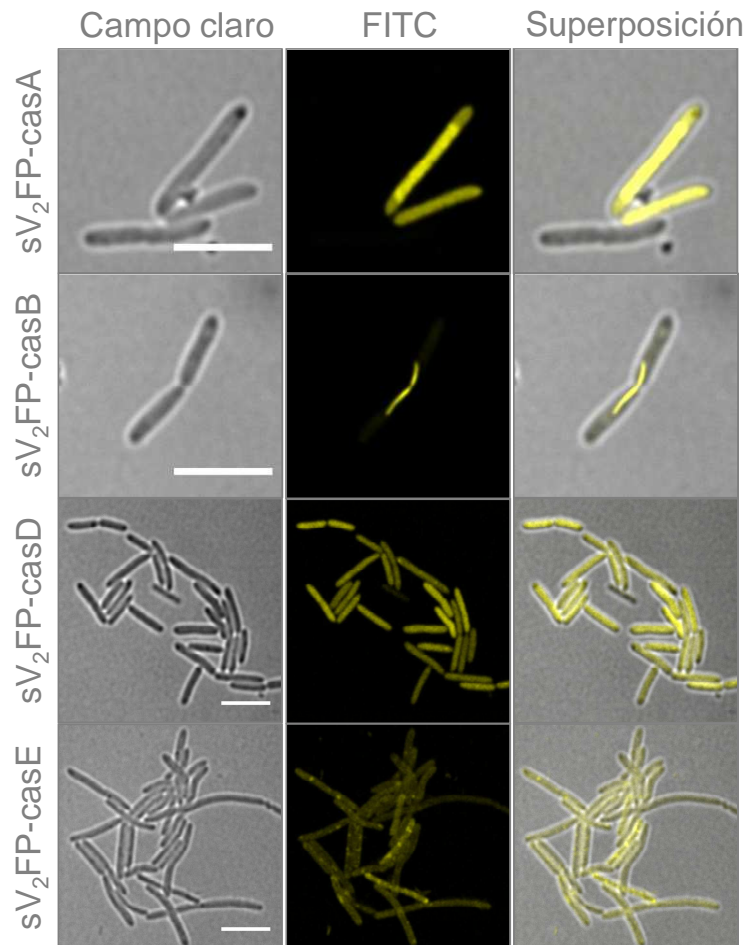


Figura 4.16. Localización de proteínas del complejo Cas. Imágenes de microscopía confocal a partir de preparaciones de distintos transformantes de *T. thermophilus* que producen en cada caso la fusión de una de las proteínas CasA, CasB, CasD o CasE a sV₂FP. La molécula testigo revela la ausencia de CasA en los polos de células alargadas, la presencia de CasB en la región donde se forma el septo, la localización difusa por todo el citoplasma en el caso de CasD y la presencia de casE próxima a la envoltura celular y en aglomeraciones puntuales de distribución variable. La barra de escala corresponde a 5 μ m.

La observación mediante microscopía confocal de fluorescencia reveló la localización de las proteínas fusionadas al testigo termoestable *in vivo* (figura 4.16). A partir del cultivo que expresó un testigo termoestable fusionado a **CasA** pudieron observarse dos fenotipos en función de la localización de la fluorescencia. Un fenotipo con fluorescencia homogénea y difusa y un fenotipo con fluorescencia ausente en los polos y presente en la zona media de la célula.

En el caso de testigos fusionados a **CasB** se observó la presencia de células con fluorescencia en puntos concretos (figura 4.17), bien a lo largo de la región media de la célula o en un único núcleo de fluorescencia intensa en un punto de localización variable.

4. RESULTADOS

Los transformantes que expresaron las fusiones a **CasD** mostraron un fenotipo con fluorescencia de localización difusa, homogénea por todo el citoplasma de la célula y en casi todas las células observadas. No se detectaron regiones concretas o puntos de mayor intensidad de fluorescencia en ninguna de estas bacterias (figura 4.16).

En el caso de los transformantes que expresaron el testigo fusionado a **CasE** los cultivos tardaron entre 4 y 6 horas más que el resto en alcanzar la DO_{550} igual a 0,2 habiéndose incubado en las mismas condiciones que las anteriores cepas. La observación inicial reveló una intensidad homogénea en las bacterias observadas y entre distintas bacterias del cultivo con una intensidad de fluorescencia notablemente más tenue que las anteriores cepas. Sin embargo, una observación más minuciosa reveló una localización más intensa en zonas próximas a la envoltura bacteriana y en pequeños cúmulos puntuales de distribución variable (figura 4.16).

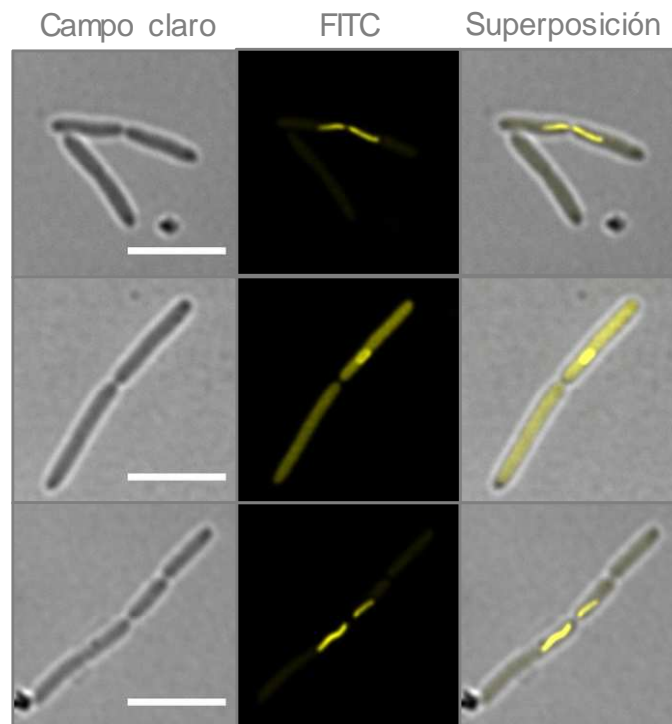


Figura 4.17. Seguimiento de la localización de casB *in vivo*. Se muestran los distintos fenotipos de localización de casB en *T. thermophilus* puestos de manifiesto mediante una proteína fluorescente como molécula testigo. La barra de escala corresponde a 5 μ m.

4.1.9. FRET

El espectro de emisión de las variantes termoestables azules y el de absorción de las amarillas se solapan (figura 4.18). Este hecho permite usar estas moléculas testigo para verificar la interacción proteína-proteína *in vivo* mediante métodos basados en la transferencia tipo FRET, en la que una proteína azul actúa de donador y una proteína amarilla actúa de aceptor de energía. La estrategia consiste en obtener fusiones de una proteína "A" a un testigo azul y una proteína "B" a un testigo amarillo. Si existe interacción entre "A" y "B" *in vivo*, la excitación de la proteína azul conlleva una transferencia parcial de energía con longitud de onda azul desde esta proteína a la proteína amarilla.

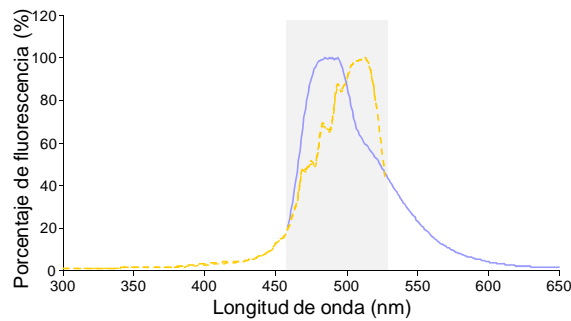


Figura 4.18. Solapamiento de espectros. Solapamiento del espectro de emisión de sCFP con el de absorción de sV₂FP

Existen distintos procedimientos para calcular la fracción de fluorescencia amarilla que corresponde a la transferencia mediante FRET. La existencia de señal FRET positiva es una prueba de la interacción *in vivo* entre las proteínas problema. En nuestro trabajo se abordaron los cálculos mediante dos procedimientos que se resumen en la figura 4.19.

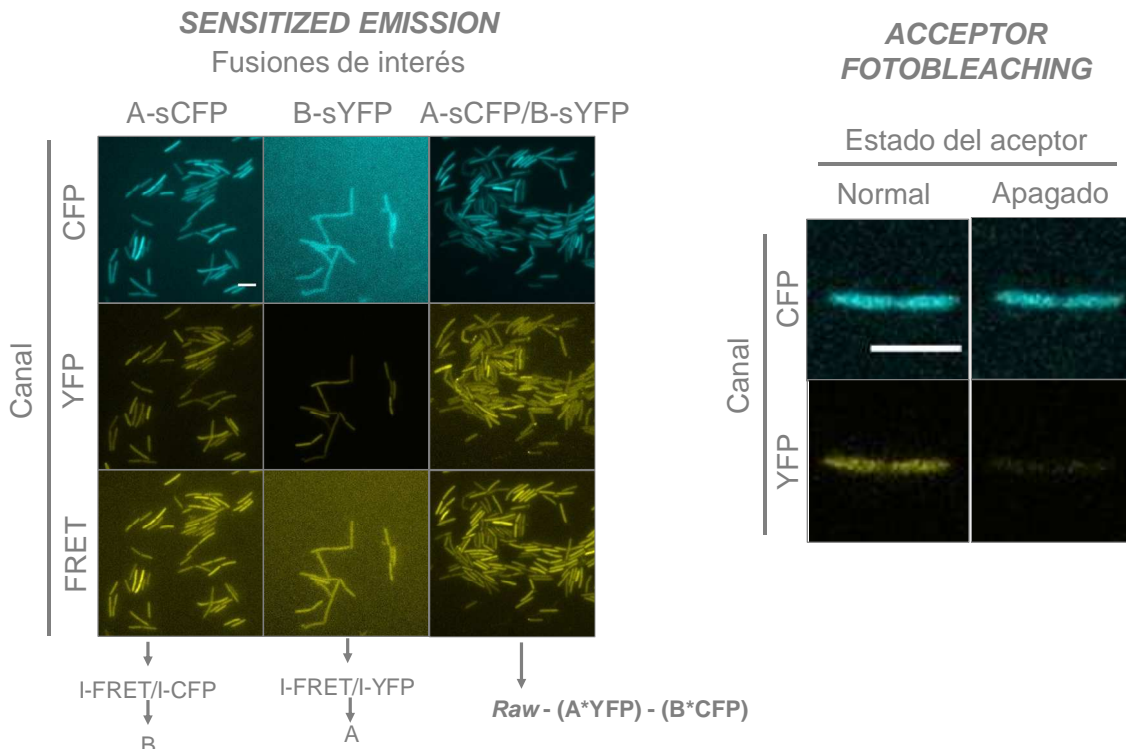


Figura 4.19. Señal FRET: métodos empleados. Métodos empleados en nuestro trabajo para el cálculo de la señal FRET. Las barras de escala corresponden a 5 μ m.

4.1.9.1. Prueba de la viabilidad del FRET en *T. thermophilus* HB27

La primera prueba llevada a cabo para la verificación de la existencia de FRET en *T. thermophilus* consistió en obtener combinaciones de una proteína fluorescente termoestable azul y una amarilla unidas mediante una región flexible de unión. El propósito de este experimento fue simular con certeza las condiciones de interacción entre proteínas exponiendo los pares a la proximidad necesaria para que tenga lugar el FRET. En concreto se optó por expresar cada una de las fusiones *sifp-se₁fp*, *se₁fp-sifp*, *se₁fp-sv₂fp* y *sv₂fp-se₁fp* que dieron lugar en cada caso a una proteína de fusión resultante de la unión de dos proteínas testigo mediante una región flexible. Se detectó una señal indicativa de FRET en la cepa que expresó *se₁fp-sifp* y en la cepa que expresó *sv₂fp-se₁fp* (figura 4.20).

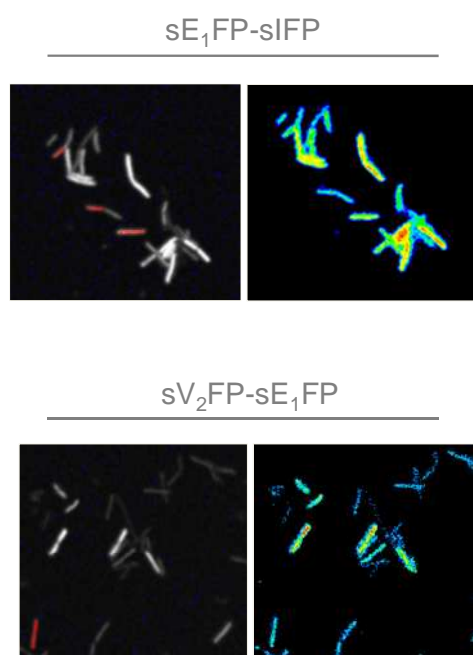


Figura 4.20. FRET con el modelo de unión donador-aceptor. Señal FRET obtenida al expresar en *T. thermophilus* las fusiones donador/aceptor indicadas en cada caso.

4.1.9.2. Modelos basados en FRET para detectar la interacción entre proteínas en *T. thermophilus*.

Tras quedar probado que puede existir FRET en *T. thermophilus*, según lo expuesto en el apartado anterior, se crearon modelos basados en FRET para detectar la posible interacción entre proteínas de interés. Estos modelos se basaron en expresar proteínas de fusión de variantes de proteínas fluorescentes termoestables a proteínas cuya interacción se ha descrito en la bibliografía, como son el sistema CRISPR-Cas (Bhaya *et al.*, 2011) y las proteínas implicadas en la quimiotaxis en *Thermotoga maritima* (Nguyen y Jonathan, 2010), o para la que existen fuertes indicios basados en resultados experimentales previos de nuestro laboratorio, como sería el caso del modelo de interacción DnrS-DnrT (Cava *et al.*, 2007).

a) Modelo de interacción entre elementos del Sistema CRISPR-Cas.

La interacción entre proteínas mediante la formación del “complejo Cas” está descrita y bien caracterizada a nivel estructural en el caso de microorganismos como *E. coli* (Jore *et al.*, 2011; van Duijn, *et al.*, 2012; Wiedenheft *et al.*, 2011). Se conoce la existencia de genes que codifican proteínas homólogas de este complejo tanto en *T. thermophilus* HB8 como en *T. thermophilus* HB27 (Haft *et al.*, 2005), habiéndose iniciado la caracterización de algunas de estas proteínas de *T. thermophilus* (Mulepati y Bailey, 2011).

En nuestro trabajo, estos genes fueron la base para crear un modelo de interacción entre homólogos a Cas presentes en *T. thermophilus* mediante la obtención de fusiones de proteínas fluorescentes termoestables con las proteínas CasA, CasB, CasD y CasE. Como resultado y, empleando *T. thermophilus* HB27 como hospedador, la expresión por separado de fusiones de las moléculas testigo termoestables a cada una de las proteínas CasA, CasB, CasD y CasE en *T. thermophilus* HB27 dio lugar a patrones como los descritos en el apartado 4.1.8. Sin embargo, en el caso de los experimentos para probar la interacción entre algún par de proteínas, no se detectó una señal FRET positiva en transformantes de *T. thermophilus* HB27 que expresan las fusiones a alguno de los pares donador/aceptor. En concreto, los pares comprobados fueron todas las combinaciones de cada uno de los donadores sE₁FP-CasB, sE₁FP-CasD y sE₁FP-CasE con cada uno de los aceptores sIFP-CasB, sV₂FP-CasA, sV₂FP-CasB, sV₂FP-CasD y sV₂FP-CasE expresados en transformantes de *T. thermophilus* HB27.

Los cultivos empleados para las pruebas de interacción en el modelo CRISPR-Cas se incubaron en las mismas condiciones. Sin embargo, fue difícil controlar los niveles de fluorescencia de donador y aceptor. Para indagar en las posibles causas de este fenómeno se comprobó el tamaño de los plásmidos introducidos en *T. thermophilus* HB27 mediante digestión con *NdeI* (figura 4.21). Como resultado, los tamaños de los productos de digestión, en muchos casos, no corresponden con el tamaño esperado. Al digerir plásmidos de dos tipos obtenidos de un único transformante suele aparecer, en contra de lo esperado, un único producto de digestión. Además, aparecen más bandas de lo esperado cuando se digieren plásmidos de cepas que sobreexpresan el gen *case* (figura 4.21).

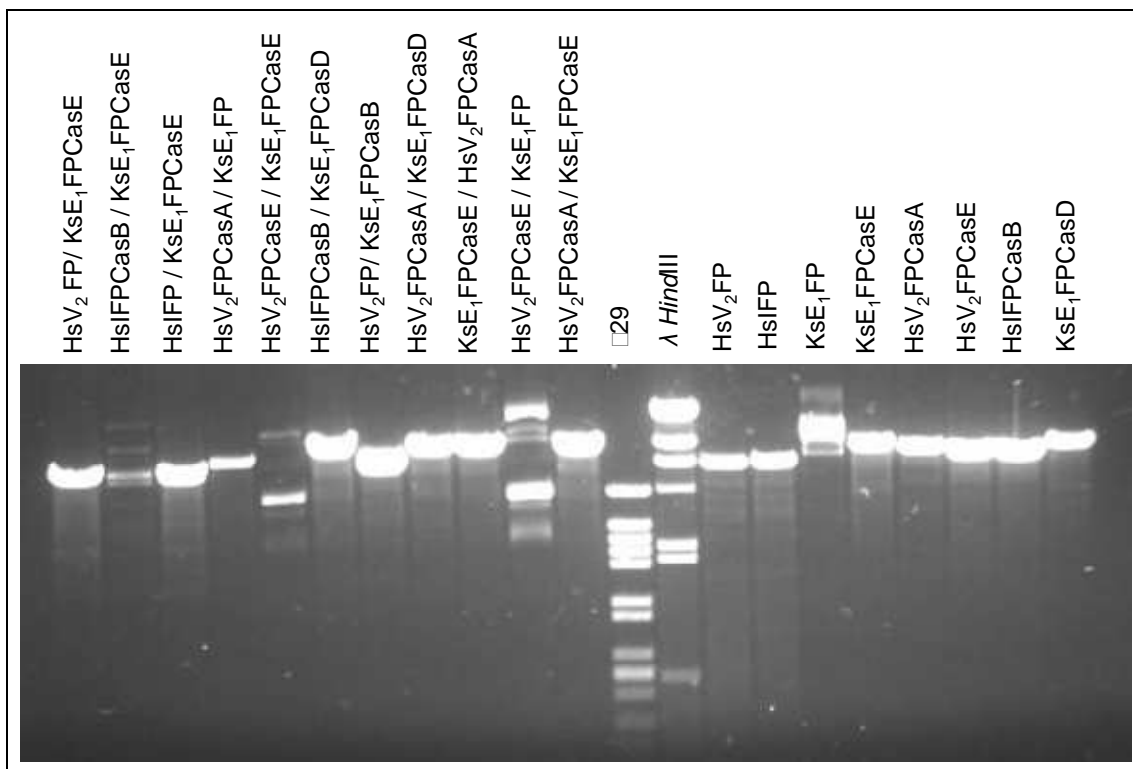


Figura 4.21. Verificación del tamaño de DNA de plásmidos a partir de algunas cepas empleadas para los experimentos de FRET. El DNA de plásmidos se obtuvo a partir de las cepas de *Thermus thermophilus* y fue digerido con *NdeI*.

b) Modelo de interacción entre DnrS y DnrT.

Las proteínas DnrS y DnrT son reguladores transcripcionales que participan en el control del metabolismo del nitrógeno por parte de *T. thermophilus*. DnrT no es sensible a O_2 , es necesaria para la transcripción de los operones *nar*, *nrc* y *dnr* y, a concentraciones altas, actúa como represor del promotor *Pnqo*. La proteína DnrS es sensible al O_2 y es necesaria para la transcripción de *nar* y *dnr* pero no para la transcripción de *nrc*. Ambos reguladores median la adaptación de cepas de *T. thermophilus* portadoras del elemento NCE al crecimiento en condiciones anaeróbicas. La interacción DnrT-DnrS fue probada en trabajos anteriores del laboratorio mediante ensayos basados en el “doble híbrido” bacteriano usando *E. coli* como hospedador, por lo que el modelo de interacción de DnrS-DnrT fue considerado un buen candidato para su confirmación mediante FRET.

El paso previo a la expresión simultánea de fusiones a pares aceptor-donador para las pruebas de FRET en *T. thermophilus* consistió en comprobar que cada una de las fusiones se expresase funcionalmente *in vivo*. Aunque se obtuvo cierto nivel de expresión, puesto de manifiesto en algunos casos mediante *Western blot* (figura 4.22), la intensidad de fluorescencia a la que dio lugar no fue detectable con el microscopio. La degradación sufrida por DnrS en condiciones aerobias fue un obstáculo para la viabilidad del modelo. Se intentó solucionar este hecho mediante la expresión de las fusiones en la cepa de *T. thermophilus* HB27 $\Delta TTC0746$. Esta es una cepa carente del gen que codifica una proteasa del tipo

“proteasa Lon-A bacteriana”. Se ha demostrado que su uso como hospedador mejora, respecto a *T. thermophilus* HB27, la producción de proteínas heterólogas provenientes de termófilos (Maehara *et al.*, 2008). Sin embargo, no se desveló ninguna mejora sustancial en la estabilidad de DnrS y los niveles de fluorescencia continuaron siendo insuficientes en todos los casos observados.

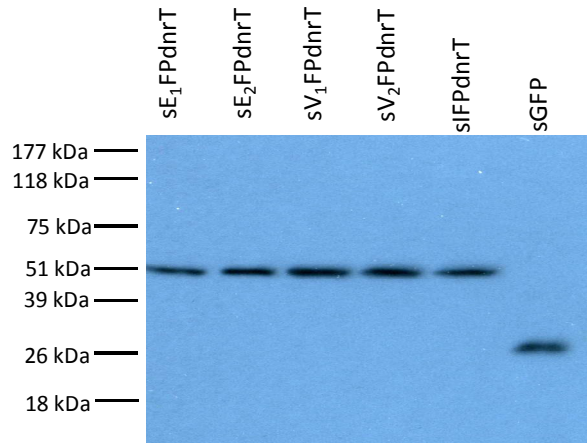


Figura 4.22. Seguimiento de la producción de fusiones a proteínas fluorescentes mediante *Western blot*. La expresión génica dependió del promotor *PslpA*.

c) Modelo de interacción entre proteínas implicadas en la quimiotaxis en *Thermotoga marítima*.

Las proteínas implicadas en la quimiotaxis de *Thermotoga marítima* son capaces de interaccionar entre sí incluso cuando son expresadas en *T. thermophilus*. Un trabajo basado en la complementación de la adenilato kinasa de *Thermotoga neapolitana* empleando *T. thermophilus* como hospedador, demostró la interacción de CheY con CheA^{p1p2}, que comprende los dominios p1 y p2 de dicha proteína (aminoácidos 1-264), la interacción de CheY con CheX y la homodimerización de CheX (Nguyen y Silber, 2010). Según nuestro modelo, se comprobó, mediante *Western blot*, que la producción de las fusiones de las proteínas CheY, CheX y CheA^{p1p2} en *T. thermophilus* HB27 tuvo lugar y permitió, mediante microscopía, detectar la fluorescencia en los transformantes que expresaban una fusión y en los que expresaban dos fusiones. Sin embargo, no se detectó señal FRET positiva con ninguna de las combinaciones de las proteínas CheY, CheX o CheA^{p1p2}, fusionadas a sus respectivos componentes de los pares FRET.

4.2. OBTENCIÓN DE VARIANTES DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE mCHERRY FUNCIONALES EN *Thermus thermophilus*.

Este apartado describe los resultados más relevantes en la línea de obtención de variantes termoestables con espectro de emisión de longitud de onda roja a partir del parental *mCherry*. Para ello, se obtuvieron genotecas mediante un enfoque aleatorio basado en PCR propensa a error (epPCR). Por último, se estableció un criterio de selección de mutantes y se diseñó y optimizó un método de cribado. Los resultados más relevantes fruto de este trabajo se exponen a continuación.

4.2.1. Obtención de genotecas de mutantes de mCherry mediante epPCR

Los cambios en las propiedades tales como el espectro de emisión, la maduración del cromóforo y la estabilidad que tienen lugar en DsRed, se producen por mutaciones repartidas por toda la estructura de la proteína (Shaner *et al.*, 2007). Esta observación respalda la idea de que la mutagénesis aleatoria en sitios al azar a lo largo de toda la secuencia de la proteína *mCherry* es un método adecuado para la obtención de variantes que se puedan utilizar en microorganismos que crecen a elevadas temperaturas, como es el caso de *T. thermophilus*. Sobre la base de esta idea, se obtuvieron cinco genotecas de mutantes de *mCherry* con cinco mezclas de reacción distintas a las que acompañaron tasas de mutación con diferentes porcentajes (figura 4.23) y distinto sesgo (figuras 4.25 - 4.27).

De acuerdo a la caracterización de las genotecas, se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de Mn^{2+} y la tasa de reemplazo a nivel de DNA o de aminoácidos (figura 4.23).

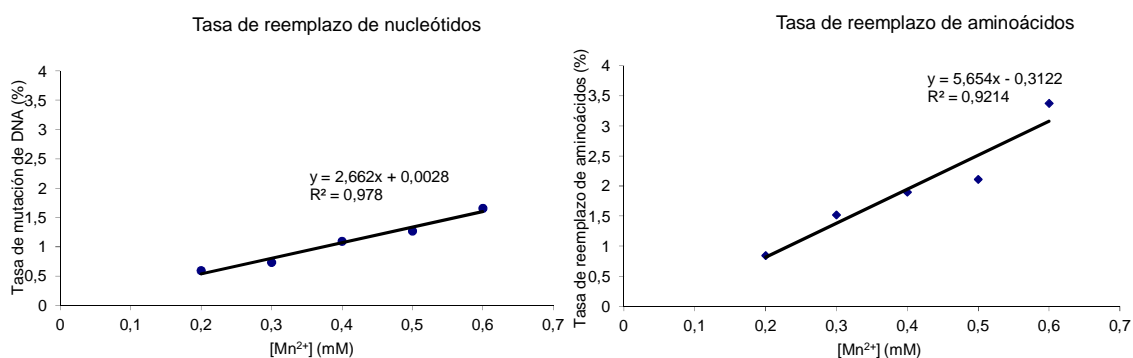


Figura 4.23. Tasas de reemplazo resultantes de las distintas mezclas de epPCR. Se muestran las tasas de reemplazo de nucleótidos resultantes de las distintas mezclas en la epPCR (izquierda) y las tasas de reemplazo de aminoácidos resultantes de la expresión de dichas genotecas en *E. coli* (derecha). En ambos casos se muestra la recta de ajuste por mínimos cuadrados indicándose su fórmula explícita y su coeficiente de correlación (R^2).

El cálculo del porcentaje de eventos de transición y transversión y la razón entre ellos (Ti/Tv) es ampliamente aceptada para estimar el grado de variación y el sesgo dentro de la

genoteca (Wong *et al.*, 2006). En las genotecas de nuestro trabajo (figura 4.24) la razón Ti/Tv alcanza su valor máximo cuando la concentración de Mn^{2+} en la mezcla de reacción de la epPCR es de 0,4 mM (condiciones en que se obtuvo la genoteca 3). La razón Ti/Tv disminuye a medida que las concentraciones, mayores o menores que 0,4 mM, se alejan de este valor.

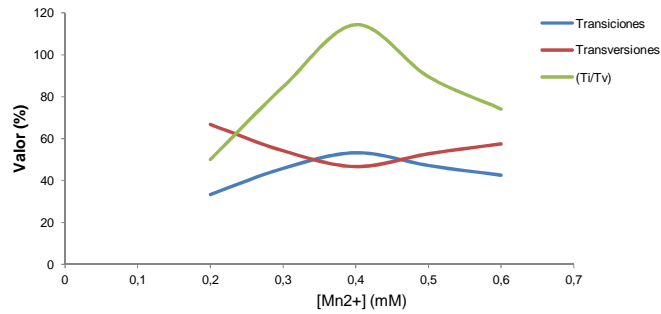


Figura 4.24. Transiciones y transversiones en función de la concentración de Mn^{2+} . Se indica la variación en el porcentaje de transiciones (Ti), transversiones (Tv) y la razón entre ellas expresada como porcentaje (Ti/Tv).

Un análisis más preciso del espectro mutacional de las genotecas puede basarse en la cuantificación de los porcentajes de cada uno de los 12 tipos de reemplazo de nucleótidos que son posibles. En nuestro trabajo, puede observarse una variación en la distribución de estos porcentajes en función de la genoteca seleccionada (figura 4.25). Aunque este sesgo existe en cada una de las genotecas en mayor o menor grado, se observa que es menos evidente al considerar las genotecas de forma conjunta.

4. RESULTADOS

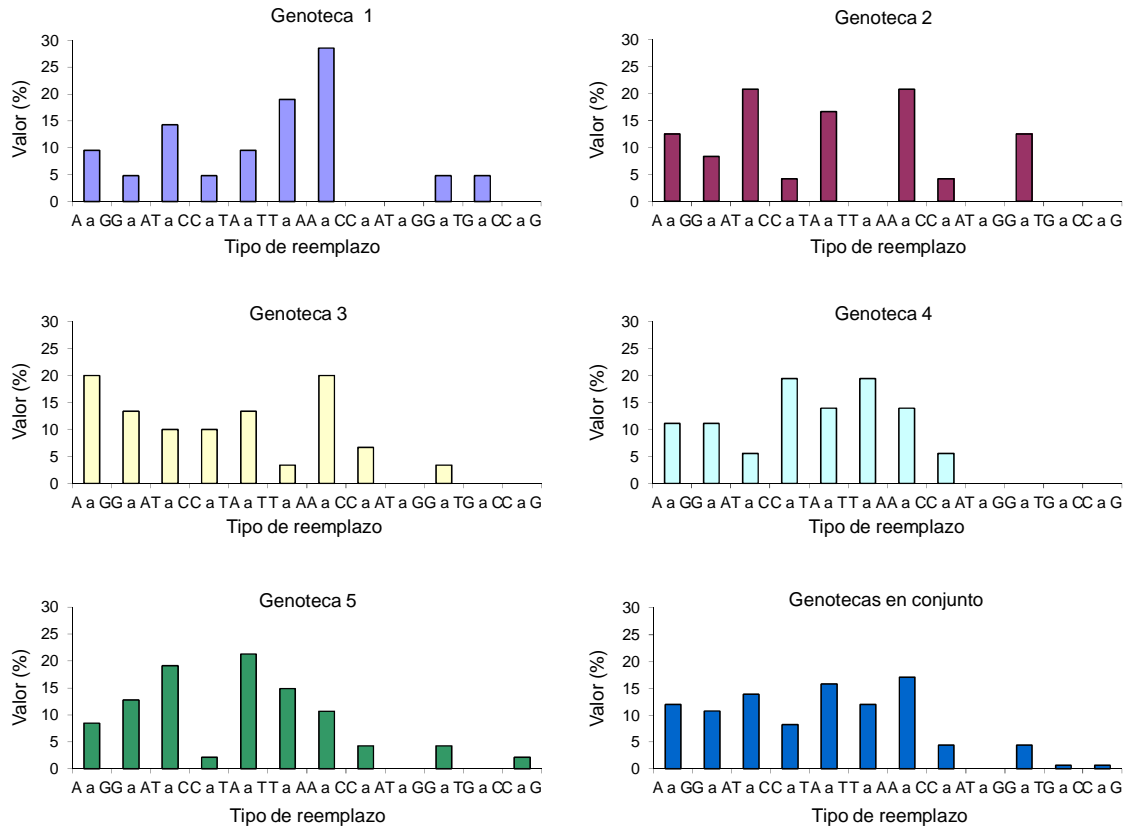


Figura 4.25. Distribución de transiciones y transversiones según la clase de reemplazo de nucleótido.

La presencia de posiciones en las que, debido al sesgo de la epPCR, ocurren reemplazos de forma preferente (*hot spots*) en la secuencia primaria de mCherry puede evaluarse mediante la interpretación de la distribución de frecuencias de estos reemplazos a lo largo de dicha secuencia (figura 4.26). En nuestro caso puede notarse la existencia de diferencias en la frecuencia de reemplazo según la posición. En primer lugar, puede distinguirse un nivel basal de reemplazo a lo largo de la secuencia con valores en cada posición que no superan el 1 % del total. En segundo lugar, existen posiciones en las que el nivel de reemplazo ronda el 2 % del total. Por último, destacan dos posiciones, Ser⁷⁴ y Met¹⁴⁰, cada una de las cuales recoge alrededor de un 3 % del total de reemplazos muestreados. Según estos resultados, puede considerarse que el 6,12 % de los reemplazos de aminoácidos ocurridos tienen lugar en *hot spots*.

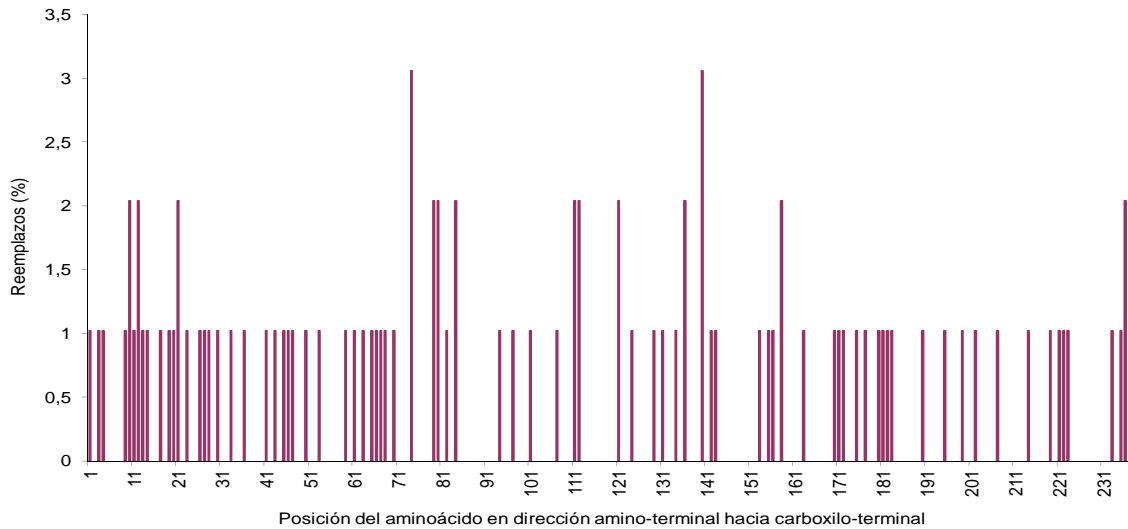


Figura 4.26. Distribución de los reemplazos en la secuencia primaria de mCherry. Se indica la fracción de reemplazos de aminoácidos utilizando el total de datos muestreados en las cinco genotecas y expresado en tanto por ciento.

Dado que la organización del código genético favorece los reemplazos por aminoácidos muy conservativos resultando en aminoácidos químicamente similares, la caracterización de la diversidad química de los aminoácidos reemplazantes es de enorme importancia (Wong *et al.*, 2006). Los resultados de este tipo de caracterización en nuestro trabajo revelan un cierto grado de homogeneidad en cuanto a la diversidad química de los aminoácidos reemplazantes si se comparan las genotecas 2, 3 y 4 entre sí. Las mayores diferencias ocurren al comparar los resultados de las genotecas 1 y 5 con el resto (figura 4.27).

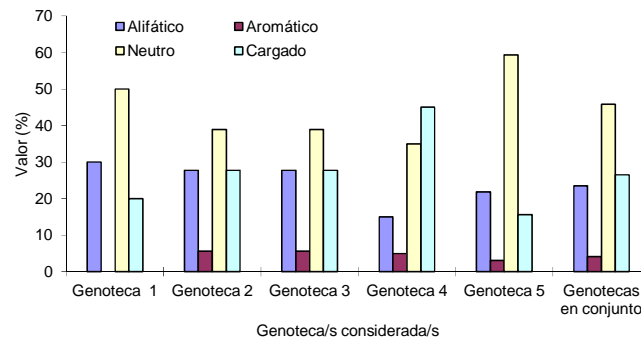


Figura 4.27. Diversidad química de los aminoácidos reemplazantes. Se muestra, con cada genoteca por separado y las genotecas consideradas en conjunto, el porcentaje de aminoácidos reemplazantes que pertenece a cada una de las cuatro categorías según sea alifático, aromático, neutro o cargado.

4.2.2. Selección de variantes termoestables mediante THR

Uno de los factores que puede afectar a la funcionalidad de una proteína exógena en un organismo heterólogo a altas temperaturas, como sería el caso de la producción de mCherry en *T. thermophilus*, es la imposibilidad de adquirir un plegamiento adecuado. La temperatura óptima de crecimiento de *T. thermophilus* es superior a 70 °C. Cabe esperar que

4. RESULTADOS

las interacciones intramoleculares e intermoleculares que sostienen la estructura funcional de una determinada proteína no se establezcan adecuadamente sin un acondicionamiento previo de su arquitectura. En tales condiciones, parece razonable el empleo de un método de selección de proteínas termoestables basado en la interferencia con el plegamiento de un testigo. El método THR, es independiente de la actividad y permite seleccionar cualquier proteína termoestable. Se basa en la expresión de una fusión entre una proteína de interés, en posición amino terminal, y una variante termoestable de la nucleotidil kanamicin transferasa, en posición carboxilo terminal, en *T. thermophilus*. Dado que las proteínas mal plegadas tienen un efecto perjudicial en el plegamiento de su porción carboxilo terminal (el testigo), la estabilidad de los mutantes de la proteína de interés sufre una transducción al testigo fusionado y conduce a una señal de vida o muerte a elevadas temperaturas (Chautard *et al.*, 2007).

En la adaptación en el uso del método THR al caso que nos ocupa, es decir la fusión mCherry-Kat, cabría esperar una mayor laxitud en la estructura de mCherry haciéndola interferir con el plegamiento de Kat. Predijimos que la funcionalidad de esta última quedaría anulada impidiendo el crecimiento de colonias en un medio con una determinada concentración de kanamicina. De modo que se podrían establecer una concentración de Kanamicina óptima para la selección de mutantes de mCherry con una mejora en su capacidad de plegamiento a altas temperaturas. Esto sirvió de base para diseñar un método de cribado de mCherry en genotecas de productos de PCR mutagénica fusionados al gen *kat* en el vector pNCK.

Sin embargo, nuestros resultados revelan que la relación que existe entre el aumento de la concentración de Kanamicina y el número de colonias de *T. thermophilus* que crecieron en las placas de la genoteca tras su incubación a 70 °C, no permite establecer una concentración crítica de antibiótico que conduzca a la selección (figura 4.28). Aunque finalmente este método se descartó, permitió deducir que la estructura de la proteína mCherry es termoestable por sí misma y que, por lo tanto, el problema que afecta a la función de mCherry a altas temperaturas en *T. thermophilus* es la lentitud en la maduración del cromóforo.

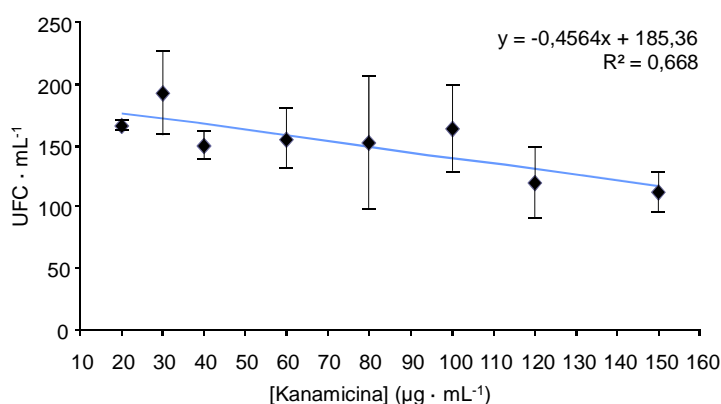


Figura 4.28. Efecto de la concentración de kanamicina en el número de colonias por placa. Se muestra la nube de puntos del número de colonias obtenido según la concentración de kanamicina y la recta de regresión por el método de mínimos cuadrados, indicándose la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación (R^2).

4.2.3. Mejora de la maduración del cromóforo en mCherry

La proteína mCherry tiene un cromóforo de tipo DsRed cuya maduración consta de varios pasos. Inicialmente ocurre una ciclación y una primera oxidación, tras lo cual el cromóforo adquiere una configuración *cis* y sufre una segunda oxidación que da lugar a la formación de un cromóforo de color rojo (Baird *et al.*, 2000). El tiempo necesario para que se forme totalmente el cromóforo rojo se estimó en 27 h en el caso de DsRed. La mejora de la eficiencia y velocidad de maduración en variantes de RFPs ha sido objeto de estudio y mejora (Stepanenko *et al.*, 2011; Subach *et al.*, 2011). Dada la importancia de la maduración del cromóforo en la adquisición de fluorescencia por parte de la proteína mCherry, conviene considerar la posible influencia de la temperatura sobre este proceso.

En nuestro trabajo, la producción de mCherry, a partir del gen insertado en el vector pNCK expresado en cultivos de *T. thermophilus* fue detectada mediante *Western blot*. Sin embargo, fue imposible detectar fluorescencia mediante microscopía por parte de bacterias tomadas de cultivos de transformantes de *T. thermophilus* HB27 que la producían, mientras que la cepa de *E. coli* portadora del mismo vector sí fue detectable al microscopio siendo útil como control positivo (figura 4.29). Por otra parte, cuando tras incubar placas de un cultivo de *T. thermophilus* portador de pNCKmcherry a 60-70 °C se dejaron reposar a temperaturas de 4 °C, 22 °C ó 37 °C durante 16 h, se hizo posible la detección al microscopio (figura 4.29).

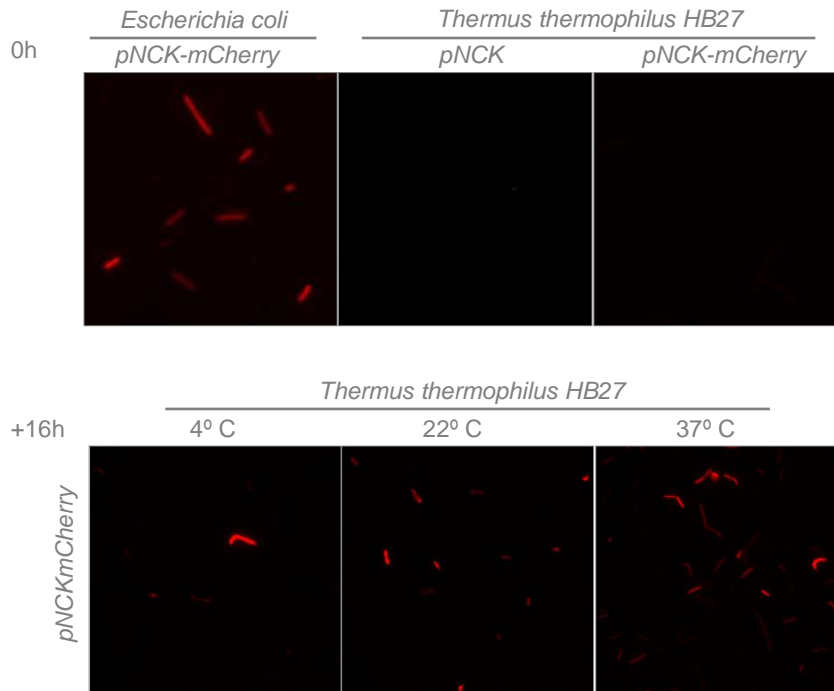


Figura 4.29. Maduración del cromóforo en mCherry. Las imágenes en los campos de la parte superior, tomados inmediatamente tras la incubación de cada cultivo, indican un nivel intenso de fluorescencia en la cepa *Escherichia coli* portadora de mCherry. Esto no ocurre en ninguna de las dos cepas de *T. thermophilus* indicadas a su derecha. La parte inferior muestra el nivel de fluorescencia adquirido tras un período de reposo a distintas temperaturas por parte de un cultivo de la cepa de *T. thermophilus* portadora de pNCKmCherry.

4. RESULTADOS

Las genotecas de pNCK-mCherry creadas mediante epPCR y transformación en *T. thermophilus* se utilizaron para aplicarles una doble presión de selección: sobre el plegamiento y sobre la maduración del cromóforo. Por un lado, la elevada temperatura de crecimiento de los cultivos de *T. thermophilus* ejerce presión de selección sobre la capacidad de plegamiento de las variantes de mCherry. Por otro lado, se estableció un criterio para ejercer presión de selección sobre la velocidad de maduración del cromóforo, que consistió en elegir aquellas colonias de la genoteca que tras crecer a 60 °C (temperatura a la que existe presión de selección sobre el plegamiento) y ser posteriormente incubadas a 37 °C mostrasen, en algún momento, un nivel de fluorescencia mayor que aquellas que expresaron el gen parental de mCherry en las mismas condiciones (figura 4.30). Para el cribado se utilizó el escáner de fluorescencia Typhoon 9410 *scanner* (GE Healthcare) en el modo de fluorescencia, midiendo a través del filtro 610 nm BP la emisión de fluorescencia por parte de las colonias excitadas a 532 nm, habiéndose establecido el plano focal a 3 mm del lector. La comparación se hizo respecto a transformantes portadores de pNCKmCherry que expresan la variante parental de la proteína mCherry. Mediante este procedimiento se eligieron 21 colonias, tres de las cuales se consideraron de interés prioritario por el nivel de fluorescencia a que dieron lugar tras una resiembra en las mismas condiciones del cribado inicial.

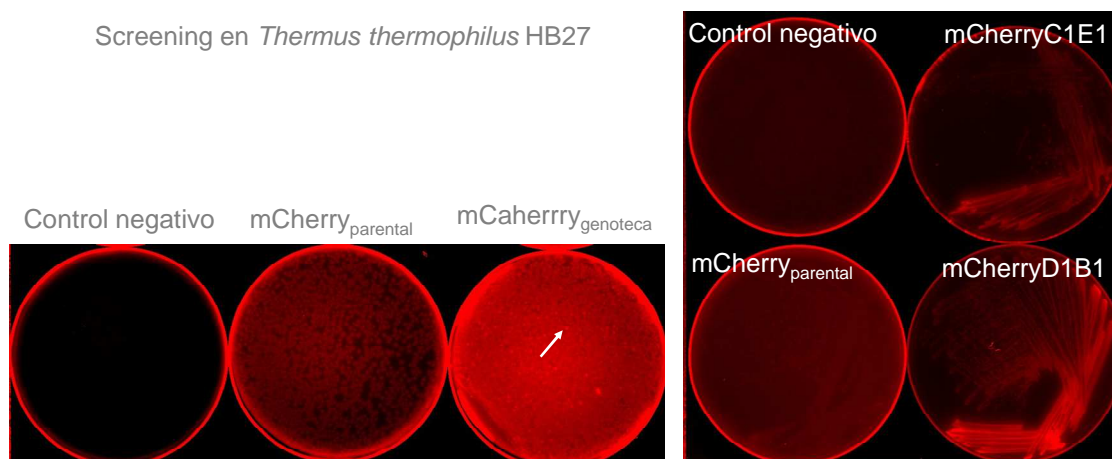


Figura 4.30. Observación mediante *scanner* de fluorescencia. A la izquierda, se muestra una de las placas de siembra de la genoteca de mutantes de mCherry de la que se destaca una colonia seleccionada por su mayor intensidad de fluorescencia tras reposar 30 minutos a 37 °C. Se muestran a su vez placas de siembra del control negativo, portador de pNCK, y la cepa portadora del gen parental de mCherry en pNCK. A la derecha se indica el resultado, tras el reposo de 30 minutos a 37 °C, de la resiembra de dos de las colonias elegidas. Comparada con la fluorescencia de la cepa que expresa la proteína parental, la intensidad es notablemente mayor en ambos casos.

La secuencia primaria de las tres variantes derivadas de mCherry elegidas tras el cribado se muestra en la figura 4.31. Los reemplazos resultantes de la mutagénesis aleatoria son Y72N, G73S y Q113L en la variante B1D1, Q113L en la variante C1E1 y V26E, Y177H, N209I, Y212H y E232G en la variante A1F1. Las variantes B1D1, C1E1 y A1F1 se aislaron mediante el cribado de las genotecas resultantes del uso de concentraciones de Mn^{2+} en la epPCR iguales a 0,2 mM, 0,3 mM y 0,5 mM respectivamente.

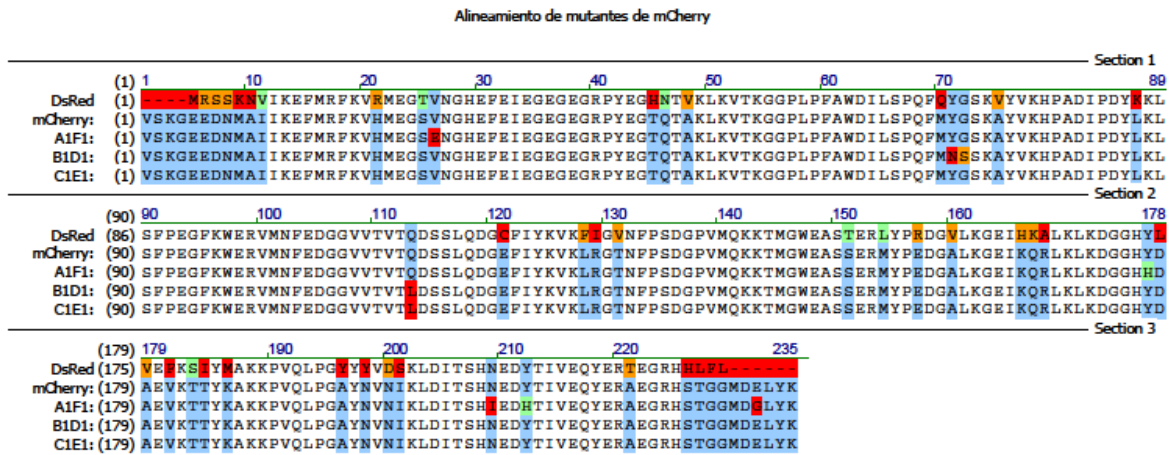


Figura 4.31. Secuencias de mutantes de mCherry. Se muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de tres variantes de mCherry rescatadas mediante el cribado con scanner de fluorescencia. El color de subrayado denota el grado de conservación del aminoácido respecto al de la misma posición en mCherry. Rojo, no similar; azul, conservativo; verde, similar; anaranjado, levemente similar. En la primera línea se muestra la secuencia de DsRed, proteína a partir de la que se obtuvo mCherry.

4.2.4. Observación de la fluorescencia de mutantes de mCherry *in vivo*

Para verificar la utilidad de las variantes generadas mediante epPCR a partir de mCherry y la posibilidad de su uso de forma combinada con otras variantes termoestables derivadas de sGFP, se expresaron de forma simultánea en *T. thermophilus* la variante B1D1 obtenida tras el cribado basado en el escáner de fluorescencia y una fusión sIFP-CasB. El empleo simultáneo de ambos testigos permitió distinguir la localización de CasB en color amarillo sirviendo mCherry como color de contraste (figura 4.32). Las imágenes de fluorescencia revelan la ausencia de interferencia con la localización de CasB y, tanto en el caso de la variante B1D1 como la fusión sIFP-CasB, ausencia de artefactos como por ejemplo cuerpos de inclusión o interferencia con la funcionalidad.

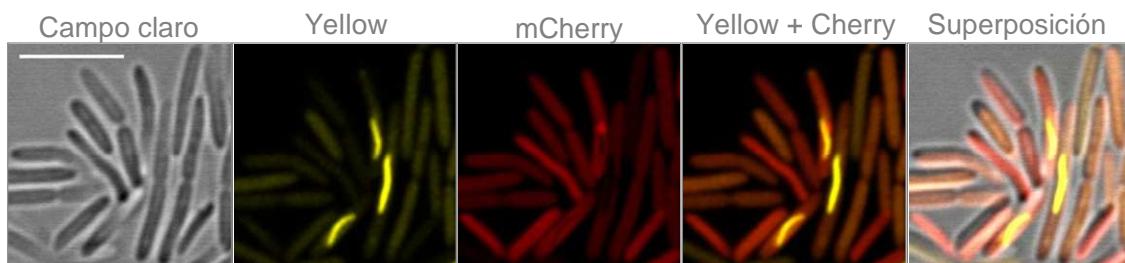


Figura 4.32. Microscopía mediante segmentación automática por colores. Imágenes adquiridas mediante un microscopio láser confocal espectral y el resultado de la segmentación automática por colores. Como muestra se empleó un derivado de *T. thermophilus* HB27 mediante transformación bacteriana. La cepa conseguida produjo de forma simultánea un derivado de mCherry y una fusión casB-sIFP. La barra de escala de la primera imagen es común para toda la serie y corresponde a 5 µm.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El estudio de *T. thermophilus* es de enorme interés por ser un excelente modelo de microorganismo termófilo y por su aplicación en biotecnología (Cava *et al.*, 2009). Es fácilmente cultivable en el laboratorio, adquiere DNA exógeno con gran eficiencia (Cava *et al.*, 2009), es una buena elección para estudios de biología estructural (Sazanov y Hichliffe, 2006; Selmer *et al.*, 2006), permite termoestabilizar proteínas (Nakamura *et al.*, 2005) y producir termozimas (Hidalgo *et al.*, 2004; Pessela *et al.*, 2007). Sin embargo, el número de alternativas disponibles para su estudio y aplicación, especialmente en comparación a modelos como *E. coli*, es relativamente bajo. Esto se debe, principalmente, a la dificultad de que las herramientas de biología celular y molecular mantengan su funcionalidad a temperaturas tan elevadas como las de los óptimos de crecimiento de dichos organismos. Aunque el interés por la biología de *T. thermophilus* y su aplicación condujo al desarrollo de marcadores moleculares termoestables, como los genes de resistencia a antibióticos (Brouns *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2005), fue hace relativamente poco tiempo cuando se consiguió la localización de proteínas basada en sGFP, una variante de proteína fluorescente verde que se pliega correctamente, adquiriendo y manteniendo su funcionalidad a 70 °C en *T. thermophilus* (Cava *et al.* 2008).

Nuestro trabajo ha dado continuidad a este último logro y ha ampliado las posibilidades de uso de proteínas fluorescentes en termófilos. Para conseguirlo, se fijó el objetivo de obtener un mayor número de marcadores con distintos colores a partir de dos variantes de proteínas fluorescentes que se consideraron adecuadas como punto de partida: sGFP (Pédelacq *et al.*, 2006) y mCherry (Shaner *et al.*, 2004). Las variantes seleccionadas debían afrontar dos problemas impuestos por la elevada temperatura de crecimiento de *T. thermophilus*. Por un lado, durante su producción a elevada temperatura, la proteína fluorescente debe adquirir una conformación adecuada y la maduración de su cromóforo debe hacerlo fluorescente, algo que no es posible con variantes como eGFP (Cava *et al.*, 2008). Pero además, el estado funcional, debe mantenerse con la intensidad suficiente y el tiempo necesario para permitir su aplicación en *T. thermophilus* evitando su apagado por la incidencia de luz (*bleaching*) y la influencia de la elevada temperatura (desactivación vibracional). En nuestro trabajo, se amplió la “paleta de colores” termoestable mediante dos enfoques. El diseño racional a partir de sGFP se usó para obtener variantes termoestables de color cian, verde y amarillo, algunas de las cuales (sYFP, sCFP) ya habían sido descritas en un trabajo previo (Pédelacq *et al.*, 2006). La evolución dirigida de mCherry se usó para la obtención de variantes termoestables de color rojo.

5.1. Diversificación del color de proteínas fluorescentes derivadas de sGFP.

La plasticidad y capacidad de adaptación de las proteínas fluorescentes está avalada por muchos trabajos en los que se mejoran algunas de sus propiedades como el aumento en

su intensidad de emisión fluorescente (Cramer *et al.*, 1995), la reducción de la anchura de su espectro de emisión (Ai *et al.*, 2006) o el aumento de la distancia entre sus espectros de absorción y emisión, es decir, el desplazamiento Stokes (Tsien, 1998). En otros casos se han conseguido proteínas fluorescentes que funcionan como biosensores de calcio (Akerboom *et al.*, 2009), de voltaje (Gautam *et al.*, 2009) o de pH mediante mecanismos basados en su fotoactivación o en la fotoconversión de su espectro de emisión (Patterson y Lippincott-Schwartz, 2002; Sankaranarayanan y Ryan, 2000; Llopis *et al.*, 1998). Sin embargo, estas variantes modificadas se han aplicado en su mayoría en organismos mesófilos.

Se ha demostrado que el plegamiento correcto de una proteína fluorescente es un requisito previo a la formación de un cromóforo fluorescente (Tsien, R. Y., 1998). En este sentido, se creó la *superfolder Green Fluorescent Protein* (sGFP), una variante de GFP que adquiere un plegamiento robusto, con mejor capacidad de recuperación, gran resistencia a la desnaturalización y una gran estabilidad termodinámica (Pédelacq *et al.*, 2006). Si bien, la variante no termoestable *enhanced GFP* (eGFP) ya presentaba cierta resistencia frente a la temperatura tras haber sido producida a 37 °C (Tsien, 1998), dicha resistencia es aún mayor en sGFP (figura 4.4). Además, se ha visto que aumentos moderados de temperatura (de 20 a 37 °C) en las condiciones de producción de la proteína disminuyen drásticamente la eficiencia de maduración del cromóforo de eGFP y que, aumentos grandes de temperatura (>20 °C) disminuyen el máximo a 395 nm y aumentan a 470 nm en el espectro de absorción de avGFP (Tsien, 1998). Todos estos factores impiden el uso de proteína fluorescente a menos que se mejore su plegamiento y maduración a 70 °C. Por el contrario, la robustez del plegamiento de sGFP le permite madurar y ser funcional en *T. thermophilus* a 70 °C (Figura 4.11; Cava *et al.*, 2008).

Para obtener proteínas fluorescentes termoestables a partir de sGFP se aprovechó el conocimiento actual sobre los cambios en la secuencia primaria que dan lugar a modificaciones en las propiedades espectrales y de maduración del fluoróforo en derivados de la variante eGFP (figura 1.5-A; Tabla 4.1; Shaner *et al.*, 2007; Tsien, 1998), introduciendo estos reemplazos en la secuencia primaria de sGFP (figura 4.1; Tabla 4.1). Los reemplazos sobre la secuencia de sGFP utilizados en nuestro trabajo (Tabla 4.1; figura 4.1) dieron lugar a proteínas funcionales en todos los casos (figura 4.11). Este hecho concuerda con la observación de que las proteínas con estabilidad mejorada generalmente son más resistentes a las mutaciones que las proteínas de las que derivan (Bornberg-Bauer y Chan, 1999; Bloom *et al.*, 2006; Pedelacq *et al.*, 2006), siendo más aptas para evolucionar pues son más permisivas a las mutaciones que dan lugar a nuevas funciones. Por lo general, el aumento en el número de reemplazos puede conllevar una pérdida de estabilidad, pero en nuestro caso, la mayor estabilidad de la proteína parental amortiguaría el "efecto colateral" de pérdida de estabilidad que se esperaría que acompañase a modificaciones como, por ejemplo, el cambio en las propiedades espectrales o la mejora de la eficiencia de maduración (Bloom *et al.*, 2006; Wagner, 2008). Por

lo tanto, sGFP es un buen punto de partida para la ingeniería de proteínas, habiéndose podido aprovechar su cualidad termorresistente para generar mayor diversidad de proteínas fluorescentes termoestables que se puedan usar en microorganismos termófilos.

5.2. Producción a 37 °C y purificación de proteínas fluorescentes termoestables.

Las fracciones de cada una de las proteínas fluorescentes termoestables derivadas de sGFP en nuestro trabajo se obtuvieron mediante producción en forma de proteína fusionada a seis histidinas consecutivas, seguidas de una región espaciadora, en el extremo amino-terminal de cada proteína. Esta fusión, permite purificar proteínas mediante cromatografía de afinidad usando resinas que contienen un metal, en nuestro caso cobalto, capaz de formar quelatos metálicos con el grupo de seis histidinas (Porath *et al.*, 1975). Para conseguirlo, hizo falta clonar previamente en el vector pET28b(+) cada uno de los genes que codifica cada una de las variantes. La producción se llevó a cabo en *E. coli* BL21 (DE3) como hospedador y utilizando IPTG como inductor. La producción y maduración de estas proteínas tuvo lugar a 37 °C para rendir en todos los casos proteínas fluorescentes (figura 4.4).

5.3. Caracterización espectral.

En primer lugar, el escaso grado de variación en los espectros de absorción y emisión de 30 °C a 70 °C indica que el cromóforo es estable a ambas temperaturas (figura 4.3). De hecho, la expresión de las variantes termoestables de proteína fluorescente en *T. thermophilus* permitió su visualización mediante microscopía de fluorescencia empleando filtros de excitación y emisión comúnmente disponibles (figura 4.3) y la captura de imágenes de fluorescencia en muestras de cultivo fijadas a 60 °C (figura 4.11).

En segundo lugar, la tendencia al estrechamiento y definición de los máximos de absorción y emisión y la disminución de la magnitud del *desplazamiento Stokes* a medida que los espectros se desplazan hacia el rojo (figura 4.3) podría explicarse por la disminución en la probabilidad de desactivación vibracional. Además, se aprecia, especialmente en sE₁FP, sE₂FP, sCGFP y en menor grado en el resto, un desplazamiento del espectro de emisión hacia valores de mayor longitud de onda, es decir, de menor energía, en los espectros a 70 °C respecto a los medidos a 30 °C (figura 4.3). Este desplazamiento podría ser la consecuencia de la pérdida de energía mediante desactivación no radiante, ya que el aumento de la temperatura conlleva, por un lado, una disminución en la viscosidad del disolvente, y por otro lado, un aumento en el número de colisiones entre las proteínas y el disolvente en el que se encuentran, que favorecen la desactivación de los estados electrónicos excitados a través de

procesos no radiantes de conversión externa (amortiguación colisional) (referencia). El desplazamiento de los espectros de emisión hacia longitudes de onda de mayor magnitud cuando se aumenta la temperatura, es despreciable en el caso de las proteínas zafiro y amarillas (figura 4.3), seguramente debido a que en estas variantes existe un menor número de niveles vibracionales que en las proteínas sCFP, sE₁FP, sE₂FP, sCGFP, sGFP, sM₁FP y sM₂FP. Además, el empaquetamiento más compacto del cromóforo de las proteínas zafiro y amarillas disminuye su probabilidad de perder energía mediante procesos no radiantes de conversión interna. Estas observaciones respecto a los espectros de excitación y emisión obtenidos y las explicaciones de su origen son coherentes con los resultados de desactivación térmica de la fluorescencia obtenidos en nuestro trabajo (figura 4.4).

5.3.1 Variantes “cyan” de sGFP.

En el caso de las variantes “azules” de GFP, el reemplazo responsable del desplazamiento de los espectros de absorción y emisión es Y66W. Según trabajos anteriores (Heim y Tsien, 1996; Sawano y Miyawaki, 2000), la introducción de Trp⁶⁶ en eGFP, origina un fluoróforo de tipo indólico y de tamaño mayor que el fluoróforo verde original, caracterizado por un desplazamiento de 30 nm hacia el azul y por la aparición de dos máximos locales en el espectro de emisión que se corresponden con dos estados cuánticos en equilibrio (Heim y Tsien, 1996; Sawano y Miyawaki, 2000). En sCFP, sE₁FP y sE₂FP se verifica el mismo desplazamiento en los máximos de los espectros de absorción y emisión respecto a la proteína parental sGFP. y el doble máximo de emisión mencionado anteriormente (figura 4.3). Según nuestros resultados, el aumento de temperatura de 30 °C a 70 °C parece favorecer el estado cuántico en el que el máximo de emisión está más próximo a 500 nm en sCFP, sE₁FP y sE₂FP. Es decir, con el aumento de temperatura se favorece un estado cuántico en el que la emisión fluorescente es de mayor longitud de onda y por lo tanto de menor energía. Este resultado es un reflejo de la importancia de la pérdida de energía mediante emisión no radiante en las variantes azules frente al resto de proteínas fluorescentes, que se verifica especialmente en los experimentos de desactivación térmica de la fluorescencia.

S72A es el único reemplazo introducido en sCFP para dar lugar a sE₁FP y a 30 °C su espectro es igual al de sCFP con una reducción en el segundo máximo de emisión (figura 4.3). En el caso de eCFP, también se verifica una pequeña reducción en el máximo de emisión a 505 nm (Rizzo *et al.*, 2004) aunque no se asoció esta reducción con ninguno de los tres reemplazos (S72A/Y145A/H148D) que diferenciaban a Cerúlea de eCFP. Sin embargo, nuestros resultados revelarían que S72A es responsable de dicha disminución.

Las posiciones Tyr¹⁴⁵ e His¹⁴⁸ son responsables de los dos estados de emisión anteriormente mencionados. Se ha visto en eCFP que Tyr¹⁴⁵ e His¹⁴⁸ pueden presentar dos conformaciones posibles (Rizzo *et al.*, 2004). En la conformación principal A' de eCFP, la Tyr¹⁴⁵ se orienta hacia el interior y la His¹⁴⁸ hacia el exterior y están directamente implicados en la interacción con el cromóforo de eCFP. En la conformación secundaria B' de eCFP, Tyr¹⁴⁵ se

orienta hacia el exterior e His¹⁴⁸ hacia el interior, pero no interaccionan con el cromóforo (Bae *et al.*, 2003). En el caso de las variantes *superfolder* azules, la distinción de dos máximos de emisión en sCFP y sE₁FP no es tan clara y esto podría deberse al hecho de que en la posición del aminoácido 145 estas variantes tienen Phe en lugar de Tyr. sE₂FP cuenta con los reemplazos Y145A y H148D, que causan el ensanchamiento de los espectros de absorción y emisión a 70 °C pero no parecen implicar grandes diferencias en lo que respecta al doble máximo de emisión (figura 4.3). Según trabajos anteriores, Y145A contribuye a un aumento en la estabilidad y mayor resistencia a *photobleaching*, a expensas de una disminución en \square_f mientras que H148D aumenta \square_f y ϵ_λ (Rizzo *et al.*, 2004; Kremers *et al.*, 2006). Aunque no se han individualizado las mutaciones, en nuestro caso se verifica un aumento global en \square_f para sE₂FP con respecto a sE₁FP. Además, según nuestros resultados la presencia de Ala¹⁴⁵ y Asp¹⁴⁸ en sE₂FP conduce a un desplazamiento del espectro de emisión hacia longitudes de onda más larga a 70 °C. La magnitud de este desplazamiento hacia el rojo es mayor en el espectro de emisión de sE₂FP que en sCFP y sE₁FP (figura 4.3) y la causa podría estar relacionada con una mayor disposición a la pérdida de fluorescencia a través de procesos no radiativos mediante vibración térmica.

5.3.2 Variante “verde-cyan” de sGFP.

La variante verde-cyan de GFP contiene dos tipos de mutación. Por una parte, el reemplazo Y66W es el responsable de la formación de un nuevo cromóforo tipo indol si se introduce en eGFP, al que acompaña un desplazamiento hacia menor longitud de onda y la aparición de dos máximos de emisión (Sawano, 2000). Por otro lado, el reemplazo T203Y en eGFP, conduce a la variante YFP y conlleva la sustitución de un residuo polar, hidrófilo, por un residuo apolar, hidrófobo, y el establecimiento de una interacción π - π entre la Tyr⁶⁶ y el anión fenolato de Tyr⁶⁶ desplazando el espectro a máximos de absorción y emisión de 514 nm y 524 nm respectivamente (Ormö *et al.*, 1996; Griesbeck *et al.*, 2001). De forma conjunta, los reemplazos Y66W/T203Y en eGFP o en sGFP conducen a un aumento en el desplazamiento de Stokes con efectos semejantes en las variantes resultantes eCGFP (Sawano y Miyawaki, 2000) y sCGFP (figura 4.3) respectivamente.

Comparado con eCGFP el máximo de absorción de sCGFP es mucho más definido y más estrecho y el espectro de emisión muestra un hombro a la derecha del máximo (figura 4.3) ausente en su homóloga eCGFP (Sawano y Miyawaki, 2000). Al igual que ocurría con las variantes “cyan”, la forma del espectro de emisión revela la existencia de dos estados cuánticos, en un equilibrio desplazado hacia el estado favorecido, en este caso, de menor longitud de onda. Estos máximos de absorción y emisión se hallan desplazados ligeramente hacia el rojo y el máximo de emisión desplazado ligeramente hacia el azul (figura 4.3) con respecto a los máximos de absorción y emisión descritos para eCGFP (455 nm y 506 nm, respect.) (Sawano y Miyawaki, 2000). Como consecuencia el desplazamiento de Stokes que existe en sCGFP (37 nm) es menor que el de eCGFP (51 nm). Sin embargo, sigue existiendo una diferencia considerable comparada con sGFP, cuyo desplazamiento de Stokes es de 17

nm. El valor relativamente grande que adquiere el desplazamiento de Stokes en sCGFP es interesante porque ayudaría a minimizar el cruce de canales cuando se usan variantes de distintos colores de forma conjunta.

5.3.3 Variantes “verdes” de sGFP.

El espectro de absorción y emisión obtenido para sGFP en nuestro trabajo (figura 4.3) muestra algunas diferencias con el previamente descrito (Pédélecq *et al.*, 2006). En concreto, en nuestro caso aparecen tres máximos de absorción. Esto podría atribuirse a la diferencia en las condiciones experimentales, especialmente en lo que se refiere al nivel de resolución en el espectro, que en nuestro caso tuvo un paso de banda menor y el barrido se hizo en pasos de 1 nm (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, el espectro de emisión de sGFP, sM₁FP y sM₂FP es prácticamente idéntico al de avGFP (figura 4.3; Cramer *et al.*, 1995).

Las variantes monoméricas de sGFP (sM₁FP y sM₂FP) se obtuvieron mediante los reemplazos A206K, L221K y F223R, que sustituyen residuos hidrofóbicos por residuos con carga positiva. En el caso de eGFP, los tres reemplazos de forma conjunta parecen ser los responsables de la eliminación de un “parche hidrofóbico”, que constituye una región de la superficie de proteínas fluorescentes responsable de la dimerización de barriles- β , de modo que se facilita su uso como pares FRET (Zacharias *et al.*, 2002). Como puede comprobarse según nuestros resultados, si bien puede esperarse la disminución en la tendencia a la dimerización por parte de sM₁FP y sM₂FP respecto a sGFP, ni el reemplazo A206K por sí mismo ni el reemplazo conjunto A206K/L221K/F223R en sGFP, tienen efecto alguno en la forma de los espectros de absorción y emisión, siendo estos idénticos a los de sGFP (figura 4.3; Cramer *et al.*, 1995).

El reemplazo T203I que conduce a la supresión del máximo a 475 nm origina la variante Sapphire de GFP (Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003). A su vez, T-Sapphire es una variante de Sapphire con los reemplazos Q69M/C70V/V163A/S175G (Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003). De acuerdo con los autores, en conjunto, estos reemplazos facilitan el plegamiento a 37 °C pero no se les atribuye ningún efecto sobre los espectros de absorción y emisión. En nuestro trabajo, V163A ya está incorporada en la sGFP parental, y se prescindió de S175G (Cramer *et al.*, 1996; Tsien, 1998; Nagai *et al.*, 2002), dado que las dificultades relacionadas con el plegamiento y la maduración a elevadas temperaturas se consideraron resueltas con las modificaciones propias de sGFP (Pédélecq *et al.*, 2006).

En nuestro caso, sS₁FP y sS₂FP (análogas a Sapphire y T-Sapphire respectivamente) presentan, como era de esperar, un nuevo máximo de absorción a 399 nm en detrimento del máximo a 475 nm (figura 4.3). Sin embargo, los reemplazos Q69M y C70V para obtener sS₂FP a partir de sS₁FP no causaron diferencias espectrales apreciables. Aunque según trabajos anteriores, C70V fue un error de PCR que resultó crucial para que existiera fluorescencia en

Sapphire (Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003), según nuestros resultados, la variante sS₁FP (T203I) no necesita C70V para emitir fluorescencia. Por su parte, la mutación Q69M se relaciona con la estabilidad, expresión a 37 °C, con ϕ_f y con ϵ_λ en proteínas amarillas dando lugar a máximos de excitación y emisión de 516 nm y 529 nm respectivamente (Griesbeck *et al.*, 2001), pero en el caso de sS₁FP y sS₂FP la mutación demostró ser neutra ya que su introducción no supone ningún cambio en los espectros de sS₂FP respecto a sS₁FP (figura 4.3).

5.3.4 Variantes “amarillas” de sGFP.

Los reemplazos asociados a la obtención y mejora de proteínas fluorescentes amarillas que se consideraron en nuestro trabajo son F46L, V68L, Q69M, S72A y T203Y (Tabla 4.1) aunque de todos ellos, el único asociado a la modificación de los espectros es T203Y. El residuo Tyr²⁰³ aporta un anillo aromático cuyo empaquetamiento junto al anión fenolato del cromóforo conduce a una interacción π - π entre la Tyr⁶⁶ y el anión fenolato de Tyr⁶⁶ desplazando el espectro a máximos de absorción y emisión de 514 nm y 524 nm respectivamente (Ormö *et al.*, 1996; Griesbeck *et al.*, 2001). Esto seguramente se debe a que una mayor capacidad de polarizar el cromóforo junto con la interacción de tipo π - π reduce la energía del estado excitado, es decir, aumenta las longitudes de onda de excitación y emisión (Wachter *et al.*, 1998). El mismo reemplazo en sGFP conduce a la variante sYFP cuyos máximos de absorción y emisión han aumentado hasta 20 nm (figura 4.3) y prácticamente coinciden en los mismos valores de longitud de onda que los de YFP, por lo que podemos esperar que los cambios en el tipo de interacciones sean los mismos que en la variante YFP (Ormö *et al.*, 1996). Dado que no existen diferencias destacables entre los espectros de sYFP, sV₁FP, sV₂FP y sIFP (figura 4.3), podemos atribuir el desplazamiento de los máximos de absorción y emisión exclusivamente al reemplazo T203Y en los cuatro casos, careciendo F46L, V68L, Q69M y S72A de algún efecto sobre los espectros de sV₁FP, sV₂FP y sIFP.

5.3.5 Variante “fotoactivable” de sGFP.

La proteína avGFP suele presentar una población mixta de cromóforos tipo fenol neutro y fenolato aniónico, cuyos máximos de absorción son a 488 nm y 475 nm respectivamente. Al ser excitada con radiación visible a 400 nm, el cromóforo sufre una fotoconversión hacia la forma aniónica, que cuando se excita a 488 nm emite una fluorescencia tres veces más intensa que la inicial. Se sabe que los reemplazos en la posición 203 de la secuencia de proteínas fluorescentes pueden influir en la fotoconversión (Patterson *et al.*, 2002), provocar un desplazamiento de su máximo de emisión hacia mayor longitud de onda e incluso condicionar su capacidad de emitir fluorescencia (Sawano y Miyawaki, 2000). Algunos de los primeros estudios afirmaban que el reemplazo en la posición 203 por un residuo aromático da lugar a un desplazamiento de los espectros de absorción y emisión, si el aminoácido sustituyente es K, N, H, R o L la proteína resultante no emitía fluorescencia pero si el aminoácido sustituyente es P, V, I, W, F, S o Y, la variante resultante sí emitía fluorescencia (Sawano y Miyawaki, 2000).

Estudios posteriores desvelaron que el reemplazo T203H conducía a una variante apenas detectable con excitación a 475 nm o 488 nm (Patterson *et al.*, 2002), lo cual pudo conducir a considerar esta variante no fluorescente en los estudios iniciales (Sawano y Miyawaki, 2000), pero que tras ser excitada a 413 nm sufre un aumento de absorbancia en el máximo menor y un pequeño desplazamiento hacia el rojo. Tras esta fotoactivación a 413 nm, la excitación de esta proteína a 488 nm rinde una intensidad de fluorescencia 100 veces mayor que la inicial y una estabilidad destacable (Patterson *et al.*, 2002). En nuestro trabajo, la introducción del reemplazo T203H en la variante sGFP conduce a unos máximos de absorción y emisión de 508 nm y 524 nm respectivamente y un espectro muy parecido al de las variantes “amarillas”, pero con un pequeño aumento en el desplazamiento de Stokes (figura 4.3).

5.4. Termoestabilidad

El aumento de la vibración térmica y el posterior desplegamiento de la proteína son los responsables de la pérdida de la estructura secundaria, que se puede monitorizar mediante CD (Bokman y Ward, 1981). En el caso de las proteínas fluorescentes, la pérdida de estructura con el aumento de la temperatura se puede monitorizar además a través de la pérdida de la emisión fluorescente. Según estos datos, todas las variantes de sGFP conseguidas en nuestro trabajo tienen mayor termoestabilidad que sus homólogas no termoestables y en algunos casos menor desactivación térmica que la proteína parental (figura 4.4). Los perfiles de desactivación que se obtienen son semejantes a los de la variante eGFP y eYFP, pero la pérdida de fluorescencia se produce a temperaturas superiores en más de cinco grados centígrados.

Se ha propuesto que la desnaturalización de avGFP sería la responsable de la pérdida de intensidad de fluorescencia únicamente cuando se alcanza la temperatura de desplegamiento cooperativo (Kiss *et al.*, 2009). De hecho y según los resultados de nuestro trabajo, salvo en el caso de las variantes amarillas, no existe un paralelismo entre la desnaturalización de la proteína, seguida mediante CD (figura 4.9), y la pérdida de fluorescencia con el aumento de temperatura (figura 4.4), aunque la correlación de los datos de CD con la curva de desactivación de la fluorescencia permitió diferenciar sobre esta última la pérdida de emisión únicamente debida a la desnaturalización de la proteína (Binz *et al.*, 2003).

5.4.1 Variantes “cyan” de sGFP.

El caso en el que se observa con mayor claridad la existencia de pérdida de emisión no asociada a desnaturalización es en las variantes sCFP, sE₁FP y sE₂FP. En ellas, la pérdida gradual de fluorescencia comienza a temperaturas mucho menores (figura 4.4) de la temperatura de desplegamiento cooperativo (figura 4.9). Estos resultados, junto con el hecho de que los residuos cercanos al cromóforo en los cristales de eCFP presentan mayores valores del factor B (Bae *et al.*, 2003) apuntan a una pérdida de energía del estado excitado del cromóforo a través de mecanismos de emisión no fluorescente como la amortiguación por

colisión entre átomos. En este caso, la proteína permanecería plegada pero el aumento de la vibración y las colisiones dentro de la proteína y con el disolvente debidas al aumento de la temperatura generan esta pérdida de energía de forma no radiante. El mecanismo por el que ocurre esta pérdida de fluorescencia explicaría también el desplazamiento de los espectros de sCFP, sE₁FP y sE₂FP hacia el rojo al aumentar de 30 °C a 70 °C.

Se ha descrito que la estabilidad de las proteínas “cyan” mejora por los reemplazos S72A, Y145A y H148D. En concreto, se sabe que S72A mejora el plegamiento a 37 °C, Y145A está relacionado con la mejora de la resistencia y la estabilidad a costa de ϕ_f y H148D modifica el comportamiento del tiempo de vida de la fluorescencia (Rizzo *et al.*, 2004). Según nuestros resultados, S72A mejora parcialmente la termoestabilidad de la variante sE₁FP respecto a sCFP al retrasar el inicio del desplegamiento cooperativo con el aumento de temperatura (figura 4.4) y los reemplazos Y145A y H148D tuvieron un efecto despreciable sobre la estabilidad de sE₂FP.

A la vista de los resultados, sería deseable introducir en las proteínas sCFP y derivadas nuevas mejoras que conduzcan a un aumento de ϕ_f , que estabilicen el estado excitado y que empaqueten de forma más rígida el cromóforo. Todo ello resultaría en proteínas con una emisión más intensa a altas temperaturas debido a una menor pérdida de energía por mecanismos no radiantes. Trabajos recientes ponen de manifiesto que esta mejora sería posible introduciendo reemplazos adicionales en las variantes azules termoestables que hemos desarrollado. Por ejemplo, las mutaciones N146I, M153T, V163A, S175G y A206K sobre eCFP dan lugar a la variante **SCFP3A**. En SCFP3A, debido al reemplazo H148D, la lámina β_7 presenta una única conformación que resulta en un único máximo de emisión de mayor ϕ_f . Además, la existencia de una única conformación restringe parcialmente el movimiento de Ile¹⁴⁶ reduciendo así la posibilidad de colisiones con el fluoróforo, que apagan la fluorescencia. Con el reemplazo T65S sobre sCFP3A se obtiene **mTurquoise**, cuya fluorescencia tiene mayor tiempo de vida y mayor ϕ_f . T65S es en realidad una reversión sobre eGFP, mediante la que desaparece un grupo metilo del cromóforo causando un “efecto dominó” que altera las interacciones de van der Waals existentes pero que fortalece el estado excitado mediante un enlace de hidrógeno con Ser²⁰⁵. En conjunto, se rigidifica el entorno del cromóforo limitando así la pérdida de energía del estado excitado a través de procesos no radiantes. Por último, la proteína **mTurquoise2** es la variante I146F de mTurquoise, con el resultado de que el cromóforo está estabilizado por todos lados, especialmente desde el residuo Ile¹⁴⁶ sobre lámina β_7 y se establecen mayor número de interacciones de van der Waals con el cromóforo respecto a mTurquoise. Como consecuencia aumenta el tiempo de vida media del estado excitado del cromóforo, un hecho que correlaciona con el aumento resultante en ϕ_f (Goedhart *et al.*, 2012).

Las variantes sCFP, sE₁FP y sE₂FP obtenidas en nuestro trabajo son las más susceptibles de mejora. Afortunadamente, los resultados recientes que acabamos de discutir,

son muy prometedores y nuestro trabajo prueba que al trasladar las mutaciones descritas en eGFP a la secuencia de sGFP, generalmente, se reproducen los mismos efectos. Por lo tanto, es muy razonable esperar que uno o varios de estos reemplazos en sE₁FP sirvan para obtener mejores versiones de proteínas fluorescentes termoestables azules. Según este planteamiento, los reemplazos N146I, H148D, S175G, V206K en sE₁FP darán lugar a una variante, sSCFP3A, con mejoras similares a las descritas para SCFP3A y los reemplazos N146I, S175G, V206K reproducirán efectos similares a SCFP3B. La obtención de la versión termoestable de mTurquoise se haría mediante la reversión T65S en sSCFP3A, siendo posible obtener una variante similar a mTurquoise2 añadiendo además el reemplazo I146F. Cabe considerar además el posible efecto de los reemplazos en la posición Phe¹⁴⁵ de sE₁FP. Como ya se ha discutido, los reemplazos en esta posición pueden desplazar la lámina β_7 y afectar a \square_f . Como se vio, en algunas variantes derivadas de CFP la presencia de Ala¹⁴⁵ aumenta la estabilidad de la proteína a expensas de una disminución de \square_f . Pero por otro lado, se ha visto que combinada con Y66W puede aumentar \square_f , siendo esto algo que ocurre en nuestra variante sE₂FP. Si las variantes sSCFP3A, sSCFP3B y versiones superfolder de mTurquoise y mTurquoise2 no ven aumentado su \square_f , sería aconsejable considerar, por ejemplo, la mutagénesis saturante en la posición 145 de estas variantes de proteína fluorescente.

5.4.2 Variantes “verdes” y amarillas de sGFP.

El balance entre los procesos de emisión de energía (radiante o no radiante) por parte de las proteínas fluorescentes y su resistencia al inicio del desplegamiento cooperativo discutidos anteriormente determina la forma de los perfiles de desactivación por temperatura. Estos perfiles son de carácter monofásico en sPAFP, sV₂FP y sIFP y de carácter bifásico en el resto (figura 4.4).

Los reemplazos que justifican estas diferencias están próximos a la tríada 65, 66, 67 y en la región correspondiente a la cadena β_{10} (figura 4.1). Así, Thr²⁰³ es reemplazada por Ile en sS₁FP, sS₂FP y por Tyr en las proteínas amarillas termoestables (figura 4.1, Tabla 4.1). La ralentización en la pérdida de fluorescencia con respecto a la proteína parental sGFP (figura 4.4) ocurre seguramente gracias al efecto de T203I en el caso de sS₁FP y sS₂FP o gracias a T203Y en el caso de sV₂FP, sIFP y sPAFP. De hecho, el empaquetamiento de dos anillos aromáticos producido mediante T203Y, contribuiría a fortalecer el plegamiento dando lugar a moléculas más rígidas y robustas, con mayor resistencia a la desactivación y mayor capacidad de reactivación respecto al resto de variantes.

Otro reemplazo que parece contribuir aún más a esta mejora es Q69M, común a sS₂FP y sIFP (figura 4.1; Tabla 4.1). En estos dos últimos casos se trata de las variantes termoestables con mayor retardo en la desactivación y mejor capacidad de reactivación (figura

4.4; figura 4.5). Estructuralmente, la introducción del residuo voluminoso de Met⁶⁹ provoca cambios de conformación sobre las dos láminas β más próximas, que se desplazan debido a la interacción por contacto estérico entre Val¹⁵⁰ y Leu²⁰¹ con la Met⁶⁹. Otros residuos en el entorno local, incluyendo el cromóforo y la Tyr²⁰³ con apilamiento π , sufren cambios compensatorios, de modo que la mayoría de enlaces de hidrógeno e interacciones que empaquetan la estructura permanecen inalterados. Globalmente, Q69M conlleva la presencia de un residuo más voluminoso que impide la entrada de iones (p.ej. haluros) en la proximidad del cromóforo y la desactivación que esto conllevaría. Por último, aunque Q69M es muy ventajoso en las variantes amarillas, la presencia de Met⁶⁹ no es tolerada por las variantes azules porque, como su cromóforo se basa en Trp⁶⁶, que es muy voluminoso, no tolera un residuo voluminoso en su proximidad en la posición 69 (Griesbeck *et al.*, 2001).

5.4.4 Replegamiento de variantes termoestables.

Aunque se ha descrito que el efecto de la vibración térmica sería un proceso de reversión inmediata, la pérdida de plegamiento de la proteína requiere más tiempo para ser revertida (Kiss *et al.*, 2009). En el caso de las proteínas estudiadas en nuestro trabajo, la capacidad de revertir el proceso replegándose de nuevo hasta adquirir una conformación nativa es heterogénea (figura 4.5). Dicha heterogeneidad podría deberse a una distinta respuesta frente a modificaciones químicas como la desamidación, la formación de succinimidas o la oxidación que se aceleran a partir de 80 °C (Daniel *et al.*, 1996).

Los resultados de los ciclos de calentamiento y enfriamiento intermitente de 95 °C y 30 °C permiten valorar la contribución relativa del desplegamiento general de la proteína en la pérdida de fluorescencia (figura 4.7). Según esto, las proteínas con mayor capacidad de recuperar la fluorescencia a 30 °C en estos ciclos son aquellas en las que el plegamiento ocurre más rápidamente o en el que su desnaturalización a alta temperatura requiere más tiempo (Kiss C., *et al.*, 2009). En nuestro caso, sS₂FP recupera más del 80% de su fluorescencia inicial si se deja el tiempo necesario, lo cual indica una extraordinaria capacidad de recuperar su estructura nativa. Esto concuerda con su mayor resistencia a los ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento (figura 4.7). La razón que explica el comportamiento en ambos casos parece deberse especialmente al efecto de Q69M, reemplazo con el que se sustituye un residuo polar sin carga por uno neutro, algo que puede influir en las interacciones intramoleculares a la hora de replegar. Una observación que refuerza la afirmación sobre el posible papel de Met⁶⁹ en la mejora de la capacidad de plegamiento es la existencia de un efecto similar en las proteínas amarillas. Las variantes sYFP, sV₂FP y sPAFP tienen Gln⁶⁹. Los valores obtenidos en la recuperación de sYFP y sPAFP, sustituidos ambos en la posición 203, son muy bajos y similares. Parece que la presencia de Ala⁷² y Leu⁴⁶ en sV₂FP es la responsable de la mejora de la capacidad de replegar. El efecto de F46L es específico sobre proteínas amarillas, ya que no aporta las mejoras deseadas al ser introducido en eBFP, eCFP o eGFP (Nagai *et al.*, 2002) y carece de efecto alguno en Sapphire (Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003). Entre los papeles que se le atribuyen destacan la mejora del plegamiento, el

aumento en la velocidad de oxidación del cromóforo que conduce a un aumento en la velocidad y eficiencia de maduración a 37 °C. Se le atribuye menor efecto de forma aislada que junto con los reemplazos M153T/V163A/V175G, con los cuales, además mejora la resistencia a la acidosis y presencia de cloruro en el medio (Nagai *et al.*, 2002). Aunque Thr¹⁵³ y Ala¹⁶³ están presentes en sV₂FP, la ausencia de Gly¹⁷⁵ permite considerar el reemplazo en esta posición para la mejora del plegamiento. En cualquier caso, el efecto de los reemplazos en las posiciones 153 y 163 sobre sGFP para dar lugar a sV₂FP (figura 4.4; tabla 4.2; tabla 4.3) es coherente con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Nagai *et al.*, 2002).

5.5. Expresión en *Thermus thermophilus*

Una de las primeras aplicaciones de las proteínas fluorescentes fue como marcadores de la expresión génica. Esto se consiguió mediante su expresión en organismos filogenéticamente muy distintos al organismo del cual proceden (Chalfie *et al.*, 1994). La intensidad de emisión fluorescente por parte de estas proteínas depende, entre otros factores, de la eficiencia de maduración, de ϵ_A y de \square_f (Tsien, 1998; Shaner *et al.*, 2005; Ward, 2006). Sin embargo, entre los factores que condicionan su utilidad *in vivo* debemos incluir además el nivel de expresión de la proteína, el éxito en la adquisición de un plegamiento funcional dentro de la célula en estudio, la conservación de sus propiedades espectrales en niveles detectables y la capacidad de distinguir la señal correspondiente a la proteína de la señal de autofluorescencia de la célula en estudio o de la señal de ruido en el sistema empleado. En nuestro caso se ha confirmado mediante la expresión en el microorganismo termófilo *T. thermophilus* que todas las variantes termoestables de proteína fluorescente desarrolladas en nuestro trabajo se pliegan correctamente y adquieren un cromóforo funcional dentro de la célula en las condiciones de crecimiento de dicho microorganismo y a pesar de la elevada temperatura (figura 4.11). Además, la relación señal/ruido en cada caso permitió distinguir con facilidad la señal correspondiente a la proteína fluorescente en uso y la señal, prácticamente despreciable, de ruido o de fondo, a pesar de que *T. thermophilus* produce gran cantidad de pigmentos carotenoides (Costa *et al.*, 2006).

Los resultados de la expresión de las proteínas fluorescentes en *T. thermophilus* (figura 4.11) revelaron que estas no forman cuerpos de inclusión dentro de la célula, a pesar de que las condiciones en que se estudiaron los transformantes mediante microscopía confocal fueron de máxima producción de cada una de las variantes fluorescentes (figura 4.11.a - 4.11.d). Los resultados obtenidos demuestran su utilidad como marcadores de expresión génica y apuntan a que serán buenos testigos de localización empleados como proteínas de fusión. Dado que todas las variantes son funcionales en *T. thermophilus* y no tienen tendencia a formar agregados ni siquiera a elevadas concentraciones, la presencia de puntos de fluorescencia más intensa en células que producen proteínas de fusión de estas variantes a otras proteínas desvelarán que la formación de agregados se debe a la proteína problema y no a las proteínas fluorescentes. Este tipo de comprobaciones es importante a la hora de evitar construir

argumentos sobre observaciones artefactuales como se ha citado recientemente en el caso de la formación de filamentos helicoidales en bacterias. Aunque hasta hace poco tiempo se aceptaba ampliamente que la proteína MreB bacteriana es capaz de formar largos filamentos helicoidales, existen pruebas de que este hecho es debido a la disrupción de la interacción natural de MreB, a través de una hélice amino terminal de carácter anfipático, con la membrana, debido al efecto por parte de la proteína fluorescente con la que se fusionó, promoviendo de este modo su polimerización (Swulius y Jensen, 2012).

Otra aplicación de las proteínas fluorescentes termoestables puede basarse en el hecho de que la intensidad de fluorescencia emitida por parte de la célula productora de proteínas fluorescentes es directamente proporcional a la concentración de proteína producida (Pédelacq *et al.*, 2006). De este modo, la intensidad de fluorescencia será indicativa del nivel de expresión *in vivo* de la proteína fluorescente o de un producto de fusión de una proteína con dicha proteína fluorescente. Esto puede ser muy útil en el seguimiento de los niveles de producción de una determinada proteína de fusión bajo el control de un regulador determinado. En relación a esto, las diferencias en los niveles de intensidad de fluorescencia en imágenes de microscopía confocal serán un reflejo de las diferencias en la concentración de la proteína fluorescente en estudio según las zonas de la célula consideradas.

La producción de proteínas exógenas en hospedadores heterólogos conduce frecuentemente a fenómenos de toxicidad que pueden llevar incluso a la muerte celular. En el caso de las proteínas fluorescentes se ha citado la posible toxicidad debida a la formación de especies reactivas de oxígeno, altamente oxidantes, tóxicas y potencialmente letales (Tsien *et al.*, 1998; Bulina *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007). De hecho, existen aplicaciones basadas en el uso de fotosensores que generan especies reactivas de oxígeno tras la irradiación con luz (Bulina *et al.*, 2006). Este sería el caso de "KillerRed", una variante de proteína fluorescente que tras ser irradiada con luz genera gran cantidad de especies de oxígeno reactivas, cuyas aplicaciones incluyen el estudio de la señalización basada en ROS, el estudio de interacciones entre proteínas, e incluso la muerte celular selectiva en la terapia fotodinámica de modelos de cáncer mediante destrucción de tumores inducida por luz (Bulina *et al.*, 2006). La estructura de "KillerRed" indica que su fototoxicidad podría derivar de la existencia de un poro y un canal, relleno de moléculas de agua, que alcanza el cromóforo desde una de las bases del barril- β ; la presencia de dos residuos (Asn¹⁴⁵ y Thr²⁰¹) que estabilizan la forma *cis* del cromóforo y dos aminoácidos (Glu⁶⁸ y Ser¹¹⁹) adyacentes al cromóforo y cuyos residuos son los reactivos clave (Pletnev *et al.*, 2009). En el caso que nos ocupa, la cadena de reacciones de formación de especies potencialmente tóxicas comienza con la maduración del cromóforo. En este proceso se libera H₂O₂ en una relación 1:1 respecto a la concentración de proteína fluorescente (Tsien, 1998). Por lo tanto, el incremento en el nivel de producción de estas proteínas viene acompañado de un incremento de igual magnitud en la producción de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, no existe ningún efecto por parte de estas proteínas sobre la viabilidad celular (figura 4.11). Esto podría deberse, por un lado, a que el barril- β de las proteínas

5. DISCUSIÓN

fluorescentes puede estar apantallando al cromóforo, dificultando así la formación de especies reactivas de oxígeno (Surrey *et al.*, 1998; Greenbaum *et al.*, 2000), y a que, por otro lado, los seres vivos aerobios y aerotolerantes disponen de mecanismos para hacer frente a las especies reactivas de oxígeno que se forman como productos naturales del metabolismo celular. En concreto, *T. thermophilus* mitiga los efectos del estrés oxidativo reajustando la expresión de sus genes (Agari *et al.*, 2010). Además, en *T. thermophilus* existen enzimas relacionadas con la primera línea de respuesta frente al estrés oxidativo. Por un lado, una superóxido dismutasa dependiente de Mn e hipertermoestable que convierte aniones superóxido (O_2^-) en H_2O_2 y O_2 (Liu *et al.*, 2011) y, por otro lado, una catalasa dependiente de Mn que es capaz de desintoxicar la célula mediante la descomposición de H_2O_2 en H_2O y O_2 (Hidalgo *et al.*, 2004a; Hidalgo *et al.*, 2004b). Según nuestros resultados, los niveles de H_2O_2 producidos a las concentraciones de proteína fluorescente probadas *in vivo* no afectan la viabilidad de los cultivos de *T. thermophilus* (figura 4.11). Por lo tanto, en el caso de expresar como proteínas exógenas una proteína fluorescente y otra cualquiera en forma de fusión, si existe algún efecto de toxicidad, éste no se deberá a la proteína fluorescente.

Otro efecto nocivo asociado a la detección de la fluorescencia *in vivo* es el efecto de fototoxicidad. Este consiste en el daño inducido por la incidencia de luz y suele ocurrir como consecuencia de la exposición repetida o prolongada de las células marcadas, a la iluminación con láseres de lámparas de alta potencia (Scott *et al.*, 2007). A diferencia de otros fluoróforos, las proteínas fluorescentes no suelen ser fototóxicas, debido a que su cromóforo está profundamente enterrado en el interior de la envoltura de láminas- β que la protege (Shaner *et al.*, 2005). Sin embargo, varios trabajos sugieren que algunos compuestos como la riboflavina o el triptófano podrían también contribuir a efectos adversos inducidos por la luz (Spierenburg *et al.*, 1984; Silva *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1994; Lucius *et al.*, 1998). Por lo tanto, con el fin de evitar posibles efectos adversos en su aplicación en *T. thermophilus*, en el caso de necesitar un único marcador convendría elegir una de las variantes con mayor longitud de onda de excitación. De este modo, se minimizaría el efecto fototóxico del láser empleado para la excitación, ya que cuanto mayor sea su longitud de onda, menor será su energía, siendo así menor su efecto perjudicial. En este caso, de las proteínas termoestables derivadas de sGFP, la mejor elección sería una proteína amarilla, ya que, no sólo son las más termoestables (figura 4.4), sino que la longitud de onda en su óptimo de excitación es mayor que en el resto (figura 4.3). Además sus valores de ϕ_f son, por lo general, relativamente mayores que las variantes cian, verde-cyan y verdes (tabla 4.5).

5.6. Aplicación *in vivo* de las variantes de sGFP

5.6.1. Localización *in vivo* de proteínas

Entre las aplicaciones *in vivo* de las proteínas fluorescentes destaca su utilidad como testigos de la localización de proteínas y seguimiento de su dinámica a lo largo del tiempo de vida del modelo en estudio. Su aplicación con este propósito está muy extendida en el caso de organismos mesófilos (Chudakov *et al.*, 2005; Miyawaki *et al.*, 2005; Shaner *et al.*, 2005; Dixit *et al.*, 2006; Prescott *et al.*, 2006). La aplicación de sGFP como testigo de localización en microorganismos termófilos es relativamente reciente (Cava *et al.*, 2008). Las variantes obtenidas en nuestro trabajo amplían el repertorio de testigos termoestables que se pueden utilizar para este fin (figura 4.15; figura 4.16). La obtención de las fusiones sE₁FP-CasB, sIFP-CasB y sV₂FP-CasB permitió desvelar la localización de acumulaciones de la proteína CasB *in vivo* con cualquiera de los testigos empleados (figura 4.15). Si existe interferencia en el plegamiento o la maduración de cualquiera de los testigos empleados como proteína de fusión, este no impide la maduración funcional del testigo y permite su detección (figura 4.15).

5.6.2. Estudios mediante la segmentación por colores

Los estudios basados en la distinción de forma simultánea de proteínas fluorescentes de distintos colores están muy extendidos en el caso de organismos mesófilos, llegando a alcanzar grandes niveles de complejidad cromática, como en los estudios de la expresión combinatorial de proteínas fluorescentes para el cartografiado de circuitos neuronales y el estudio de las relaciones anatómicas neurona-neurona, neurona-células gliales y de células gliales entre sí, a partir del estudio del cerebro mediante el método “*Brainbow*” (Livet *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2011). Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se dispone de testigos termoestables con espectros de absorción y emisión cuya distinción es posible detectándolas por canales de fluorescencia distintos en los equipos de uso común en los centros de investigación (figura 4.13). Así por ejemplo, podrá estudiarse la dinámica o la localización de dos proteínas de forma simultánea si cada una de ellas se fusiona a un testigo de propiedades espectrales distinguibles entre sí.

5.6.3. Estudios de interacción basados en FRET

El uso de las proteínas fluorescentes en estudios de co-localización de proteínas ha sido ampliamente usado como apoyo a la demostración de la interacción entre proteínas *in vivo*. Sin embargo, la resolución espacial de la microscopía óptica es insuficiente para determinar si lo que se percibe como dos proteínas que co-localizan en un determinado compartimento de la célula es el resultado de una interacción real entre ellas. De ahí la conveniencia de optar por los estudios basados en FRET para demostrar la interacción entre

proteínas *in vivo* (Förster, 1948; Mitra *et al.*, 1996), ya que su resolución (entre 2-5 Å) es mucho mayor que la de la microscopía óptica y la existencia de señal FRET es una fiel demostración de la interacción entre proteínas *in vivo* (Periasamy *et al.*, 2008). Aunque esta técnica ha sido de amplio uso en mesófilos, la aplicación del FRET basado en el uso de proteínas fluorescentes en organismos termófilos no ha sido posible hasta el momento, debido a la ausencia de los correspondientes pares aceptor/donador termoestables.

Afortunadamente, nuestros resultados sientan las bases para aplicar FRET al estudio de la interacción proteína-proteína en organismos termófilos. En concreto, se han obtenido las variantes de proteína fluorescente termoestables que pueden actuar como pares FRET aceptor/donador. Esto es posible, por un lado, gracias al solapamiento del espectro de emisión de las proteínas fluorescentes termoestables sCFP, sE₂FP o sE₂'FP con el de absorción por parte de las amarillas sYFP, sV₁FP, sV₂FP o sIFP (figura 4.18). Por otro lado, se ha demostrado que su producción a elevada temperatura rinde fluoróforos funcionales incluso como proteína de fusión a otras proteínas (figura 4.15; figura 4.16). De modo que cualquier pareja formada por una proteína fluorescente termoestable azul (sCFP, sE₂FP o sE₂'FP) y una amarilla (sYFP, sV₁FP, sV₂FP o sIFP) puede actuar como par FRET para demostrar la interacción entre dos proteínas termoestables en *T. thermophilus* (figuras 4.18; figura 4.19).

Según lo descrito en el párrafo anterior los pares FRET resultantes de nuestro trabajo cumplen el criterio de solapamiento de espectros, la termoestabilidad y su funcionalidad a elevada temperatura incluso empleada como proteína de fusión. Sin embargo, existen otros factores, como la proximidad entre aceptor y donador, su orientación adecuada, la eficiencia en la transmisión de la señal del donador al aceptor y los niveles de producción de ambos tipos de fluoróforos y la relación de molaridad entre ellos, que pueden influir en el éxito para detectar claramente la señal FRET. Por ello, se consideró necesario obtener pruebas más fehacientes de su utilidad *in vivo* mediante la creación de un modelo que simulase la interacción entre proteínas de forma clara. Este modelo, basado en la interconexión de pares FRET donador y aceptor mediante una región flexible de unión, asegura la proximidad entre donador y aceptor y permite la orientación adecuada de los fluoróforos gracias a su flexibilidad. Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto la existencia de transferencia de energía mediante FRET dentro de la célula, probando definitivamente la utilidad de nuestros marcadores fluorescentes para estudiar la interacción proteína-proteína en microorganismos termófilos (figura 4.20).

5.7. Obtención de variantes derivadas de mCherry

La obtención de proteínas fluorescentes con espectros de emisión en la franja del rojo es de enorme interés. Esto se debe a que responden a la necesidad de marcadores para microscopía multicolor, se excitan a mayores longitudes de onda y, por lo tanto, su excitación da lugar a menor fototoxicidad, penetra mejor en las muestras en estudio y dan lugar a menor grado de dispersión de la luz (Scott *et al.*, 2007). Entre ellas, DsRed fue la primera proteína

fluorescente derivada de antozoos que se estudió en profundidad (Matz *et al.*, 1999). Aunque prometedora, esta proteína tiene algunas limitaciones de partida. En primer lugar, la maduración de su cromóforo es muy lenta ya que, aunque una vez adquirida la capacidad de emisión fluorescente su ϵ_{λ} es de $7,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y su ϕ_f es 0,7, el proceso tarda 27 h. En segundo lugar, durante su maduración, el cromóforo pasa por un estado intermedio en el que la mayor parte de la emisión fluorescente es de color verde, algo que no conviene en experimentos multicolor debido al solapamiento con el espectro de proteínas típicamente verdes (Baird *et al.*, 2000). Por último, DsRed es además un tetrámero obligado, algo que interfiere con su uso como proteína de fusión ya que, por ejemplo, da lugar a grandes agregados (Brooke *et al.*, 2002).

Los intensos esfuerzos de evolución dirigida han dado lugar a valiosas mejoras. Ejemplos a destacar son la eliminación de la tendencia a formar agregados obteniendo variantes monoméricas, trabajo que requirió más de 33 reemplazos en la secuencia de DsRed (Campbell *et al.*, 2002), el incremento de la tasa de maduración (mayor proporción de la proteína en su estado de color rojo que en el verde) (Rizzo y Piston, 2005), y el aumento de la intensidad fluorescente en términos de máxima señal dentro de la célula (Bevis y Glick, 2002; Rizzo y Piston, 2005). Pero además, la química de los cromóforos de proteínas rojas fluorescentes es más diversa y compleja que la de los cromóforos tipo GFP y, por lo tanto, tienen mucho mayor potencial para su selección, puesta a punto y diversificación (Subach *et al.*, 2011). Ejemplos que respaldan lo anterior son la diversidad que existe en la serie “mFruit”, derivada de DsRed (Shaner *et al.*, 2004) y el desarrollo de variantes capaces de conmutar entre dos estados con propiedades espectrales fácilmente distinguibles como es el caso de rsTagRFP (Subach *et al.*, 2010). Sin embargo, su uso se ha limitado a organismos mesófilos sin existir hasta el momento trabajos destinados a su aplicación en termófilos.

En nuestro trabajo, la obtención de variantes termoestables de RFP se abordó mediante evolución dirigida. Como proteína de partida se eligió mCherry por varios motivos. Es una proteína monomérica, lo cual ahorra el enorme esfuerzo por obtener variantes monoméricas a partir de proteínas de color rojo de otros organismos, como sería el caso de HcRed1, de *Heteractis crispera* (Gurskaya *et al.*, 2001), eqFP611, de *Entacmaea quadricolor* (Widenmann *et al.*, 2002), o AsRed2 y Jred, de *Anemonia sulfata* (Shagin *et al.*, 2004), pues todas ellas, además de tener baja eficiencia de maduración, tienden a formar dímeros o multímeros (Scott *et al.*, 2007). Además mCherry tiene, entre las candidatas de la serie “mFruit”, el espectro de mayor longitud de onda, la mayor fotoestabilidad, la maduración más rápida y una excelente tolerancia a los cambios de pH (Shaner *et al.*, 2004). Además, pertenece a una serie con una diversa gama de colores y bien caracterizada (Stepanenko *et al.*, 2011; Subach *et al.*, 2011). Esto, por un lado, convierte a los derivados termoestables de mCherry en buenos candidatos para su evolución mediante diseño racional basado, por ejemplo, en las relaciones estructura-función de la serie “mFruit” (Subach *et al.*, 2011). Por otro lado, también serán buenos candidatos para la evolución dirigida, ya que la serie “mFruit”

consta de proteínas monoméricas en las que con pocos reemplazos se pueden obtener diversos colores y proteínas distintas (Shaner *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2007). Por lo tanto, puede esperarse que ocurra lo mismo partiendo de una variante “mFruit” que ya es termoestable dando lugar a nuevas variantes termoestables con distintas propiedades espectrales en la franja del rojo.

Tras analizar la idoneidad de la proteína de partida y los métodos para evolucionarla *in vitro*, queda el paso más crítico, es decir, el empleo de un método de cribado o selección que permita rescatar las variantes que se ajusten a nuestro interés, en nuestro caso, una proteína roja que sea funcional tras producirse en un organismo termófilo a 70 °C. Una posibilidad considerada para la producción de mCherry en *T. thermophilus* es que puede que no se pliegue adecuadamente debido a que las interacciones intramoleculares e intermoleculares que intervienen en su plegamiento, no se establecen adecuadamente si la proteína no posee las adaptaciones necesarias para ello. Esto motivó la elección inicial de un método de selección basado en la fusión mCherry-Kat (figura 4.28) de manera análoga al sistema de termoselección descrito en Chautard *et al.* 2007. Según esto, cabría esperar que las variantes de mCherry que no se pliegan bien interfieran con el plegamiento de Kat. La funcionalidad de esta última quedaría anulada impidiendo el crecimiento de colonias en un medio con una determinada concentración de kanamicina. Así podríamos haber establecido unas condiciones de temperatura y concentración de Kanamicina óptimas para seleccionar mutantes de mCherry con mejoras en su capacidad de plegamiento a altas temperaturas.

Los resultados obtenidos por esta vía (figura 4.28), es decir, la ausencia de efecto claro de la concentración de kanamicina o de la temperatura, en los rangos considerados, parece indicar que la capacidad de plegamiento por parte de mCherry no es el factor determinante de la ausencia de fluorescencia. De modo que se pensó en otro factor que pudiera estar impidiendo la utilidad de mCherry en *T. thermophilus*. En concreto, las fracciones de cultivo de *T. thermophilus* que expresaron mCherry a 70 °C y se incubaron posteriormente a temperaturas moderadas (4 °C, 22 °C ó 37 °C) adquirieron niveles detectables de fluorescencia (figura 4.29) y esto apunta al proceso de maduración del cromóforo como factor clave. Aunque mCherry madura con gran rapidez y eficiencia comparado con el resto de proteínas fluorescentes rojas cuando se expresa en *E. coli* (Shaner *et al.*, 2004), como se ha podido comprobar, esto no es extensible a su producción a elevada temperatura en *T. thermophilus*. De modo que la clave para la aplicación de variantes rojas en *T. thermophilus*, al menos en el caso de aplicar mCherry, parece estar en la mejora de la velocidad de maduración. Según nuestros resultados (apartado 4.2), no se detectó en ningún caso fluorescencia azul o verde, que correspondería con un estado intermedio de maduración del cromóforo (Stepanenko *et al.*, 2011; Subach *et al.*, 2011). Esto apunta a que el paso limitante de la maduración del cromóforo tipo DsRed que tiene mCherry, cuando se expresa en *T. thermophilus*, es la ciclación inicial, la primera oxidación o la combinación de ambos pasos. De modo que la adquisición de configuración *cis* y la segunda oxidación, que da lugar a la formación del

cromóforo de color rojo, es lo suficientemente rápida como para que una vez formado el intermediario azul, se convierta en un cromóforo tipo DsRed casi de forma instantánea, haciendo que la detección del estado del cromóforo de color verde no se perciba cuando se observan las muestras al microscopio confocal.

Aunque no se caracterizó en detalle la cinética de maduración de las variantes obtenidas a partir de mCherry, el tiempo de maduración estimado para todas ellas es inferior a 1 h a 37 °C, tras haber sido expresadas en cultivos de *T. thermophilus* (figura 4.29). Por lo general, los reemplazos seleccionados en nuestro trabajo tras el cribado de las variantes de mCherry resultantes de la mutagénesis aleatoria no coinciden con posiciones a las que se asocie alguna mejora según los trabajos descritos en la bibliografía. El reemplazo Y177H es una excepción ya que esta posición se asoció con el incremento del brillo y tasa de maduración en mRFP1, si bien en aquel caso el reemplazo F177V es de distinta naturaleza (Campbell *et al.*, 2002). Otro reemplazo vinculado a la mejora del brillo y tasa de maduración en mRFP1 es V71A (Campbell *et al.*, 2002). Aunque no coinciden exactamente con esa posición, su proximidad a ella y el hecho de haber sido seleccionadas en el cribado de nuestro trabajo hace pensar que los reemplazos Y72N y G73S de la variante B1D1 pueden tener un papel en la mejora del brillo y/o maduración de mCherry. Por último, el reemplazo Q113L es común a las variantes B1D1 y C1E1 de nuestro trabajo (figura 4.31). El hecho de que estas dos variantes se seleccionaran a partir de genotecas distintas y que este reemplazo sea el único presente en la variante C1E1 respalda su posible papel en la mejora del brillo y tasa de maduración de mCherry, lejos de haber sido seleccionado por otras causas, como por ejemplo, el sesgo de las genotecas (figuras 4.24 - 4.27). Es decir que, aunque las genotecas obtenidas en nuestro trabajo son sesgadas (figuras 4.21 - 4.24), ninguna de las posiciones coincide con *hot spots* mutagénicos derivados del sesgo en la obtención de las genotecas (figura 4.26), lo que respalda su posible papel en la mejora de las variantes obtenidas, más allá de su selección por el mero azar.

Los niveles de fluorescencia que se adquieren dentro de las células de *T. thermophilus* permiten su detección cuando se emplea como único marcador fluorescente (figura 4.29; figura 4.30) pero también permite su distinción cuando se emplea en experimentos en que se usan varios marcadores de forma simultánea (figura 4.32). El logro ideal será la obtención de variantes termoestables de mCherry que maduren con eficiencia en cultivos de *T. thermophilus* sin la necesidad de incubarlo posteriormente a temperaturas moderadas. Aunque esto todavía no se ha conseguido, nuestros resultados han permitido determinar un método de selección adecuado para conseguir este fin gradualmente mediante ciclos iterativos de evolución dirigida.

Un planteamiento alternativo a la evolución dirigida en ciclos iterativos podría basarse en un diseño racional sobre la base de resultados obtenidos en trabajos anteriores. Aunque algunos de los reemplazos descritos en estos trabajos se acompañan de efectos no deseados, no dejan de ser interesantes. De este modo, aunque N42Q aumenta el máximo de absorción a

5. DISCUSIÓN

488 nm, acelera la maduración del cromóforo; T21S se asocia a la disminución de la emisión verde y la aceleración de la velocidad de maduración del cromóforo; H41T, V44A y P(-4)L se asocian al aumento del brillo; R2A, K5E y N6D aumentan la solubilidad y T217A y A145P reducen la emisión verde. DsRedT4 es una variante de DsRed que gracias a ser portadora de todos estos reemplazos su tiempo de vida medio es de 0,7 h. DsRedT3 es una variante similar que mantiene Ala²¹⁷, lo cual implica que aunque madura igual de rápido y conserva algo de emisión verde, es más brillante (Bevis y Glick, 2002).

6. CONCLUSIONES

Como fruto de este trabajo y la discusión y contraste razonado de los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de las técnicas de ingeniería de proteínas mediante diseño racional utilizando la variante sGFP como parental, permite obtener variantes de proteína fluorescente con las propiedades espectrales modificadas.
2. Las modificaciones en las propiedades espectrales a consecuencia de los reemplazos en la secuencia primaria de sGFP realizados en este trabajo, corresponden en gran medida con lo esperado de acuerdo al efecto descrito, según la bibliografía, para estas mutaciones en variantes de GFP no termoestables.
3. La caracterización *in vitro* de las 14 variantes de proteínas fluorescentes termoestables llevada a cabo en este trabajo revela una dinámica de desactivación monofásica en el caso de las proteínas amarillas y bifásica para el resto. En todos los casos la termoestabilidad es suficiente para su uso en el microorganismo termófilo *Thermus thermophilus*.
4. Las variantes de proteína fluorescente termoestable desarrolladas en este trabajo constituye una herramienta de localización de proteínas en *T. thermophilus* mediante su uso como moléculas testigo.
5. La aplicación de las variantes termoestables de proteínas fluorescentes desarrolladas en nuestro trabajo puede hacerse de forma aislada o combinando proteínas fluorescentes con distintas propiedades espectrales, gracias a que su observación mediante microscopía confocal y citometría de flujo permite distinguirlas por canales no solapantes.
6. El solapamiento de espectros de emisión de sCFP, sE₁FP, sE₂FP con el de absorción de sYFP, sIFP, sV₁FP y sV₂FP y los resultados obtenidos utilizando el modelo de pares FRET termoestables unidos mediante una región de enlace respaldan el uso de FRET en *Thermus thermophilus* como prueba de interacción entre proteínas.
7. En el caso de la proteína fluorescente mCherry el problema que se debe afrontar para su aplicación en el microorganismo termófilo *Thermus thermophilus* no es la mejora del plegamiento de la estructura de la proteína sino la eficiencia de maduración de su cromóforo.
8. La estrategia de evolución dirigida mediante mutagénesis aleatoria partiendo de la secuencia primaria de mCherry y posterior cribado basado en imágenes de *scanner* de fluorescencia, es un método adecuado para obtener variantes termoestables de proteína fluorescente con maduración eficiente del cromóforo y con espectro de emisión en torno al rojo.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht, S.C., Barata, A.G., Großhans, J., Teleman, A.A. y Dick, T.P. (2011). In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell Metabolism*, **14**:819-829.

Agari, Y., Kuramitsu, S. y Shinkai, A. (2010). Identification of novel genes regulated by the oxidative stress-responsive transcriptional activator SdrP in *Thermus thermophilus* HB8. *FEMS Microbiol. Lett.* **313**:127-134.

Aharoni, A., Amitai, G., Bernath, K., Magdassi, S., Tawfik, D.S., (2005). High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments. *Chem. Biol.*, **12**(12):1281-1289.

Ai, H., Henderson, J.N., Remington, S.J. y Campbell, R.E. (2006) Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem. J.* **400**:531-540.

Akerboom, J., Rivera, J.D., Guilbe, M.M., Malavé, E.C., Hernandez, H.H., Tian, L., Hires, S.A., Marvin, J.S., Looger, L.L y Schreiter, E.R. (2009). Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J. Biol. Chem.* **284**:6455–6464.

Arnold, F.H. y Volkov, A.A. (1999). Directed evolution of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:54-59.

Atsushi Miyawaki. (2011). Proteins on the move: insights gained from fluorescent protein technologies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **12**(10):656-668.

Babiak, P. y Reymond, J.L., (2005). A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support. *Anal Chem.*, **77**(2):373-377.

Baird, G.S., Zacharias, D.A. y Tsien, R.Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**(22):11984-11989.

Betzig, E., Patterson G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W. Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J. y Hess, H.F. (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, **313**:1642–1645.

Bevis, B.J. y Glick, B.S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.*, **20**(1):83-87.

Binz, H.K., Stumpp, M.Y., Forrer, P., Amstutz, P. y Plückthun, A. (2003). Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J. Mol. Biol.*, **332**, 489-503.

Biteen, J. S., Thompson, M.A., Tselentis, N.K., Bowman, G.R., Shapiro, L. y Moerner, W.E. (2008) Super-resolution imaging in live *Caulobacter crescentus* cells using photoswitchable EYFP. *Nature Methods*, **5**(11):947–949.

Bloom, J.D., Labthavikul, S.T., Otey, C.R. y Arnold, F.H. (2006) Protein stability promotes evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**:5869-5874.

Bloom, J.D., Romero, P.A., Lu, Z. y Arnold, F.H. (2007). Neutral genetic drift can alter promiscuous protein functions, potentially aiding functional evolution. *Biol. Direct.*, **2**:17.

Bokman, Stephen H. y Ward, William W. (1981). Renaturation of *Aequorea* green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **101**(4):1372-1380.

- Bornscheuer, U.T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C. y Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, **485**:185-194.
- Bornscheuer, U.T. y Kazlauskas, R.J., (2011). Survey of protein engineering strategies. *Current protocols in protein science*. 26.7.1-26.7.14.
- Brock, T.D. y Edwards, M.R. (1970). Fine structure of *Thermus aquaticus*, an extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, **104**(1):509-517.
- Brock, T.D. y Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. And sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **98**(1):289-297.
- Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanuchevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlayak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S. y Lukyanov, K.A. (2006). A genetically encoded photosensitizer. *Nature Biotechnology*, **24**:95-99.
- Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., Britanova, O.V., Onichtchouk, D., Lukyanov, S. y Chudakov, D.M. (2006). Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nature protocols*, **1**(2):947-953.
- Campbell, T.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.s., Zacharias, D.A., y Tsien, R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *PNAS U.S.A.* **99**:7877-7882.
- Cava, F., de Pedro, M.A., Blas-Galindo, E., Waldo, G.S., Westblade, L.F. y Berenguer, J. (2008) Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures *in vivo*: a tool to study extreme thermophile biology. *Environmental Microbiology*, **10**(3):605-613.
- Cava, F., Hidalgo, A. y Berenguer, J., (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles*, **13**:213-231.
- Cava, F., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlafla, Z., Blas-Galindo, E., Gómez-Puertas, P. y Berenguer, J. (2007). Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Molecular Microbiology*, **64**(3):630-646.
- Connolly A.R. y Sutherland, J.D. (2000). Catalyst screening using an array of thermistors. *Angew. Chem. Int Ed Engl.*, **39**:4268-4271.
- Costa, M.S., Rainey, F.A. y Nobre, M.F. (2006). The genus *Thermus* and relatives. *Prokaryotes*, **7**:797-812.
- Chattoraj, M., King, B.A., Bublitz, G.U. y Boxer, S.G. (1996). Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**:8362-8367.
- Chautard, H., Blas-Galindo, E., Menguy, T., Grand'Moursel, L., Cava, F., Berenguer, J. y Delcourt, M. (2007). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nat Methods*, **4**(11):919-921.
- Chen, K y Arnold, F.H. (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *PNAS U.S.A.* **90**:5618-5622.
- Chung, A.P., Rainey, F.A., Valente, M., Nobre, M.F. y da Costa, M.S. (2000). *Thermus igniterrae* sp. nov. and *Thermus antranikianii* sp. nov., two new species from Iceland. *Int. J. Syst. Evol. Microbial.* **50**(1):209-217.
- Ckurshumova, W., Caragea, A.E., Goldstein, R.S. y Berleth, T. (2011) Glow in the dark: fluorescent proteins as cell and tissue-specific markers in plants. *Molecular plant*, **4**(5):794-804.

- Coco, W.M., Levinson, W.E., Crist, M.J., Hektor, H.J., Darzins, A., Pienkos, P.T., Squires, C.H. y Monticello, D.J. (2001). DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nature biotechnology*, **19**:354-359.
- Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. y Stemmer W.P.C. (1995). Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling. *Nature Biotechnology*, **14**:315-319.
- Cramer, A., Raillard, S-A, Bermudez, E. y Stemmer, W.P.C. (1998). DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, **391**:288-291.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, X.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., y Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* **20**(11):448-455.
- Cubitt, A.B., Wollenweber, L.A. y Heim, R. (1999) Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* **58**:19-30.
- Daniel, R.M., Dines, M. y Petach, H.H. (1996). The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. *Biochem J.*, **317**:1-11.
- Day, R.N. (2005). Imaging protein behaviour inside the living cell. *Molec. Cell. Endocrin.* **230**:1-6.
- Delagrave, S., Hawtin, R., Silva, C., Yang, M. y Youvan, D. (1995) Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **13**:151-154.
- Dinh, T. y Bernhardt, T.G., (2011). Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *Journal of bacteriology.* 193(18):4984-4987.
- Dopf, J. y Horiagon, T.M. (1996). Deletion mapping of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene*, **173**:39-44.
- Farinas, E.T., Bulter, T. y Arnold, F. H. (2001). Directed enzyme evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:545-551.
- Fasman, G. D. (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. *Plenum Pub. Corp.*
- Fernández-Herrero, L. A., Badet-Denisot, M.A., Badet, B. y Berenguer, J. (1995). glmS of *Thermus thermophilus* HB8: an essential gene for cell-wall synthesis identified immediately upstream of the S-layer gene. *Mol. Microbiol.*, **17**(1):1-12.
- Förster, T. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**:55-75.
- Fox, R.J., Davis, S.C., Mundorff, E.C., Newman, L.M., Gavrilovic, V., Ma, S.K., Chung, L.M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J.C., Sheldon, R.A. y Huisman, G.W. (2007). Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nature biotechnology*, **25**(3):338-344.
- Frommer, W.B., Davidson, M.W. y Campbell, R.E. (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem. Soc. Rev.*, **38**(10):2833-2841.
- Galperin, E., Verkhusha, V.V. y Sorkin, A. (2004). Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells. *Nat. Methods.*, **1**(3):209-217.
- Gautam, S. G., Perron, A., Mutoh, H. y Knopfel, T. (2009). Exploration of fluorescent protein voltage probes based on circularly permuted fluorescent proteins. *Front. Neuroengineering* **2**:14.

Goedhart, J., Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M.A., Weeren, L., Gadella, T.W.J. y Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications.*, **3**:751. doi: 10.1038/ncomms17381.

Goedhart, J., Weeren, L., Hink, M. A., Vischer, N.O.E., Jalink, K. y Gadella, T.W.J. (2010). Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nature Methods*, **7**(2):137-139.

Goddard, J.P. y Reymond, J.L. (2004). Enzyme assays for high-throughput screening. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**:314-322.

Gibbs, M.D., Nevalainen, K.M.H y Bergquist, P.L. (2001). Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene*, **271**:13-20.

Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K. y Tsien, R.Y. (2000). The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**(22):11990-11995.

Gupta, R.D. y Tawfik, D.S. (2008). Directed enzyme evolution via small and effective neutral drift libraries. *Nature methods*, **5**(11):939-942.

Gurskaya, N.G., Fradkov, A.F., Terskikh, A., Matz, M.V., Labas, Y.A., Martynov, V.I., Yanushevich, Y.G., Lukyanov, K.A. y Lukyanov, S.A. (2001). GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett.* **507**:16-20.

Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F. y Nelson, K. E. (2005) A guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas subtypes exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Comput Biol.*, **1**(6):e60.

Hanahan, D. (1983). Studies on the transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

Hanson, G.T., Aggeler, R., Pglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R.A., Tsien, R. Y. y Remington, S. J. (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* **279**(13):13044-13053.

Heim, R., Prasher, D.C. y Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *PNAS, USA.* **91**:12501-12504.

Heim, R. y Tsien, R. Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol.*, **6**(2):178-82.

Herman, A. y Tawfik, D.S. (2007). Incorporating synthetic oligonucleotides via gene reassembly (ISOR): a versatile tool for generating targeted libraries. *Protein engineering design and selection*, **20**(5):219-226.

Hidalgo, A., Betancor, L., Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. y Berenguer, J. (2004). *Thermus thermophilus* as a cell factory for the production of a thermophilic Mn-dependent catalase which fails to be synthesized in an active form in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(7):3839-3844.

Hidalgo, A., Betancor, L., Mateo, C., Lopez-Gallego, F., Moreno, R., Berenguer, J., Guisán, J.M. y Fernández-Lafuente, R. (2004). Purification of a catalase from *Thermus thermophilus* via IMAC chromatography: effect of the support. *Biotechnol.*, **20**:1578-1582.

Hidalgo, A., Schliessmann, A., Molina, R., Hermoso, J. y Bornscheuer, U.T., (2008). A one-pot, simple methodology for cassette randomisation and recombination for focused directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**(9):567-576.

- Höhne, M., Schätzle, S., Jochens, H., Robins, K. y Bornscheuer, U.T. (2010) Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nature Chem. Biol.* **6**:807-813.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. y Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.*, **9**(4):789-798.
- Hu, C.D. y Kerppola, T.K. (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat. Biotechnol.* **21**(5):539-545.
- Hudson, J.A., Morgan, H.W. y Daniel, R.M. (1987). *Thermus filiformis* sp. nov., a filamentous caldoactive bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**(4):431-436.
- Jézéquel, L., Loeper, J. y Pompon, D. (2008). Sequence-independent construction of ordered combinatorial libraries with predefined crossover points. *BioTechniques*, **45**(5):523-532.
- Jochens, H., Aerts, D. y Bornscheuer, U.T. (2010). Thermostabilization of an esterase by alignment-guided focussed directed evolution. *Protein Engineering, Design and selection*, **23**(12):903-909.
- Jochens, H. y Bornscheuer, U.T. (2010). Natural diversity to guide focused directed evolution. *ChemBioChem*, **11**:1861-1866.
- Joo, H., Lin, Z.L., y Arnold, F.H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. *Nature*, **399**:670-673.
- Jore, M.M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J.B., Westra, E.R., Waghmare, S.P., Wiedenheft, B., Pul, U., Wurm, R., Wagner, R., Beijer, MR., Barendregt, A., Zhou, K., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Doudna, J.A., Boekema, E.J., Heck, A.J., van der Oost, J. y Brouns, S.J.(2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol.*, **18**(5):529-536.
- Kaltwasser, M., Wiegert, T. y Schumann, W., (2002) Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, **68**(5):2624-2628.
- Kashiwagi, K., Isogai, Y., Nishiguchi, K-I y Shiba, K. (2006). Frame shuffling: a novel method for *in vitro* protein evolution. *Protein engineering, design and selection*, **19**(3):135-140.
- Kazlauskas, R.J. y Bornscheuer, U.T. (2009). Finding better engineering strategies. *Nature chemical Biology*, **5**(8):526-529.
- Kikuchi, M., Ohnishi, K., y Harayama, S. (1999). Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene*, **236**:159-167.
- Kim, H.K. y Kaang, B.K. (1998). Truncated green fluorescent protein mutants and their expression in *Aplysia* neurons. *Brain. Res. Bull.*, **47**:35-41.
- Kiss, C., Temirov, J., Chasteen, L., Waldo G.S. y Bradbury, A.R.M. (2009). Directed evolution of an extremely stable fluorescent protein. *Protein engineering, design and selection*. **22**(5):313-323.
- Khersonsky, O. y Tawfik, D.S. (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**:471-505.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C. Y Tawfik, D.S. (2006). Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, **10**:498-508.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Kolkman, J.A. y Stemmer, W.P.C., (2001). Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nature biotechnology*, **19**:423-428.
- Kristjánsson, J.K., Hjörleifsdóttir, S., Marteinnsson, V.T. y Alfredsson, G.A. (1994). *Thermus scotoductus*, sp. nov., a pigment-producing thermophilic bacterium from hot tap water in Iceland and including thermos sp. X-1. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**(1):44-50.
- Kuipers, R.K., Joosten, H.-J., van Berkel, W.J.H., Leferink, N.G.H., Rooijen, E., Ittmann, E., van Zimmeren, F., Jochens, H., Bornscheuer, U., Vriend, G., Martins dos Santos, V.A.P. & Schaap, P.J. (2010). 3DM: Systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* NA–NAdoi:10.1002/prot.22725
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F. y Wyss, M. (2000). The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**:408-415.
- Lehmann M, Loch C, Middendorf A, Studer D, Lassen SF, Pasamontes L, van Loon AP y Wyss M. (2002). The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Prot. Eng.* **15**(5):403-411.
- Lehmann, M. y Wyss, M. (2001). Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**(4):371-375.
- Lennox, E. X. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, **1**:190-206.
- Lim, C.R., Kimata, K., Oka, M., Nomaguchi, K. y Kohono, K. (1995). Thermosensitivity of a green fluorescent protein utilized to reveal novel nuclear-like compartments. *J. Biochem.*, (Tokyo), **118**:13-17.
- Lippincott-Schwartz, J. y Patterson. G.H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, **300**:87-91.
- Li WF, Zhou, XX y Lu, P. (2005). Structural features of thermozyms. *Biotechnol. Adv.*, **23**:271-281.
- Liu, J., Yin, M., Zhu, H., Lu, J. y Cui, Z. (2011). Purification and characterization of a hyperthermostable Mn-superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*. **15**:221-226.
- Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, **450**, 56–62.
- Lossau, H., Kummer, A., Heinecke, R., Pöllinger-Dummer, F., Kompa, C., Bieser, G., Jonsson, T., Silva, C.M., Yang, M.M., Youvan, D.C. y Michel-Boyerle, M.E. (1996). Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant green fluorescent proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions. *Chem Phys*, **213**:1-16.
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G. y Tsien, R.Y. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**(12):6803-6808.
- Lutz, S., Ostermeier, M. y Benkovic, S.J. (2001a). Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using α -phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Research*, **29**(4):e16.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G.L., Maranas, C.D. y Benkovic, S.J. (2001b). Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *PNAS*, **98**(20):11248-11253.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark, D.P. (2009) Brock Biology of Microorganisms. *Pearson Education, Inc.* Cap.6.
- Maehara, T., Hochino, T. y Nakamura, A. (2007). Characterization of three putative Lon proteases of *Thermus thermophilus* HB27 and use of their defective mutants as hosts for production of heterologous proteins. *Extremophiles.*, **12**(2):285-296.
- Manaia, C. M., Hoste, B., Gutierrez, M. C., Gillis, M., Ventosa, A., Kersters, K. y da Costa, M. S. (1994). Halotolerant *Thermus* strains from marine and terrestrial hot springs belong to *Thermus thermophilus* (ex Oshima and Imahori, 1974) nom. Rev. emend. *Syst Appl. Microbiol.* **17**(4):526-532.
- Markwardt, M.L., Kremers, G-J., Kraft, C.A., Ray, K., Cranfill, P.J.C., Wilson, K.A., Day, R.N., Wachter, R.M., Davidson, M.W. y Rizzo, M.A. (2011). An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS ONE*, **6**(3):e17896.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnol.* **17**(10):969-973.
- Miesenböck, G., de Angelis, D.A., y Rothman, J.E., (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, **394**:192-195.
- Miller, W.G. y Lindow, S.E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene*, **191**:149-153.
- Mirabella, R., Franken, C., Krogt, G.N.M, Bisseling, T. y Geurts, R. (2004) Use of the Fluorescent Timer DsRED-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants. *Plant Physiol.*, **135**(4):1879-1887.
- Mitra, R.D., Silva, C.M. y Youvan, D.C. (1996) Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*, **173**:13-17.
- Morley, K.L. y Kazlauskas, R.J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.*, **23**(5):231-237.
- Mulepati, S., y Bailey, S. (2011) Structural and biochemical analysis of the nuclease domain of the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) associated protein 3 (Cas3). *J Biol Chem*, **286**(36):31896-31903.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, April:36-43.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. y Miyawaki, A. (2002). A variant of Yellow Fluorescent Protein with Fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, **20**:87-90.
- Neuman, N y Sztzke, G. (1990). Circular dichroism of proteins. *Proteins and M. Purton, eds.* (Cambridge: Elsevier Trends Journals); pp. 107-116.
- Nguyen, P.Q. y Jonathan, J.S., (2010). A selection that reports on protein-protein interactions within a thermophilic bacterium. *Protein engineering, design and selection*, **23**(7):529-536.
- Olenych, S.G., Claxton, N.S., Ottenberg, G.K. y Davidson, M. W. (2007). The Fluorescent Protein Color Palette. *Current Protocols in Cell Biology*. 21.5.1-21.5.34.
- Oshima, T. e Imahori, K. (1974). Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a non-sporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**(1):102-112.

- Ostermeier M, Nixon AE, Shim JH y Benkovic SJ., (1999a). Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *PNAS*, **96**(7):3562-7.
- Ostermeier, M., Shim, J.H. y Benkovic, S.J. (1999b). A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature biotechnology*, **17**:1205-1209.
- Packhomov, A. A. y Martynov, V.I., (2008). GFP family: structural insights into spectral tuning. *Chemistry and Biology*, **15**(8):755-764.
- Park, S., Morley, K.L., Horsman, G. P., Holmquist, M., Hultz, K. y Kazlauskas,R.J. (2005). Focusing mutations into the *P. fluorescens* esterase binding site increases enantioselectivity more effectively than distant mutations. *Chem. Biol.*, **12**(1):45-54.
- Patterson, G.H. y Lippincott-Schwartz, J. (2002). A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, **297**:1873-1877.
- Pédelacq, J-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. y Waldo G.S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, **24**(1):79-88.
- Perozzo, M.A., Ward, K.B., Thompson, R.B. y Ward, W.W. (1988). X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of Aequorea green fluorescent protein crystals. *J. Biol. Chem.* **263**:7713-7716.
- Phillips Jr. y George N., (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current opinion in structural biology*, **7**:821-827.
- Piston, D.W. y Kremers, G-J., (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *TRENDS in biochemical sciences*, **32**(9):407-414.
- Pletnev, S., Gurskaya, N.G., Pletneva, N.V., Lukyanov, K.A., Chudakov, D.M., Martynov, V.I., Popov, V.O., Kovalchuk, M.V., Wlodawer, A., Dauter, Z. y Pletnev, V. (2009). Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed. *Journal of Biological Chemistry*. **284**(46):32028-32039.
- Polizzi, K.M., Chaparro-Riggers, J.F., Vázquez-Figueroa, E. & Bommarium, A.S. (2006). Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase. *Biotechnology Journal* **1**, 531–536
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, Y. y Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**:598-599.
- Qian, Z. y Lutz, S. (2005). Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**:13466-13467.
- Quesada-Gómez, C. (2008). Daño y respuesta al estrés oxidativo en bacterias del género *Bacteroides*: resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de virulencia. *Rev. Biomed.* **19**:162-168.
- Remington, S.J., (2006). Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Current opinion in structural biology*, **16**:714-721.
- Romero, P.A. y Arnold, F.H., (2009). Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. *Nature reviews molecular cell biology*, **10**:866-876.
- Rizzo, M.A., Springer G. H., Granada, B. y Piston, D.W. (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology*, **22**:445-449.
- Reetz, M.T y Carballeira, J.D., (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature protocols*, **2**(4):891-903.

- Reetz, M.T., Carballeira, J.D. y Vogel, A., (2006). Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**:7745-7751.
- Reetz, M.T., Kahakeaw, D. y Renate Lohmer. (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *ChemBioChem*, **9**:1797-1804.
- Reetz, M.T. y Sanchis, J., (2008). Constructing and analyzing the fitness landscape of an experimental evolutionary process. *ChemBioChem*, **9**:2260-2267.
- Reetz, M.T., Wang, L-W y Bocola, M., (2006). Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of CASTing for probing protein sequence space. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**:1236-1241.
- Reetz, M.T. y Wu, S., (2008). Greatly reduced amino acid alphabets in directed evolution: making the right choice for saturation mutagenesis at homologous enzyme positions. *Chem. Bommun.*, 2008, **43**:5499-5501.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. y Studier, F. W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**(1):125-135.
- Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A.M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., Gallaher, J.L., Althoff, E.A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S, Houk, K.N., Tawfik, D.S. y Baker, D., (2008). Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*, **453**(7192):190-195.
- Salazar, O. y Sun, L. (2003). Evaluating a screen and analysis of mutant libraries. *En: Directed Enzyme Evolution. Screening and Selection Methods*. Ed. Arnold, F.H. y Georgiou, G. *Humana Press, Totowa, New Jersey* (EEUU) pp. 85-97.
- Sankaranarayanan, S. y Ryan, T. A., (2000). Real-time measurements of vesicle-SNARE recycling in synapses of the central nervous system. *Nature Cell Biol.* **2**:197-204.
- Sawano, A. y Miyawaki, A., (2000). Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, **28**(16):e78(i-vii).
- Schmidt-Dannert, C. Y Arnold, F.H. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trends Biotechnol.* **17**(4):135-136.
- Shagin, D.A., Barsova, E.V., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Labas, Y.A., Semenova, T.N., Ugalde, J.A., Meyers, A., Nuñez, J.M., Widder, E.A., Lukyanov, S. y Matz, M.V. (2004). GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* **21**(5):841-850.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. y Davidson, M. W., (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science*, **120**(24):4247-4260.
- Shaner, N. C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. y Tsien, R.Y., (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, **22**(12):1567-1572.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A. y Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods.* **2**:905-909.
- Shimomura, O., Johnson F.H. y Saiga, Y., (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **59**:223-239.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Shivange, A.V., Marienhagen, J., Mundhada, H., Schenk, A. y Shwaneberg, U., (2009). Advances in generating functional diversity for directed protein evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**:19-25.
- Shkrob, M.A., Yanushevich, Y.G., Chudakov, D.M., Gurskaya, N.G., Labas, Y.A., Poponov, S.Y., Mudrik, N.N., Lukyanov, S. y Lukianov, K.A. (2005). Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from *Actinia equina*. *Biochem. J.*, **392**(3):649-654.
- Shyu, I.J. y Hu, C.D. (2008). Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research. *Trends Biotechnol.*, **26**(11):622-630.
- Sieber, V., Martinez, C.A. y Arnold, F.H., (2001). Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nature biotechnology*, **19**:456-460.
- Stemmer, W.P. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **91**(22):10747-10751.
- Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Shcherbakova, D.M., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K. y Verkusha, V.V., (2011) modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *Biotechniques*, **51**(5):313-327.
- Subach, F.V., Piatkevich, K.D. y Verkusha, V.V., (2011). Directed molecular evolution to design advanced red fluorescent proteins. *Nature methods*, **8**(12):1019-1026.
- Subach, F.V., Zhang, L., Gadella, T.W.J., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A. y Verkhusha, V.V. (2010). Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET. *Chemistry and Biology.* **17**:745-755.
- Swulius, M.T. y Jensen, G.J. (2012). The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag. *J. Bacteriol.* **194**(23):6382-6386.
- Tawik, D.S. y Griffiths, A.D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.*, **16**:652-656.
- Tormos, K.V. y Chandel, N.S. (2011). Seeing the light: probing ROS in vivo using redox GFP. *Cell Metabolism*, **14**:720-721.
- Tsien, R. Y., (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509-544.
- Turner, N.J. (2003). Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, **21**:474-478.
- Valencia-Burton, M., McCullough, R. M., Cantor, C. R. y Broude, N. E., (2007). RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation. *Nature Methods* **4**:421-427.
- Van den Brulle, J. (2008). A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques*, **45**(3):340-343.
- Van Duijn, E., Barbu, I.M., Barendregt, A., Jore M.M., Wiedenheft, B., Lundgren, M., Westra, E.R., Brouns, S.J., Doudna, J.A., van der Oost, J. y Heck, A.J. (2012). Native tandem and ion mobility mass spectrometry highlight structural and modular similarities in clustered-regularly-interspaced short-palindromic-repeats (CRISPR)-associated protein complexes from *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cell. Proteomics.*, **11**(11):1430-1441.
- Vazquez-Figueroa, E., Yeh, V., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F. & Bommarium, A.S. (2008). Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media. *Protein Eng., Des. Sel.* **21**, 673-680

- Vieille, C. y Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**:1-43.
- Wachter, R.M., Elsliger, M.A., Kallio, K., Hanson, G.T. y Remington, S.J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, **6**(10):1267-1277.
- Wagner, A. (2008) Robustness and evolvability: a paradox resolved. *Proc. Biol. Sci.*, **275**, 91-100.
- Wahler, D. y Reymond, J.L. (2001). High-throughput screening for biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:535-544.
- Waldo, G. S., Standish, B.M., Berendzen, J. y Terwilliger, T.C. (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, **17**:691-695.
- Wang, L., Jackson, W.C., Steinbach, P.A. y Tsien, R.Y., (2004). Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *PNAS*. **101**(48):16745-16749.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. y Doudna, J. A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, **482**:331-338.
- Widenmann, J., Schenk, A., Röcker, C., Girod, A., Spindler, K.D. y Nienhaus, G.U. (2002). A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria). *Proc Natl Acad Sci. USA*. **99**(18):11646-11651.
- Williams, G.J., Nelson, A.S., y Berry, A. (2004). Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**:3034-3046.
- Williams, R.A.D., Smith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J. y Sharp., R.J. (1995). DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to re-establish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**(3):495-499.
- Williams, R.A.D., Smith, K.E., Welch, S.G. y Micallef, J. (1996). *Thermus oshimai* sp. nov., isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of *Thermus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(2):403-408.
- Weissman, T.A., Sanes, J.R., Lichtman, J.W. y Livet, J. (2011). Generating and imaging multicolour Brainbow mice. *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top114.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**(2):221-271.
- Wong, T.S., Roccatano, D., Zacharias, M. y Schwaneberg, U. (2006). A statistical analysis of current random mutagenesis methods for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.* **335**:858-871.
- Wong, T.S., Zhurina, D. y Schwaneberg, U. (2006). The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **9**:271-289.
- Wong, T.S., Tee, K.L., Hauer, B. y Schwaneberg, U. (2005). Sequence Saturation Mutagenesis with tunable mutation frequencies. *Anal. Biochem.* **341**:187-189.
- Wong, T.S., Tee, K.L. y Schwaneberg, U. (2004). Sequence Saturation Mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**:e26.
- Wong, T.S., Roccatano, D., Loakes, D., Tee, K.L., Schenk, A., Hauer, B. y Schwaneberg, U. (2008). Transversion enriched sequence saturation mutagenesis (SeSaM-T⁺): a random mutagenesis method with consecutive nucleotide exchanges that complements the bias of error-prone PCR. *Biotechnol. J.*, **3**:74-82.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Wong, T.S., Roccatano, D. y Schwaneberg, U. (2007). Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environ. Microbiol.* **9**:2645-2659.
- Yang, F., Moss, L.G. y Phillips, G.N. Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, **14**(10):1246-1251.
- Yang, W., Wang, H., Dong, J., Xy, Z., Shen, Y., Sun, Y., Liu, X., Li, Z., Lei, H. y Du, X. (2012) Cloning, expresion, purification, and characterization of novel single-chain variable fragment antibody against the 2-nitrobenzaldehyde derivative of a furaltadone metabolite in *Escherichia coli*. *Protein, Expr Pur.* **84**(1):140-146.
- Yang, T.T., Kain, S.R., Kitts, P., Kondepudi, A., Yang, M.M. y Youvan, D.C. (1996) Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant. *Gene*, **173**:19-23.
- Zacharias, D. A., Violin, J.D., Newton, A.C. y Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, **296**:913-916.
- Zanghellini, A., Jiang, L., Wollacott, A.M., Cheng, G., Meiler, J., Althoff, E.A., Röthlisberger, D. y Baker, D. (2006). New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design. *Protein Sci.*, **15**(12):2785-2794.
- Zapata-Hommer, O. y Griesbeck, O., (2003). Efficiently folding and circularly permuted variants of the sapphire mutant of GFP. *BMC Biotechnology*, **3**, 5.
- Zhao, H.M. y Arnold, F.H. (1997). Combinatorial protein design: strategies for screening protein libraries. *Current Opinion in Structural Biology*, **7**:480-485.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A. y Arnold, F.H. (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature biotechnology*, **16**:258-261.
- Zhao, H., Moore, J.C., Volkov, A.A., y Arnold, F.H., (1999). Method for optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Manual of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 597-604.
- Zhao, H. y Zha, W. (2006). In vitro "sexual" evolution through the PCR-based staggered extension process (StEP). *Nature protocols*, **1**(4):1865-1871.
- Zhang, H., Wang, S., Sun, Q. y Smith, S.C. (2009) Kinetic isotope effect for ground state proton transfer in the green fluorescent protein: a quantum-kinetic model. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**:8422-8424.
- Zhang, J, Campbell, R.E., Ting, A.Y. y Tsien, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**:906-918.

ANEXO I

Anexo I.I. Tablas anexas.

Tabla I. Cepas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15), hsdR17, recA, endA1, gyrA96, thi¹, relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>hsdS, gal (λcl⁸⁵⁷, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1)</i>	(Rosenberg <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> XL1	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi¹ hsdR17 supE44 relA1 lac. [F⁺ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> JM110	<i>rpsL thr leu thi¹ lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F⁺ traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985). Stratagene..
<i>T. thermophilus</i> HB27	Silvestre	Cedida por el Dr. Koyama
<i>T. thermophilus</i> HB27 WHITE		Obtenida en el laboratorio.

Tabla II: plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pET28b(+)	Kan ^r , <i>lacI</i> , promotor de T7. Vector para la expresión de genes dirigida por la RNA polimerasa del fago T7. Se puede obtener una proteína de fusión con 6 histidinas en N-terminal o en C-terminal.	Novagen
pMKnqo	Kan ^r , utilizado para clonar fusiones.	Cava <i>et al.</i> 2007
pMKsGFP	Kan ^r . Derivado de pMK18. Expresa <i>sgfp</i> bajo el control del promotor <i>PslpA</i> .	Cava <i>et al.</i> , 2007
pMHnqosGFP	Derivado de pMH184 por inserción del fragmento <i>Pnqo-sGFP</i> desde pMKPnqo-sGFP, clonado a XbaI/HindIII.	Cava <i>et al.</i> 2007
pMK184	Kan ^r . Deriva de pMK18 y su sitio de multiclonaje tiene diana <i>Bam</i> HI única.	Cava <i>et al.</i> 2007
pMH185	Plásmido derivado de pMH184	Cava <i>et al.</i> 2007
pNCK	Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>kat</i> en <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III desde pUC18Rep. Hacia 5' de <i>kat</i> hay una secuencia que codifica 9 aminoácidos. Empleado como vector para genotecas de mutantes de mCherry y ensayos de termoestabilidad.	Chautard <i>et al.</i> 2007
pNCK-mcherry	Derivado de pNCK por inserción del gen que codifica la proteína mCherry clonada en <i>Nco</i> I/ <i>Not</i> I. Control en ensayos de termoestabilidad.	Este trabajo.
pET28-rejA	(pUT18-dnrS, pKT25dnrS). Utilizado para obtener <i>dnrS</i> mediante PCR.	Cava <i>et al.</i> 2007
pGreenTIR	Utilizado para obtener <i>egfp</i> mediante PCR	Miller y Lindow, 1997
<i>pMutin-yfp</i> (ECE151)	Utilizado para obtener <i>eyfp</i> mediante PCR	Kaltwasser <i>et al.</i> 2002.
<i>pMutin-cfp</i> (ECE150)	Utilizado para obtener <i>ecfp</i> mediante PCR	Kaltwasser <i>et al.</i> 2002.
pET28b(+)-dnrT	Kan ^r . Derivado de pET28b con <i>dnrT</i> clonado en <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI. Se usó para obtener el gen <i>dnrT</i> mediante digestión del plásmido con <i>Nco</i> I/ <i>Cla</i> I.	Cava <i>et al.</i> 2007

Plásmido	Descripción	Referencia
pET28b(+)-dnrS	Kan ^r . Derivado de pET28b(+) con <i>dnrS</i> clonado en <i>NdeI/EcoRI</i> . Se usó para obtener el gen <i>dnrS</i> mediante PCR.	Cava <i>et al.</i> 2007
pMKnarC	Kan ^r . Vector derivado del pMKPnqobgaA mediante sustitución del gen <i>bgaA</i> por <i>narC</i> en las dianas <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007
pMHnarC	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se ha clonado <i>Pnqo-rbsnarC</i> procedente de pMKnarC insertándolo en <i>XbaI/HindIII</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007
pMKPnqo-sGFP	Kan ^r . Obtenido mediante la sustitución del gen testigo <i>bgaA</i> de pMKnqobgaA por el gen <i>sgfp</i> , que codifica sGFP, precedido por un sitio de policlonaje y una región espaciadora flexible para la fusión traduccional a <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007
pMKPnqo-sGFP-narC	Kan ^r . Vector derivado de pMKPnqoSFP para la expresión de la fusión NarC-sGFP insertada en las dianas <i>BcuI/Clal</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007
pMHPnqo-sGFP	Hyg ^r . Vector derivado de pMH184 en el que se clonó <i>sgfp</i> , precedido de un sitio de multiclonaje y un brazo espaciador flexible, para la expresión de proteínas de fusión controlada por el promotor <i>Pnqo</i> (<i>XbaI/HindIII</i>)	Cava <i>et al.</i> 2007
pMHPnqo-sGFPnarC	Derivado de pMHPnqoSFP con el gen <i>narC</i> clonado en las dianas <i>BcuI/Clal</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007
pMH-PhoA-sGFP	Derivado de pMHPnqoSFP con el gen <i>phoA</i> clonado mediante inserción en <i>BcuI/CLAI</i>	Cava <i>et al.</i> 2007
pMHPnqo-dnrT-scfp	Derivado de pMHnqo-scfp por inserción direccional de <i>dnrT</i> en las dianas <i>NcoI</i> y <i>Clal</i> .	Cava <i>et al.</i> 2007

Tabla III: Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Utilidad en este trabajo
pMKPnqo-sXFP.	Derivados de pMKPnqo en los que se clonó un gen que codifica una variante termoestable de proteína fluorescente.	Expresión de proteínas fluorescentes termoestables en <i>T. thermophilus</i>
pET28b(+)-sXFP.	Derivados de pET28b(+) en los que se clonó uno de los genes que codifica una variante termoestable de proteína fluorescente.	Producción en masa de proteínas fluorescente en <i>E. coli</i> DE3. Obtención de proteína pura.
pMKPnqo-CasB-sE ₁ FP, pMKPnqo-CasD-sE ₁ FP, pMKPnqo-CasE-sE ₁ FP.	Derivados de pMKnqo-sE ₁ FP en los que se clonó en fase y como fusión al gen <i>se₁fp</i> el gen <i>casB</i> , <i>casD</i> o <i>casE</i> respectivamente.	Expresión de fusiones CasB-sE ₁ FP, CasD-sE ₁ FP y CasE-sE ₁ FP en <i>T. thermophilus</i> para localización y FRET.
pMHPnqo-CasA-sV ₂ FP, pMHPnqo-CasB-sV ₂ FP, pMHPnqo-CasD-sV ₂ FP, pMHPnqo-CasE-sV ₂ FP.	Derivados de pMHPnqo-sV ₂ FP en los que se clonó en fase y como fusión al gen <i>sV₂FP</i> el gen <i>casA</i> , <i>casB</i> , <i>casD</i> o <i>casE</i> respectivamente.	Expresión de fusiones CasA-sV ₂ FP, CasB-sV ₂ FP, CasD-sV ₂ FP y CasE-sV ₂ FP en <i>T. thermophilus</i> . Experimentos de localización y FRET.
pMHPnqo-CasB-sIFP	Derivado de pMHPnqo-sIFP en el que se clonó el gen <i>sIFP</i> fusionado a <i>casB</i> .	Expresión de CasB-sIFP en <i>T. thermophilus</i> para localización y FRET.
pMH185-sE ₁ FP-dnrS, pMH185-sE ₂ FP-dnrS, pMH185-sV ₁ FP-dnrS, pMH185-sV ₂ FP-dnrS, pMH185-sIFP-dnrS	Derivados de pMH185 en los que se clonó un gen que codifica una proteína fluorescente termoestable, indicado en cada caso, fusionado con el gen de <i>T. thermophilus</i> <i>dnrS</i> .	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de la proteína DnrS fusionada a una variante de proteína fluorescente termoestable según el caso. Experimentos de localización y FRET.
pMH185-sE ₁ FP-dnrT, pMH185-sE ₂ FP-dnrT, pMH185-sV ₁ FP-dnrT, pMH185-sV ₂ FP-dnrT, pMH185-sIFP-dnrT	Derivados de pMH185 en los que se clonó un gen resultante de la fusión de un gen que codifica una proteína fluorescente termoestable, indicado en cada caso, con el gen de <i>T. thermophilus</i> <i>dnrT</i> .	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de la proteína DnrT fusionada a una variante de proteína fluorescente termoestable según cada caso. Experimentos de localización y FRET.
pMK184-sE ₁ FP-dnrS, pMK184-sE ₂ FP-dnrS, pMK184-sV ₁ FP-dnrS, pMK184-sV ₂ FP-dnrS, pMK184-sIFP-dnrS	Derivados de pMK184 en los que se clonó un gen de fusión de un gen que codifica una proteína fluorescente termoestable, indicado en cada caso, con el gen de <i>T. thermophilus</i> <i>dnrS</i> .	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de la proteína DnrS fusionada a una variante de proteína fluorescente termoestable según cada caso. Experimentos de localización y FRET.

Plásmido	Descripción	Utilidad en este trabajo
pMK184-sE ₁ FP-dnrT, pMK184-sE ₂ FP-dnrT, pMK184-sV ₁ FP-dnrT, pMK184-sV ₂ FP-dnrT, pMK184-sIFP-dnrT	Derivados de pMK184 en los que se clonó un gen de fusión de un gen que codifica una proteína fluorescente termoestable, indicado en cada caso, con el gen de <i>T. thermophilus</i> <i>dnrT</i>	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de DnrS fusionada a una proteína fluorescente termoestable según cada caso. Experimentos de localización y FRET.
pMK184-sE ₁ FP, pMK184-sE ₂ FP, pMK184-sV ₁ FP, pMK184-sV ₂ FP, pMK184-sIFP	Derivados de pMK184 en los que se clonó un gen que codifica la proteína fluorescente termoestable que se indica en cada caso.	Expresión de proteínas fluorescentes termoestables en <i>T. thermophilus</i> empleado como control en el FRET.
pMH185-sE ₁ FP, pMH185-sE ₂ FP, pMH185-sV ₁ FP, pMH185-sV ₂ FP, pMH185-sIFP	Derivados de pMH185 en los que se clonó un gen que codifica la proteína fluorescente termoestable que se indica en cada caso.	Expresión de proteínas fluorescentes termoestables en <i>T. thermophilus</i> empleado como control en el FRET.
pMHpnqo-sIFP-CheA, pMHpnqo-sIFP-CheX, pMHpnqo-sIFP-CheY	Derivados de pMHpnqo portadores de la fusión del gen <i>sifp</i> con un gen que expresa la proteína CheA, X o Y de <i>T. maritima</i> indicado en cada caso.	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de sIFP fusionada CheA, CheX o CheY según el caso, para FRET y localización.
pMKpnqo-sE ₁ FP-CheA, pMKpnqo-sE ₁ FP-CheX, pMKpnqo-sE ₁ FP-CheY	Derivados de pMKpnqo portadores de la fusión del gen <i>se₁fp</i> con un gen que expresa la proteína CheA, X o Y de <i>T. maritima</i> indicado en cada caso.	Expresión en <i>T. thermophilus</i> de sE ₁ FP fusionada a la proteína CheA, CheX o CheY según el caso. Experimentos de FRET y localización.
pGreenTIR-sin <i>NdeI</i>	Derivado de pGreenTIR. Tiene una mutación silente en <i>egfp</i> para eliminar la diana <i>NdeI</i> presente y poder clonarlo en pET28b(+).	Molde para amplificar <i>egfp</i> y clonarlo en pET28b(+)

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados.

Pareja	Nombre	Secuencia 5'-3'	T _m (°C)
1	Y66H_fw	GTCACTACTCTGACCCACGGTGTTCATGCTTT	64
	Y66H_rv	AAAGCATTGAACACCGTGGGTGAGTAGTGAC	64
2	Y66W_fw	GTCACTACTCTGACCTGGGGTGTTCATGCTTT	64
	Y66W_rv	AAAGCATTGAACACCCAGGTGAGTAGTGAC	64
3	Y66W/S72A_fw	TGACCTGGGGTGTTCATGCTTTGCCGTTATCCGG	69
	Y66W/S72A_rv	CCGGATAACGGGCAAAGCATTGAACACCCAGGTCA	69
4	Y145A/H148D_fw	GGACACAACTCGAGTACAACGCTAACTCAGACAATGTATACATCACGGCAG	71
	Y145A/H148D_rv	CTGCCGTGATGTATACATTGTCTGAGTAGCCTTGTACTCGAGTTTGTGTCC	71
5	T203Y_fw	AACCATTACCTGTCGTACCAATCTGCTTTTCG	63
	T203Y_rv	CGAAAGGACAGATTGGTACGACAGGTAATGGTT	63
6	A206K_fw	CCATTACCTGTCGACACAATCTAAGCTTTTCAAAGATCCCAACGAAA	68
	A206K_rv	TTTCGTTGGGATCTTTCGAAAGCTTAGATTGTGTCGACAGGTAATGG	68
7	L221K/F223R_fw	AACGAAAAGCGTGACCACATGGTCTTAAAGGAGCGTAACTGCTGCTGGGATTACAC	74
	L221K/F223R_rv	CTTCAACGTTGTGGCGAATTTGAAGTTAGCCTGGATTCCATTCTTTTG	69
8	T203I_fw	AGACAACCATTACCTGTCGATACAATCTGCTTTTCG	64
	T203I_rv	CGAAAGGACAGATTGTATCGACAGGTAATGGTTGTCT	64
9	Q69M/C70V_fw	CTTGTCACTACTCTGACCTATGGTGTATGGTCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAA	72
	Q69M/C70V_rv	TTTCATGTGATCCGGATAACGGGAAAAGACCATAACACCATAGGTCAGAGTAGTGACAAG	72
10	F46L_fw	CAAACGGAAAACCTCACCCCTTAAATTAATTTGCACTACTGGAAAACCTA	65
	F46L_rv	TAGTTTTCCAGTAGTGCAAATTAATTTAAGGGTGAGTTTTCCGTTTG	65
11	S72A_fw	TGACCTATGGTGTTCATGCTTTGCCGTTATCCGG	67
	S72A_rv	CCGGATAACGGGCAAAGCATTGAACACCATAGGTCA	67
12	V68L/Q69M_fw	CCAACACTTGTCACTACTCTGACCTATGGTCTTATGTGCTTTTCCCGTTATC	70
	V68L/Q69M_rv	GATAACGGGAAAAGCACATAAGACCATAGGTCAGAGTAGTGACAAGTGTGG	70
13	T203H_fw	ACCAGACAACCATTACCTGTCGCATCAATCTGTCTTTCCGAAAAGATC	69
	T203H_rv	GATCTTTCCGAAAAGGACAGATTGATGCGACAGGTAATGGTTGTCTGGT	69

Tabla V. Medios de cultivo.

Nombre	Composición	Referencia
LB (Luria Bertani)	Bacto-triptona 10 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 5 g·L ⁻¹ , NaCl 5 g·L ⁻¹ , pH=7,5	(Lennox, 1955)
SOC	Bacto-triptona 20 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 5g·L ⁻¹ , NaCl 0,5 g·L ⁻¹ , KCl 0,2 g·L ⁻¹ , MgCl ₂ 10 mM, MgSO ₄ 20 mM, Glucosa 0,3 % (p/v)	(Hanahan, 1983)
TB _F	Bacto-triptona 8 g·L ⁻¹ , extracto de levadura 4 g·L ⁻¹ , NaCl 3 g·L ⁻¹ , pH=7,5 (suspensión en agua mineral Fontjaraba)	(Fernández-Herrero, 1995)

Tabla VI. Soluciones y tampones.

Nombre	Composición	Utilidad en este trabajo
1x Tampón TAE	Tris-acetato 40 mM pH=8,0, EDTA 1 mM	Electroforesis de ADN: preparación de geles de agarosa y electroforesis
10X Tampón de carga de DNA	TAE 10X, glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v), cianol de xileno FF 0,25 % (p/v)	Electroforesis de ADN: Preparación de muestras
5x Tampón de lisis y carga Laemmli	Tris-HCl 300 mM pH=6,8, SDS 5 % (p/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), glicerol 50 % (v/v), azul de bromofenol 0,002 % (p/v), EDTA 25 mM	SDS-PAGE: Preparación de muestras de proteínas
5X Tampón <i>running</i>	Tris 125 mM pH 8,8, glicina 1 M, SDS 20 mM	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes
Tampón de transferencia	Tris 48 mM pH 8,5, glicina 39 mM, SDS 0,037 % (p/v) y metanol 20 %	Transferencia de proteínas a membrana de PVDF en semiseco
1X TBS-Tween20	Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %	Preparación de la solución de bloqueo y dilución de los anticuerpos para los ensayos de <i>Western blot</i>
Solución de revelado	Luminol, luciferina, 0,1 M Tris, pH 7,8, H ₂ O ₂ 0,006 % (v/v)	Revela la presencia de anticuerpo secundario en los resultados de WB.
Solución de bloqueo	Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1 %, 3 % leche desnatada.	Preparación de la solución de bloqueo y dilución de los anticuerpos para los ensayos de <i>Western blot</i>
Solución de teñir Proteínas	Coomassie R250 0,1 % (p/v), ácido acético glacial 10 % (v/v), metanol 20 % (v/v)	Teñir proteínas en gel tipo SDS-PAGE
Solución de desteñir proteínas	Acido acético glacial 10 % (v/v), metanol 40 % (v/v)	Desteñir proteínas en gel tipo SDS-PAGE
2X Tampón de separación	0,75 M Trizma Base, pH 8,8	Ingrediente del gel de separación de proteínas mediante SDS-PAGE.
2X Tampón de concentración	Trizma Base, pH 6,8	Ingrediente del gel de concentración de proteínas mediante SDS-PAGE.
1X <i>tampón fosfato</i>	0,05 M Fosfato de sodio, pH 7,0/8,0	Como ingrediente de otros tampones y para el lavado de algunos materiales.
1X <i>Tampón de lavado</i>	0,05 M Fosfato de sodio, 0,3 M NaCl, pH7,0	Para lavar resinas de cromatografía de afinidad.
1X <i>Tampón de lavado con imidazol</i>	0,05 M Fosfato de sodio, 0,3 M NaCl, 0,01 M Imidazol, pH 7,0	Para eliminar especies químicas con uniones débiles a la resina de cromatografía de afinidad.
1X <i>Tampón de equilibrado</i>	0,05 M Fosfato de sodio, 0,3 M NaCl, pH8,0	Equilibrado del pH de la resina.

Tabla VII. Antisueros empleados para *Western-blot* en este trabajo.

Nombre	Descripción	Referencia
α -DnrT	Anticuerpo de conejo contra DnrT de <i>T. thermophilus</i> NAR1 desnaturalizada.	Cava, F. <i>et al.</i> 2007
α -dnrS	Anticuerpo de conejo contra DnrS, de <i>T. thermophilus</i> NAR1, desnaturalizada.	Cava, F. <i>et al.</i> 2007
α -GFP	Anticuerpo IgG1 de ratón contra la proteína avGFP desnaturalizada.	Roche
α -6His	Anticuerpo de ratón contra 6 His.	Invitrogen
Ds-red <small>monoclonal</small>	Anticuerpo de ratón que reconoce proteínas tipo mCherry desnaturalizadas	Clontech
GAM-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa de rábano.	Biorad
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano.	Biorad

Tabla VIII. Productos comerciales.

Nombre	Descripción	Referencia
Compuestos de uso general		
Trizma Base	Amina primaria con capacidad de tampón.	Sigma-Aldrich
Tween-20	Detergente aniónico.	Sigma-Aldrich
Sveltesse (Leche desnatada)	Leche pasteurizada desnatada y deshidratada.	Nestlé
Coomassie Brilliant Blue ^R	En solución acuosa es un ácido que experimenta un cambio de color al reaccionar con proteínas, principalmente cuando interacciona con residuos básicos y aromáticos de aminoácidos, especialmente con arginina.	Sigma-Aldrich
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético. Agente quelante.	Sigma
Azul de coomassie	Colorante en polvo para preparar la solución de teñir proteínas.	Serva
Betaína	Empleado en la mejora del rendimiento de la PCR.	Sigma
Cloruro de cobalto	Sólido seco usado en solución para regenerar resina con cobalto.	Sigma
DMSO	Dimetilsulfóxido en formato sólido o líquido. Solutu compatible empleado como disolvente orgánico.	Sigma
Etanol 96 % (v/v)	Empleado como disolvente y desinfectante.	VWR-Prolabo
Metanol	Empleado como disolvente.	Sigma
Formaldehido 37 % (v/v)	Fijación de células previa a su observación en el microscopio.	Merck
Ácido acético glacial	Cristaliza a baja temperatura.	Panreac
Glicerol 85 % (v/v)	Trialcohol higroscópico. Previene la ruptura de células a -80 °C.	Merck
SDS (Dodecil sulfato sódico)	Preparado sólido. Empleado en solución como agente caotrópico.	Merck
NaCl	Cloruro sódico de alta pureza.	Merck
Extracto de levadura	Contiene vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento.	Pronadisa
Tryptone	Hidrolizado de caseína empleado en la preparación de medio rico.	Pronadisa
Agar bacteriológico	Empleado para crear una matriz sólida en medios de cultivo.	Pronadisa
Bromuro de etidio	Agente intercalante, anaranjado bajo el efecto de la luz U.V.	Biorad.
<i>Agarosa low EEO</i>	Agarosa apta para gel analítico y preparativo.	Laboratorios Conda
<i>Antarctic Phosphatase</i>	Cataliza la eliminación de grupos fosfato 5' de DNA y RNA.	New England Biolabs, Inc.
<i>TALON^R CellThru Resin</i>	Resina con cobalto para purificar proteínas unidas a colas de polihistidina a partir de productos de lisis celular.	Clontech
BIO-RAD Poly-Prep Chromatography Columns	Columnas para el empaquetado de las resinas de purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.	Biorad
Three-way Stopcock	Llaves de 3 vías para controlar el flujo de la cromatografía.	SARSTEDT
<i>Biorad protein assay</i>	Basado en el cambio de color experimentado por la solución ácida de azul brillante de Coomassie ^R principalmente cuando interacciona con residuos básicos y aromáticos de aminoácidos de proteínas solubles presentes en el medio. Especialmente con arginina.	Biorad
<i>30 % Acrylamide/Bis-Acrylamide solution 29:1 (3,3 %C)</i>	Mezcla de Acrilamida:bisacrilamida para preparar la fase de gel de concentración en la separación de proteínas mediante SDS-PAGE.	Biorad

Nombre	Descripción	Referencia
Compuestos de uso general		
40% Acrylamide/Bis-Acrylamide solution 37,5:1 (2,6%C)	Mezcla de Acrilamida:bisacrilamida para preparar la fase de gel de separación en la separación de proteínas mediante SDS-PAGE.	Biorad
IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)	Análogo no metabolizable de alolactosa. Utilizado como inductor de expresión de genes de interés regulada sobre el operador mixto <i>promotor T7-operador lac</i> en el sistema pET28b(+) en <i>E. coli</i> BL21. el IPTG actúa desestabilizando el represor Lac (producto de <i>lacI</i>).	Sigma
Antibióticos		
Kanamycin (<i>Kan</i>)	Aminoglucósido cuya unión al ribosoma 70 S causa errores de lectura del RNA mensajero.	Sigma
Hygromycin	Aminoglucósido que Inhibe la síntesis de proteínas en bacterias, hongos y células eucariotas mediante la interferencia con la translocación ribosomal provocando errores de traducción de RNA mensajero.	Sigma
Ampicillin (<i>Amp</i>) (Britapen)	Inhibe la formación de enlaces cruzados del peptidoglicano, inhibiendo así la formación de la pared celular.	Laboratorios Reig Jofré.
Tetraciclín (<i>Tet</i>)	Inhibe la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la unión de aminoacil-tRNA al <i>sitio A</i> de los ribosomas.	Fluka
Enzimas de restricción		
<i>NdeI</i>	Corte escalonado en secuencias palíndromas 5'-CA*TATG-3'	Fermentas
<i>HindIII</i>	Corte escalonado en secuencias palíndromas 5'-A*AGCTT-3'	Fermentas
<i>NotI</i>	Corte escalonado de secuencias palíndromas 5'-GC*GGCCGC-3'	Fermentas
<i>NcoI</i>	Corte escalonado de secuencias palíndromas 5'-C*CATGG-3'	Fermentas
<i>XbaI</i>	Corte escalonado en secuencias palíndromas 5'-T*CTAGA-3'. Sensible a la metilación del DNA.	Fermentas
<i>ClaI</i>	Corte escalonado en secuencias palíndromas 5'-AT*CGAT-3'. Sensible a la metilación del DNA.	Fermentas
<i>EcoRI</i>	Corte escalonado en secuencias palíndromas 5'-G*AATTC-3'	Fermentas
<i>DpnI</i>	Enzima de <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41 con especificidad de corte y generación de extremos romos sobre secuencias palíndromas con metilación tipo dam 5'-Gm6A*TC-3'. Para cortar el DNA necesita la presencia de N6-metiladenina en la secuencia que reconoce.	Fermentas
<i>Fast Digest^R DpnI</i>	Actúa igual que <i>DpnI</i> , pero requiere menor tiempo de digestión.	Fermentas
Enzimas polimerasa y otras enzimas de modificación de DNA		
<i>PfuPlus polymerase</i>	DNApolimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i> , termoestable y de alta fidelidad.	EURx
<i>Tth polymerase</i>	DNA polimerasa termoestable de <i>Thermus thermophilus</i> .	Biotools
<i>Pfu polymerase</i>	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i> termoestable y de alta fidelidad.	Biotools
<i>T4 DNA ligase</i>	DNA ligasa del fago T4	Promega
USER TM Enzyme	Mezcla de Uracil DNA glicosilasa (UDG) y DNA glicosilasa endonucleasa VIII.	New England Biolabs, Inc.

Nombre	Descripción	Referencia
Marcadores de peso molecular		
<i>GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder, ready-to-use</i>	Marcador de tamaño de fragmentos de DNA entre 100 pb y 3 kpb.	Fermentas
<i>GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder, ready-to-use</i>	Marcador de tamaño de fragmentos de DNA entre 75 pb y 20 kpb.	Fermentas
<i>Lambda DNA/HindIII</i>	DNA de fago λ digerido con <i>HindIII</i> . Bandas entre 0,125 kpb y 23 kpb.	CBMSO
<i>Phi-29</i>	Digestión de DNA de fago Phi29. Bandas entre 72 pb y 4,37 kpb.	CBMSO
<i>ProSieve® Color Protein Marker</i>	Marcador de migración en gel de proteína desnaturalizada. Preteñido en bandas de color azul y rojo.	Lonza Rockland, Inc,
<i>Precision Plus Protein Unstained Standards</i>	Marcador de migración en gel de proteínas desnaturalizadas. Bandas entre 10 kDa y 250 kDa.	Biorad
Kits comerciales		
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Para limpiar directamente productos de PCR o extraer DNA de interés a partir de gel de agarosa. Basado en la adhesión del DNA a filtros con tamaño de poro adecuado, lavado y elución.	Promega
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System	Para obtener plásmidos de alta pureza mediante la adhesión del DNA de interés a un filtro en columna, lavado y posterior elución.	Promega
Material de laboratorio		
Whatmann™ 3MM	Papel (0,8 mm) de celulosa pura a partir de pelusa de algodón.	GE Healthcare
Immobilon-Transfer Membrane	Membrana de Fluoruro de Polivinildieno apta para la adhesión de proteínas mediante <i>Western-blot</i> .	Millipore
Curix RP-2 Plus Medical X-ray film	Película de revelado de 13X18mm. Empleada para revelar los resultados de WB	AGFA Healthcare
Tubos 1,5 mL y 2 mL	Recipiente para volúmenes pequeños y microcentrifugación.	Eppendorf
Cryo Tubes™ 2 mL	Útiles para conservar largo tiempo cepas bacterianas a -80 °C.	Nunc
Tubo 10 mL y 12 mL		
Tubos tipo falcon 50 mL		
Tubos de ultracentrifugación	Tubos de 50 mL con tapón a rosca. Resisten más de 20000-g.	Millipore
Centrifugal filter units Ultracell®-10K	Sistemas de filtro acoplado a tubo de centrifugación para la concentración de sustancias. 10000 MWCO.	Millipore
Cryotube™ vials	Tubos de 2 mL resistentes a temperaturas extremas bajo cero.	nunc™
Software		
Fiji	Software de libre distribución bajo "licencia publica general".	Wayne Rasband National Institute of Health, USA.
Huygens 3.2 (Linux)	Programa para el tratamiento de imágenes mediante deconvolución	Scientific Volume Imaging B.V.
Metamorph 6.2r6 (Windows)	Programa para toma y procesado de imágenes de microscopía	Universal Imaging
GraphPad Prism 6.02	Programa para el análisis estadístico y gráfico de datos	GraphPad Software
Office (Windows)	Paquete de programas de ofimática.	Microsoft

Tabla IX. Equipos utilizados.

Nombre	Descripción y Uso en este trabajo	Casa comercial
Acculab ALC210.4 analytical balance	Balanza para la medición de peso de forma precisa	Sartorius
Nanodrop ND-1000	Espectrofotómetro. Empleado para estimar la concentración de DNA y su pureza.	Thermo scientific
Sartorius Labsonic® M	Sonicador tipo sonda.	Sartorius
IKA MS1 Mini Shaker vortex	Agitador de mesa para tubos.	IKA
pH-metro	Aparato para medir pH por estabilidad o en continuo.	Crison
Thermomixer comfort	Sistema para calentamiento e incubación de tubos.	Eppendorf
Thermomixer MTP	Sistema de calentamiento y enfriamiento de tubos.	Eppendorf
U-2.000 spectrophotometer	Espectrofotómetro empleado para la estimación de densidad óptica de cultivos celulares.	HITACHI
Milli-Q Advantage A10	Sistema purificador de agua para laboratorio.	Millipore
Perkin Elmer 9600	Termociclador empleado para PCR e incubación a una temperatura dada.	Perkin elmer
Mastercycler gradient	Termociclador empleado para PCR e incubación a una temperatura dada.	Eppendorf
Thermal cycler	Termociclador empleado para PCR e incubación a una temperatura dada.	Biorad
Easyject Plus D2000	Sistema de control de pulsos de corriente para electroporación en la transformación bacteriana.	EquiBio.
Fuostar Optima	Fluorímetro empleado para las medidas de absorbancia en la estimación de concentraciones de proteína soluble.	BMG-Labtech
BD FACSCanto II Flow Cytometer	Citometro de flujo. Empleado para caracterizar poblaciones de bacterias fluorescentes.	Becton Dickinson
Aminco Bowman® Luminescence Spectrometer	Espectrómetro de luminiscencia empleado para obtener espectros de absorción/emisión y rectas tipo λ_f	SLM-Aminco
Jasco J-810 CD spectropolarimeter	Obtención de espectros de dicroísmo circular y evaluación de la termoestabilidad basada en dicroísmo circular.	Jasco
Ultraterm 6000	Calentador de baño de agua. Empleado para calentar la cámara para la cubeta en el espectrómetro de fluorescencia.	Selecta
Rotor-Gene™ 6000	Termociclador de tiempo real empleado para la evaluación de la termoestabilidad de proteína pura	Corbett Life Science
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Suministrador de electricidad. Empleado en electroforesis en gel de acrilamida o de agarosa.	Biorad
Trans-blot SD	Células de transferencia electroforetica en semiseco. Empleado en la transferencia de proteínas a membrana mediante <i>Western-blot</i> .	Biorad
UVIdoc	Sistema empleado para observar y tomar fotografías de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.	UVItec
Rotator "Orbit"	Sistema de mezcla con ángulo de rotación ajustable.	JP Selecta SA
Estufa Berlabo	Estufa empleada para la incubación a 37 °C.	Berlabo
Estufa Selecta	Estufa empleada para la incubación a 60 °C	Selecta
Estufa Memmert	Estufa empleada para la incubación a 70 °C	Memmert

Nombre	Descripción y Uso en este trabajo	Casa comercial
Max ^Q 5.000	Incubador con agitación empleado para incubar a 37 °C.	Barnstead
G25 shaker	Incubador con agitación para incubar a 60-70 °C	New Brunswick Scientific
Typhoon 9410 scanner	Scanner de fluorescencia y fosforescencia. Empleado en el rastreo de colonias con fluorescencia.	GE Healthcare
Zeiss Multifoton LSM510 Vertical	Microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M1	Zeiss
Zeiss Multifoton LSM710 Invertido	Microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioObserver.	Zeiss
Confocal LSM510 invertido	Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M(Zeiss)	Zeiss
Confocal LSM510 META	Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200	Zeiss
Sistema FRET	Equipo FRET (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) in vivo compuesto por microscopio invertido Axiovert200 acoplado a una cámara ccd monocroma C9100-02, cambio ultrarrápido de filtros y pletina motorizada.	Zeiss/Hamamatsu/Marzhauser
Avanti J-25	Centrífuga empleada en centrifugación a 20000-g	Beckman coulter
Centrífuga de mesa	Centrífuga empleada en protocolos rutinarios.	Eppendorf
Hettich zentrifugen mikro	Centrífuga de mesa empleada a temperatura ambiente o a 4 °C.	Hettich

Anexo I.II. Figuras anexas.

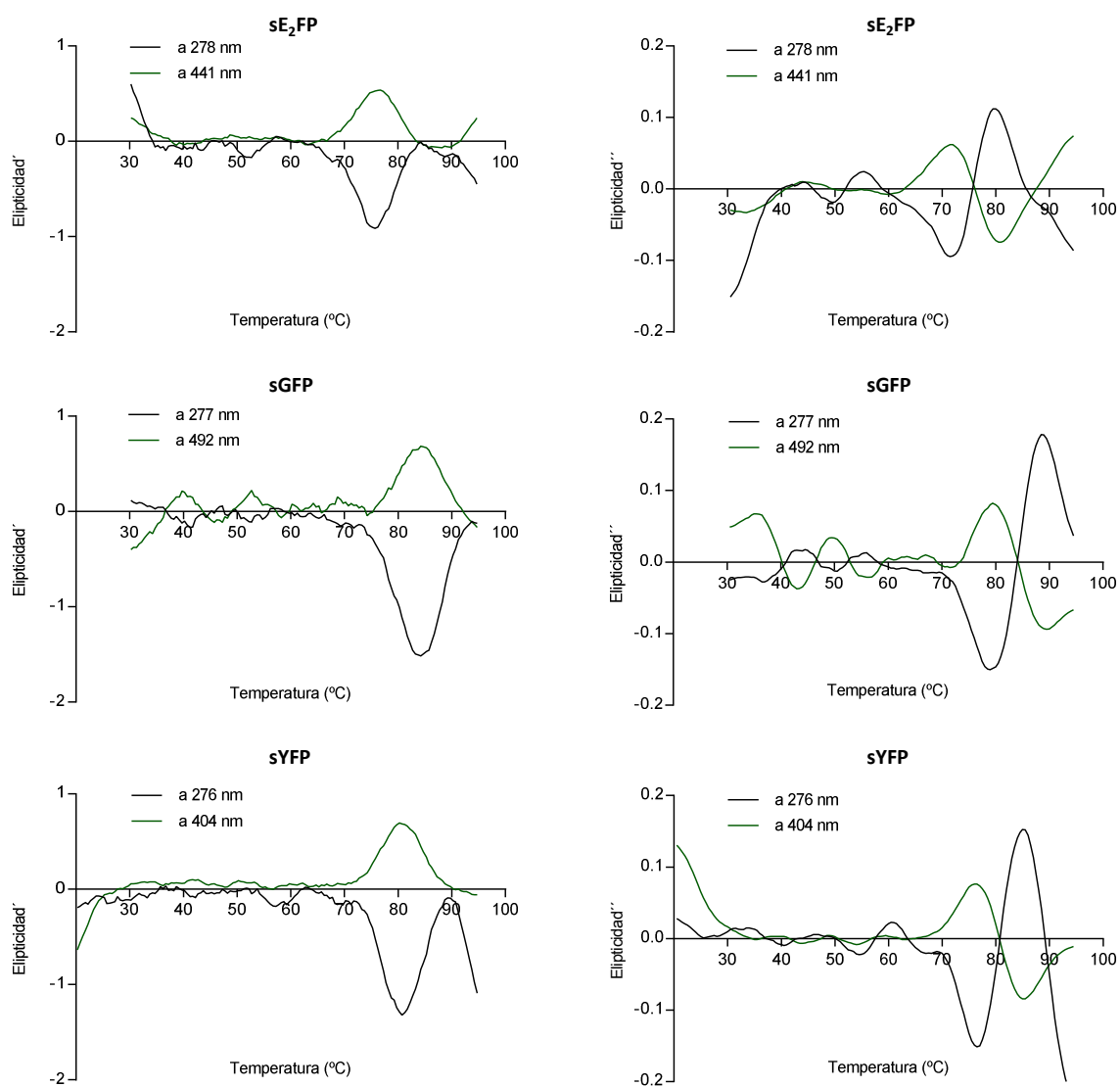


Figura A.I.II.1. Funciones derivada. Se representan los valores de la función resultante de la primera derivada (gráficos en la izquierda) y segunda derivada (gráficos a la derecha) de las variantes termoestables de proteína fluorescente sE₂FP, sGFP y sYFP obtenidas según la descripción de la sección de materiales y métodos. En color gris se muestran los valores a partir de la asimetría global de la proteína, mientras que en color verde se muestran los valores a partir de la asimetría del cromóforo de la proteína considerada.