

TESIS PROTEGIDA



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO

TESIS DOCTORAL

Noé R. Rivera

Madrid, 2012

Memoria presentada por D. Noé R. Rivera para optar a grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección de los Dres. José Berenguer Carlos y Aurelio Hidalgo Huertas en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid, 2012

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este período de formación quiero agradecer a las personas en instituciones que han hecho posible el inicio y finalización este proyecto de formación personal.

En primer lugar quiero dar las gracias a los directores de tesis, Dr. José Berenguer Carlos y el Dr. Aurelio Hidalgo Huertas por haberme permitido realizar mi tesis en su laboratorio y por haberme guiado y orientado en esta área del conocimiento que era nueva para mí. Los resultados que obtuve en mi trabajo no hubieran sido posibles sin la orientación teórica y práctica que me brindaron de principio a fin.

Durante estos 4 años tuve la suerte de coincidir en el laboratorio con gente que destaca por su profesionalidad, cuyo trabajo y orientación fueron fundamentales en mi día a día, en este sentido quiero y debo agradecer infinitamente a Esther Sánchez por estar siempre dispuesta a ayudarme en lo laboral y darme apoyo emocional cuando lo necesite; así también quiero agradecer especialmente a Mariajo por su ayuda profesional en el trabajo y por la amistad que me brindó junto a su esposo Manolo, ambos me han hecho sentir como en casa, los extrañaré sin duda.

No me puedo olvidar de la gente con la que coincidí en el laboratorio, todos me ayudaron orientándome en el trabajo y brindándome su amistad dentro y fuera del CBM: Alba, Laura, Lali, María Luisa, Pilar, Andrea, Marina, Manon, Zahra, Ayelen, Akbar, Eloy, Carlos Bricio, Carlos Bayón, Marcos, Ángel, Nacho, Emilio, Fede, Roberto, Enrico y Ala. Del Instituto de Catálisis: Mateo, Fernando, Oscar, Guti, Marco, Marcos y con ellos Chemi y Mohamed.

Amigos y compañeros de El Salvador quienes no me dieron la espalda cuando pedí ayuda, Marco Tulio Barrera, Miguel Serrano al Lic. Barahona y Douglas.

Gracias a mi familia a quienes debo todo y han sido mi mayor inspiración, Mi madre Arminda, mi hermana Iris, mi abuela Olivia, mi padre José Fidel y mi hermano Rubén.

Por último daré las gracias a La Fundación Carolina por haberme otorgado la beca que me permitió vivir estos 4 años en Madrid y a La Universidad de El Salvador por haberme concedido el permiso durante estos 4 años

SUMMARY

Thermostability is a desired property for many biotechnological applications of enzymes because it allows an increase in their half-life at the working temperatures and produces a concomitant increase in the stability against organic solvents and detergents. Thermostable enzymes from thermophilic microorganisms are well adapted to such conditions, but not are always available or fulfill the role that the industry or specific applications require, leading to the development of methods to select thermostable variants from enzymes of mesophilic origin. Some of these methods rely on the deep knowledge of the structure-function relationships of the enzyme to design modifications that increase the thermostability. In other cases the methods of “directed evolution” mimics nature by selecting for a specific property (thermostability) among a high variety of random or semi-random mutants generated by in vitro or in vivo procedures. In directed evolution, the success of the selection depends on the capability to select over a huge amount of variants, and require either robotic system for the analysis of individual variants, or intermediate enrichment selection procedures to decrease the burden of selection.

In this Thesis, we have applied the method of folding interference at high temperature in a thermophilic host (*Thermus thermophilus*) to select thermostable variants of two very different enzymes, a DNA polymerase from bacteriophage ϕ 29, and the esterase I from *Pseudomonas fluorescens* (PFEI). The method is based on the expression in the thermophilic host of fusions between the target protein (N-terminal) and a thermostable kanamycin nucleotidyl transferase (C-terminal) as selectable reporter.

In the first part of the experimental work, we isolated *T. thermophilus* deletion mutants defective in a major LonA-like protease, and checked their suitability as selection host, leading us to conclude that this protease is highly relevant to avoid toxicity of the fusions. In the second and third experimental sections, we isolated “folding-reinforced” mutants of the exonuclease and polymerase domains of the DNA polymerase of F29 and explained on structural ground their effects on stability. In the final experimental section, we went through the isolation of thermostable variants of the PFEI, and also were able to explain most of the observed effects on structural models. Some of the mutations obtained with both proteins are likely susceptible of patent protection. General conclusions about what can be expected for the general application of this method to isolate thermostable variants of any protein are discussed.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

SUMMARY	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	13
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EXTREMOFILIA	3
1.1.1. Termofilia e importancia de los microorganismos termófilos	3
1.1.2. Mecanismos de adaptación a las altas temperaturas.....	4
1.1.2.1. Solutos compatibles	4
1.1.2.2. Ácidos nucleicos	5
1.1.2.3. Membranas	5
1.1.2.4. Proteínas	6
1.1.3. Termozimas para biocatálisis.....	7
1.1.4. <i>Thermus thermophilus</i> como modelo biológico de microorganismos termófilos extremos.....	7
1.1.4.1. Descripción.....	7
1.1.4.2. Transformabilidad	9
1.1.4.3. Herramientas genéticas disponibles para <i>Thermus</i> spp.	9
1.1.4.4. Herramientas de localización celular	11
1.2. PROTEASAS TIPO LON	11
1.2.1. Estructura y mecanismo de degradación por la proteasa Lon.....	12
1.2.2. Proteasas Lon en <i>Thermus thermophilus</i> HB27.	13
1.2.3. Características fisiológicas en los mutantes en <i>lon</i>	13
1.2.4. Efecto de las mutaciones <i>lon</i> en la producción de proteínas heterólogas en <i>T. thermophilus</i> HB27.....	13
1.3. LA ADN POLIMERASA DEL BACTERIÓFAGO ϕ29	14
1.3.1. Estructura tridimensional de la ADN polimerasa de ϕ 29	14
1.3.1.1. Dominio exonucleasa.	15
1.3.1.2. Dominio polimerasa	15
1.3.1.3. Subdominio TPR1	17
1.3.1.4. Subdominio TPR2	17
1.3.1.5. Independencia estructural y comunicación entre los dominios de la ADN polimerasa ϕ 29.....	17
1.3.1.6. Base estructural del desplazamiento de hebras y la procesividad de la ADN polimerasa ϕ 29.....	18
1.4. ESTERASAS	19
1.4.1. Definición y clasificación.....	19
1.4.2. Diferencias entre lipasas y esterasas.	20
1.4.3. Estructura.	20
1.4.4. Mecanismo catalítico.....	22
1.4.5. Aplicaciones de lipasas y esterasas en la industria	23
1.4.5.1. Lipasas.....	23
1.4.5.2. Esterasas.	24

1.4.6.	Esterasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFEI)	24
1.4.6.1.	Estructura de PFEI.....	25
1.4.6.2.	Aplicaciones biocatalíticas de PFEI.	26
1.5.	INGENIERÍA DE PROTEÍNAS y TERMOESTABILIZACIÓN	26
1.5.1.	Termoestabilización de proteínas.....	27
1.5.1.1.	Diseño racional	27
1.5.1.2.	Evolución dirigida	28
1.5.1.3.	Métodos de mutagénesis	29
1.5.1.4.	Métodos de cribado o “screening”	30
1.5.1.5.	Métodos de selección.....	30
2.	OBJETIVOS.....	33
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
3.1.1.	Cepas.....	39
3.1.2.	Plásmidos	39
3.1.2.1.	Plásmidos de otras investigaciones	39
3.1.2.2.	Plásmidos construidos en el presente trabajo.....	40
3.1.3.	Oligonucleótidos utilizados	41
3.1.4.	Antisueros	43
3.2.	TAMPONES Y DISOLUCIONES	43
3.3.	MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	45
3.3.1.	Condiciones de crecimiento y conservación de estirpes bacterianas....	45
3.3.2.	Transformación bacteriana	46
3.4.	MANIPULACIÓN DEL ADN	46
3.4.1.	Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	46
3.4.2.	Preparación de ADN cromosómico de <i>T. thermophilus</i> HB27	47
3.4.3.	Técnicas de amplificación y clonaje	47
3.4.4.	Electroforesis y purificación de fragmentos de ADN	47
3.4.5.	Generación de mutaciones puntuales: QuikChange™	48
3.4.6.	Generación de mutaciones múltiples: QuikChange Multi™	48
3.4.7.	Creación de genotecas por mutagénesis al azar.....	48
3.4.7.1.	Genoteca del dominio exonucleasa de ϕ 29	49
3.4.7.2.	Genoteca del dominio polimerasa de ϕ 29	49
3.4.7.3.	Genoteca de PFEI.....	50
3.4.8.	Secuenciación del ADN	50
3.5.	MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	51
3.5.1.	Preparación de extractos para electroforesis.....	51
3.5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	52
3.5.3.	Western blot	52
3.5.4.	Expresión y purificación de PFEI y sus variantes en <i>E. coli</i>	52
3.5.5.	Expresión y purificación de la ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29 y sus variantes en <i>E. coli</i>	53
3.6.	MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.....	53
3.6.1.	Generación de mutantes de <i>T. thermophilus</i> en el gen <i>ttc0746</i>	53

3.6.1.1.	Mutantes de inserción T. thermophilus HB27 (ttc0746::kat).....	54
3.6.1.2.	Mutantes de delección de T. thermophilus HB27 en el gen ttc0746 (Δlon).....	54
3.6.2.	Ensayo de complementación de mutantes de proteasa tipo Lon	55
3.7.	ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	56
3.7.1.	Actividad proteolítica.....	56
3.7.2.	Actividad esterasa en placa multipocillo	56
3.7.3.	Actividad esterasa en gel de poliacrilamida (zimograma)	56
3.7.4.	Actividad esterasa de colonias (<i>overlay</i>).....	56
3.7.5.	Actividad esterasa de colonias (<i>overlay</i>).....	57
3.8.	ENSAYOS DE ESTABILIDAD.....	57
3.9.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	58
4.	RESULTADOS.....	62
4.1.	AISLAMIENTO DE MUTANTES DE <i>Thermus thermophilus</i> HB27 EN LA PROTEASA DE TIPO Lon (TTC0746).....	63
4.1.1.	Mutación del gen <i>ttc0746</i>	63
4.1.2.	Determinación de la actividad proteolítica en los mutantes Δlon	64
4.1.3.	Expresión de fusiones recombinantes en mutantes de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 deficientes proteasa del tipo Lon	65
4.2.	TERMOESTABILIZACIÓN DE LA ADN POLIMERASA DEL FAGO $\phi 29$.....	67
4.2.1.	Termoestabilización del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$	68
4.2.2.	Ensayos de termoestabilidad relativa en placa de las variantes seleccionadas del dominio exo	70
4.2.3.	Secuenciación de variantes seleccionadas del dominio exonucleasa....	70
4.2.4.	Análisis bioinformático y estructural de los cambios obtenidos en el dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$	72
4.2.5.	Efecto de mutaciones seleccionadas en el dominio exonucleasa, sobre la actividad de la polimerasa $\phi 29$	73
4.2.6.	Termoestabilización del dominio polimerasa de la polimerasa $\phi 29$	74
4.2.7.	Secuencia de mutantes en el dominio polimerasa	76
4.2.8.	Análisis estructural y bioinformático de las variantes seleccionadas del dominio pol	77
4.3.	TERMOESTABILIZACIÓN DE PFEI.....	78
4.3.1.	Selección de variantes termoestables de PFEI.....	78
4.3.2.	Identificación de variantes termoestables de PFEI.....	80
4.3.3.	Producción y purificación de las variantes de PFEI seleccionadas.....	82
4.3.4.	Temperatura de desnaturalización de las variantes termoestables.....	83
4.3.5.	Estabilidad térmica de las variantes seleccionadas	84
4.3.6.	Estabilidad de las variantes de PFEI frente a solventes orgánicos.....	87
4.3.7.	Parámetros cinéticos de las variantes de PFEI.....	90
4.3.8.	Análisis estructural y bioinformático de las mutaciones termoestabilizantes en PFEI.....	91
5.	DISCUSIÓN.....	95

5.1. relevancia DE LA TERMOESTABILIDAD EN BIOCATÁLISIS.....	97
5.2. MUTANTES DE <i>Thermus thermophilus</i> HB27 DEFICIENTES EN PROTEASAS TIPO Lon.....	99
5.3. TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO E INDUSTRIAL.....	100
5.3.1. Estructura de las proteínas a estabilizar e influencia de los genes codificantes	100
5.3.2. Características de las mutaciones seleccionadas.....	101
5.3.3. Localización de las mutaciones seleccionadas.....	103
5.3.4. Estabilidad de las variantes seleccionadas.....	103
5.3.5. Actividad de las variantes seleccionadas	105
5.3.6. Consideraciones generales sobre el método de termoestabilización <i>in vivo</i>	106
6. CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAA+	ATPasa asociada con varias actividades celulares
ADN	Ácido desoxiribonucleótido
ADNcs	ADN genómico de cadena simple
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
DM	Dinámica molecular
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.550	Densidad óptica a 550nm
epPCR	PCR propensa al error
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
hph5	Gen de resistencia termoestable a Higromicina B
Hyg^r	Resistente a Higromicina
Kanr	Resistente a Kanamicina
Kat	Gen de resistencia a kanamicina
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Pb	Pares de bases
PFEI	Esterase I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Uniprot P22862)
pNPA	Acetato de <i>p</i> -nitrofenol
pNPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenol
RMSD	Raíz cuadrada del cuadrado de la desviación media
RMSF	Raíz cuadrada del cuadrado de la fluctuación media
rpm	Revoluciones por minuto
TB	Medio rico de cultivo para <i>Thermus</i> (<i>Thermus</i> Broth)
THF	Tetrahidrofurano
T_m	Temperatura de desnaturalización de la proteína
Wt	Tipo silvestre
×g	Número de veces la aceleración de la gravedad

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EXTREMOFILIA

Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que la vida era sólo posible en condiciones en las que se desarrollan los animales superiores: pH neutro, temperatura entre 15 y 37 °C, fuerza iónica parecida a la de la sangre, presión atmosférica, presencia de oxígeno y ausencia de radiación. Sin embargo, existen microorganismos no ya capaces de sobrevivir en condiciones muy distintas de éstas, sino que se han adaptado de tal forma a ellas que necesitan vivir en ambientes en los que algunos de estos parámetros adquieren valores extremos. Estos microorganismos son conocidos como “extremófilos”.

La definición de ambiente extremo ha sido abordada por diferentes autores. Así para algunos un ambiente extremo es aquel que presenta un bajo grado de diversidad biológica (Gromiha y Selvaraj 2004), mientras que para otros es aquel en el que los organismos que los habitan han debido desarrollar modificaciones significativas con respecto a sus antecesores, con el objetivo de adaptarse a dichas condiciones (Tian *et al.* 2010).

Los extremófilos se clasifican en base a una o varias condiciones del ambiente que habitan y que necesitan para crecer. En base a la temperatura óptima de crecimiento encontramos: psicrófilos si su temperatura óptima es menor de 20 °C, mesófilos, si crecen entre 20 y 45 °C y termófilos si su temperatura óptima de crecimiento es mayor de 45 °C. Si el criterio de clasificación es el pH se clasifican como acidófilos, si viven en ambientes con pH entre 0 y 5, neutrófilos con capacidad de crecimiento entre pH 5 y 8,5, y alcalófilos si crecen en pH 8.5 y 11.5. A los que sobreviven en ambientes con altas presiones se les clasifican como piezófilos; los que soportan altas presiones osmóticas son llamados osmófilos (sacarófilos y halófilos) y así a los que toleran altos niveles de radiación son llamados radiotolerantes. También existen organismos “poliextremófilos” que viven en ambientes en los que existe más de una condición extrema, como altas temperaturas y pH ácido o alta osmolaridad (Mesbah y Wiegel 2008).

1.1.1. Termofilia e importancia de los microorganismos termófilos

Como ya mencionamos anteriormente, los microorganismos termófilos son aquellos que crecen a temperaturas superiores a 45 °C. Éstos los podemos subdividir en termófilos moderados (entre 45 y 65 °C), extremos (entre 65 y 80 °C) e hipertermófilos, con temperaturas óptimas superiores a los 80 °C (Huang *et al.* 2004). Los microorganismos termófilos en su mayoría son microorganismos pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea*. Entre las bacterias, las mayores temperaturas de crecimiento observadas están entre 90 y 95 °C para *Thermotoga maritima* y *Aquifex pyrophilus*, respectivamente. Del dominio *Archaea*, los microorganismos que hasta la fecha han mostrado las mayores temperaturas de crecimiento, son *Pyrolobus*

fumarii, con una temperatura máxima de 113 °C (Blochl *et al.* 1997) y la cepa 121, que crece a 121 °C (Kashefi y Lovley 2003).

Los microorganismos termófilos son objeto de especial interés científico ya que su capacidad de vivir en ambientes extremos indica su origen probablemente antiguo presentando por ello un gran interés evolutivo (Gaucher *et al.* 2010). Además poseen una serie de mecanismos adaptativos que pueden alimentar la posterior comprensión de la evolución y los mecanismos que les afectan (Huber *et al.* 2000). Por otro lado, al estar toda su maquinaria molecular adaptada a trabajar en altas temperaturas, sus enzimas, conocidas como termozimas, presentan gran interés biotecnológico y su comparación con las de organismos mesófilos ha proporcionado claves sobre los mecanismos que permiten la termoestabilización.

Desde el punto de vista de la biología estructural, las proteínas y complejos macromoleculares de algunos microorganismos termófilos han sido escogidas como modelo de estudio por ser más fácilmente cristalizables que sus homólogas de microorganismos mesófilos, debido a su gran rigidez estructural a temperatura ambiente. Hay ejemplos de grandes complejos biológicos procedentes de termófilos cuya estructura ha sido determinada a alta resolución antes que los de organismos mesófilos, como el ribosoma 70s (Yusupov *et al.* 2001), la RNA polimerasa bacteriana (Selmer *et al.* 2006) o el complejo respiratorio I (Efremov *et al.* 2010) de *Thermus* sp. Esta característica de las proteínas de microorganismos termófilos constituye una de las principales razones para escoger a estos organismos como sujeto de estudio en los primeros programas de genómica estructural (Jenney y Adams 2008).

1.1.2. Mecanismos de adaptación a las altas temperaturas.

1.1.2.1. Solutos compatibles

En el citoplasma de los organismos termófilos aparecen concentraciones elevadas de solutos compatibles que contribuyen a la termoestabilidad de las enzimas, ácidos nucleicos y moléculas biológicas lábiles como el ATP (Adams 1993; Faria *et al.* 2008; Oshima y Osawa 1983). Estos solutos están, generalmente, cargados negativamente y la mayoría están incluidos en 2 categorías: unos son derivados de hexosas con el grupo hidroxilo del C1 comúnmente bloqueado en una configuración α , y otros son polifosfodiésteres (Lamosa *et al.* 2006); y no han sido identificados en bacterias o arqueas que crezcan en un rango de temperaturas más moderado. Además, se ha demostrado que algunos solutos tales como el manosilglicerato y el di-glico-fosfato protegen a proteínas mesófilas de la desnaturalización por calor en ensayos *in vitro* (Borges *et al.* 2002).

1.1.2.2. Ácidos nucleicos

Dadas las condiciones en las que se desarrollan los microorganismos termófilos, éstos deben proteger su material genético de la desnaturalización provocada por altas temperaturas. En este sentido se han observado en arqueas y bacterias altas concentraciones intracelulares de sales como el di-inositol-1,1'-fosfato potásico (Scholz *et al.* 1992) y el 2,3- difosfoglicerato cíclico (Hensel y König 1988) que estabilizan la estructura secundaria de los ácidos nucleicos, así como poliaminas policatiónicas tales como putrescina, espermidina, norespermidina, termoespermidina y espermina, que aumentan la temperatura de fusión del ADN (Friedman y Oshima 1989).

Además, se ha descrito, tanto en arqueas como en bacterias, la existencia de una topoisomerasa I dependiente de ATP (girasa reversa) que introduce superenrollamientos positivos en la doble cadena de ADN (Kikuchi y Asai 1984). Por otra parte, en arqueas se ha observado la presencia de histonas que compactan el ADN formando estructuras tipo nucleosomas (Pereira *et al.* 1997).

Además, debido a la pérdida espontánea de bases que genera sitios apúricos y apirimidínicos, y a la desaminación espontánea de citosina y 5-metilcitosina, que se produce a altas temperaturas, existe un mayor requerimiento de una maquinaria de reparación eficiente, habiéndose identificado homólogos de diferentes sistemas de reparación, escisión de base, desaminación y recombinación, tanto en bacterias como en arqueas (Grogan 1998). Por otro lado, los microorganismos termófilos deben adoptar estrategias orientadas a preservar la integridad del ARNt debido a la fuerte relación estructura-función del mismo. En bacterias y arqueas, este problema se aborda fundamentalmente mediante modificación posttranscripcional tanto de la base como de la ribosa, siendo la modificación más extendida la metilación de la ribosa en posición 2' (Edmonds *et al.* 1991).

1.1.2.3. Membranas

Debido a las altas temperaturas de los hábitats en los que viven los microorganismos termófilos, es necesario que éstos mantengan un equilibrio entre la fluidez y la estabilidad de sus membranas. Este equilibrio requiere una composición de lípidos de membrana diferente a la que presentan los microorganismos mesófilos.

En arqueas hipertermófilas la membrana lipídica está compuesta por una monocapa de dibifitanil-diglicerol-tetraeter (C₄₀) en los que se reemplazan los enlaces éster, por enlaces éter más estables que previenen la hidrólisis espontánea de los lípidos de membrana. Además se sustituyen los ácidos grasos por fitanol, que permite mayor grado de empaquetamiento hidrofóbico, otorgando mayor cohesión y reduciendo el grado de libertad traslacional de la membrana (De Rosa *et al.* 1986; Kates 1993; Langworthy y Pond 1986). Los

componentes de membrana de arqueas pueden presentar grandes modificaciones tanto en las cadenas de fitanol (Glozzi *et al.* 1983) como en las cabezas polares, que se conjugan con residuos glicosídicos para proporcionar mayor estabilidad (van de Vossenberg *et al.* 1998).

1.1.2.4. Proteínas

Las proteínas de organismos termófilos también deben tener la estabilidad suficiente para conservar tanto su conformación nativa como la integridad del centro activo, mientras mantienen la flexibilidad necesaria para llevar a cabo su función (Benkovic y Hammes-Schiffer 2003). En los estudios comparativos entre proteínas homólogas de organismos mesófilos y termófilos, no se ha observado la presencia de interacciones diferentes intra- o intermoleculares, o de estructuras que ayuden a la preservación del plegamiento. En general, parece que las mismas fuerzas que cursan en el mantenimiento de la estructura de las proteínas de mesófilos son las que mantienen a las de termófilos. De hecho, basta con pequeñas modificaciones estructurales para incrementar la estabilidad de las proteínas (Sadeghi *et al.* 2006).

En general, las diferencias observadas entre proteínas de organismos termófilos y mesófilos son principalmente:

1) Incremento del número de interacciones:

Las interacciones inter- e intramoleculares contribuyen significativamente a la termoestabilidad de las proteínas. Los datos de las investigaciones a este respecto muestran que las proteínas de termófilos presentan un incremento en el número de puentes de hidrógeno (Vogt *et al.* 1997), puentes salinos (Karshikoff y Ladenstein 2001), interacciones hidrofóbicas (Goodenough y Jenkins 1991), puentes disulfuro (Matsumura *et al.* 1989) y coordinación con metales (Kataeva *et al.* 2003; Krishnamurthy *et al.* 2009). En general la estabilidad conformacional de las proteínas, se encuentra en el rango de los 40 kJ·mol⁻¹, y se ha observado que la contribución a dicha estabilidad de una de estas interacciones puede ser de hasta 25 kJ·mol⁻¹, por lo que la introducción de tan solo un par de estas interacciones puede incrementar significativamente la termoestabilidad de una proteína (Daniel y Cowan 2000).

2) Modificaciones conformacionales:

Las modificaciones más frecuentes son: aumento de la rigidez (Li *et al.* 2005), empaquetamiento más eficiente con menor número de cavidades (Russell *et al.* 1997), acortamiento de los bucles (Pal y Chakrabarti 1999; Schmid *et al.* 1999; Vieille 2001), incremento de estructuras secundarias

como helices- α (Facchiano *et al.* 1998) y tendencia a la oligomerización (Lassalle y Hinz 1999; Lassalle *et al.* 1998; Vonrhein *et al.* 1998).

1.1.3. Termozimas para biocatálisis

El empleo de enzimas como biocatalizadores en procesos industriales presenta ciertas ventajas sobre la química tradicional, como una alta regio- y estereo-selectividad; la posibilidad de trabajar en condiciones de reacción más suaves, lo que implica una menor dependencia del empleo de solventes o reactivos contaminantes (Elander 2003; Rozzell 1999); y la reducción de los pasos necesarios para completar una transformación. Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas el uso de enzimas procedentes de microorganismos mesófilos en la industria suele estar limitado debido a que las condiciones mínimas necesarias para realizar las transformaciones de interés suelen superar la estabilidad natural de dichas enzimas (Turner 2009). Por el contrario las termozimas presentan un grado de estabilidad natural que les confiere ciertas ventajas a la hora de ser utilizadas como biocatalizadores. Estas ventajas frente a las mesozimas suelen ser tales que superan la reducción de eficiencia que suelen presentar las enzimas termoestables (Shoichet *et al.* 1995).

Algunas de las ventajas con las que cuentan las termozimas son:

- Presentan una mayor resistencia a agentes desnaturalizantes y solventes orgánicos (Niehaus *et al.* 1999b; Sellek y Chaudhuri 1999)
- Mayor vida media, lo que hace que disminuya la necesidad de sustitución en los procesos industriales (Coolbear *et al.* 1992).
- Reducción de la viscosidad del medio, aumento de la solubilidad y el coeficiente de difusión de sustratos y/o productos (Becker *et al.* 1997).
- Menor necesidad de refrigeración de las enzimas para mantenerlas en forma activas (Bruins *et al.* 2001; Coolbear *et al.* 1992).
- Reducción del riesgo de contaminación por microorganismos mesófilos al trabajar a altas temperaturas (Niehaus *et al.* 1999a).
- Purificación más eficiente de las termozimas por desnaturalización diferencial cuando se expresan en un organismo mesófilo (Kirk *et al.* 2002; Takesawa *et al.* 1990).

1.1.4. *Thermus thermophilus* como modelo biológico de microorganismos termófilos extremos

1.1.4.1. Descripción

El género *Thermus* spp, (Brock y Freeze 1969) incluye aislados de bacterias termófilas moderadas y extremas, generalmente aerobias, con una pigmentación amarillo-anaranjada o rojiza (Yokoyama *et al.* 1996), de tinción Gram negativa y con un contenido en G+C en torno al 70 %. La secuencia de

su ARNr 16S, así como la de muchas proteínas habitualmente empleadas como relojes moleculares, permite definir al género como perteneciente a una de las ramas más antiguas de la filogenia bacteriana, formando junto con los cocos Gram positivos del género *Deinococcus* uno de los Filums en los que se dividen actualmente las bacterias (Kwasigroch *et al.* 2002). Tras *Thermotoga* y *Aquifex*, este grupo constituiría una de las ramas más antiguas en la evolución de las bacterias según (Woese 1987), o incluso la más antigua si se considera la filogenia media de un conjunto de proteínas trazadoras (Wu *et al.* 2009). Otra interpretación basada en el análisis de inserciones y deleciones en proteína (indels) y la estructura de la envoltura celular, sitúan a este filo en una posición intermedia entre Gram-positivos y Gram-negativos (Gupta 2000). Esta última interpretación también tiene apoyo en filogenia basada en genoma completo y comparación de COGs (Cluster of Orthologous Groups)(Trivedi *et al.* 2006).

El género es de una enorme amplitud y gran diversidad interna como consecuencia de su adaptación a diversos nichos ecológicos termófilos, incluyendo, además de fuentes termales neutras o ligeramente básicas de diferentes puntos del mundo, como Japón, Islandia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, etc. (Hudson *et al.* 1989), sistemas de refrigeración de industrias, centrales nucleares (Kwasigroch *et al.* 2002) en un manantial de aguas termales a 3,2 kilómetros de profundidad en una mina de oro de Sudáfrica (Balkwill *et al.* 2004). Esta gran distribución y diversidad de orígenes confiere al género un enorme potencial como fuente de enzimas de posible aplicación biotecnológica y ha hecho de éste un sistema biológico modelo (Cava *et al.* 2009).

A nivel metabólico, *Thermus* spp. emplea aminoácidos y azúcares como fuentes preferidas de carbono y energía, aunque la mayor parte de las estirpes pueden crecer en medios minerales con amonio y algún azúcar, lo que indica la existencia de un metabolismo biosintético bastante completo. A nivel energético, la mayor parte de las cepas han sido descritas como respiradoras aerobias, aunque existen cepas facultativas capaces de crecer en anaerobiosis por desnitrificación parcial o completa (Cava *et al.* 2008b). Un ejemplo de aislados de ese tipo es la cepa de *T. thermophilus* NAR1, que puede proliferar utilizando nitrato como aceptor final de electrones (Ramirez-Arcos *et al.* 1988). Actualmente se han descrito cepas capaces de crecer con, o al menos reducir, virtualmente todo el espectro posible de aceptores de electrones inorgánicos (Balkwill *et al.* 2004; Gihring y Banfield 2001; Kieft *et al.* 1999; Moller y van Heerden 2006). El carácter predominantemente aerobio y la no existencia de requerimientos especiales hacen que su crecimiento sea bastante rápido y fácil de reproducir en condiciones de laboratorio, lográndose con algunas cepas tiempos de duplicación de 40 minutos. La secuenciación del genoma de 4 cepas de *Thermus* ha sido completada y las secuencias dadas en acceso libre (Gounder *et al.* 2011; Henne *et al.* 2004; Masui 2004). Excepto en *T. scotoductus* SA1, el genoma parece dividirse entre un

cromosoma de 1,9 Mpb aproximadamente, y un megaplásmido de tamaño muy variable entre cepas (0,23 a 0,46 Mp). En todas ellas se observa un contenido en G+C aproximadamente del 69% y una densidad codificante es alta (95%, 2,200 proteínas), siendo mayor la del cromosoma que la del megaplásmido.

1.1.4.2. Transformabilidad

Una de las características más relevantes del género a nivel de su empleo como modelo es la posesión de un sistema de competencia natural formado por al menos 16 proteínas codificadas en 7 loci diferentes, algunas con homología a proteínas de pili tipo IV y otras a componentes de sistemas de secreción tipo II y del sistema de competencia de bacterias mesófilas (Averhoff y Friedrich 2003; Friedrich *et al.* 2002; Koyama *et al.* 1986). En *T. thermophilus* HB27, este sistema de competencia natural se expresa constitutivamente y es de una enorme eficiencia, permitiendo velocidades de entrada de ADN lineal o circular muy elevadas (40 kb/s y célula en algunas cepas) (Schwarzenlander y Averhoff 2006). En algunos casos se ha podido demostrar también la capacidad de determinadas cepas de transferir copias completas de su genoma a una cepa receptora (Ramirez-Arcos *et al.* 1998b). Recientemente se ha propuesto la existencia de un nuevo sistema conjugativo en bacterias termófilas extremas (Cesar *et al.* 2011).

1.1.4.3. Herramientas genéticas disponibles para *Thermus* spp.

Para la selección positiva, en un principio se utilizó complementación de auxotroffas, inicialmente el gen *trpB* (Koyama *et al.* 1990) de síntesis de triptófano, y después genes de síntesis leucina (*leuB*) (Tamakoshi *et al.* 1995) y de pirimidina (*pyrE*) (Yamagishi *et al.* 1996) o combinación de ellos (Tamakoshi *et al.* 1997). También se ha utilizado con éxito el gen de la malato deshidrogenasa, aunque la selección es mucho menos eficaz (Kayser y Kilbane 2001). Sin embargo, estos sistemas de selección con genes homólogos dan problemas debido a la gran capacidad de recombinación entre secuencias homólogas presentes en estos organismos (Koyama *et al.* 1986). Un trabajo seminal en el desarrollo de herramientas de manipulación genética de *Thermus* spp. fue la identificación de mutantes termoestables de la kanamicina nucleotidil transferasa (Liao *et al.* 1986; Matsumura y Aiba 1985) que fueron empleados en el primer sistema de selección termorresistente por antibiótico en 1992 (Lasa *et al.* 1992b; Mather y Fee 1992) y fue el único disponible hasta que, mediante evolución dirigida, se consiguieron otros 2 genes de resistencia a antibióticos útiles para su aplicación en *T. thermophilus*: uno a bleomicina (Brouns *et al.* 2005) y otro a higromicina B (Nakamura *et al.* 2005a).

En *Thermus* se han descritos también diversos genes que han mostrado ser de gran utilidad como genes testigo para el análisis de la expresión

genética *in vivo* tales como *bgaA* y *phoA*, codificantes de una beta-galactosidasa citoplásmica y una fosfatasa hiper alcalina periplásmica termoestables respectivamente (Cava et al., 2004; Cava et al., 2007).

Existen en la actualidad plásmidos replicativos bifuncionales *Thermus-E. coli* derivados de tres orígenes de replicación diferentes aislados a partir de fragmentos de plásmidos crípticos presentes en tres cepas de *Thermus spp.*, a los que se les ha incluido un replicón de *E. coli*. Las versiones originales de todos ellos fueron seleccionables mediante resistencia termoestable a kanamicina (de Grado et al. 1999; Lasa et al. 1992b) aunque existen ya algunos derivados con resistencia a Bleomicina (Brouns et al. 2005) o a Higromicina B (Cava et al. 2007; Nakamura et al. 2005a) que permiten expresar proteínas en fondos genéticos ya resistentes a kanamicina. Existen además otras versiones para expresión dotadas de un promotor derivado del operón de la nitrato reductasa que puede ser inducido por nitrato y en condiciones microaerófilas (Moreno et al. 2003). Finalmente, el estudio de genes de función esencial para el organismo es también abordable en base a la expresión de un RNA antisentido capaz de provocar un fuerte descenso en la expresión de su gen blanco, lo que permite estudiar la función biológica de genes esenciales (Moreno et al. 2004). Por otro lado, se han conseguido aislar y caracterizar de fuentes alcalinas termófilas de Islandia, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Rusia, fagos capaces de infectar de una forma más o menos específica a distintas cepas de *Thermus spp.* (Sakaki y Oshima 1975; Yu et al. 2006), aunque aún no se ha descrito su posible utilización como vectores.

En la actualidad la obtención de mutantes de inserción dirigida del gen termoestable de resistencia a kanamicina (*kat*) sobre cualquier gen “blanco” no esencial resulta bastante sencilla en la mayor parte de las cepas de *T. thermophilus*, existiendo muchos ejemplos descritos (Fernández-Herrero et al. 1995; Lasa et al. 1992a; Ramirez-Arcos et al. 1998a). En un plásmido suicida (no replicativo en *Thermus spp.*) se clonan las regiones flanqueantes del gen a silenciar (1 kpb cada una aproximadamente) que servirían luego como zonas de recombinación homóloga para la integración del plásmido en el genoma del microorganismo. A continuación se clona el gen *kat* entre los dos brazos de recombinación. Una vez lograda la construcción se linealiza la construcción. Seguidamente se transforma la cepa a mutar con la construcción lineal y se seleccionan los mutantes por crecimiento en medio sólido con kanamicina.

Un segundo método de obtención de mutantes vuelve a basarse en la utilización de vectores suicidas que contienen el gen *kat*. En este caso, el clonaje de un fragmento central del gen blanco a inactivar en estos vectores y su utilización por transformación conlleva necesariamente la integración por recombinación, seleccionada por la resistencia al antibiótico. En las cepas obtenidas lo que se obtienen son dos copias del gen mutado, una con una

delección en su extremo 3' y la otra con una delección en 5', cuya extensión depende del fragmento empleado para la inactivación. Cabe destacar que actualmente es posible el aislamiento de mutantes de delección carentes de genes de resistencia, tanto en base a la utilización del gen *pyrE* en cepas auxótrofas para uracilo, y su posterior eliminación por incubación con ácido fluororótico (FOA) (Tamakoshi *et al.* 1999), o mediante el uso de vectores suicidas portadores del *kat*. En éstos, se insertan las regiones flanqueantes del gen a deleccionar, de forma que se puede forzar una inserción recombinativa del plásmido (no replicativo) sobre el gen blanco por transformación y selección en el antibiótico. Puesto que la estabilidad de estos merodiploides es relativamente baja, existe una fuerte tendencia a la pérdida del plásmido por retro-recombinación que debe de conducir a la obtención de un 50 % de mutantes de delección, y otro tanto de revertientes silvestres, todos ellos ya sensibles al antibiótico. Este sistema se ha empleado por ejemplo para la obtención de mutantes sencillos y dobles de los factores traduccionales GreA y Gfh1 de *T. thermophilus* (Laptenko *et al.* 2006). Recientemente se ha publicado la obtención de mutantes *T. thermophilus* deficientes en la proteína CsaA o CsaB para evaluar su papel en la síntesis de polisacáridos de pared celular secundaria (Acosta *et al.* 2012).

1.1.4.4. Herramientas de localización celular

Las proteínas fluorescentes son herramientas ampliamente utilizadas en estudios biológicos de bacterias mesófilas y eucariotas (Prescott *et al.* 2006) pero, la susceptibilidad a altas temperaturas constituía un problema para su uso en termófilos. Recientemente se ha demostrado que la variante llamada *superfolder* GFP (sGFP) (Pedelacq *et al.* 2006), es funcional en *T. thermophilus* a 70 °C y se ha utilizado como herramienta para la ubicación de proteínas a altas temperaturas en hospedadores termófilos (Cava *et al.* 2008a). La maduración del fluoróforo de la GFP debe estar restringida al citoplasma celular; por esta razón la sGFP es una herramienta que puede utilizarse para discriminar entre sistemas de transporte bacteriano, ya que el sistema Tat, a diferencia del Sec, es capaz de transportar a través de la membrana interna del microorganismo proteínas que se encuentran en su conformación madura, y por lo tanto una fusión con la sGFP de una proteína que se exportara a través de este sistema devendría en la emisión de fluorescencia fuera del citoplasma, mientras que si ésta fuera dependiente de Sec no se observaría fluorescencia al no formarse el fluoróforo.

1.2. PROTEASAS TIPO LON

En procariontes, la degradación de proteínas esta mediada principalmente por cuatro proteasas citosólicas dependientes de ATP altamente conservadas, proteasas Lon, ClpAP, ClpXP y ClpYQ, y por la

proteasa anclada a membrana HflB (FtsH) (Tsilibaris *et al.* 2006). Estas proteasas son miembros de la familia de proteínas AAA+ (ATPasa asociada con una gran variedad de actividades celulares) (Neuwald *et al.* 1999), todas ellas tienen un mecanismo de acción similar, después del reconocimiento y unión al sustrato, la hidrólisis del ATP permite el desplegamiento del sustrato, que es trasladado a la cámara proteolítica en la que tiene lugar la hidrólisis procesiva de enlaces peptídicos (Goldberg *et al.* 1994).

1.2.1. Estructura y mecanismo de degradación por la proteasa Lon

Las proteasas tipo Lon pueden dividirse en dos subfamilias: LonA y LonB. LonA se encuentra en bacterias y células eucarióticas. Las proteasas de la subfamilia A están compuesta por tres diferentes dominios: el dominio N-terminal, el cual se ha relacionado con el reconocimiento del sustrato (Lee *et al.* 2004; Roudiak y Shrader 1998). El dominio AAA+ en el centro de la proteína, responsable de la actividad ATPasa (Goldberg *et al.* 1994) y el dominio C terminal o dominio P, responsable de la actividad peptidasa (ver Figura 1.1). La subfamilia LonB se encuentra en arqueas y únicamente posee el dominio central y el C-terminal.

Lon oligomeriza en forma de un anillo hexamérico (Rudyak *et al.* 2001), una estructura consistente con el ensamble de la mayoría de las proteínas AAA⁺. Tal conformación crea una estructura tipo anillo con una cavidad central llamada fosa proteolítica, con el centro proteolítico activo de cada subunidad localizado en el interior de la cavidad. El centro activo del dominio proteolítico de Lon está formado por los aminoácidos Lys-Ser (Amerik *et al.* 1991) a diferencia de la triada Ser-His-Asp del sitio catalítico de las serina proteasas.

El corte del enlace peptídico por esta proteasa ocurre preferentemente cerca de residuos hidrofóbicos, aunque se han observado múltiples y discontinuas interacciones con los residuos del sustrato en la vecindad del sitio de corte (Van Melderen y Aertsen 2009).

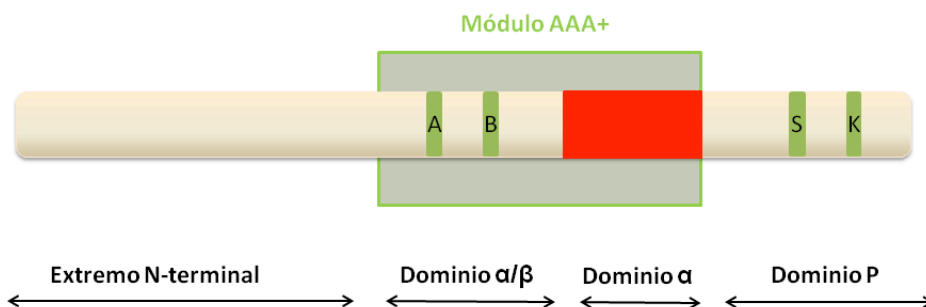


Figura 1.1. Organización estructural las proteasas tipo Lon. Se resalta en verde el módulo AAA+ o dominio ATPasa, en el cual se observan los motivos de unión a nucleótidos Walker A y B, y en rojo el dominio α o de discriminación y unión a sustrato (SSD). En el dominio P se resaltan los residuos catalíticos Ser y Lys. (Lee y Suzuki 2008)

Las proteasas tipo Lon participan tanto en el control general de calidad, al degradar proteínas anormales, como en el control específico de muchas proteínas reguladoras, y además son responsables de la degradación de productos de genes heterólogos sobreexpresados en *E. coli*. Las proteasas tipo Lon reconocen “parches” de aminoácidos hidrofóbicos (preferentemente aminoácidos aromáticos) que normalmente no están expuestos en sustratos adecuadamente plegados (Gonzalez *et al.* 1998).

1.2.2. Proteasas Lon en *Thermus thermophilus* HB27.

En el genoma de *T. thermophilus* HB27, existen tres genes de potenciales proteasas dependientes de ATP. La comparación de secuencias de TTC0418 y TTC0746 muestra similitudes significativas con las proteasas tipo LonA de bacterias, tal como la proteasa Lon de *Escherichia coli*, especialmente en las tres regiones características de las proteasas tipo Lon (Maehara *et al.* 2008). TTC1975 exhibe similitud únicamente en el dominio proteolítico C-terminal. El análisis enzimático de las proteasas de *T. thermophilus* HB27 producidas en *E. coli*, revela que TTC0418 y TTC0746 exhiben actividades peptidasa y proteasa dependiente de ATP contra péptidos sintéticos y caseína respectivamente. Ambas enzimas poseen actividad ATPasa significativa en presencia de sustratos. Por otro lado, TTC1975 posee actividad proteasa contra caseína, pero la adición de ATP no aumenta dicha actividad (Maehara *et al.* 2008).

1.2.3. Características fisiológicas en los mutantes en *lon*.

A pesar de todas las actividades en las que está implicada, Lon no es una enzima esencial bajo condiciones de crecimiento normales en muchas especies de bacterias. *E. coli* K-12 mutante en *lon* es viable *per se*, sin embargo es sensible a agentes que dañan el DNA y acumula proteínas anormales. Los mutantes *lon* presentan además un fenotipo mucosid, consecuencia de la sobreproducción de polisacárido capsular debido a la estabilización del activador transcripcional RcsA. Además, crecen normalmente en medio rico, pero muestran un marcado retraso del crecimiento después de ser transferido a un medio mínimo, posiblemente debido a baja disponibilidad de aminoácidos libres causado por una menor eficiencia en el recambio proteico (Kuroda *et al.* 2001).

1.2.4. Efecto de las mutaciones *lon* en la producción de proteínas heterólogas en *T. thermophilus* HB27.

La producción de 3 proteínas de *Pyrococcus horikoshii* (treonina deshidrogenasa, α -manosidasa y glutamato deshidrogenasa) y una α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*, se vio aumentada únicamente en los mutantes de TTC0764. En el caso de la α -manosidasa (α -man), se observó que la producción se duplicaba en los mutantes de TTC0764 (Maehara *et al.* 2008). Debido a que de *T. thermophilus* HB27, es usada como cepa hospedadora el sistema de selección de proteínas termoestables empleado en esta Tesis, sería de suma utilidad lograr un mutante de delección en estas proteasa, pero sensible a kanamicina, con el objetivo de mejorar la productividad de variantes termoestables de enzimas de interés en la industria y biotecnología.

1.3. LA ADN POLIMERASA DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29

La ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29, el producto del gen viral 2 (p2), es una enzima monomérica de 66 kDa, que pertenece a la familia B de las polimerasas y se caracteriza por utilizar una proteína terminal (TP) para el inicio de la replicación. Esta polimerasa, cataliza dos reacciones sintéticas 1) La polimerización de ADN dependiente de ADN y 2) La deoxinucleotidilación de la proteína terminal, la cual consiste en la formación de un enlace covalente (fosfodiéster) entre el grupo hidroxilo de la Ser232 de la PT y el 5'-dAMP, para lo cual requiere la presencia de iones metálicos divalentes (Peñalva y Salas 1982). La utilización de PT como "primer", implica que la ADN polimerasa ϕ 29 cataliza el paso inicial de la polimerización del ADN viral, (Peñalva y Salas 1982). Además de las dos reacciones sintéticas anteriores, la ADN polimerasa de ϕ 29 posee dos actividades de degradación sobre ADN, 1) la actividad exonucleasa 3'-5' implicada en la actividad correctora de errores (Blanco y Salas 1985) y 2) la pirofosforólisis (Blasco *et al.* 1991). Esta última es la reversa de la actividad de polimerización y su función no ha sido establecida hasta el momento.

1.3.1. Estructura tridimensional de la ADN polimerasa de ϕ 29

La estructura tridimensional de la ADN polimerasa de ϕ 29, (Kamtekar *et al.* 2004) muestra una conformación espacial muy similar a las polimerasas cristalizadas hasta la fecha, en particular a las de la familia B. La resolución de la estructura tridimensional confirma las predicciones hechas por análisis de secuencia y ensayos de mutagénesis puntual. La enzima consiste en un dominio N-terminal exonucleasa (residuos del 5 a 189) y un dominio C-terminal polimerasa (residuos 190 a 575) (Figura 1.2). La estructura y orientación de ambos dominios encajan bien dentro de la estructura de polimerasas de la familia B descrito por primera vez para la polimerasa RB69 (Wang *et al.* 1997).

1.3.1.1. Dominio exonucleasa.

Este dominio está muy conservado en las familias de polimerasas A, B Y C. (Figura 1.2) Además muestra un mecanismo enzimático común catalizado por iones metálicos divalentes. En el caso de la polimerasa $\phi 29$ los residuos de unión a metales divalentes y catalíticos son, D12, E14, D66, K143, Y165 y D169, pertenecientes a los tres motivos altamente conservados entre las polimerasas con capacidad de corrección de errores: Exo I, Exo II y Exo III (ver Figura 1.2 y Tabla 1.1) (Bernad *et al.* 1989; Esteban *et al.* 1994; Soengas *et al.* 1992). La sustitución de cualquiera de los residuos catalíticos por alanina reduce la actividad exonucleasa unas 10^5 veces (Bernad *et al.* 1989; Esteban *et al.* 1994; Soengas *et al.* 1992). También la estructura de la polimerasa $\phi 29$ unida a $(dT)_5$ ha permitido identificar a los residuos T15, N62, y F65, como los residuos del sitio catalítico exonucleasa que contactan con el ADNcs (de Vega *et al.* 2000; de Vega *et al.* 1998). Por último la estructura de la polimerasa con ssADN muestra que el dominio exonucleasa contacta únicamente con las tres bases del extremo 3' del ADN en formación.

1.3.1.2. Dominio polimerasa

El dominio polimerasa, presenta los tres segmentos más conservados entre las ADN polimerasas de eucariotas (Figura 1.2). Estas tres regiones contienen las secuencias de aminoácidos DX_2SLYP , KX_3NSXYG , y $YXDTDS$ (Tabla 1.1). Por mutagénesis dirigida de estos motivos de la polimerasa $\phi 29$ (Bernad *et al.* 1990; Blasco *et al.* 1992; Blasco *et al.* 1993a; Blasco *et al.* 1993b) se ha demostrado que se corresponden con los motivos A, B y C, del sitio catalítico evolutivamente conservado en muchas enzimas que sintetizan ácidos nucleicos (Delarue *et al.* 1990).

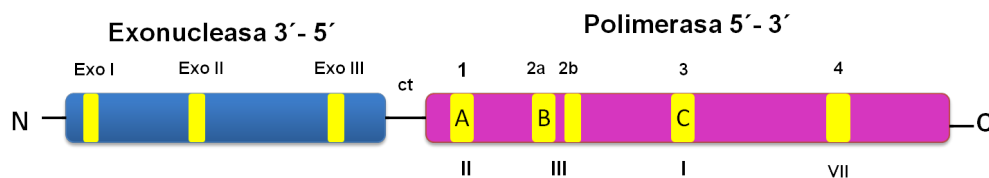


Figura 1.2. Representación de los dominios funcionales de la ADN polimerasa de $\phi 29$. El esquema muestra los motivos más conservados en las ADN polimerasas tanto de origen procariótico como eucariótico. Los dominios N-terminal y C-terminal están representados por un rectángulo de color azul y lila, respectivamente. El enlace entre estos dos dominios (ct) está implicado en la "comunicación" entre ambos dominios. En el dominio C-terminal se indican las diferentes nomenclaturas que reciben las regiones A, B y C, que contienen los motivos más conservados entre las enzimas que sintetizan ácidos nucleicos (Blanco y Salas 1996).

Tabla 1.1. Papel de los diferentes residuos en la actividad catalítica de la ADN polimerasa $\phi 29$. Se resaltan las dos regiones principales de la enzima y se muestran los diferentes motivos con

los residuos implicados en las diferentes actividades catalíticas de la polimerasa $\phi 29$ (Bernad *et al.* 1989; Esteban *et al.* 1994; Soengas *et al.* 1992).

Región	Motivo	Actividades					
		Unión de metal y catálisis	Unión de ADN	Unión a TP	Unión a dNTP	Desplazamiento de hebra	
Exo I	DXE	D12, E14 D66 K143 Y165, D169	T15 Y59, H61, N62, F65, F69, R 96, K110, K112, K 113, S122, L123, F158	F223, Y69, F69, H61, R96, K114, S122, F128		D12, E14, D66	
Exo II	NX ₂₋₃ F/D Pre-(S/T)LX ₂ H KX ₂ H						
Exo III	YX ₃ D						K143, Y165, D169
CT	YXGG		Y226, F230, R223	R223, G228, G229, F230			
A/II	DX ₂ SLYP	D249 R438 D456, D458	S252 K205, Y 315 N387,, G 391, F393, L384 T434, R438 K498, Y500	D332, K305, Y315 T434, R438	Y254		
TPR1							
Pre-B						K371, K379	
B/2 ^a /III	KX ₃ NSXYG					K383, Y390, K392	
2b/III	TX ₂ GR						
C/3/I	YXDTDS					Y454	
4/VII	KXY						

El dominio polimerasa, se divide al igual que otras ADN polimerasas en los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb*, por analogía a la imagen de una mano derecha (Figura 1.3). El subdominio *palm* como en todas las estructuras de las ADN polimerasas conocidas (excepto las polimerasas β) contiene los residuos carboxílicos catalíticos conservados (D249, D456 y D458) responsables de la transferencia de nucleótidos (Steitz *et al.* 1994). El subdominio *fingers*, como el de otras ADN polimerasas de la familia B, contiene un par de hélices α antiparalelas donde se localizan los residuos responsables de unir el nucleótido entrante. Como era de esperar en la estructura de la ADN polimerasa $\phi 29$ sin sustratos, el subdominio *fingers* se encuentra en conformación abierta. Con excepción de la familia Y de ADN

polimerasas, la conformación cerrada del dominio *fingers* ha sido observada solo cuando el dNTP entrante presenta un correcto apareamiento con el molde de ADN. El subdominio *thumb*, presenta una estructura inusual en relación a la estructura de otras polimerasas, pues es un subdominio pequeño de 45 residuos de aminoácidos con carácter poco helicoidal. Este dominio está constituido por un lazo (residuos 530–534), seguido por un conector que contiene una corta hélice de estructura secundaria irregular (535–547) y termina en una estructura tipo horquilla, β -giro- β (residuos 548–575). Por último, como ya se había mencionado antes, esta enzima se diferencia de los otros miembros de la familia B, en que presenta las regiones TPR1 y TPR2 de unión a la proteína terminal.

1.3.1.3. Subdominio TPR1

La inserción TPR1, conforma un subdominio bien definido que se extiende desde el residuo 261 al 358. En la secuencia primaria está ubicada entre los subdominios *palm* y *fingers*. Utilizando el complejo ternario (Polimerasa, PT y dNTP) de la ADN polimerasa de RB69 (ADN polimerasa del fago RB69 de *E. coli.*) se ha modelado la interacción de la ADN polimerasa ϕ 29 con ADN. Este modelado sugiere que el subdominio TPR1 establecería contacto con el surco mayor del ADN a través de los residuos 304-314 de dicha inserción (Kamtekar *et al.* 2004)

1.3.1.4. Subdominio TPR2

TPR2 está localizada entre los subdominios *fingers* y *palm* y presenta gran similitud con una región en forma de horquilla de la RNA polimerasa de T7, ambas presentan la misma conformación y emergen de la misma región del subdominio *palm*.

1.3.1.5. Independencia estructural y comunicación entre los dominios de la ADN polimerasa ϕ 29

Al expresar en *E. coli* derivados de delección de ambos dominios de la ADN polimerasa ϕ 29, se ha observado que el derivado que contiene únicamente los residuos del dominio N-terminal (los primeros 189 residuos), es incapaz de catalizar las reacciones sintéticas de la polimerasa antes descritas, pero retiene la actividad 3'-5' exonucleasa (Blanco y Salas 1985). Por otro lado, el derivado que conserva el dominio polimerasa y ha perdido los primeros 189 residuos, retiene las actividades sintéticas de la polimerasa (Truniger *et al.* 1998), pero carece de actividad 3'-5' exonucleasa. Estos datos demuestran la organización modular de la polimerasa ϕ 29 en dos dominios independientes que contienen las actividades sintéticas y degradativas. A pesar de la organización en dos dominios independientes, la fidelidad de la reacción global catalizada por la polimerasa ϕ 29 requiere de "comunicación" entre las actividades del dominio polimerasa y exonucleasa, este tipo de comunicación implica el movimiento del "primer" (PT) entre los dos dominios.

En este sentido se ha demostrado por mutagénesis puntual que el motivo YXG(G/A), localizado entre los dominios polimerasa y exonucleasa (Figura 1.2), está implicado en la unión a ADN y juega un papel importante en la coordinación entre la síntesis de ADN y la corrección de errores.

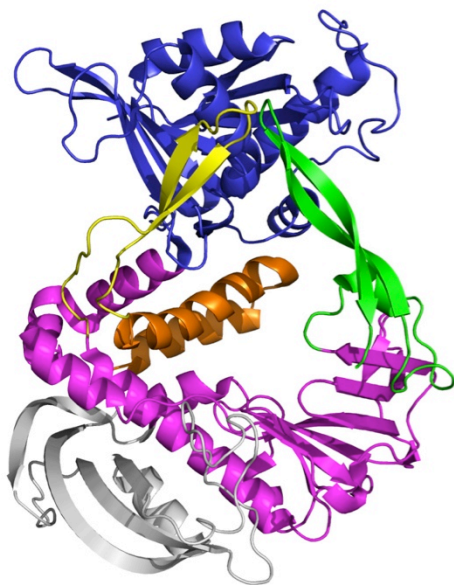


Figura 1.3. Estructura de la ADN polimerasa del fago $\phi 29$. Representación en cintas de la organización por dominios de la ADN polimerasa del fago $\phi 29$. El dominio exonucleasa se muestra en azul, los diferentes subdominios del dominio polimerasa se muestran, en color púrpura el subdominio *palm*; en gris, TPR1; amarillo, TPR2; verde, *thumb* y naranja el subdominio *fingers* (Kamtekar *et al.* 2004).

1.3.1.6. Base estructural del desplazamiento de hebras y la procesividad de la ADN polimerasa $\phi 29$.

En la estructura tridimensional se muestra que la distribución espacial de los dominios y subdominios de la polimerasa $\phi 29$ permite la formación de “túneles *upstream* y *downstream*” que en el modelado con ADN explican la base de la alta procesividad y capacidad intrínseca de desplazamiento de ADN (Kamtekar *et al.* 2004)

El subdominio TPR1, TPR2, junto con los subdominios *thumb*, *palm* y el dominio exonucleasa forman una estructura “anular” que en el modelado de la polimerasa $\phi 29$ con ADN sugiere que este “anillo” estabilizaría el dúplex de ADN “*upstream*” al sitio catalítico de la polimerasa, ya que éste queda abrazado completamente por la polimerasa explica en parte la alta procesividad de la polimerasa $\phi 29$ (Kamtekar *et al.* 2004) (ver Figura 1.4).

Los subdominios TPR2 y *fingers* y el dominio exonucleasa forman un pequeño túnel “*downstream*” cuyas dimensiones (10 x 10 Å) no permiten el paso de ADN de cadena doble por él. Se sugiere que este túnel, llamado túnel “*downstream*” estaría forzando la apertura del ADN aguas abajo y permitiría que solo la cadena molde alcance el sitio catalítico de la polimerasa

(Figura 1.4), de esta manera el túnel “downstream” estaría contribuyendo a la apertura de la doble cadena de ADN (Kamtekar *et al.* 2004).

La alta procesividad y la capacidad intrínseca de desplazamiento de hebra de esta enzima han permitido el desarrollo de un sistema de amplificación isotérmico (a 30°C) de ADN (Dean *et al.*, 2001). Dicho sistema de amplificación es de suma importancia en biotecnología, pero dado que la enzima es inestable a temperaturas mayores de 37 °C está limitado su uso en protocolos de amplificación que impliquen mayor temperatura o el uso de solventes orgánicos. Por esta razón sería muy importante poder seleccionar mutantes termoestables de esta enzima más resistentes a temperaturas y solventes orgánicos, y por ello en la presente tesis se ha aplicado el sistema de interferencia de plegamiento para tratar de aislar mutantes termoestables que puedan ser utilizados en futuras aplicaciones biotecnológicas.

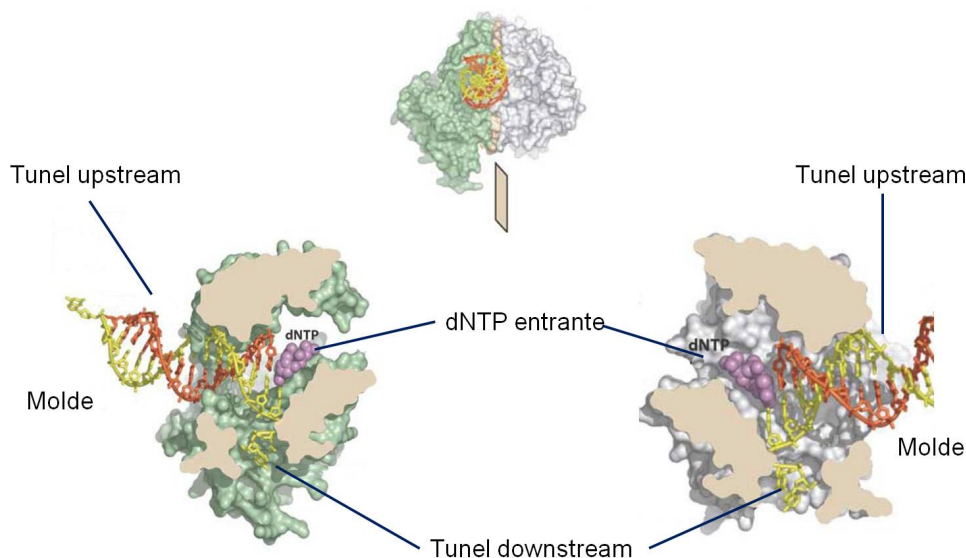


Figura 1.4. Representación de superficie de la ADN polimerasa $\phi 29$ con sustratos (Oligonucleótido, rojo; molde, amarillo; dNTP entrante, púrpura). El corte de la molécula permite observar tres túneles dentro del sitio activo. Un túnel para el dNTP entrante; el túnel downstream, que por sus dimensiones solo permite que la cadena molde aguas abajo alcance el sitio catalítico de la polimerasa y el túnel upstream, de mayores dimensiones por el que saldría la nueva doble cadena de ADN (Kamtekar *et al.* 2004).

1.4. ESTERASAS

1.4.1. Definición y clasificación.

Según la recomendación del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las hidrolasas (EC 3) se clasifican en varias subclases según el enlace sobre el que actúan (éster, peptídico, amida). Las éster hidrolasas (EC 3.1), comúnmente denominadas esterasas, representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la ruptura y formación de enlaces tipo éster. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en animales, plantas, insectos y microorganismos mesófilos y termófilos (Levissou *et al.* 2009) incluyendo *T. thermophilus HB27* (Fuciños *et al.* 2011) y constituyen una familia de enzimas con un amplio rango de sustratos; de ahí que su potencial hidrolítico pueda extenderse a cualquier compuesto que contenga un enlace éster. De acuerdo con la naturaleza del enlace éster sobre el que actúan, las éster hidrolasas han sido subdivididas en: carboxil éster hidrolasas (EC 3.1.1), tioéster hidrolasas (EC 3.1.2), fosfomonoesterasas (EC 3.1.3) y fosfodiesterasas (EC 3.1.4). Las carboxilester hidrolasas (EC 3.1.1) se dividen en dos subclases principales en base a la especificidad de sustrato: carboxil esterasas (EC 3.1.1.1) o esterasas verdaderas y las lipasas (EC 3.1.1.3). Las lipasas son enzimas lipolíticas que constituyen una clase especial de carboxil éster hidrolasas capaces de liberar ácidos grasos de cadena larga de ésteres insolubles en agua (lípidos). Las características físicoquímicas de los sustratos constituyen la principal propiedad que distingue las esterasas lipolíticas de las no lipolíticas.

1.4.2. Diferencias entre lipasas y esterasas.

Aunque lipasas y esterasas muestran una estructura molecular y un mecanismo de acción semejante y a pesar de que su especificidad de sustrato algunas veces se superponga, presentan también varias diferencias que permiten separarlas en 2 grupos. Se suelen definir las esterasas como aquellas que catalizan la hidrólisis de acilglicérols con cadena corta y ausencia de activación interfacial, presentando un mecanismo clásico de Michaelis-Menten (Hari Krishna y Karanth 2002) mientras que las lipasas son enzimas capaces de actuar sobre ésteres de glicerol con una cadena acílica igual o superior a 8 átomos de carbono (y por tanto insolubles en agua), que presentan una estructura tipo “tapadera” y experimentan activación interfacial (Jaeger *et al.* 1999; Verger 1997). La activación interfacial de las lipasas consiste en que dichas enzimas muestran bajas velocidades de catálisis frente a sustratos solubles, pero su actividad hidrolítica sufre un brusco incremento cuando la concentración de sustrato excede de la concentración micelar crítica (Chahiniana y Sarda 2009).

1.4.3. Estructura.

Ambas enzimas presentan un plegamiento α/β hidrolasa (Ollis *et al.* 1992). Éste consiste generalmente en un centro constituido por 8 láminas β

mayoritariamente paralelas (sólo la segunda hebra es antiparalela), rodeadas a ambos lados por hélices α (Figura 1.5). Los elementos de estructura secundaria se unen entre sí a través de unas conexiones o lazos cuya longitud difiere de unas proteínas a otras (Nardini y Dijkstra 1999; Ollis *et al.* 1992). En general, las láminas β presentan un giro helicoidal levógiro, lo que implica que la primera y última hebra se crucen de manera casi perpendicular (Richardson, 1976). Las diferencias más importantes en esta disposición espacial radican en las hélices α que conectan las hebras β de la lámina central. En algunos casos, una o más de estas hebras pueden estar ausentes. Solamente la hélice αC parece estar conservada, pues ocupa una posición estratégica en el centro de láminas β , jugando un papel importante en el correcto posicionamiento del residuo nucleófilo del centro activo (Nardini y Dijkstra 1999; Schrag y Cygler 1997).

En general, se establecen cuatro características esenciales para pertenecer a la familia de las α/β hidrolasas:

- a) el orden de la triada catalítica debe ser nucleófilo-ácido-histidina. El nucleófilo (serina, cisteína o ácido aspártico), ubicado detrás de la hebra $\beta 5$, el residuo ácido, ubicado casi siempre al final de la hebra 7 y la absolutamente conservada histidina, ubicada después de la última hebra (Figura 1.5).
- b) la presencia del codo nucleófilo ($\beta 5$)
- c) la estructura debe comenzar en la lámina $\beta 3$ y poseer al menos 5 hebras β paralelas
- d) la existencia de un largo lazo al final de la hebra $\beta 7$ que permita que las cadenas laterales de los residuos catalíticos establezcan puentes de hidrógeno. De las tres últimas, al menos dos de ellas deben de estar presentes en este tipo de proteínas (Heikinheimo *et al.* 1999).

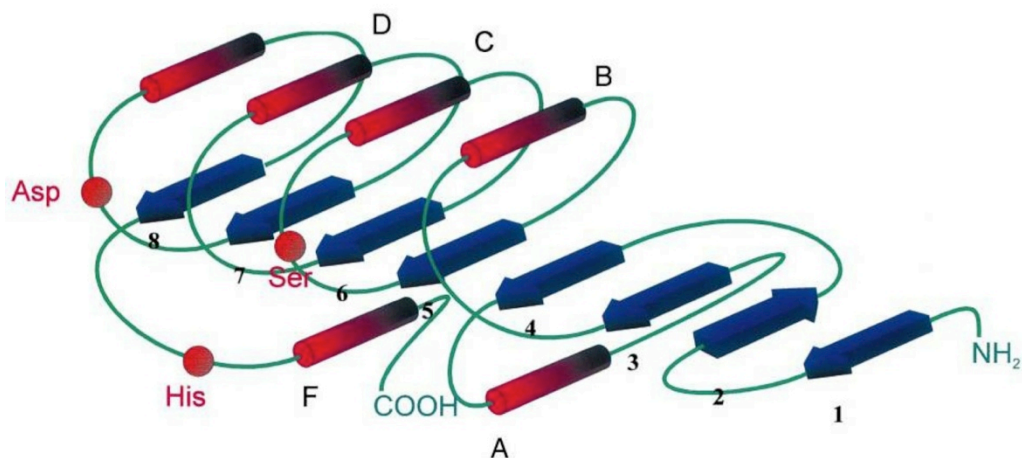


Figura 1.5. Plegamiento α/β hidrolasa típico (Ollis *et al.* 1992). Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa típico. Las láminas β (1 a 8) se muestran como flechas de color azul, las hélices α (A–F), se presentan como cilindros de color rojo. La posición relativa de los aminoácidos de la triada catalítica se indica como círculos de color rojo.

1.4.4. Mecanismo catalítico.

La maquinaria catalítica de las esterasas consta de dos elementos: una triada catalítica y un agujero oxianiónico (Dodson y Wlodawer 1998; Fischer y Pleiss 2003; Pleiss *et al.* 2000). El mecanismo catalítico es similar al descrito para las serín-proteasas y ocurre en varias etapas (Dodson y Wlodawer 1998), basado en un sistema de transferencia de carga a través de la llamada “triada catalítica”, formada por serina, histidina y ácido aspártico (Brady *et al.* 1990) (Figura 1.6).

En primer lugar la serina activa se sitúa próxima al grupo carbonilo del enlace a romper. Los residuos de serina no suelen ser reactivos, pero éste se encuentra en un entorno poco habitual, ya que está muy próximo a una histidina. El protón de la serina se transfiere al anillo de la histidina (paso 1), dejando en la serina una carga negativa. Normalmente, esta transferencia sería imposible debido a los pK_a elevados de los grupos alcohol ($-\text{OH}$), pero parece facilitarse por un residuo ácido (tercer residuo de la triada catalítica) que, por su carga negativa, estabiliza la protonación del anillo de histidina adyacente. La serina activada es un fuerte nucleófilo y puede atacar al carbonilo del sustrato, formando un estado de transición tetraédrico (paso 2). La ruptura del enlace éster se produce en este estado activado, dando un intermediario acilo-enzima. El grupo alcohol liberado extrae el protón de la histidina (que originalmente era el protón de la serina). El intermediario acilo-enzima es entonces hidrolizado por una molécula de agua (paso 3). Ésta se coloca entre el grupo acilo y la histidina y le transfiere un protón. El grupo –

OH restante se une al intermediario acilo para formar un nuevo estado de transición tetraédrico. Este proceso es esencialmente una inversión de la formación del intermediario acilo inicial. La estabilización de los estados de transición tetraédricos generados en el transcurso de la reacción es llevada a cabo por el denominado “agujero oxianiónico”. En éste se establecen puentes de hidrógeno entre el oxígeno cargado negativamente del sustrato y determinados grupos NH de residuos proteicos. Por último (paso 4), el protón se transfiere desde la histidina de nuevo a la serina y se rompe el intermediario acil-enzima, liberando así el componente acilo. La enzima vuelve a su estado original y está preparada para catalizar la hidrólisis de otra molécula de sustrato. Si en lugar de agua es un alcohol el que realiza el ataque nucleófilo en el intermediario tetraédrico 2, se liberará un éster y, en lugar de la reacción de hidrólisis, se producirá una transesterificación.

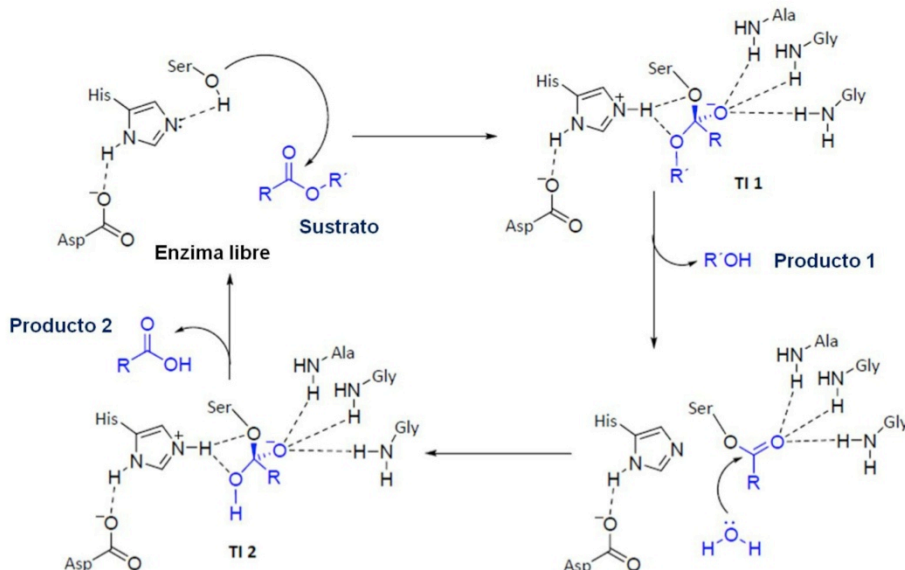


Figura 1.6. Representación esquemática del mecanismo catalítico de las serin hidrolasas. Se muestran los residuos del centro activo (Ser, His y Asp) y los que constituyen el hueco oxianiónico (Ala, Gly y Gly).

1.4.5. Aplicaciones de lipasas y esterasas en la industria

1.4.5.1. Lipasas.

Estas enzimas son biocatalizadores muy versátiles. Pueden llevar a cabo un amplio espectro de reacciones de bioconversión tales como hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholisis, acidólisis y aminólisis (Pandey *et al.* 1999). De ahí el incremento exponencial de sus aplicaciones en biotecnología en comparación con otras enzimas hidrolíticas. La razón de su enorme potencial biotecnológico viene explicada por los siguientes hechos:

a) estabilidad en solventes orgánicos b) no requieren cofactores, c) amplia especificidad de sustrato y d) en algunos casos, elevada enantioselectividad (Jaeger y Reetz 1998).

1.4.5.2. Esterasas.

En la industria farmacéutica las esterases se usan para obtener fármacos ópticamente puros o precursores de los mismos a partir de mezclas racémicas (Bornscheuer 2002). Probablemente la esterasa más conocida es la llamada carboxil esterasa NP (por el naproxeno), aislada de *B. subtilis* (Quax y Broekhuizen 1994) que se utiliza para la resolución de (R, S)-naproxeno y de (R,S)-ibuprofeno metilester con una excelente pureza óptica. Para la síntesis de ibuprofeno también se utiliza la esterasa de *Pseudomonas sp.* (Kim *et al.* 2002a; Kim *et al.* 2002b). Además, la esterasa de *Trichosporon brassicae* se usa en la producción del fármaco antiinflamatorio ketoprofeno (Wu *et al.* 2003).

En agricultura se han utilizado las fosfodiesterasas para sintetizar compuestos organofosforados como el Cumafos y sus oxoderivados, ampliamente usados como insecticidas y nematicidas. Los residuos de estos compuestos son tóxicos ambientales que pueden contaminar productos alimenticios. En este contexto, las fosfodiesterasas de *Brevundimonas diminuta* y *Alteromonas sp.* han sido usadas en detoxificación y degradación de este tipo de compuestos organofosforados (Horne *et al.* 2002)

Un ejemplo prominente del uso de carboxil esterases para la industria alimentaria es la liberación del ácido ferúlico de la pared polisacáridica de plantas. El ácido ferúlico es precursor de la vainilla, un saborizante ampliamente utilizado y de alto valor comercial (Gasson *et al.* 1998).

En la industria cosmética, la feruloil esterasa de *Aspergillus niger*, se utiliza para la síntesis del ester pentilferulato, usado en cosméticos y perfumes (Giuliani *et al.* 2001)

En la industria de la pulpa y del papel, la esterol esterasa de *Ophiostoma piceae*, se usa para la reducción de “pitch” en el proceso de manufactura de papel. (Calero-Rueda *et al.* 2002).

1.4.6. Esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFEI).

La esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFEI, uniprot P22862) es una de tres esterases descritas a principios de la década de los 90 (Choi *et al.* 1990; Hong *et al.* 1991; Kim *et al.* 1994). En el contexto genómico se encuentra como un gen aislado, no formando parte de ningún operón. Presenta afinidad por sustratos aromáticos, siendo clasificada como una “aril

esterasa” y guarda homología estructural y funcional con haloperoxidasas (Pelletier y Altenbuchner 1995).

1.4.6.1. Estructura de PFEI.

La estructura tridimensional de PFEI (Cheeseman *et al.* 2004) muestra que es una proteína globular, con plegamiento de tipo α/β hidrolasa, presenta un núcleo de 8 láminas plegadas β y 10 hélices α que rodean el núcleo de la proteína (Figura 1.7). Una característica estructural importante de la PFEI, es la presencia una larga inserción en forma de “V”, llamada lazo $\alpha 6$ - $\alpha 7$, este lazo cruza entre las láminas $\beta 6$ - $\beta 7$ y topológicamente es análoga a la tapa de las lipasas (Schrag y Cygler 1997). En las lipasas, la tapa controla la activación interfacial, pero no hay evidencias que sugieran que en la catálisis por PFEI se produzca este tipo de activación.

La triada catalítica de PFEI (nucleófilo-ácido-histidina), está constituida por la Ser94, Asp222 y por la His251. La serina catalítica está ubicada en un codo nucleofílico y como parte de la secuencia conservada de las lipasas y esterasas Gly- X^1 -Ser- X^2 -Gly. En la PFEI, X^1 es la Phe93 y X^2 es Met95. La His251 y Asp222 están en posición consistente con el mecanismo hidrolítico. El hueco oxaniónico está formado por la amida N-H de Trp28 y la Met95. El centro activo está parcialmente oculto por el lazo $\beta 6$ - $\beta 7$, limitando el acceso directo solo a pequeños sustratos en ausencia de grandes cambios conformacionales de la enzima. La superficie del interior del sitio activo es de pequeño volumen y muestra dos bolsillos de unión diferentes, uno para acomodar la porción acilo del éster y el otro para el residuo alcohólico.

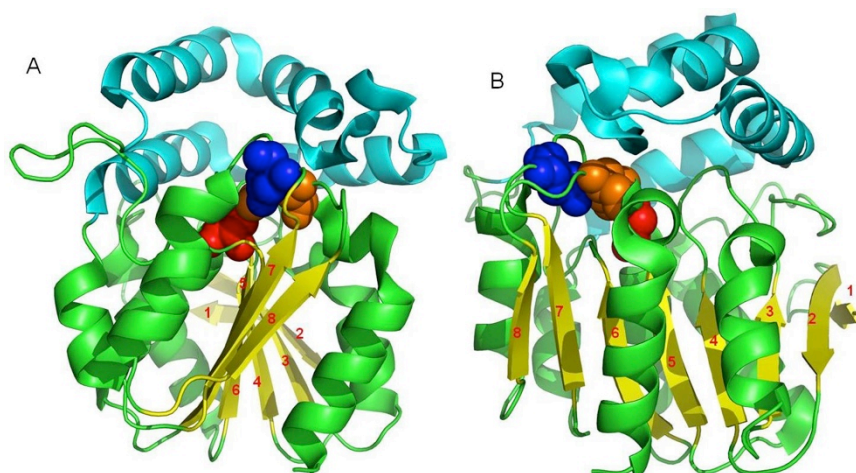


Figura 1.7. Diagrama de cinta de PFEI. La PFEI pertenece a la familia de las α/β hidrolasas. En la imagen A, se hace énfasis en la triada catalítica, rojo, Ser94; azul, Asp222 y naranja, His251; como se puede observa el centro activo está parcialmente cubierto por el lazo $\beta 6$ - $\beta 7$ (color celeste). En la imagen B se resalta la estructura secundaria de la proteína, en amarillo se observan las 8 láminas β que conforman el centro de la estructura, en color verde 6 hélices alfa

que flanquean a ambos lados las láminas β ; en celeste se observan 4 hélices α que forman el lazo $\beta 6$ - $\beta 7$ que limita la entrada al centro activo.

1.4.6.2. Aplicaciones biocatalíticas de PFEI.

PFEI presenta una gran versatilidad en la hidrólisis de ésteres. Se ha demostrado que tanto los ésteres de vinilo como los ésteres de arilo son buenos sustratos de la PFEI (Liu *et al.* 2001). Por otro lado, PFEI está muy relacionada con la familia de las haloperoxidasas que no contienen grupo hemo, mostrando de hecho una baja actividad haloperoxidasa, aprox. 470 veces menor que la haloperoxidasa de *Pseudomonas pyrocinia* (Pelletier y Altenbuchner 1995).

Debido a los diversos tipos de sustratos sobre los que puede actuar, la PFEI silvestre se utiliza en la síntesis de D- β -acetiltioisobutirato en fase orgánica (Krebsfänger *et al.* 1998). Además, se han generado variantes de PFEI con enantioselectividad mejorada para ciertos compuestos quirales. La mutación Thr230Ile y Thr230Pro incrementa la enantioselectividad hacia metil (S)-3-bromo-2-metilpropanoato. Las mutaciones puntuales Asp158Asn, Leu181Gln, Asp158Leu y Leu181Ser incrementan la enantioselectividad hacia etil (R)-3-fenilbutirato (Horsman *et al.* 2003). Los mutantes Phe144Leu/Phe159Leu y Phe126Leu/Phe144Leu/Phe159Leu, mostraron mayor enantioselectividad en la resolución cinética del acetato de 1-fenil-1-propilo que la esterasa silvestre (Schließmann *et al.* 2009). Por otro lado, la variante puntual Phe125Ile y la doble variante G119Ser/Phe125Ile, han mostrado mayor eficiencia catalítica que el silvestre (10 veces la eficiencia catalítica) hacia ésteres de 4-nitrofenol con cadenas entre 8 y 10 átomos de carbono (Hidalgo *et al.* 2008). Recientemente se ha descubierto que PFEI posee una actividad (-)- γ -lactamasa promiscua y enantioselectiva, que ha sido mejorada a un nivel de interés industrial por la introducción de la mutación Leu29Pro (Torres *et al.* 2012b).

1.5. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y TERMOESTABILIZACIÓN

La metodología tradicional para descubrir nuevos biocatalizadores incluye la búsqueda de muestras en varios ecosistemas para aislar microorganismos con actividades catalíticas interesantes. En las últimas décadas, la metagenómica y el desarrollo de bases de datos de genomas ha facilitado la búsqueda de nuevas enzimas con aplicación en biotecnología; sin embargo, la mayoría de las aplicaciones de las enzimas no se focalizan en la reacción catalizada en la naturaleza. Además, las condiciones de reacción (p.ej. disolvente, molaridad, pH, temperatura, etc.) suelen diferir sustancialmente de las condiciones del ambiente en las que la enzima ha evolucionado. Así, es probable que la actividad, especificidad de sustrato,

enantioselectividad y estabilidad deban ser mejorados (Turner 2009). La ingeniería de proteínas ha emergido como una alternativa gracias a los avances en biología molecular y bioinformática, las cuales han hecho posible la modificación en la actividad de las de enzimas por cambio en su secuencia de aminoácidos.

1.5.1. Termoestabilización de proteínas

La aplicación de enzimas en procesos biotecnológicos, requiere de biocatalizadores que puedan ser reciclados y reutilizados eficientemente, de tal forma que los procesos sean más económicos y competitivos que la síntesis química convencional. Para ello se necesitan enzimas que presenten mayor estabilidad en las condiciones de laboratorio tales como temperatura elevada, presencia de solventes orgánicos, alta concentración de sustrato y producto, etc. (Lehmann 2001). Lo anterior ha llevado a la obtención de variantes modificadas de enzimas de organismos mesófilos con la resistencia de las proteínas de microorganismos termófilos pero conservando suficiente flexibilidad como para mantener su actividad catalítica a “baja temperatura”. Sin embargo, no es fácil predecir qué cambios hay que hacer en una proteína para convertirla en termoestable, incluso conociendo la estructura 3D, debido a que la estabilidad de las proteínas no puede ser atribuido a un determinante común y por tanto la predicción de mutaciones con el efecto deseado mediante diseño racional es aún una tarea difícil en ingeniería de proteínas (Savile *et al.* 2010).

Las dos estrategias principalmente utilizadas para mejorar proteínas son el diseño racional y la evolución dirigida (Figura 1.8).

1.5.1.1. Diseño racional

El diseño racional está basado en la predicción del cambio de aminoácidos con el que se logrará el cambio deseado en las propiedades de la proteína. El efecto de las modificaciones planeadas se simula *in silico* mediante modelado molecular, y las variantes más prometedoras son generadas mediante mutagénesis dirigida. Para que esto sea posible es necesario conocer la estructura de la proteína (o al menos un modelo de homología), los aminoácidos conservados y el mecanismo catalítico. Los aminoácidos conservados pueden ser identificados por alineamiento de secuencia o de estructura (Jochens *et al.* 2009). El método de diseño racional más recientemente desarrollado para predecir la termoestabilidad de una proteína está basado en el factor-B (Reetz y Carballeira 2007). El factor-B es la atenuación de la dispersión de los rayos X causados por el desplazamiento o vibración de los átomos de una proteína cristalizada. Por lo tanto, el valor del factor-B puede relacionarse con el grado de flexibilidad de un aminoácido en la proteína e indicaría el efecto de ese residuo sobre la estabilidad térmica, entendida como rigidez de la proteína. Residuos que muestran un alto valor

de factor-B, son por tanto sujetos de mutagénesis saturante. Este parámetro ha sido utilizado para aumentar la termoestabilidad de la lipasa A de *Bacillus subtilis* (Reetz y Carballeira 2007) y de la PFEI (Jochens *et al.* 2010). Tomando en cuenta que la termoestabilización de proteínas es un fenómeno complejo y que no hay reglas generales que puedan ser aplicadas a cualquier proteína para lograr este objetivo, es probable que el diseño racional deje fuera de su estrategia un número importante de cambios que podrían lograr el mismo o mayor grado de estabilización que el logrado con la focalización de cambios a residuos con alto valor B. Además es difícil predecir interacciones entre mutaciones, p. ej, sinergias (referencia).

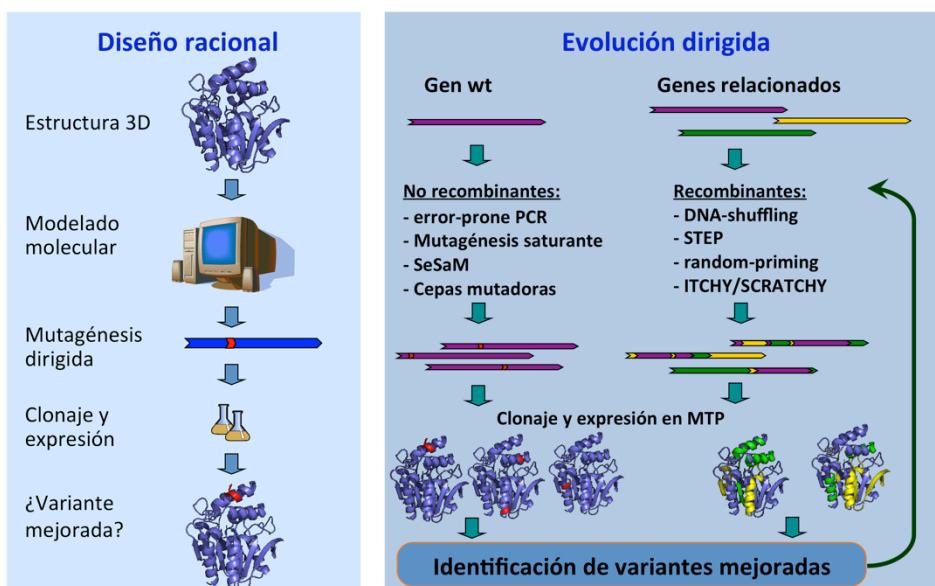


Figura 1.8. Estrategias para la mejora de las propiedades de una enzima mediante ingeniería de proteínas

1.5.1.2. Evolución dirigida

La evolución dirigida se basa en la generación aleatoria de diversidad genética (por sustitución, delección o inserción de nucleótidos) y la identificación del mejor mutante de entre un grupo amplio de genes. Por lo general, los mejores candidatos identificados en la primera generación son mejorados en siguientes ciclos. Así éste es un proceso iterativo que será continuamente repetido hasta que el resultado sea satisfactorio. Una ventaja importante de la evolución dirigida es que no necesita información estructural sobre la proteína a mejorar previamente a la realización del experimento.

Los requisitos para esta estrategia son: la disposición del gen de interés, un sistema de expresión adecuado, un método efectivo para crear

genotecas de mutantes y un método de selección adecuado (Bornscheuer *et al.* 1998). Los dos pasos críticos para la evolución dirigida son: generar una biblioteca de variantes no sesgada, con un grado de diversidad que cubra suficiente espacio de secuencia para lograr el mutante esperado y contar con un método de cribado o selección de alto rendimiento que permita identificar la variante mejorada.

1.5.1.3. Métodos de mutagénesis

Las características ideales que un método de mutagénesis debería poseer (Lutz y Patrick 2004), son: a) espectro de mutación no sesgado, b) frecuencia de mutación controlable, c) sustitución de nucleótidos consecutiva d) que permita una mutagénesis en conjunto (p.ej., Introducir principalmente aminoácidos cargados positiva o negativamente, evitar codones de parada, etc), e) independiente del tamaño del gen, f) técnicamente simple y reproducible y g) económica. Debido a la degeneración del código genético, una genoteca con una alta frecuencia de mutación no es suficiente para que se generen todos los cambios de aminoácidos posibles. Para saturar la posición de un aminoácido, los tres nucleótidos que conforman el codón deben ser cambiados. Así, en teoría, un método ideal de mutagénesis debe sustituir estadísticamente cualquier aminoácido presente en la proteína por cada uno de los otros 19.

Los métodos de mutagénesis se dividen en no recombinantes y recombinantes. En los primeros, el gen que codifica la proteína de interés es mutado sin incluir secuencia alguna de otros genes. La PCR propensa al error (epPCR) es el método más práctico y rápido, por esa razón es el más utilizado para generar mutagénesis al azar en un fragmento de ADN dado. Alterando las condiciones óptimas de una PCR, al aumentar la concentración de Mg^{2+} , introducir Mn^{2+} y alterar la proporción de nucleótidos, la frecuencia de error de la Taq polimerasa puede ser aumentada de 0.001-0.02% a más del 1% (Arnold y Georgiou 2003; Cadwell y Joyce 1992). Las desventajas de la epPCR son, un espectro no homogéneo de mutaciones en el cambio de nucleótidos y a menudo se observa una baja eficiencia de ligación de fragmentos de la epPCR con el vector (Neylon 2004). Para superar estos problemas se ha desarrollado polimerasas mejoradas como la Pfu-Pol (exo-) (Biles y Connolly 2004).

Por otro lado existen también métodos de evolución recombinantes basados en la combinación de secuencias de ADN para generar diversidad. El objetivo es acumular las mutaciones ventajosas y eliminar las deletéreas de forma similar a la recombinación sexual que ocurre en la naturaleza. El primer método de recombinación al azar descrito es el *DNA shuffling* (Stemmer 1994). Este método está basado en la recombinación de fragmentos de ADN que se generan por mutagénesis al azar del gen de interés y posterior digestión parcial con DNasa I. A pesar de que es una

técnica que ha probado su eficiencia (Crameri *et al.* 1996), funciona únicamente con genes homólogos y estos no siempre están disponibles; la digestión con DNasa I es difícil de controlar, la eficiencia de ligación durante la ligación suele ser baja y la combinación de fragmentos suele ocurrir mayoritariamente entre secuencias con mayor homología, generando nuevamente el gen parental. Muchas optimizaciones y variaciones del *DNA shuffling* han sido publicadas para evitar los inconvenientes antes descritos (Crameri *et al.* 1998; Ness *et al.* 2002).

1.5.1.4. Métodos de cribado o “screening”

Los métodos de cribado evalúan clones individuales y requieren la preparación de algunas variantes de ensayo tales como pruebas de actividad en placa, ensayos en placa multipocillo, arrays, chips, etc (Aharoni *et al.* 2005). La mayoría de estos métodos utilizan sustratos cromogénicos o fluorogénicos. Los métodos cromogénicos son los más utilizados debido a que son fácilmente manejables. Suelen realizarse en placa con agar sólido (ensayo de *overlay*) o en placas multipocillo. En este último caso, se emplean en combinación con equipos de alto rendimiento como robots o equipos de espectrofotometría o fluorimetría. Los derivados del *p*-nitrofenol (Moore y Arnold 1996; Reetz *et al.* 1997), son habitualmente empleados porque la hidrólisis de sus esteres libera *p*-nitrofenol, cuya forma desprotonada tiene un color amarillo intenso y de este modo la velocidad de la reacción puede ser medida a través del incremento en la absorbancia del producto.

1.5.1.5. Métodos de selección

Tras generar una genoteca con el grado de diversidad deseado, el siguiente objetivo es que solo las variantes de interés pasen los sucesivos filtros establecidos y que los mejores candidatos puedan seguir siendo evaluados hasta lograr la proteína con las características deseadas (Tamakoshi *et al.* 2001). Tradicionalmente, los métodos de selección que utilizan como estrategia la viabilidad de un microorganismo suelen basarse en “la supervivencia de los individuos más aptos”. Al eliminar una gran cantidad de variantes que no interesan, los métodos de selección suelen ser menos laboriosos y más eficientes que las técnicas de “screening”; así, algunos sistemas de selección permiten el análisis de hasta 10^{10} variantes al mismo tiempo, actuando sobre poblaciones completas sin necesidad de realizar ensayos individuales.

En el caso de selección de proteínas termoestables, se han descrito algunos métodos de selección funcionales en microorganismos termófilos. Los primeros ejemplos descritos son la selección de mutantes termoestables de los genes de resistencia a antibióticos tales como, la kanamicina (Matsumura y Aiba 1985), bleomicina (Brouns *et al.* 2005) e higromicina B.

Estas resistencias termoestables han sido utilizadas en *Thermus thermophilus* (Nakamura *et al.* 2005b) y *Sulfolobus solfataricus* (Cannio *et al.* 2001). Además de las proteínas de resistencia a antibióticos, se han termoestabilizado otras como la α -galactosidasa de *Bacillus stearothermophilus* (Fridjonsson *et al.* 2002) y las 3-isopropilmalato deshidrogenasas de *E. coli* (Tamakoshi *et al.* 1995) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Tamakoshi *et al.* 2001). Entre las limitaciones de los métodos funcionales están la imposibilidad de ser aplicados a proteínas sin actividad enzimática y la dificultad de hacer a un organismo dependiente de una actividad enzimática dada. Para superar esta limitación, se han desarrollado sistemas de selección independientes de actividad que pueden ser aplicadas en la selección de proteínas termoestables.

La técnica Proside (“PROtein Stability Increased by Directed Evolution”) (Sieber *et al.* 1998) vincula la resistencia a proteasas de las variantes estables de una proteína con la infectividad de un fago filamentoso, pero este método tiene limitaciones severas respecto al tamaño de la proteína a seleccionar (<110 aminoácidos); otros sistemas, como la presentación en levaduras (*yeast display*) (Richman *et al.* 2006) pueden aplicarse a la selección de mutantes termoestables de proteínas de gran tamaño, pero requieren herramientas para la selección con FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (p. ej. anticuerpos), que son caros y no siempre están disponibles para la proteína de interés. Un ejemplo más es el método de fusión de una proteína de interés con *folding reporter* GFP (frGFP) (Waldo *et al.* 1999). Mediante este método se relaciona el correcto plegamiento de la proteína de interés con el plegamiento de una variante de GFP sensible a la interferencia, que podrá ser detectada gracias a la fluorescencia emitida.

Utilizando *T. thermophilus* HB27 como hospedador, se ha desarrollado un sistema de selección independiente de actividad, aplicable en principio a cualquier tipo de proteína (Chautard *et al.* 2007). El sistema parte de la premisa de que las proteínas termoestabilizadas deben plegar mejor a temperaturas elevadas que la proteína parental no termoestable, y utiliza el principio de “interferencia de plegamiento” sobre una proteína testigo que confiere resistencia termoestable a kanamicina. En el vector desarrollado (pNCK) puede clonarse de forma dirigida el gen de la proteína de interés, generando una fusión N-terminal a la kanamicina nucleotidil transferasa termoestable. Dicha fusión es expresada desde el promotor constitutivo PslpA, garantizando un nivel elevado de expresión, de forma que las variantes más estables provocan un mayor nivel de resistencia a kanamicina dando lugar a clones resistentes al antibiótico (Chautard *et al.* 2007). Este método ha sido empleado con éxito en la termoestabilización de proteínas sin actividad enzimática como los interferones alfa, beta y gamma humanos. Además se han seleccionado mutantes termoestables de enzimas tales como, una lipasa de *Bacillus subtilis* y una formiato deshidrogenasa de 45 kDa de *Pseudomonas* sp.) (Chautard *et al.* 2007) (ver Figura 1.9).

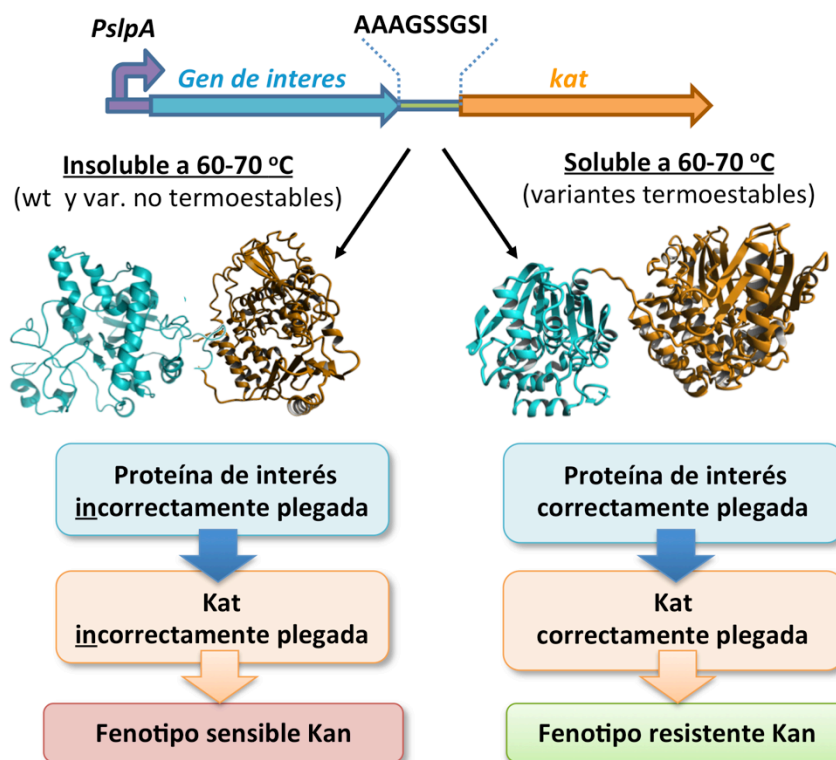


Figura 1.9. Esquema del sistema de selección de proteínas termoestables en *T. thermophilus* HB27. El sistema usa como vector de termoselección el plásmido pNCK, en el cual se puede clonar el gen de interés quedando en el extremo N-terminal de la kanamicina nucleotidil transferasa termoestable, entre ambas existe una secuencia llamada "linker" que consiste de una secuencia flexible de aminoácidos que sirve de unión flexible entre el N-terminal y el C-terminal (Chautard *et al.* 2007).

2. OBJETIVOS

A la vista del estado actual del tema y de los antecedentes teóricos expuestos en la introducción, se propusieron los siguientes objetivos para este trabajo de tesis:

1. Estudio del efecto de las proteasas homólogas a Lon sobre la expresión recombinante de fusiones a la kanamicina nucleotidil transferasa en *Thermus thermophilus*
2. Termoestabilización de la ADN polimerasa del fago $\phi 29$.
3. Termoestabilización de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas

Las estirpes bacterianas empleadas en este trabajo se describen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cepas empleadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia
E. coli DH5 α	supE44 Δ lacU169 (F80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(Hanahan 1983)
T. thermophilus HB27	Silvestre. Aerobio	Cedida por el Dr. Koyama
T. thermophilus HB27 TTC0746::kat	Mutante de inserción TTC0746::kat	Presente trabajo
T. thermophilus HB27 Δ TTC0746 (tb. Δ lon)	Mutante de delección gen de proteasa tipo lon	Presente trabajo

3.1.2. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo se describen en las Tablas 3.2 y 3.3.:

3.1.2.1. Plásmidos de otras investigaciones

Tabla 3.2 Plásmidos procedentes de otros trabajos empleados en esta Tesis

Nombre	Marcador/Utilidad	Referencia
pUC18	Amp ^r , Plac-lacZ' Vector de clonaje intermedio de las regiones flanqueantes del gen del gen TTC0746 .	(Vieira y Messing 1982)
pK18	Kan ^r . pUC18 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por kanamicina. Vector de clonaje intermedio de las regiones flanqueantes del gen del gen TTC0746 .	L. A. Fernández-Herrero (datos de laboratorio)
pET28-b	Amp ^r , Kan ^r , vector de clonaje intermedio del gen TTC0746 para compeltentar cepa T. thermophilus mutantes en TTC0476.	Novagen
pGASTON-PFEI	Derivado de pGASTON, Amp ^r , posee un promotor inducible por L-ramnosa. Utilizado como vector de clonación y expresión de mutantes de la esterasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Proporcionado por el Prof. U. Bornscheuer
pGASTON-	Derivado de pGASTON-PFEI, producido por	Dr. Aurelio

Nombre	Marcador/Utilidad	Referencia
PFEI-T3	mutagénesis dirigida	Hidalgo
pGASTON-PFEI-F158L	Derivado de pGASTON-PFEI, producido por mutagénesis dirigida,	Dr. Aurelio Hidalgo
pMH184	Hyg ^r vector de clonaje del gen TTC0476, para complementar cepas <i>T. thermophilus</i> mutantes en proteasa lon.	(Cava <i>et al.</i> 2007)
pNCK	Derivado de pUC18 por inserción del gen <i>kat</i> , clonado a <i>EcoRI/HindIII</i> desde pUC18Rep. En posición 5' del gen <i>kat</i> se encuentra una secuencia que codifica 9. Utilizado para seleccionar variantes termoestables de proteínas en <i>T. thermophilus</i> HB27.	(Chautard <i>et al.</i> 2007)
pNCK- ϕ 29	Derivado de pNCK por la inserción del gen de la polimerasa del fago ϕ 29 (BamHI /Not I). Usado como molde para amplificación por PCR de los dominios silvestres de la polimerasa del fago ϕ 29	Proporcionado por el Dr. Mario Mencía

3.1.2.2. Plásmidos construidos en el presente trabajo

Tabla 3.3 Plásmidos construidos en este trabajo

Nombre	Marcador/Utilidad	Referencia
pUC18 Δlon	Vector derivado de pUC18, que contiene las regiones flanqueantes del gen del gen TTC0746 (<i>EcoRI/XbaI/HindIII</i>).	Presente trabajo
pH118 Δlon	Derivado de pH118 Hyg ^r , que contiene las regiones flanqueantes del gen del gen TTC0746 (<i>EcoRI/XbaI/HindIII</i>).	Presente trabajo
pH118 $\Delta lon::kat$	Derivado de pH118 Δlon Kan ^r , por inserción de cassette de kanamicina (<i>XbaI</i>) y digestión con <i>EcoRI</i>	Presente trabajo
pK18 Δlon	Derivado de pK18 Kan ^r , que contiene las regiones flanqueantes del gen del gen TTC0746 (<i>EcoRI/XbaI/HindIII</i>).	Presente trabajo
pET28b-TTC0746	Amp ^r , Kan ^r , vector de clonaje intermedio del gen TTC0746 para complementar cepas de <i>T. thermophilus</i> mutantes en el gen TTC0476 ().	Presente trabajo
pGASTON-PFEI 34	Derivado de pGASTON-esterasa silvestre, Utilizado para sobreexpresar el clon 34 mutante termoestable de la esterasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Presente trabajo
pGASTON-PFEI - HJ	Derivado de pGASTON-esterasa silvestre, producido por mutagénesis dirigida para usar como control de estabilidad de	Dr. Aurelio Hidalgo

		mutantes termoestables	
pGASTON-PFEI T3-34		Derivado de pGASTON-esterasa silvestre, producido por mutagénesis dirigida,	Dr. Aurelio Hidalgo
pGASTON-PFEI S7-34		Derivado de pGASTON-esterasa silvestre, producido por mutagénesis dirigida,	Dr. Aurelio Hidalgo
pMH184-TTC0746		Kan ^r , vector de clonaje del gen TTC0476, para complementar cepas de <i>T. thermophilus</i> HB27 mutantes en proteasa lon (XbaI/EcoRI)	Presente trabajo
pNCK-exo		Derivado de pNCK por inserción del gen silvestre del dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29 (BamHI /Not I), Utilizado como molde para generar una genoteca por mutagénesis	Presente trabajo
Genoteca pNCK-exo	1	Generada por mutagénesis al azar del dominio exonucleasa silvestre, clonado en el vector pNCK (BamHI /Not I)	Presente trabajo
Genoteca pNCK-exo	2	Generada por mutagénesis dirigida (QuikChange Multi®, Stratagene.) del dominio exonucleasa, clonado en el vector pNCK (BamHI /Not I)	Dr. Mario Mencía
pNCK-Dpolwt		Derivado de pNCK por inserción del gen silvestre del dominio polimerasa de la polimerasa ϕ 29 (BamHI /Not I)	Presente trabajo
pNCK-DpolD248E		Mutante inactivo derivado de pNCK-Dpolwt por mutagénesis puntual. Utilizado como molde para generar una genoteca por mutagénesis	Presente trabajo
pNCK-PFEI		Derivado del pNCK por inserción del gen silvestre de la esterasa I de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , (BamHI /Not I) se utilizó como molde para mutagénesis	Presente trabajo
Genoteca pNCK-PFEI		Derivado del pNCK-PFEI por mutagénesis. Utilizada para seleccionar variantes termoestables de PFEI 67.5 °C en <i>T. thermophilus</i> HB27(BamHI /Not I)	Presente trabajo
pNCK-PFEI-34		Derivado de pNCK- PFEI, seleccionado de la genoteca pNCK- PFEI a 67.5 °C en <i>T. thermophilus</i> HB27 (BamHI /Not I)	Presente trabajo

3.1.3. Oligonucleótidos utilizados

Tabla 3.4 Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'→ 3	Uso/Diana restricción
TTC0746upEcoRIfw	AAAAAAGAATTTCGGACCGTCT ACCCGAG	Oligonucleótido directo que amplifica la región anterior al gen TTC0746, EcoRI.

TTC0746upXbarv	AAAAAATCTAGAAGCCTAAGC CTACCTATGTCAAGTT	Oligonucleótido reverso que amplifica la región anterior al gen TTC0746, XbaI.
TTC0746downXbalfw2	AAAAAATCTAGAGGACCAGG TCCTGGACCTG	Oligonucleótido directo que amplifica la región posterior al gen TTC0746, XbaI.
TTC0746downHindr v2	AAAAAAAAGCTTCGGACCCCT CTACACCCTC	Oligonucleótido reverso que amplifica la región posterior al gen TTC0746, HindIII
TTC0746 Ndelfw3	AAAAAACATATGCTACCGGAA ACCATG	Oligonucleótido directo que amplifica el gen TTC0746, NdeI.
TTC0746EcoRIrv	AAAAAAGAATTCCTAGGCATG GGCCACGAGCT	Oligonucleótido reverso que amplifica el gen TTC0746, EcoRI.
TTC0746confirmfw	CCATCGGCGGGGTGAAGG	Oligonucleótido directo para confirmar la delección del gen TTC0746
TTC0746confirmrv	GCCGTCCGGGTTCTTGCG	Oligonucleótido reverso para confirmar la delección del gen TTC0746
Upconfirmfw	GGAGCTCCACGGGGA	Oligonucleótido directo para confirmar la delección del gen TTC0746
Downconfirmrv	GCACCGGGACCGGAGGC	Oligonucleótido reverso para confirmar la delección del gen TTC0746
ExoBamHlfw	AAAAAAGGATCCCCGAGAAA GATGTATAGTT	Directo para amplificar el dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29
ExoNotlrw	AAAAAAGCGGCCGCACTGTC ACTGCCTGCTGTCATCCG	Reverso para amplificar el dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29
D-polBamHlfw	AAAAAAGGATCCACAGCAGG CAGTGACAGTCTAAA	Directo para amplificar el dominio polimerasa de la polimerasa ϕ 29
D-polNotlrw	AAAAAAGCGGCCGCTTTGATT GT	Reverso para amplificar el dominio polimerasa de la polimerasa ϕ 29
pNCKepfw3	ACTCGCCCGTCTCGGGTTC	Oligonucleótido directo, amplificación y secuenciación de genes clonados en el pNCK

pNCKeprv2	CGACCAAGAGAGCCATAAAC ACC	Oligonucleótido reverso, amplificación y secuenciación de genes clonados en el pNCK
PFEINdelfw	AAAAAACATATGAGCACATTT GTTGC	Oligonucleótido directo que amplifica el gen PFEI, NdeI.
PFEIBamHlrv	AAAAAAGGATCCGCGTTTCAA GAACG	Oligonucleótido reverso que amplifica el gen PFEI, BamHI.
M13fw	GTAAAACGACGGCCAG	Directo utilizado para la secuenciación de clonajes realizados en vectores pUC y derivados
M13rv	CAGGAAACAGCTATGAC	Reverso utilizado para la secuenciación de clonajes realizados en vectores pUC y derivados
Rrnbrv	CCGCCAGGCAAATTCTGT	Secuenciar derivados de la esterasa clonados en el plásmido pGASTON
Rhapfw	CATCATCACGTTTCATCTTCC	Secuenciar derivados de la esterasa clonados en el plásmido pGASTON

3.1.4. Antisueros

Tabla 3.5 Antisueros usados en este trabajo

Nombre	Características	Referencia
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano. Anticuerpo secundario en Western-blot.	Bio-Rad
α -Pol	Anticuerpo de conejo contra la polimerasa ϕ 29, utilizado en ensayos de Western blot.	Proporcionado por el Dr. Mario Mencía
α -Kat	Anticuerpo de conejo contra la kanamicina nucleotidil transferasa. Utilizado en ensayos de Western blot.	Dr. Aurelio Hidalgo

3.2. TAMPONES Y DISOLUCIONES

Tabla 3.6 Tampones y disoluciones usadas

Nombre	Composición	Utilidad
Tampón TAE 1x	Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM.	Electroforesis en geles de agarosa.
Tampón de carga Laemmlí 5X	Tris-HCl 300 mM pH 6.8, SDS 5%, β-mercaptoetanol 10 %, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.002%, 25mM EDTA.	Preparación de muestras de proteínas para su análisis en SDS-PAGE.
Tampón de electroforesis 5X	Tris 125 mM pH 8.8, glicina 1M, SDS 20 mM.	Tampón para geles de SDS-PAGE.
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.
Solución de revelado	1.25 mM Luminol, 36 μM Luciferina y 0.022% H ₂ O ₂ en Tris-HCl 100 mM pH 8'0	Revelado de membranas de Western blot.
TBS-Tween 1x	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%.	Solución de bloqueo, lavado y dilución de anticuerpos para ensayos de Western blot.
Tampón de carga de ADN 10X	TAE 10X, glicerol 30%, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF.	Preparación de muestras para electroforesis de ADN.
RNasa A	2 mg/ml de RNasa A en Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 0.1M, glicerol 20% y hervir durante 10 minutos para eliminar ADNsas.	Eliminación de RNA de muestras.
Tampón A	0.4 mg/ml de 1 -naftil acetato, acetona 1:10 (v/v) en tampón fosfato 50 mM pH 7,5.	Detección de actividad esterasa en gel de Acrilamida.
Tampón B	1 mg/ml de Fast Red TR en tampón fosfato 50 mM pH 7.5.	Detección de actividad esterasa en gel de Acrilamida.
Solución de renaturalización	Tris-HCl 20 mM a pH 8,0 con 0,5% (p/v) de Tritón X-100	Renaturalizar esterasas en gel de poliacrilamida
Tampón de equilibrado	Fosfato 50 mM pH8.0, 300 mM NaCl.	Equilibrado del pH de la resina.
Tampón de lavado	Fosfato 50 mM pH7.0, NaCl 300 mM.	Lavado de resinas de cromatografía de afinidad.
Tampón de Elución	Fosfato 50 mM pH7.0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol.	Liberar la proteína de la columna de cobalto.
Solución I de minipreps	Tris 25 mM pH7.5, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM.	Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina
Solución II de minipreps	NaOH 0,2 M, 1% SDS.	Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina
Solución III de minipreps	3 M de Acetato potásico, 0,5 M ácido acético glacial	Purificación de ADN plasmídico por lisis

Nombre	Composición	Utilidad
Tampón mutagénico 10x	70 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 100 mM Tris (pH 8.3 a 25°C), y gelatina 0.1 % (peso/vol.)	alcalina Se utiliza en PCR propensa al error

3.3. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1. Condiciones de crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

T. thermophilus fue cultivado a 60 ó 70 °C en medio TB (tripticasa BBL 8g/l, extracto de levadura Gibco 4 g/l y NaCl 3 g/l, pH 7.5) (Fernández-Herrero *et al.* 1995). El crecimiento en aerobiosis fue realizado en matraces rellenos con medio de cultivo líquido hasta 1/5 de su capacidad, con una agitación de 150 rpm. Se añadieron los antibióticos respectivos cuando las condiciones lo requerían. El medio sólido se obtuvo suplementando el medio TB líquido con agar (Pronadisa) a una concentración final de 1.5% p/v. Las placas, con una concentración de kanamicina de 30 µg/ml para la obtención de mutantes, se incubaron a la temperatura indicada durante 48 horas en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio. Para la selección de derivados termoestables de los dominios la polimerasa del fago φ29 y de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFEI), se utilizaron temperaturas y concentraciones de kanamicina específicas para cada caso, las cuales se detallan en cada apartado correspondiente.

E. coli fue cultivado a 37 °C en medio LB (Lennox 1955) líquido en matraces o tubos rellenos con medio de cultivo hasta ¼ de su capacidad con una agitación de 150 rpm, o con agar (1.5% p/v). En algunas ocasiones el crecimiento de *E. coli* se realizó a 21 °C cuando se requería para la sobreexpresión de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens*. Para la selección de recombinantes utilizando su actividad β-galactosidasa, se añadió X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) (Roche) a una concentración final de 40 µg/ml en las placas de selección. Se utilizaron varios antibióticos cuando se requería seleccionar algún clon determinado. Estos fueron: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), higromicina (100 µg/ml) y bleomicina (15 µg/ml en el caso de *T. thermophilus* HB27). El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la densidad óptica a 550 nm (DO₅₅₀) en el caso de *T. thermophilus* HB27 y 600 nm (DO₆₀₀) para *E. coli*, la medición se realizó en un espectrofotómetro Hitachi U-2000.

Las estirpes bacterianas fueron conservadas en placa durante un máximo de un mes, a 4 °C en el caso de *E. coli* y el mismo tiempo a temperatura ambiente en el caso de *T. thermophilus*.

Cuando se requería su almacenamiento durante largos periodos de tiempo, las cepas de *E. coli* se mantuvieron a -70 °C en medio de crecimiento en presencia de glicerol 20% (v/v). Las células de *T. thermophilus*, se conservaron a -20 °C en forma de sedimentos celulares compactos y semi-secos (pellets).

3.3.2. Transformación bacteriana

La transformación de *E. coli*, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan 1983). En el caso de *T. thermophilus*, tanto la estirpe silvestre como sus mutantes fueron transformadas por competencia natural (Koyama *et al.* 1986), añadiendo 0.1- 0.2 µg de ADN a 0.6 ml de cultivo en fase exponencial tardía (aprox. 0.4 DO₅₅₀) en medio de crecimiento TB. En el caso de *T. thermophilus* HB27, cuando fue necesaria una alta eficiencia de transformación, se utilizó la electroporación para transformar las células. Cincuenta µl de células electrocompetentes preparadas de manera análoga a *E. coli* (Sambrook *et al.* 1989), fueron incubadas con el ADN durante 30 minutos a 4 °C, y posteriormente fueron sometidas a un pulso corto (5 ms) en un campo eléctrico de 12500 V/cm (Easyject Plus D2000; 2500 V, 201 Ω y 25 µF, en cubetas de 0.2 cm de grosor). Tras la transformación, las bacterias se incubaron, en todos los casos, en medio rico sin antibiótico, a su temperatura óptima de crecimiento el tiempo necesario para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico correspondiente. En el caso de *E. coli*, este tiempo venía determinado por el tipo de antibiótico que se estuviera utilizando, siendo de 60 minutos en el caso de Ampicilina y de 120 minutos si se empleaba kanamicina, higromicina o bleomicina. Para *Thermus*, independientemente del antibiótico (kanamicina, higromicina o bleomicina) el tiempo siempre fue de 4 horas. Tras este período de incubación, la suspensión se extendió en placas de selección con el antibiótico correspondiente y se dejaron crecer los transformantes durante 12 horas a 37 °C para *E. coli*, y 24 a 48 horas a una temperatura de crecimiento entre 60 y 70 °C para *T. thermophilus* HB27.

3.4. MANIPULACIÓN DEL ADN

3.4.1. Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*

La obtención del ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos saturados de *E. coli* o de *T. thermophilus* HB27, utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989) o bien, cuando la pureza requerida para el ADN era mayor, utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega).

3.4.2. Preparación de ADN cromosómico de *T. thermophilus* HB27

La purificación de ADN cromosómico, se realizó a partir de cultivos saturados de de *T. thermophilus* HB27, utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) usando el protocolo de extracción de ADN para bacterias Gram negativas.

Las concentraciones de ADN genómico y plasmídico fueron determinadas por espectrofotometría en un equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

3.4.3. Técnicas de amplificación y clonaje

Para la amplificación de ADN utilizamos la ADN polimerasa de *T. thermophilus* (Biotools B&M), y en determinados casos se añadió la de *Pyrococcus furiosus* (Roche Molecular Biochemicals o Biotools B&M), en una relación 3:1 para aumentar la fidelidad de la amplificación. Se utilizó 1 unidad de la enzima, con el tampón suministrado por la casa comercial, 10% DMSO, entre 3 y 4 mM de Cl_2Mg , 0,5 mM de una mezcla igualada de dNTPs y 50 pmol de cada oligonucleótido (Sigma-Aldrich), cuya secuencia se muestra en la sección 3.1.3 con un volumen final de reacción de 25 o 50 μ l. Para la amplificación se han utilizado varios termocicladores, principalmente el modelo iCycler de Bio-Rad, y el MásterCycler Personal de Eppendorf. Como molde utilizamos ADN plasmídico, ADN cromosómico, o cultivos celulares. La digestión del ADN, tanto del procedente de una PCR como del plasmídico, fue realizada siguiendo las condiciones de tampón, temperatura y concentración, recomendadas por la casa suministradora para cada una de las diferentes enzimas de restricción utilizadas, tanto individuales, como en dobles reacciones (Fermentas).

La ligación de fragmentos de ADN fue llevada a cabo con la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs), utilizando las condiciones recomendadas por la casa comercial, con 1 unidad en un volumen final de 20 μ l, ajustando la relación molar vector:inserto a 1:3. Las muestras fueron incubadas a 16 °C durante 16 horas. Diferentes volúmenes de estas ligaciones fueron utilizadas para transformar 50 μ l de células competentes. Para disminuir la cantidad de vector religado los extremos de éste fueron defosforilados, utilizando para ello Fosfatasa antártica (New England Biolabs). Se realizó una incubación a 37 °C durante 2-4 horas siguiendo las recomendaciones de la casa distribuidora.

3.4.4. Electroforesis y purificación de fragmentos de ADN

La separación electroforética de fragmentos de ADN fue realizada en geles de agarosa 0.8% (p/v) (Sigma Low EEO) en tampón TAE 1X. La

purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa fue realizada mediante el kit Wizard SV gel and PCR Clean-up (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.5. Generación de mutaciones puntuales: QuikChange™

Esta reacción fue realizada para generar mutaciones puntuales de los dominios de la polimerasa $\phi 29$ y de la esterasa I de *Pseudomonas fluorescens* (PFEI). Para introducir las mutaciones se realizó una amplificación del plásmido que contenía el gen a mutar utilizando dos oligonucleótidos complementarios portadores de la mutación y la enzima PfuPlus! (Gdansk, Polonia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar el ADN molde se realizó una digestión durante 1 hora con la enzima de restricción *DpnI*, que digiere ADN metilado y hemimetilado. A continuación se transformaron células de *E. coli* DH5 α con 5 μ l del resultado de la digestión y se seleccionaron los transformantes por resistencia a ampicilina.

3.4.6. Generación de mutaciones múltiples: QuikChange Multi™

Se utilizó esta reacción para generar genotecas con las mutaciones más frecuentemente encontradas en los ensayos de termoselección de los dominios de la polimerasa del fago $\phi 29$. Se siguieron las indicaciones descritas en el protocolo del kit Multi Site-Directed Mutagenesis de Stratagene.

3.4.7. Creación de genotecas por mutagénesis al azar

Todas las genotecas aleatorias fueron generadas por PCR propensa al error (*error-prone PCR*, epPCR). El protocolo para epPCR incluye variantes sobre el protocolo típico de PCR tales como, un programa de amplificación con mayor número de ciclos, 2.5-5 unidades de Taq polimerasa (GoTaq®Flexi, Promega) mezcla no equimolar de dNTPS (10 mM dATP y dCTP; 2 mM dTTP y dGTP), tampón “mutagénico” (ver sección 0) y diferentes concentraciones de MnCl₂ (Cadwell y Joyce 1995). Además, con excepción de la genoteca del dominio polimerasa, en todos los casos se utilizó como molde de la epPCR la construcción pNCK con el gen silvestre de interés insertado con las dianas de restricción BamHI/NotI. En el caso de la genoteca del dominio polimerasa se utilizó como molde la construcción pNCK-pold248E. También se utilizó el mismo par de oligonucleótidos pNCK-epfw3 y pNCK-eprv2 para la epPCR. Estos oligonucleótidos hibridan en el vector pNCK 50 pares de bases aguas arriba y 50 pares de bases aguas abajo de las secuencias de restricción de inicio y finalización del gen de interés, de tal forma que, se generaba un producto de epPCR con un “brazo” de corte que permitió mayor eficiencia a la hora de clonar en pNCK(BamHI/NotI). Antes de proceder a generar las genotecas definitivas, se establecieron condiciones de

mutagénesis adecuadas basadas en resultados de secuenciación. Una vez establecidas las condiciones de mutagénesis, se ligó el producto final de la epPCR con el vector pNCK, previa digestión de ambos con las enzimas para las secuencias de restricción descritas anteriormente.

3.4.7.1. Genoteca del dominio exonucleasa de $\phi 29$

Como se mencionó anteriormente, la genoteca del dominio exonucleasa fue generada por PCR propensa al error (epPCR). La mutagénesis esperada se logró con la mezcla de reacción y programa de amplificación en termociclador que se muestran en las Tablas 3.7 y 3.8 respectivamente.

Tabla 3.7. Mezcla de reacción para la epPCR del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$.

Reactivo	Cantidad
Agua ultrapura	csp 400 μ l
Buffer mutagénico	40 μ l
dNTPs no equimolares:	40 μ l
MnCl ₂ (10 mM)	10 μ l
pNCK-epfw3 (100mM)	4 μ l
pNCK-eprv2 (100mM)	4 μ l
ADN molde	80 ng
GoTaq polimerasa (5U/ μ l)	4 μ l

Tabla 3.8 Programa de termociclador para epPCR del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$.

Ciclo	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	Desnaturalización	95	1
2 a 31	Desnaturalización	95	1
	Anillamiento	59	1
	Elongación	72	1 min/kb
32	Elongación final	72	10

3.4.7.2. Genoteca del dominio polimerasa de $\phi 29$

La mutagénesis esperada para la genoteca del dominio polimerasa se logró con la mezcla de reacción y programa de amplificación en termociclador que se muestran en las Tabla 3.9 y 3.10, respectivamente.

Tabla 3.9. Mezcla de reacción para la epPCR del dominio polimerasa de la polimerasa $\phi 29$.

Reactivo	Cantidad
Agua ultrapura	csp 400 μ l
Buffer mutagénico	40 μ l
dNTPs no equimolares	40 μ l

MnCl ₂ (10 mM)	4 µl
pNCK-epfw3 (100mM)	4 µl
pNCK-eprv2 (100mM)	4 µl
ADN molde	80 ng
GoTaq polimerasa (5U/µl)	4 µl

Tabla 3.10. Programa de termociclador para epPCR del dominio polimerasa de la polimerasa ϕ 29

Número de ciclo	paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	95	1 minuto
2 a 31	Desnaturalización	95	1minuto
	Anillamiento	59	1minuto
	Elongación	72	1 minuto y 30 segundos
32	Elongación final	72	10 minutos

3.4.7.3. Genoteca de PFEI.

La mutagénesis esperada para la genoteca PFEI se logró con la mezcla de reacción y programa de amplificación en termociclador que se muestran en las Tablas 3.11 y 3.12 respectivamente.

Tabla 3.11. Mezcla de reacción para la epPCR de PFEI.

Reactivo	Cantidad
Agua ultrapura	csp 400µl
Buffer mutagénico	40 µl
dNTPs no equimolares	40 µl
MnCl ₂ (10 mM)	2.5 µl
pNCK-epfw3 (100mM)	4 µl
pNCK-eprv2 (100mM)	4 µl
ADN molde	80 ng
GoTaq polimerasa	4 µl

Tabla 3.12. Programa de termociclador para ep PCR de la PFEI

Número de ciclo	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	95	1 minuto
2 a 31	Desnaturalización	95	1minuto
	Anillamiento	59	1minuto
	Elongación	72	1minuto
32	Elongación final	72	10 minutos

3.4.8. Secuenciación del ADN

El ADN plasmídico fue secuenciado de forma automática en la Unidad de Genómica del parque Científico de Madrid o en la empresa Secugen (Madrid).

3.5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.5.1. Preparación de extractos para electroforesis

Para la obtención de proteínas totales tanto de *E. coli* como de *T. thermophilus*, las células fueron recogidas por centrifugación suave. El sedimento celular fue lavado en tampón Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM y resuspendido en tampón de ruptura de Laemmli 1X. Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y posteriormente centrifugadas durante 10 minutos a 15000 ×g en una minicentrífuga Hettich Zentrifugen Mikro para separar los restos insolubles correspondientes a la envoltura celular. El extracto así obtenido fue analizado mediante SDS-PAGE.

Para separar las fracciones solubles e insolubles en *E. coli*, las células fueron recogidas y lavadas como en el caso anterior, posteriormente el sedimento fue resuspendido en el mismo tampón de lavado al que, según el caso se añadió inhibidor de proteasas (Complete Mini de Roche, una pastilla cada 10 ml de tampón), siempre que no se fuera a proceder a la purificación de alguna enzima, en un volumen variable entre 0,3-1 ml, y siempre a una temperatura cercana a los 4 °C. La suspensión celular fue lisada mediante ultrasonidos (*sonicación*) aplicando 2 pulsos de 30 segundos – 1 minuto a 18 µm de amplitud en un aparato LABSONIC U (B. Braun) (potencia: máxima; intensidad: alta; frecuencia de ciclo: 0.8 s). Una vez realizada la sonicación, las células no rotas fueron eliminadas mediante centrifugación a baja velocidad (3000 ×g, Hettich Zentrifugen Mikro, 10 minutos, 4 °C). La separación de la fracción proteica soluble de la insoluble fue realizada mediante centrifugación de este lisado a alta velocidad (16000 ×g, Hettich Zentrifugen Mikro, 15 minutos, 4 °C). Posteriormente, las fracciones fueron lavadas en el mismo tampón y centrifugadas de nuevo en las mismas condiciones. La fracción insoluble fue resuspendida en un volumen igual al de la fracción soluble del tampón usado. Para el análisis por SDS-PAGE se añadió tampón de Laemmli 5X a estos extractos y fueron hervidos y centrifugados como en el caso de las proteínas totales.

Para separar las fracciones soluble y de membrana de *T. thermophilus* HB27, se partió de células en fase exponencial, que fueron lisadas mediante ultrasonidos, seguido de una centrifugación suave (3000 ×g, 5 min) para eliminar células intactas. Posteriormente, las fracciones soluble y de membrana fueron separadas mediante dos pasos de centrifugación consecutivos (2000 ×g, 20 min). Las proteínas divididas bien en la fracción

soluble o de membrana fueron separadas por SDS-PAGE y analizadas mediante “Western Blot”.

3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación electroforética de proteínas fue realizada mediante geles SDS-PAGE discontinuos (10-12%) (Laemmli 1970). La visualización de las proteínas fue realizada mediante tinción con Azul de Coomassie (0,25% Brilliant Blue-R en 45% metanol, 10% acético) y posterior lavado con 45% metanol, 10% acético, o bien por transferencia de las proteínas a membrana para su inmunodetección (“Western-Blot”) con los anticuerpos conjugados correspondientes.

3.5.3. Western blot

Las proteínas resueltas en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (“Immobilon-P”, Millipore), prehumedecida en metanol y equilibrada en “tampón de transferencia”. La transferencia en semiseco fue efectuada en un aparato Novablot 2117-250 (LKB) durante 30-60 minutos a 0.8 mA/cm² en presencia de “tampón de transferencia”. Posteriormente las membranas se bloquearon con leche desnatada 3% en tampón TBS-Tween durante 1 h, y después se incubaron durante otra hora con el anticuerpo indicado a la concentración estimada en cada caso, siempre a temperatura ambiente. Tras este tiempo se efectuaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween para eliminar el anticuerpo no unido. La presencia del anticuerpo primario unido a las proteínas se determinó con un anticuerpo secundario modificado para su detección mediante quimioluminiscencia, que se puso en contacto con la membrana durante una hora a temperatura ambiente, y utilizando la solución reveladora de Western blot. En algunas ocasiones se precisó utilizar la misma membrana para la inmunodetección de dos proteínas diferentes, para lo cual, y tras haber realizado y revelado el primer Western-blot, se eliminó la interacción de los anticuerpos con la proteína sumergiendo la membrana en *solución de stripping* a 50 °C y con agitación durante 30 minutos. Tras esta incubación se lavó abundantemente con TBS-Tween.

3.5.4. Expresión y purificación de PFEI y sus variantes en *E. coli*.

El plásmido utilizado para la expresión de estas enzimas en *E. coli* fue pGASTON. Éste es un vector seleccionable con ampicilina y posee un promotor inducible por L-ramnosa (Stump *et al.* 2000). En este vector se introdujeron las secuencias codificantes de las distintas esterasas amplificadas mediante PCR con las dianas para enzimas de restricción *Nde*I en 5' y *Hind*III en 3', utilizando para ello los oligonucleótidos específicos que están detallados en la tabla correspondiente. La inducción fue realizada por adición de L-ramnosa a una concentración final de 0.2% (p/v) a un cultivo

líquido cuya OD₆₀₀ fue 0.5. Luego de la inducción, se dejó el cultivo en agitación a 22 °C, y 18 horas más tarde se sedimentaron las células por centrifugación (15 min, 4°C, 3900 ×g). El sedimento de células fue resuspendido en 10 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5, y luego fueron rotas por sonicación en hielo (20 minutos, pulso 50% y amplitud del 60%); tras otro paso de centrifugación (15 minutos a 4 °C 3900xg), la fracción soluble de proteínas se puso en contacto con la resina TALON[®] CellThru (Clontech), de afinidad por cobalto. Se incubó la resina con la fracción soluble con agitación rotatoria durante 1 h a 4 °C, y después se procedió al lavado de la resina para eliminar otras proteínas que presentan interacciones no específicas con el soporte cromatográfico. Tras esto, se eluyó la proteína de interés utilizando el tampón de elución que contenía 150 mM de imidazol. El equilibrado y lavado de la resina, así como la elución de la proteína se realizaron con las soluciones recomendadas por el fabricante (Clontech). Luego se diafiltró y concentró la proteína en dispositivos de centrifugación Amicon[®] Ultra 15 (Millipore) y finalmente se suplementó con glicerol a una concentración final de 50% (v/v) y se almacenó a -20 °C.

3.5.5. Expresión y purificación de la ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29 y sus variantes en *E. coli*.

El plásmido utilizado para la expresión de la ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29 en *E. coli* fue proporcionado por el Dr. Mario Mencía. Éste es un vector seleccionable por ampicilina y la expresión de la polimerasa se halla bajo el control de un promotor de T7, a su vez bajo el control de lacUV. En este vector se introdujeron las modificaciones de las distintas variantes de ϕ 29 mediante mutagénesis dirigida utilizando para ello los oligonucleótidos específicos que están detallados en la tabla correspondiente. La inducción fue realizada por adición de IPTG a una concentración final de 0.5 mM a un cultivo líquido cuya OD₆₀₀ fue 0.5. Luego de la inducción, se dejó el cultivo en agitación a 30 °C, y 5 horas más tarde se sedimentaron las células por centrifugación (15 min, 4°C, 3900 ×g). El sedimento de células fue resuspendido en 10 ml de tampón fosfato 50 mM, pH 7.5, y luego fueron rotas por sonicación en hielo (20 minutos, pulso 50% y amplitud del 60%). Tras otro paso de centrifugación (15 minutos a 4 °C 3900xg), la fracción soluble de proteínas se puso en contacto con la resina Strep-tactin Superflow[®] de alta capacidad (IBA GmbH), de afinidad por Strep-tag. Se purificaron las proteínas siguiendo las instrucciones del fabricante, a 4 °C.

3.6. MÉTODOS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

3.6.1. Generación de mutantes de *T. thermophilus* en el gen *ttc0746*

La obtención de mutantes de delección en proteasas del tipo Lon, se llevó a cabo en dos pasos. El primero fue la interrupción del gen seleccionado mediante la inserción de un elemento génico que dotaba al organismo receptor de resistencia termoestable a kanamicina. El segundo paso consistió en la eliminación completa del gen del genoma bacteriano, empleando el plásmido suicida pH118, seleccionable con higromicina B.

3.6.1.1. Mutantes de inserción *T. thermophilus* HB27 (*ttc0746::kat*)

Para la generación de este mutante se utilizó el plásmido no replicativo en *T. thermophilus*, pH118. Se clonaron las regiones flanqueantes del gen TTC0746, (1 kpb cada una aproximadamente), que servirían luego como zonas de recombinación homóloga para la integración del plásmido en el genoma del microorganismo. A continuación se clonó el gen de la kanamicina nucleotidil transferasa termoestable en medio de los dos brazos de recombinación. Una vez lograda la construcción, se llevó a cabo la digestión del plásmido con la enzima EcoRI (Fermentas) para linealizar la construcción. Seguidamente se transformó la cepa a mutar (*T. thermophilus* HB27 silvestre) y se seleccionaron los mutantes por crecimiento en placas con kanamicina 30 µg/ml (Figura 3.1A). La comprobación de la integración del plásmido y delección del gen se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para confirmar la mutación del gen TTC0746 (proteasa tipo Lon).

3.6.1.2. Mutantes de delección de *T. thermophilus* HB27 en el gen *ttc0746* (Δ Lon)

Para generar este tipo de mutantes se llevó a cabo una segunda transformación utilizando el plásmido no replicativo pH118, en el que se habían clonado las mismas regiones flanqueantes el gen *ttc0746* (1 kpb cada una aproximadamente) empleadas para la mutagénesis insercional. Seguidamente se transformó con este plásmido cepas mutantes *T. thermophilus* HB27 *ttc0746::kat*. Los transformantes se seleccionaron por resistencia a doble antibiótico (kanamicina e higromicina B). Una vez comprobado mediante doble resistencia a antibiótico la integración del segundo plásmido, se procedió a crecer los clones obtenidos en medio líquido carente de antibiótico, realizando pases sucesivos hasta que se observó el fenotipo sensible a kanamicina e higromicina en placa, como consecuencia de la escisión recombinativa del plásmido. Se confirmó la mutación por PCR con los oligonucleótidos especificados en la tabla correspondiente. Un esquema de la realización de estos mutantes y la comprobación de la correcta integración se puede ver en la Figura 3.1B.

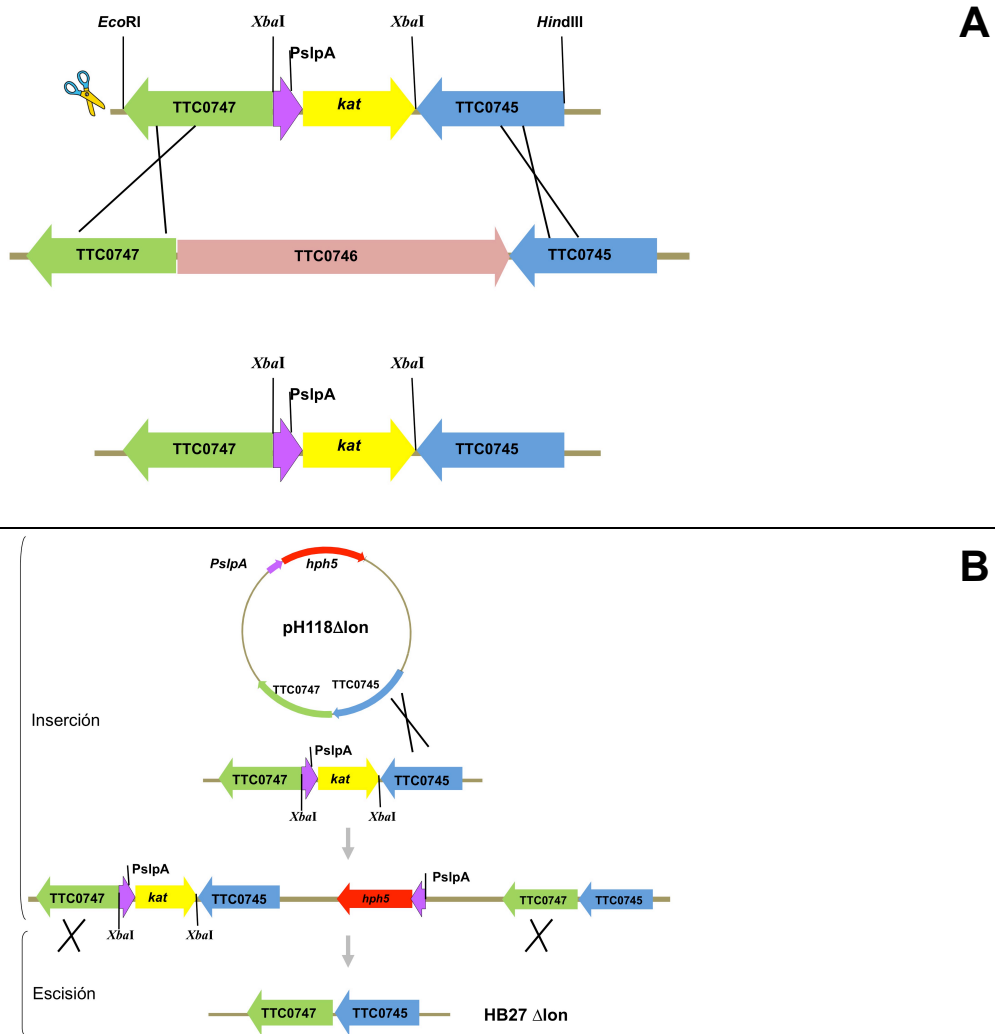


Figura 3.1 Esquema de la construcción de mutantes de inserción (A) y de delección (B) de genes en *T. thermophilus*

3.6.2. Ensayo de complementación de mutantes de proteasa tipo Lon

La complementación del gen de la proteasa tipo Lon (TTC0476), se realizó mediante la transformación de los mutantes *T. thermophilus* HB27 Δlon con el plásmido pMH184 en el que se había clonado el gen *ttc0476*. Los mutantes reconstituidos fueron seleccionados por resistencia a higromicina B 100 $\mu\text{g/ml}$.

3.7. ENSAYOS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.7.1. Actividad proteolítica

La actividad proteolítica del mutante de *T. thermophilus* en el gen *ttc0746*, por medio de un ensayo enzimático (Protease Fluorescent Detection Kit, Sigma-Aldrich) siguiendo las especificaciones del fabricante. Además se evaluó la estabilidad de fusiones proteína-Kat por medio de Western blot.

3.7.2. Actividad esterasa en placa multipocillo

Este ensayo se utilizó para cuantificar en líquido la actividad, las constantes cinéticas y la inactivación térmica o por solventes de PFEI. El método está basado en la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol (acetato, butanoato, octanoato) al correspondiente ácido y *p*-nitrofenol. A pH ligeramente alcalino, el *p*-nitrofenol está ionizado y su ión tiene color amarillo, pudiendo ser cuantificado fotométricamente a 410 nm. La medición se realizó en el lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). Para los ensayos de inactivación térmica, se incubó la proteína en el tampón de reacción a 65 °C y con una agitación de 800 rpm. En el caso de inactivación por solventes, se mantuvieron a 42 °C con una agitación de 800 rpm. En el caso del cálculo de constantes cinéticas, las velocidades medidas se ajustaron directamente a la ecuación de Michaelis-Menten por el método de mínimos cuadrados utilizando el programa GraphPad Prism. Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado y en las gráficas correspondientes se representa la media de dichas medidas.

3.7.3. Actividad esterasa en gel de poliacrilamida (zimograma)

El zimograma de actividad esterasa está basado en la hidrólisis enzimática de α -naftilacetato a ácido acético y α -naftol. La formación de conjugados de α -naftol y Fast Red de color rojo indica la existencia de una proteína con actividad esterasa. Después de la electroforesis de las muestras en condiciones desnaturalizantes, se incubó el gel resultante en la solución de renaturalización durante una hora, Tras este proceso se incubó el gel en una mezcla en proporciones 1:1 de la solución A y B de revelado de actividad esterasa y el gel se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta que se observó la aparición de bandas rojas (Bornscheuer *et al.* 1994).

3.7.4. Actividad esterasa de colonias (*overlay*).

El ensayo de actividad esterasa en placas con medio sólido LB ampicilina 100 μ g/ml se utilizó para la identificación de clones (en *E. coli*) que contienen derivados de esterasa activos seleccionados previamente en *T.*

thermophilus HB27. Se realizaron dos réplicas de cada clon con sus respectivos controles, positivo (pNCK- PFEI) y negativo (pNCK) y se incubaron a 37 °C durante 12 a 18 horas, luego de esto se cubrió una de las placas con solución de agar al 0,5% que contenía Fast Red y α - naftilacetato. El control positivo y las colonias que contienen un derivado de esterasa activo, hidrolizan el α - naftilacetato a ácido acético y α - naftol y la liberación de conjugados de α -naftol y Fast Red de color rojo permiten diferenciar estos clones activos de aquellos que contienen una enzima inactiva o incorrectamente expresada.

3.7.5. Actividad esterasa de colonias (*overlay*).

El ensayo de actividad esterasa en placas con medio sólido LB ampicilina 100 μ g/ml se utilizó para la identificación de clones (en *E. coli*) que contienen derivados de esterasa activos seleccionados previamente en *T. thermophilus* HB27. Se realizaron dos réplicas de cada clon con sus respectivos controles, positivo (pNCK- PFEI) y negativo (pNCK) y se incubaron a 37 °C durante 12 a 18 horas, luego de esto se cubrió una de las placas con solución de agar al 0,5% que contenía Fast Red y α - naftilacetato. El control positivo y las colonias que contienen un derivado de esterasa activo, hidrolizan el α - naftilacetato a ácido acético y α - naftol y la liberación de conjugados de α -naftol y Fast Red de color rojo permiten diferenciar estos clones activos de aquellos que contienen una enzima inactiva o incorrectamente expresada.

3.8. ENSAYOS DE ESTABILIDAD

En el proceso de caracterización de las variantes de PFEI se determinó su temperatura de desnaturalización (T_m) utilizando un espectrofotómetro de dicroísmo circular (Jasco, Groß-Umstadt, Germany). En todos los casos se utilizó 0,56 mmol de proteína pura previamente dializadas frente a tampón fosfato 25 mM, pH 7.5 a 4 °C. Como primer paso se realizó el espectro de absorción de cada variante de PFEI en el rango de 190 a 250 nm con el objetivo de descartar interferencias en la absorción de luz UV a 222 nm.

El rango de temperatura utilizado para la desnaturalización de las variantes de PFEI fue de 10 a 95 °C y la cinética de desnaturalización se siguió a 222 nm. Se utilizaron como controles PFEI silvestre y la variante termoestable PFEI-HJ cuyos valores de T_m fueron publicados en 2010 (Jochens *et al.* 2010). Una vez obtenido el espectro de desnaturalización de cada variante se calculó la derivada de los datos para obtener el valor de T_m de cada proteína. En ocasiones fue necesario medir T_m en presencia del caotropo cloruro de guanidinio a una concentración de 62,5 mM debido a que

la T_m de ciertas proteínas fue superior a la temperatura máxima que puede alcanzar el equipo utilizado (95°C).

3.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El ensamblado, alineamiento, y traducción de secuencias génicas, se realizó utilizando el programa Vector NTI 10 (Invitrogen) y el servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>).

Los modelos estructurales de las variantes de PFEI fueron realizados utilizando el programa Yasara. Los reemplazos de aminoácidos se introdujeron sobre una cadena de la estructura de PFEI (PDB: 1VA4) y se minimizó la energía de la estructura resultante en vacío utilizando el campo de fuerzas Nova (Krieger *et al.* 2002). Las imágenes fueron generadas con PyMol v0.99 (DeLano Scientific)

La predicción del efecto de mutaciones seleccionadas sobre la estabilidad térmica de las proteínas de interés, se realizó mediante simulaciones de dinámica molecular o mediante el cálculo del factor B de cada aminoácido de la proteína a partir de la información contenida en el archivo PDB de la misma. Dicha información fue extraída y tratada utilizando el programa B-fitter (Reetz *et al.* 2006). Por otra parte, la dinámica molecular (DM) es una técnica de simulación en la que se permite que átomos y moléculas interactúen por un período, permitiendo una visualización del movimiento de las partículas. En la DM clásica se utilizan las Ecuaciones de Newton para describir el sistema, en términos de su energía como un sumatorio de las contribuciones electrostáticas, de Van der Waals, cinética etc, a través de una ecuación denominada *campo de fuerza*. Por lo tanto, el resultado de una simulación de dinámica molecular son las posiciones (x,y,z) y velocidades v de cada átomo de la molécula, para cada instante en el tiempo. A este conjunto de variables se le denomina *trayectoria*. Una de las limitaciones de la DM es que muchas propiedades que pueden resultar de interés, como la formación o ruptura de enlaces no puedan ser estudiadas mediante este método ya que no contempla estados excitados o reactividad. Existen métodos híbridos denominados QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) en los que un centro reactivo es tratado de modo cuántico mientras que el ambiente que lo rodea se trata de modo clásico. El desafío en este tipo de métodos resulta en la definición de manera precisa de la interacción entre los dos formas de describir el sistema.

La DM a nivel atómico es una poderosa herramienta para estudiar la flexibilidad conformacional de las proteínas, y por lo tanto su rigidez o estabilidad y en último extremo su desnaturalización, por lo tanto se puede utilizar para predecir (diseño racional) aquellas posiciones en las que

introducir mutaciones para la mejora de la termoestabilidad (Pikkemaat *et al.* 2002). Algunos de los casos en los que se estudia la flexibilidad o desnaturalización de las proteínas se reflejan en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13: Algunos ejemplos de estudio de la termoestabilidad mediante DM

Proteína	Fuente	Tiempo (ns)	Campo de fuerzas	Temp (K)	Ref.
DhIA	<i>Xanthobacter</i>	1	GROMOS87	298	(Pikkemaat <i>et al.</i> 2002)
Rubredoxina	<i>Clostridium</i> , <i>Pyrococcus</i>	6-7		300-373	(Grottesi <i>et al.</i> 2002)
CSP	<i>Thermotoga</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	5	Amber Ff96	300, 600	(Motono <i>et al.</i> 2008)
Lipasa L1	<i>B. stearothermophilus</i>	4	Amber	300, 400, 500	(Abedi Karjiban <i>et al.</i> 2009)
P450	<i>Sulfolobus</i>	30	Amber ff99	300, 500	(Mehareenna y Poulos 2010)
1-3;1-4 β -glucanasa	<i>Bacillus</i>	4	Gromos 43a1	300, 325	(Gargallo <i>et al.</i> 2006)
pNB-esterasa	<i>Bacillus</i>	0.5	Dreiding	300	(Wintrode <i>et al.</i> 2003b)

La principal limitación de la DM en el estudio de la desnaturalización de proteínas es la escala de tiempo del proceso a temperatura ambiente, lo que se ha resuelto mediante DM a alta temperatura (400-600 K) para observar procesos en una escala de tiempo accesible (ns) (Mehareenna y Poulos 2010). El aumento de la temperatura únicamente acelera la velocidad de reacción pero no altera el modo de desnaturalización (Abedi Karjiban *et al.* 2009).

El estudio de las trayectorias (posición, energía) de cada átomo en cada momento de la simulación permite calcular un gran número de parámetros que dan información estructural sobre la proteína:

- a) **RMSD**, es decir la desviación en la posición de un átomo con respecto a una posición ideal, generalmente, la posición de partida o la posición cristalográfica de dicho átomo (Figura 3.2, Ec. 1). Promediando los átomos de cada residuo atendiendo a la geometría (centro de gravedad) de cada aminoácido, se puede calcular el RMSD por residuo, cadena o incluso de la proteína completa. Los estados de transición de la desnaturalización pueden identificarse como aquellas poblaciones de estructuras inmediatamente anteriores al advenimiento de un cambio estructural de gran magnitud, medido como cambio en el RMSD (Li y Daggett 1998).

- b) **RMSF** mide las variaciones en las posiciones de cada átomo o residuo a lo largo de la dinámica (fluctuaciones) para ver cuales tienen o no más flexibilidad (Figura 3.2, Ec. 2). En el caso de CSPs, el análisis de fluctuación de los residuos a 300 K permite distinguir regiones de menor fluctuación posicional en la CSP de *Thermotoga* que en sus homólogas de termófilos moderados y mesófilos. Casualmente, son estas regiones (los extremos N- y C- terminal) las que a 600K evitan el desplegamiento, según los resultados del análisis de RMSD de cada extremo de la proteína (Motono *et al.* 2008).
- c) A partir de RMSF se pueden calcular unos **factores B teóricos** (Figura 3.2., Ec. 3), de magnitud mucho mayor que los determinados experimentalmente mediante cristalografía, debido a la baja temperatura de los experimentos de cristalización y la existencia de contactos cristalográficos que limitan el movimiento de los átomos (Verschueren *et al.* 1993). Aun así, Los factores B cristalográficos y calculados mediante DM pueden correlacionarse para ver en qué zonas no coinciden. Dichas zonas serían las que se ven afectadas por el artefacto debido al empaquetamiento cristalográfico.
- d) la persistencia de elementos de **estructura secundaria** a lo largo de la dinámica
- e) la persistencia de **enlaces de hidrógeno** (totales o entre átomos concretos) a lo largo de la dinámica.
- f) El **movimiento global** de toda una proteína a través del análisis de la componente principal de la matriz de la covarianza de las fluctuaciones de los C_{α} . Esto ayuda a ver la existencia de diferentes poblaciones conformacionales a diferentes temperaturas.
- g) Todo tipo de parámetros basados en distancias, como los **contactos** a larga distancia (contactos entre dos residuos cercanos en estructura pero lejanos en secuencia), contactos hidrofóbicos (sumatorio de índices hidrofóbicos de residuos cercanos), radio de giro (distancia del conjunto de los átomos al centro de masas y que indica el grado de expansión o compactación de una estructura).
- h) Superficie accesible al disolvente (SASA) y radio de giro, que dan una idea del **desplegamiento** de la proteína.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n R_i * R_i}{n}}$$

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{3}{\sum_{j=1}^N} \left(\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N P_{ikj}^2 - \overline{P_{ij}}^2 \right)}$$

$$Bfactor_i = \frac{80}{3} (\pi * RMSF_i)^2$$

Figura 3.2: Ecuaciones que describen los parámetros RMSD, RMSF y factor B. R es el vector que une n pares de átomos correspondientes en el espacio.

Se partió de las estructuras de PFEI (PDB: 1VA4) y la polimerasa $\phi 29$ (PDB: 2PYL) eliminando las moléculas de aguas y aditivos de cristalización (pero en el caso de la polimerasa $\phi 29$, se conservaron el DNA y los dNTPs ni los iones Mg^{2+}) y se sometió a DM utilizando el campo de fuerzas Yamber3 proporcionado con el programa YASARA v.11.6.11 durante 20 ns, con un *cutoff* de 7.86 Å, *timestep* de 2.5 fs y recogiendo datos cada 25 ps. Las condiciones simuladas fueron 298 K, pH 7 y 1 bar de presión constante (volumen de celda variable) en condiciones de límite periódico para reducir efectos debidos al límite de la celda y para simular un entorno semi-diluido basado en el método PME (Particle Mesh Ewald). Antes de ejecutar la simulación de DM se realizó una minimización de la energía para eliminar posibles conflictos.

Al final de cada simulación se calculó la energía y RMSD globales a lo largo de los 20 ns, y el RMSD, RMSF, Factores B para cada residuo.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *THERMUS THERMOPHILUS* HB27 EN LA PROTEASA DE TIPO LON (TTC0746)

Uno de los problemas potenciales de los métodos de selección por interferencia de plegamiento entre proteínas fusionadas es la posibilidad de que tales estructuras sean objeto de hidrólisis proteolítica por proteasas constitutivas o inducidas por la propia acumulación de proteínas mal plegadas, tal y como ocurre con la proteasa LonA de *E. coli* (Maurizi 1992). Tal actividad proteolítica podría liberar la proteína testigo de resistencia a kanamicina y dar origen a falsos positivos.

En *T. thermophilus* HB27 existen tres proteasas anotadas como proteasas dependientes de ATP (tipo Lon). Sin embargo, solo dos de ellas (TTC0418 y TTC0746) son realmente dependientes de ATP, y sólo en cepas mutantes en una de ellas (TTC0746) se evidenció un incremento en la sobreexpresión de proteínas heterólogas de otros microorganismos termófilos e hipertermófilos (Maehara *et al.* 2008). Debido al interés que dicho mutante podría tener para la sobreexpresión de genotecas de fusión a *kat* para la termoestabilización de proteínas mediante interferencia de plegamiento, nos propusimos obtener un mutante de delección en el gen *ttc0746* y evaluar su utilidad como anfitrión de las fusiones mencionadas anteriormente.

4.1.1. Mutación del gen *ttc0746*

Para comprobar si las cepas deficientes en proteasas tipo Lon son de utilidad para mejorar expresión recombinante de proteínas en *T. thermophilus*, y especialmente de las fusiones a Kat en el marco de la termoestabilización de proteínas de interés, se generaron mutantes en gen *ttc0746*. En una primera aproximación se realizaron mutantes insercionales, resistentes a kanamicina. La correcta inserción del gen *kat* interrumpiendo el gen *ttc0746* fue comprobada mediante PCR con los oligonucleótidos Upconfirmfw y Downconfirmrv (Tabla 3.4). Como se observa en la Figura 4.1, la estirpe silvestre genera un producto de 3000 pb (carril 3) que corresponde al tamaño del gen *ttc0746* (2600 pb) más los 400 pb que generan los oligonucleótidos al hibridar en la regiones flanqueantes de dicho gen. Por otro lado los clones mutantes obtenidos por selección en kanamicina (Kn^R, Hig^S) de clones transformados transformación con la forma lineal del plásmido pH118 $\Delta lon::kat$, generan un producto de 1300 pb que corresponde a la inserción del *cassette kat* de 900 pb más las 400 bases flanqueantes (carriles 4 al 8).

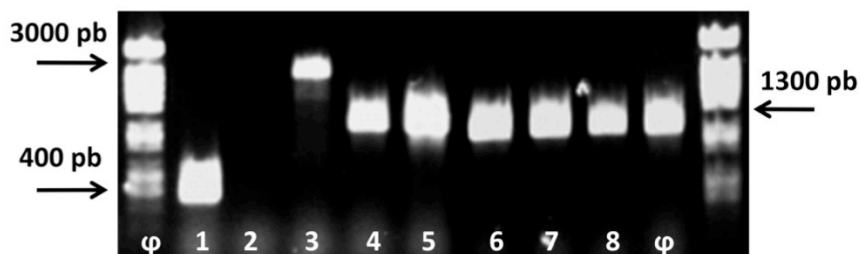


Figura 4.1. Comprobación mediante PCR de la inserción *kat* en el gen *ttc0746*. PCR utilizando los oligonucleótidos Upconfirmfw y Downconfirmrv (Tabla 3.4) sobre: 1) la construcción pH118 Δlon . 3: ADN genómico de *T. thermophilus* HB27 silvestre. 4- 9 ADN genómico de mutantes insercionales del gen *ttc0746*.

Para eliminar el gen *kat* de los mutantes insercionales se procedió a transformar la cepa mutante HB27-0746::*kat* con el plásmido pH118 Δlon , portador de las mismas regiones flanqueantes al gen *ttc0746* pero sin el cassette *kat*. Algunos transformantes seleccionados por resistencia a doble antibiótico (Kn^R , Hig^R), fueron sometidos a crecimiento sin antibióticos y posterior selección de cepas Kn^S , Hig^S en las que el plásmido se escindió por recombinación, llevándose el gen *kat*, tal y como se describe en la Figura 3.1. En los ensayos de comprobación mostrados en la Figura 4.2, se observa que los carriles 4 a 9 corresponden a mutantes de delección $\Delta ttc0746$ (Δlon en adelante) dado que no aparece en ellos la banda de 2600 pb que corresponde a la estirpe silvestre (Fig. 4.2, carril 3), también detectada en la construcción pH118 Δlon .

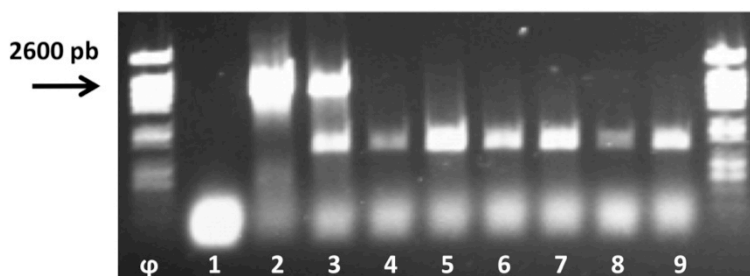


Figura 4.2. Comprobación por PCR de la eliminación del gen *kat* en derivados *ttc0746::kat*. 1: Construcción pH118 Δlon . 2: Construcción pMH184-TTC0746. 3: ADN genómico de la estirpe silvestre. 4-9: Mutantes de delección del gen TTC0746 (Δlon). Los oligonucleótidos empleados son los mismos que en la figura anterior

4.1.2. Determinación de la actividad proteolítica en los mutantes Δlon

Para verificar la pérdida del fenotipo correspondiente a la delección de este homólogo de *lon*, se realizó un ensayo de actividad proteolítica consistente en la hidrólisis de caseína marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Como se observa en la Figura 4.3, se comprobó que los

mutantes Δlon 2 y 4 presentan menor actividad proteolítica que la cepa *HB27* silvestre. Además, la actividad proteolítica se recupera parcialmente al transformarlos con pMH184-TTC0746 (+).

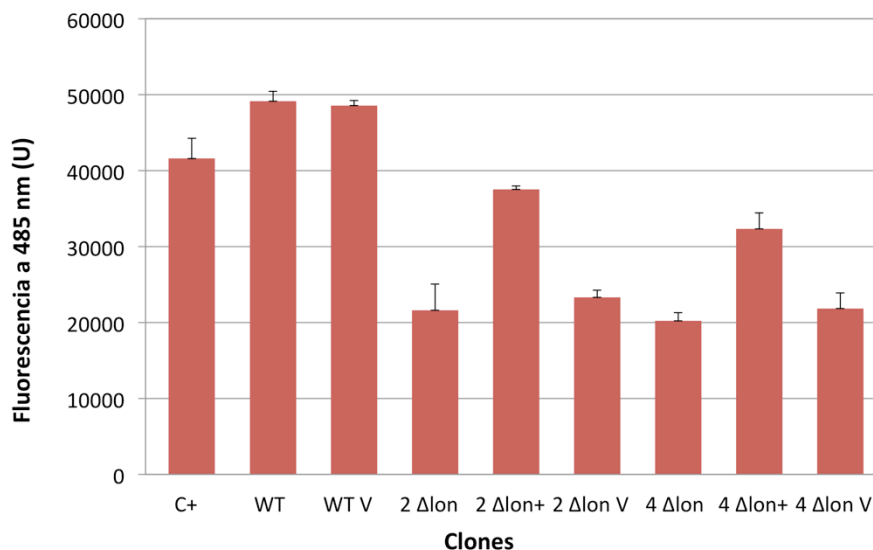


Figura 4.3. Detección de actividad proteolítica en *T. thermophilus HB27* silvestre y mutantes de delección del gen *ttc0746*. Se utilizó como sustrato caseína marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). En el eje de ordenadas se muestra la fluorescencia a 485 nm, y en el eje de abscisas se muestran los clones evaluados. C+: control positivo (solución de tripsina). WT: estirpe silvestre. 2 Δlon y 4 Δlon : clones mutantes Δlon . WT V: cepa silvestre transformada con el plásmido pMH184. 2 $\Delta lon+$ y 4 $\Delta lon+$: mutantes Δlon complementados con el gen TTC0746 clonado en el plásmido pMH184. 2 $\Delta lon V$ y 4 $\Delta lon V$: mutantes Δlon transformados con el plásmido pMH184 vacío, que se utilizaron como control.

4.1.3. Expresión de fusiones recombinantes en mutantes de *Thermus thermophilus HB27* deficientes proteasa del tipo Lon

Para valorar el efecto de la delección del gen *ttc0746* sobre el nivel de expresión de fusiones de proteínas con la kanamicina nucleotidil transferasa, se transformaron en paralelo la cepa silvestre y los mutantes Δlon con 200 ng de los plásmidos pNCK y pNCK- $\phi 29$ y se extendieron 300 μ L de cultivo transformado sobre placas con kanamicina 30 μ g/ml, incubando en condiciones permisivas (60 °C) durante 48 horas.

Como se puede observar en la Tabla 4.1, existe una reducción muy notable (<1/10) en el número de colonias obtenidas con los mutantes Δlon comparando con la cepa *HB27* silvestre cuando se transformó con vectores portadores de la fusión $\phi 29$ -Kat, mientras que ésta no se produjo cuando se empleó el vector pNCK vacío. Dado que estos datos sugerían un efecto tóxico

incrementado de las fusiones, decidimos comprobar si éstas se expresaban correctamente mediante Western blot con antisuero anti-Kat. Como se puede apreciar en la Figura 4.4, la fusión $\phi 29$ -Kat únicamente se detecta en la cepa silvestre y no en los mutantes Δlon . En éstos se aprecia un patrón de bandas similar al de la estirpe silvestre transformada con el pNCK vacío. Estos datos sugieren que los clones obtenidos son variantes de delección en los que el gen $\phi 29-pol$ ha sido eliminado, como se muestra más adelante.

Tabla 4.1. Ensayo de transformación de mutantes Δlon con el plásmido pNCK y pNCK- $\phi 29$. *T. thermophilus* HB27 WT: Cepa silvestre. Clon 2 Δlon y Clon 4 Δlon , mutantes deficientes en proteasas tipo Lon (TTC0746).

Clon	pNCK	pNCK- $\phi 29$
<i>T. thermophilus</i> HB27 WT	3000 colonias	2800 colonias
Clon 2 Δlon	2500 colonias	61 colonias
Clon 4 Δlon	2800 colonias	200 colonias

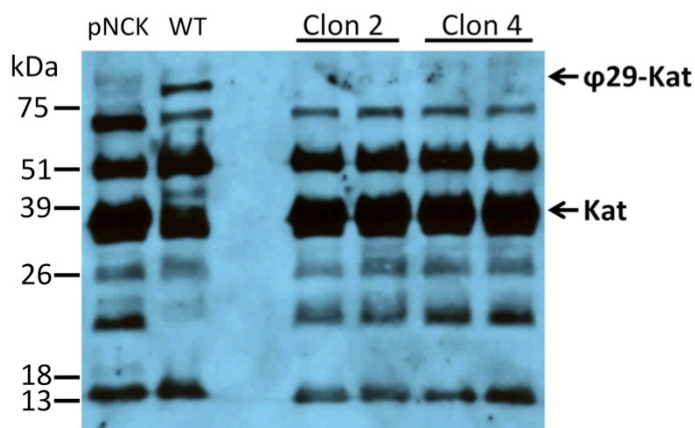


Figura 4.4. Western-blot para detectar Kat sobre extractos totales de proteínas de cultivos de *T. thermophilus* HB27 silvestre y mutantes Δlon . pNCK: *T. thermophilus* HB27 transformado con pNCK. WT: *T. thermophilus* HB27 silvestre transformado con pNCK- $\phi 29$. Clon 2 y clon 4 son mutantes Δlon . Se señalan las marcas correspondientes a la fusión $\phi 29-pol$ -KAT (96 kDa) y a al Katy (30 kDa). Se observa que la fusión solo se expresa en la estirpe silvestre.

Por lo tanto, podemos concluir que el gen *ttc0746* estaría controlando la sobreexpresión de proteínas en *Thermus* de modo que en su ausencia, la toxicidad de las fusiones se ve incrementada y el número de transformantes disminuye hasta el punto de que un muestreo de los mismos revela la existencia de fenómenos de recombinación conducentes a la eliminación del gen tóxico. La baja frecuencia de dicho fenómeno apoya este hecho y sería congruente con el número de transformantes obtenidos con respecto al control. Desde el punto de vista práctico y teniendo en cuenta estos datos, indicativos de una excesiva toxicidad de algunas fusiones en estos mutantes

con el consiguiente riesgo de obtener deleciones, decidimos emplear la cepa silvestre en la selección de mutantes termoestables.

4.2. TERMOESTABILIZACIÓN DE LA ADN POLIMERASA DEL FAGO $\phi 29$.

En trabajos iniciales realizados con el objetivo de termoestabilizar la ADN polimerasa $\phi 29$ se trabajó con el gen completo (datos de laboratorio no publicados), clonada con BamHI y NotI en el plásmido pNCK. En los ensayos de selección que se realizaron sobre una genoteca de variantes generada mediante epPCR, se encontró que los clones seleccionados a 65 °C de temperatura y 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, estaban parcial o totalmente delecionados (Figura 4.5). Por este motivo y dada la complejidad estructural de esta enzima, se cambió de estrategia y se decidió intentar termoestabilizar cada dominio de la polimerasa $\phi 29$ por separado

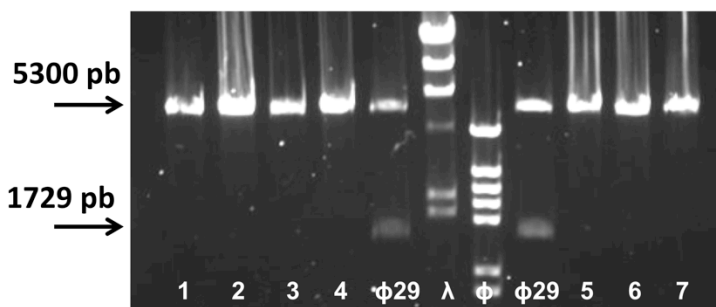


Figura 4.5. Derivados del vector pNCK- $\phi 29$. Se muestran los plásmidos aislados de 7 clones de la genoteca pNCK- $\phi 29$ seleccionados a 65 °C en placas de kanamicina 40 $\mu\text{g/ml}$. Los plásmidos fueron digeridos con BamHI/NotI, observándose únicamente la banda de 5300 pb correspondiente al vector pNCK, pero en ningún caso se observó la banda de 1729 pb que debería corresponder al gen completo de la polimerasa $\phi 29$. $\phi 29$: construcción pNCK- $\phi 29$ silvestre utilizado como control.

Para trabajar con cada dominio de la ADN polimerasa $\phi 29$ por separado, se amplificó por PCR la secuencia del dominio exo (residuos 1 a 189) y la del dominio pol (residuos 189 a 572) usando como molde el gen de la ADN polimerasa $\phi 29$ clonada en el vector pNCK (ver Figura 4.6).

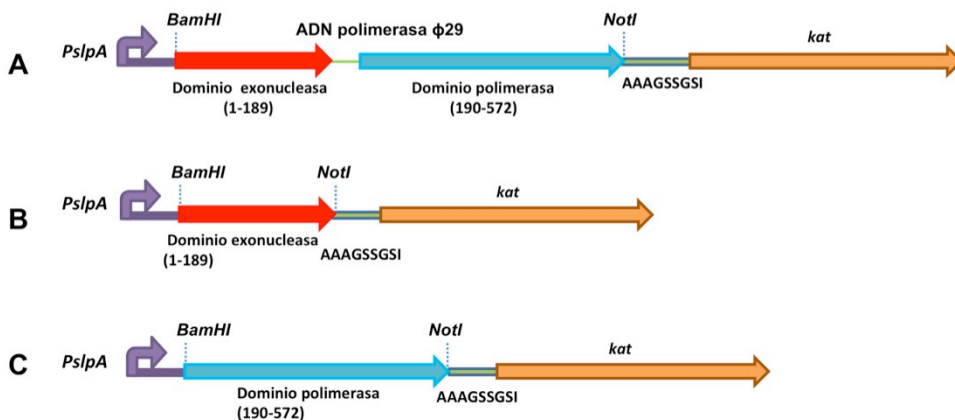


Figura 4.6. Estrategia para termoestabilizar la ADN polimerasa $\phi 29$. A: fusión de la polimerasa $\phi 29$ completa clonada con las dianas BamHI/NotI en el vector de termoselección pNCK; B: fusión del dominio exonucleasa clonado con las dianas BamHI/NotI en el vector de termoselección pNCK; C: fusión del dominio polimerasa de la polimerasa $\phi 29$. En la región de unión se muestra la secuencia aminoacídica del péptido que une a los dominios con la proteína Kat.

4.2.1. Termoestabilización del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$.

Antes de realizar los ensayos de selección en busca de mutantes termoestables en la genoteca del dominio exonucleasa, se establecieron las condiciones de selección. Para ello, se transformó *T. thermophilus* HB27 con 0,2 μg del plásmido pNCK-exo a 60°C y se extendieron 250 μl sobre placas con diferentes concentraciones de kanamicina, que fueron incubadas a tres temperaturas diferentes durante 48 horas. Los detalles del experimento y el número de colonias obtenidas en cada condición se muestran en la Tabla 4.2. Con estos datos, se decidió fijar como condiciones de selección 66 °C y 40 $\mu\text{g/ml}$ de Kn, dado que correspondían con condiciones selectivas que no permitieran el crecimiento de transformantes silvestres.

Tabla 4.2 Número de transformantes de *T. thermophilus* con la construcción pNCK-exo tras realizar una selección en diferentes condiciones de antibiótico y temperatura.

Temperatura	[Kanamicina] ($\mu\text{g/ml}$)					
	20	40	60	80	100	150
60°C	42	24	21	10	10	8
65°C	2	0	0	0	0	0
70°C	0	0	0	0	0	0

A continuación, la genoteca del dominio exonucleasa fue generada por epPCR. La mutagénesis esperada se logró con la composición y programa de amplificación en termociclador que se describen en la sección de materiales y métodos. Previo a proceder a ligar todo el producto de epPCR con el vector de selección (pNCK), se realizó un análisis de la secuencia de unos cuantos clones para conocer el porcentaje de mutación en el ADN, que fue de 0.4% y en proteínas del 1%. Con estos datos se construyó la genoteca final en *E. coli*, que contenía unos 50,000 clones. A partir de ella se purificó el ADN plásmídico y se utilizó en la selección de mutantes termoestables en *T. thermophilus* HB27 en las condiciones antes definidas (66 °C, kamamicina 40 µg/ml). Sin embargo, en estas condiciones se seleccionaron únicamente 7 clones cuyo análisis reveló que habían sufrido la delección completa del gen codificante del dominio exo (Figura 4.7 A).

Debido a la delección de los clones seleccionados a 66 °C, se realizó una segunda selección en condiciones menos restrictivas (64.5 °C y kanamicina 40 µg/ml). En estas condiciones se aislaron 88 clones que no habían sufrido delección (Tabla 4.3) , algunos de los cuales se muestran en la Figura 4.7B.

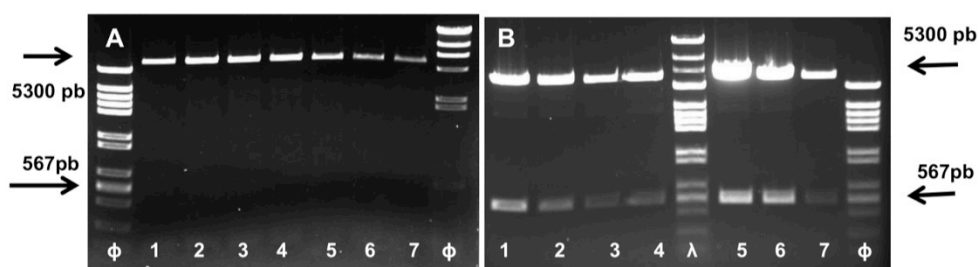


Figura 4.7. Derivados del dominio exonucleasa seleccionados en *T. thermophilus*. A) 7 clones seleccionados a 66 °C y kamamicina 40 µg/ml, digeridos con BamHI/NotI. Se observa únicamente la banda de 5300 pb correspondientes al vector de termoselección (pNCK). B) 7 clones seleccionados a 64,5 °C y kamamicina 40 µg/ml, digeridos con BamHI/NotI. En los 7 clones se observan dos bandas, una de 5300 pb correspondiente al vector y la otra de 567 pb correspondiente al dominio exonucleasa.

Tabla 4.3. Resultados de la selección de mutantes del dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29 en *T. thermophilus* HB27 a diferentes temperaturas.

Plásmido	Condiciones de selección	
	64.5 °C kanamicina 40 µg/ml	66 °C kanamicina 40 µg/ml
pNCK-exonucleasa	0 clones	0 clones
Genoteca pNCK-exonucleasa	88 clones tamaño silvestre	7 clones todos de delección

4.2.2. Ensayos de termoestabilidad relativa en placa de las variantes seleccionadas del dominio exo

La termoestabilidad de los mutantes seleccionados (medida indirectamente por la capacidad que proporcionan a su huésped para crecer en condiciones restrictivas de temperatura y kanamicina) fue comprobada en *T. thermophilus* HB27 mediante siembra en gota de de 10 μ L de distintas diluciones, usando como controles los plásmidos pNCK y pNCK-exo. Se compararon inicialmente 6 mutantes con la estirpe silvestre (Figura 4.8), llegándose a la conclusión de que las construcciones seleccionadas conferían mayor resistencia a kanamicina que la estirpe silvestre. El mismo ensayo se realizó con todos los clones y se asignó un valor arbitrario de resistencia desde 1+ si crecía solo la gota del cultivo sin diluir, y hasta 4+ si crecía hasta la dilución 1/1000

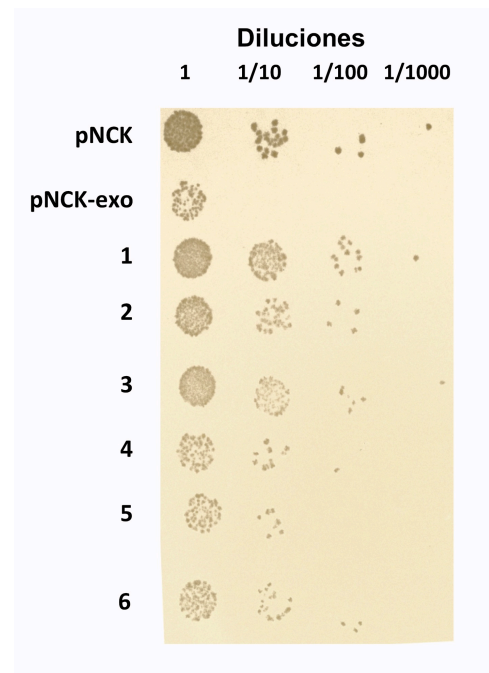


Figura 4.8. Ensayo de estabilidad de mutantes derivados de la genoteca pNCK-exo. Se usaron como controles el plásmido pNCK y pNCK-exo silvestre.

4.2.3. Secuenciación de variantes seleccionadas del dominio exonucleasa

Tras comprobar en los ensayos sobre placa que los mutantes conferían mayor resistencia a kanamicina en el ensayo de interferencia, 60 fueron enviados a secuenciar. Entre éstos se encontraron 4 derivados (6.66%) con mutaciones inactivantes, ya que afectaban a los residuos críticos en la catálisis; 2 fueron idénticos al gen silvestre (3.33%) y 9 clones (15 %) presentaban codones de parada. En el resto de los 46 clones (ver Tabla 4.4),
70

se observó que 24 (40%) fueron mutantes simples y que algunas de las mutaciones de estos clones se seleccionaron reiteradamente, tanto como mutación única como en combinación con otras. La mutación más reiterativa apareció en un 20% de los aislados, 6 mutantes simples y otros 6 mutantes combinados; Otras mutaciones reiteradas aparecieron en un 16% de los aislados (6 mutantes simples y 4 combinados) y en un 11.67% (4 simples y 3 combinados). En total las mutaciones reiterativas solas o combinadas representan el 60% del total de clones seleccionados. Para futuros ensayos se descartaron los clones con mutaciones inactivantes y los que contenían el gen silvestre. La frecuencia de las mutaciones que se observaron fue el criterio utilizado para decidir las mutaciones que se analizarían en el contexto de la polimerasa $\phi 29$ completa. Se puede apreciar un sesgo hacia los reemplazos en la región C-terminal del dominio exo, que pueden ser debidos a razones estructurales (zonas flexibles que acomodan mejor los cambios) o a un sesgo en el método en sí.

Tabla 4.4. Mutantes del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$ secuenciados. Se muestran las mutaciones encontradas en los derivados seleccionados a 64.5 °C.

Clon	Número de mutaciones	Temperatura de selección
Exo 1	2	64 °C
Exo 2	2	
Exo 3	1	
Exo 4	1	
Exo 5	2	
Exo 6	3	
Exo 7	1	65 °C
Exo 8	4	
Exo 9	1	
Exo 10	2	
Exo 11	1	
Exo 12	4	
Exo 13	3	
Exo 14	1	
Exo 15	2	
Exo 16	1	
Exo 17	1	
Exo 18	2	
Exo 19	1	
Exo 20	1	
Exo 21	1	
Exo 22	1	
Exo 23	3	
Exo 24	2	
Exo 25	1	
Exo 26	3	
Exo 27	2	
Exo 28	1	

Clon	Número de mutaciones	Temperatura de selección
Exo 29	1	
Exo 30	3	
Exo 31	2	
Exo 32	2	
Exo 33	3	
Exo 34	2	
Exo 35	1	
Exo 36	3	
Exo 37	1	
Exo 38	1	
Exo 39	1	
Exo 40	1	
Exo 41	1	
Exo 42	1	65 °C
Exo 43	1	
Exo 44	2	
Exo 45	1	
Exo 46	2	

Figura 4.9. Residuos mutados en los clones del dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29 seleccionados.

4.2.4. Análisis bioinformático y estructural de los cambios obtenidos en el dominio exonucleasa de la polimerasa ϕ 29

Para elucidar las posibles razones de la selección de los reemplazos detallados en la Tabla 4.4, se intentó comprender su contribución a la termoestabilidad de la proteína mediante dos métodos diferentes. Por un lado se utilizó el programa B-fitter para calcular el factor B de cada aminoácido en la polimerasa ϕ 29 a partir del archivo de coordenadas de la estructura cristalográfica (PDB: 2PYL). El archivo de salida del programa ordena los residuos en orden decreciente de su factor B. De dichos aminoácidos, en la Tabla 4.5 se recogen aquellos que pertenecen al dominio exo (1-189) y cuyo valor del factor B los sitúa sobre el percentil 50 de los valores B de todos los aminoácidos. El factor B muestra un sesgo hacia residuos flexibles y largos como Asp, Glu, Lys y Arg, junto con otras limitaciones que han sido descritas previamente (Feyfant *et al.* 2007; Hawkins *et al.* 2008; Soheilifard *et al.* 2008; Trevino *et al.* 2007). A pesar de todo, observamos que algunos de los residuos mutados coinciden con residuos de mayor factor B

Por otro lado, se realizó una simulación de dinámica molecular a 298 K y se compararon los residuos con alta movilidad (RMSD) con respecto a una estructura de referencia (la estructura inicial) y los residuos con alta movilidad

con respecto a su propia posición a lo largo de la simulación (RMSF). Si bien este último criterio es similar al factor B, el RMSD proporciona una idea de los desplazamientos concertados que implican a elementos de la estructura secundaria y terciaria de la proteína. Al realizar una comparación entre las mutaciones encontradas en los derivados del dominio exonucleasa de la polimerasa $\phi 29$ seleccionados experimentalmente (Tabla 4.4), con los valores de RMSD o RMSF en la simulación de dinámica molecular observamos una vez más que algunas mutaciones seleccionadas por el sistema utilizado en el presente trabajo corresponden con residuos que presentan valores altos de RMSD o RMSF.

Por último, para visualizar las posibles interacciones introducidas por los reemplazos seleccionados, éstos se introdujeron *in silico* sobre la estructura 2PYL y se minimizó en vacío utilizando el campo de fuerzas Yamber3 del programa Yasara. Se superpusieron las estructuras para comprobar que no hubiera habido grandes distorsiones durante la minimización. Posteriormente utilizando el programa Yasara se calcularon los enlaces de hidrógeno de los residuos implicados y se analizó el entorno de cada uno de ellos para intentar explicar a nivel estructural el posible efecto de las mutaciones. En el caso de mutaciones encontradas juntas, este proceso se realizó con todas ellas simultáneamente para poder apreciar los posibles efectos sinérgicos. En general, la mayor parte de los cambios encontrados pudieron ser explicados en base al establecimiento de nuevas interacciones como puentes de hidrógeno, o el reforzamiento de otras ya existentes, de modo que la flexibilidad de la cadena lateral se vería reducida.

4.2.5. Efecto de mutaciones seleccionadas en el dominio exonucleasa, sobre la actividad de la polimerasa $\phi 29$.

Basados en la frecuencia de las mutaciones y la estabilidad del crecimiento en goteo, se transfirieron las distintas variantes al laboratorio de la Prof. M. Salas, donde se introdujeron por mutagénesis dirigida las mutaciones más frecuentes en la polimerasa $\phi 29$ completa y se realizaron ensayos de amplificación ya estandarizados para dicha enzima por el Dr. Mario Mencía. Para evaluar el efecto de las mutaciones más frecuentes seleccionadas en el dominio exonucleasa sobre la actividad de la polimerasa $\phi 29$, se purificaron por cromatografía de afinidad (doble *strep-tag*) 4 mutantes simples de alta frecuencia de apareamiento y un mutante triple con las mutaciones más frecuentes.

En el ensayo de actividad amplificación de M13 con hexámeros (Figura 4.19), se observó que en las variantes T (triple) y P disminuye la capacidad de amplificación isotérmica hasta casi desaparecer, en M la disminución también se aprecia, mientras que en las variantes Y y Q conservaron una capacidad

de amplificación semejante a la de la polimerasa $\phi 29$ silvestre. Por el contrario, en el ensayo de amplificación a distintas temperaturas (Figura 4.20), las variantes Y y Q ensayadas, mostraron menor estabilidad aparente que la variante silvestre, pues no se llegó a apreciar amplificación alguna a 37°C.

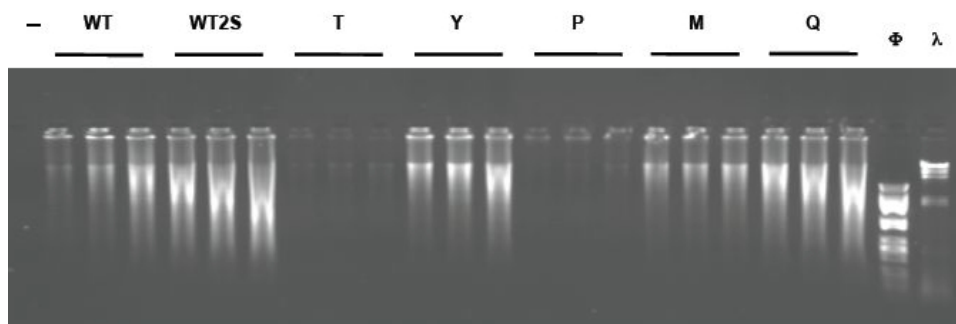


Figura 4.19. Amplificación de M13 con hexameros. Determinación de actividad específica para evaluar efecto de las mutaciones seleccionadas en el dominio exonucleasa sobre la actividad de la polimerasa $\phi 29$ (Dr. Mario Mencía.). Se realizaron amplificaciones con 20, 30 y 40 mM de polimerasa. WT: polimerasa $\phi 29$ silvestre. WT2S: polimerasa $\phi 29$ silvestre con doble strep-tag. T, Y, P, M y Q son mutantes triples y sencillos de la polimerasa. ϕ y λ : marcadores de peso molecular.

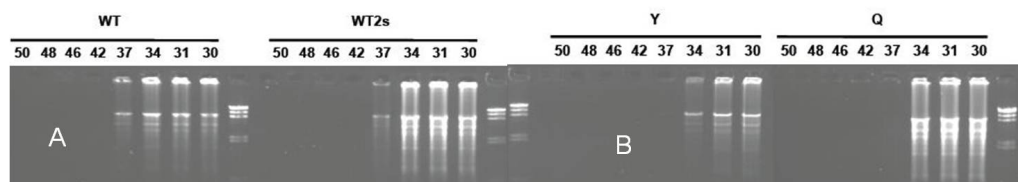


Figura 4.20. Ensayo para determinar termoactividad de mutantes de la polimerasa $\phi 29$ (Dr. Mario Mencía). Amplificación de M13 con hexameros. Se realizó un gradiente de temperatura para evaluar la actividad de cada variante a varias temperaturas. WT: polimerasa $\phi 29$ silvestre. WT2S: polimerasa $\phi 29$ silvestre con doble strep-tag. Y y Q son mutantes sencillos. ϕ y λ : marcadores de peso molecular.

En conclusión, la mayor estabilidad en el plegamiento obtenida por selección a alta temperatura no se tradujo en el caso del dominio exo en una mayor estabilidad de la enzima completa., inferida de los ensayos de actividad polimerasa a temperaturas superiores a 37 °C. Este hecho sería congruente con la apreciación de que parte de los reemplazos hallados (sobre todo aquellos en C-terminal) se deberían a un sesgo en la técnica.

4.2.6. Termoestabilización del dominio polimerasa de la polimerasa $\phi 29$.

La genoteca del dominio polimerasa (dominio pol) fue generada por epPCR. La tasa de mutagénesis deseada se logró con la reacción y programa de amplificación en termociclador que se describen en la sección correspondiente de materiales y métodos. Previo a proceder a ligar todo el producto de epPCR con el vector de selección (pNCK), se realizó un análisis previo de clones para conocer el porcentaje de error en el ADN que fue 0.3% y del 0.9% en su traducción a proteína. Con estos datos se construyó la genoteca final, la cual fue de 50,000 clones, se purificó el ADN plásmídico total y se utilizó en la selección de mutantes termoestables en *T. thermophilus* HB27.

Antes de realizar los ensayos de selección en busca de mutantes termoestables en la genoteca del dominio pol de la polimerasa $\phi 29$, se establecieron las condiciones de selección. Para ello, se transformó por competencia natural 600 μ l de un cultivo de *T. thermophilus* HB27 silvestre en fase exponencial ($DO_{550} = 0.4$) con 0.2 μ g del plásmido pNCK-polD248E. Ésta es una versión del dominio pol que carece de actividad para evitar posibles problemas de toxicidad (mutante inactivo). Luego de 4 horas de expresión de la resistencia a kanamicina, se dispusieron 250 μ l de bacterias en placas con diferentes concentraciones de kanamicina y se incubaron en tres temperaturas diferentes por 48 horas. Tras el estudio de los resultados recogidos en la Tabla 4.6 se establecieron como condiciones de selección 67 °C y kanamicina 40 μ g/ml.

Tabla 4.6 Número de transformantes de *T. thermophilus* con la construcción pNCK-pol tras realizar una selección en diferentes condiciones de antibiótico y temperatura.

Temperatura	[Kanamicina] (μ g/ml)					
	20	40	60	80	100	150
60°C	121	34	25	20	14	12
65°C	40	15	7	0	0	0
70°C	7	0	0	0	0	0

La genoteca del dominio pol fue generada por epPCR, utilizando como molde el mutante inactivo del dominio pol contenido en el plásmido pNCK (pNCKDpolD248E). La tasa de mutación deseada se logró con la reacción y programa de amplificación en termociclador que se describen en la sección correspondiente de materiales y métodos. Previo a proceder a ligar todo el producto de epPCR con el vector de selección (pNCK), se realizó un análisis de secuenciación para conocer la tasa de mutación introducida, que fue del 0.3% y del 0.9% en su traducción a proteína. Con estos datos se construyó la genoteca final, la cual fue de 50,000 clones, se purificó el ADN plásmídico total y se utilizó en la selección de mutantes termoestables en *T. thermophilus* HB27.

Después de varios ensayos de selección en las condiciones descritas anteriormente, se obtuvieron 110 clones (ver Tabla 4.7) que fueron analizados mediante restricción. Puesto que muchos de ellos aparecieron deletados (Figura 4.21) se continuó trabajando con los 38 mutantes que contenían el gen completo del dominio polimerasa. Seguidamente se purificó el plásmido de cada clon y se transformó *E. coli*, para amplificar y purificar el plásmido de cada clon. De los 38 clones, 28 presentaron un crecimiento +4 en los ensayos de termoestabilidad en gota y fueron solo éstos los enviados a secuenciar.

Tabla 4.7 Resultados de la selección de mutantes del dominio polimerasa de la polimerasa $\phi 29$ en *T. thermophilus* HB27 a 67 °C y kanamicina 40 $\mu\text{g/ml}$

Plásmido	Transformantes
pNCK- pol D248E	0 clones
Genoteca pNCK-pol D248E	38 clones no deletados
	72 clones deletados

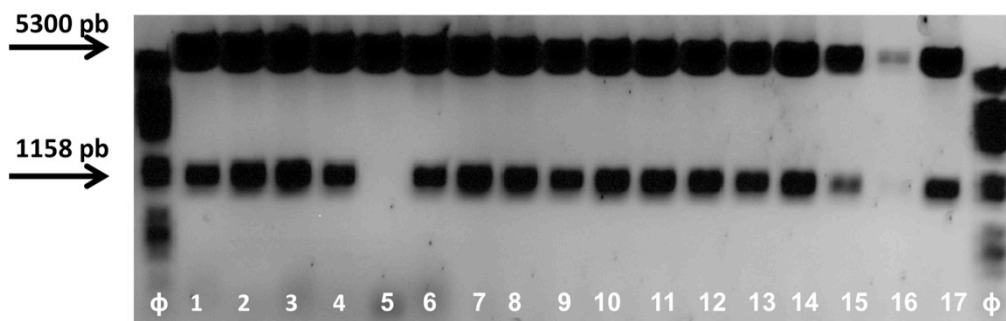


Figura 4.21. Derivados de la genoteca del dominio pol analizados mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI/NotI para descartar clones de delección. 1: control de digestión pNCKD248E, se observa dos bandas una de 5300 que corresponde con el plasmido pNCK y una de 1158 del dominio polimerasa. Del 2 al 17 clones derivados de la genoteca pNCKpol, todos los clones contienen el inserto del dominio polimerasa menos el clon 5 que es un clon de delección que muestra únicamente la banda de 5300 pb correspondientes al plásmido pNCK.

4.2.7. Secuencia de mutantes en el dominio polimerasa

Tal y como se muestra en la Tabla 4.8, de los 28 clones secuenciados, se encontraron: 2 clones (7.1%) iguales a la secuencia nativa del mutante D248E, 1 (3.51%) mutante sencillo, 2 (7.14%) mutantes dobles, 3 (10.71%) mutantes triples, 10 (35.71%) mutantes cuádruples, 5 (17.85%) mutantes quintuples, 1 (3.51%) con 6 mutaciones y 1 clon (3.51%) con 7 mutaciones. Se descartaron de futuros análisis dos secuencias más por mostrar ambigüedades. Estos datos junto con los de una genoteca previa (datos no mostrados) muestran que las mutaciones más frecuentes se repitieron en 8, 5, 4 y 3 ocasiones. Al igual que en el caso del dominio exo, la frecuencia de

aparición de las mutaciones se incrementa a medida que dichos reemplazos se acercan al extremo C-terminal del dominio pol.

Tabla 4.8 Mutaciones seleccionadas en el dominio polimerasa. La termoestabilidad se evaluó por crecimiento en goteo y se asignaron valores de resistencia desde 1+a 4+.

Clon	Número de mutaciones	Estabilidad
Pol 1	4	4+
Pol 2	1	4+
Pol 3	5	4+
Pol 4	6	4+
Pol 5	2	4+
Pol 6	4	4+
Pol 7	4	4+
Pol 8	4	4+
Pol 9	7	4+
Pol 10	2	4+
Pol 11	5	4+
Pol 12	5	4+
Pol 13	4	4+
Pol 14	5	4+
Pol 15	3	4+
Pol 16	3	4+
Pol 17	5	4+
Pol 18	4	4+
Pol 19	3	4+
Pol 20	4	4+
Pol 21	4	4+
Pol 22	4	4+
Pol 23	4	4+
Pol 24	5	4+

4.2.8. Análisis estructural y bioinformático de las variantes seleccionadas del dominio pol

En primer lugar se realizaron modelos estructurales de las variantes sencillas que contienen los reemplazos seleccionados con mayor frecuencia. De acuerdo con los modelos generados, únicamente en el caso de dos reemplazos se introdujeron interacciones adicionales en la estructura debido al cambio en la cadena lateral del aminoácido

continuación, y al igual que para el dominio exo, se analizó el posible carácter termoestabilizante de la sustitución en ciertas posiciones mediante el estudio del factor B y mediante simulaciones de dinámica molecular. Al igual que en el caso del dominio exo, algunas de las posiciones flexibles según el criterio del factor B fueron seleccionadas experimentalmente entre los individuos de la genoteca. Dado que las variantes recuperadas experimentalmente contienen reemplazos en residuos de bajo factor B y

teniendo en cuenta que la genoteca inicial no parece sesgada en cuanto a la cobertura de la secuencia del dominio pol dentro de las limitaciones de la epPCR, se puede concluir que la termoselección por interferencia de plegamiento es capaz de seleccionar variantes termoestables por otros criterios además de la pérdida de flexibilidad en las cadenas laterales de ciertos aminoácidos (factor B o RMSF).

Con el fin de ampliar la información sobre la movilidad de los residuos para los que se seleccionaron mutaciones termoestabilizantes, se realizó una simulación mediante dinámica molecular. En este caso, se realizó una de ellas a 298 K y otra a 400 K para ver los desplazamientos de los Ca correspondientes a los aminoácidos más móviles (298 K), pero también aquellos ligeramente menos móviles (400 K), con lo que se esperaba ampliar la capacidad predictiva de estas simulaciones. Si bien se pudieron observar diferencias entre las simulaciones de 298 y 400 K a nivel de RMSD, en el caso del RMSF, el ruido de la simulación aumentó considerablemente al aumentar la temperatura, lo que dificulta distinguir fluctuaciones significativas. No obstante, detectamos que muchas de las regiones más móviles han sido objeto de sustitución en los clones seleccionados, corroborando por lo tanto la validez del método de termoselección. Además, a la vista de estos resultados, en el caso del dominio pol no podríamos distinguir un sesgo de las variantes seleccionadas hacia la región C-terminal, dado que dicha zona parece ser también una de las más móviles del dominio.

4.3. TERMOESTABILIZACIÓN DE PFEI.

Como ya se mencionó anteriormente la PFEI pertenece a la familia de las α/β hidrolasas, y se utiliza en aplicaciones biocatalíticas, habiéndose publicado múltiples estudios sobre variantes de PFEI con especificidad para una gran variedad de sustratos de interés farmacéutico e industrial (Krebsfänger *et al.* 1998; Schließmann *et al.* 2009; Torres *et al.* 2012b). En este sentido, es de interés lograr variantes termoestables de PFEI que posean mayor capacidad de resistir las condiciones utilizadas para llevar a cabo las reacciones de interés en la industria.

4.3.1. Selección de variantes termoestables de PFEI

Antes de realizar los ensayos de selección en busca de mutantes termoestables se establecieron las condiciones a emplear. Para ello, se procedió a la transformación de *T. thermophilus* HB27 con el plásmido pNCK-PFEI y se seleccionaron transformantes por crecimiento durante 48 horas a tres temperaturas diferentes. Los resultados del experimento, que se muestran en la Tabla 4.10, nos llevaron a escoger como criterio de selección 66 °C y una concentración de kanamicina de 60 y 80 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 4.10. Número de transformantes de *T. thermophilus* con la construcción pNCK-PFEI tras realizar una selección en diferentes condiciones de antibiótico y temperatura.

Temperatura	[Kanamicina] ($\mu\text{g/ml}$)					
	20	40	60	80	100	150
60°C	2000	200	100	70	30	10
65°C	100	10	0	0	0	0
70°C	0	0	0	0	0	0

La genoteca de PFEI fue generada mediante epPCR. La mutagénesis esperada se logró con la reacción y programa de amplificación en termociclador que se muestran en la sección correspondiente. La tasa de mutación obtenida en el ADN fue 0,8% y del 1,8% en secuencia de aminoácidos. Debido a que es posible detectar actividad esterasa directamente en la fusión PFEI-Kat, se evaluó por medio de ensayo de “overlay” en placa el porcentaje de clones activos en *E. coli* (Figura 4.27), que fue únicamente del 12%, probablemente como consecuencia del elevado grado de mutación generado.

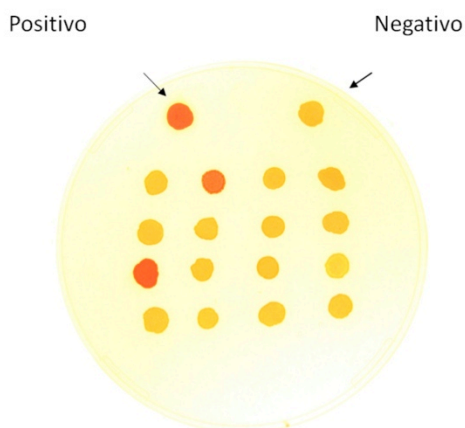


Figura 4.27. Ensayo de actividad esterasa en *E. coli*, para evaluar el porcentaje de clones activos en la genoteca. En la parte superior se muestran los controles positivo (pNCK-PFEI) y negativo (pNCK). En la parte inferior se muestran algunos de los clones evaluados, dos de ellos con actividad esterasa.

Teniendo en cuenta estos datos se construyó una genoteca de 90,000 clones, sobre la que se procedió a la selección en *T. thermophilus* HB27. Después de realizar varios ensayos de selección en las condiciones anteriormente establecidas, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 4.11. Como se puede observar, se obtuvo un alto número de clones individuales que superaron las condiciones de selección (234 clones). Por el alto número de colonias obtenidas y debido a que *T. thermophilus* HB27 presenta actividad esterasa de fondo, fue necesario extraer el plásmido de todas las colonias seleccionadas de *T. thermophilus* HB27 (miniprep conjunta de placa) y luego transformar en *E. coli* para hacer una segunda selección en busca de clones con actividad esterásica (ver ejemplo en la Figura 4.28). De esta forma se encontraron 55 clones que presentaban actividad esterasa en

E. coli y que conferían resistencia en *T. thermophilus* en las condiciones de selección.

Tabla 4.11. Resultados de la selección de mutantes del PFEI en *T. thermophilus* HB27 a 66.5 °C y kanamicina 60-80 µg/ml

Construcción	[Kanamicina] (µg/ml)	
	60	80
Silvestre	0 clones	0 clones
Genoteca	157 clones	77 clones

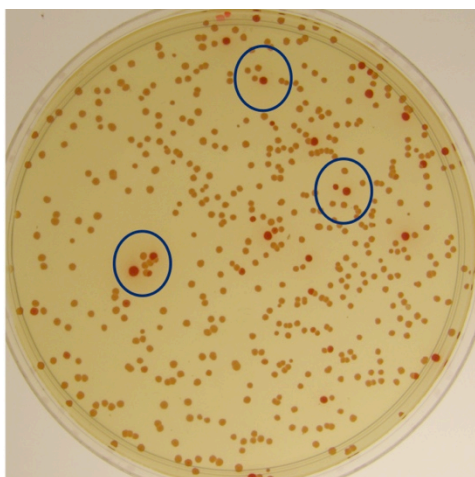


Figura 4.28. Cribado de actividad esterasa en *E. coli* para identificar derivados PFEI termoestables y activos. Las colonias con actividad esterasa se visualizan de color rojo intenso.

4.3.2. Identificación de variantes termoestables de PFEI

El siguiente paso fue extraer el plásmido de cada clon individual y realizar un segundo ensayo de termoestabilidad de cada clon en particular en *T. thermophilus* HB27 mediante goteo de diluciones crecientes en las mismas condiciones de selección que se utilizaron para seleccionar clones de la genoteca, con el mismo criterio de asignación de valores de capacidad de conferir resistencia desde 1+, si crecía solo el cultivo concentrado, hasta 4+ si crecía hasta la dilución 1/1000 (Figura 4.29). En este ensayo se utilizó como control de estabilidad el plásmido pNCK-PFEI silvestre. Como resultado del ensayo se escogieron para ser secuenciados los 48 clones que mostraron mayor termoestabilidad.

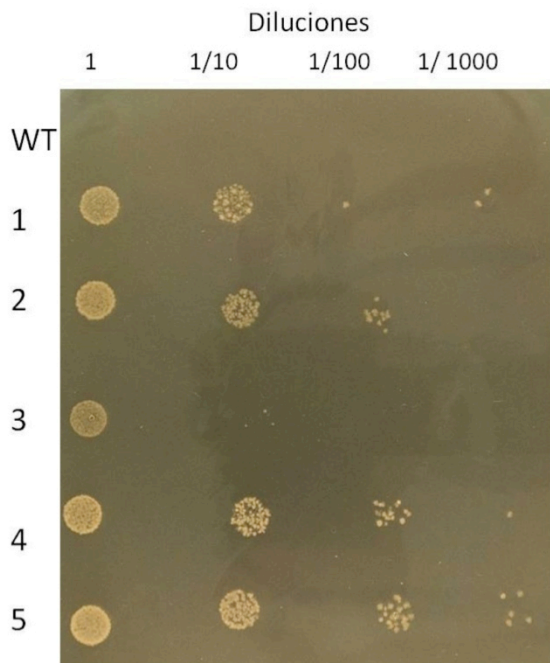


Figura 4.29. Ensayo de goteo para confirmar termoestabilidad de clones con actividad esterasa, en las condiciones de selección. Se observa que la estirpe con el plásmido pNCK-PFEI silvestre no crece en estas condiciones, mientras que 5 clones ensayados presentan resistencia incrementada en distinto grado

De la secuenciación (Tabla 4.12) se obtuvieron 42 secuencias sin ambigüedades, distribuidas de la siguiente forma: una secuencia (2,3%) silvestre; 11 (26.1%) mutantes sencillos, cada uno diferente en cada caso; 12 (28,5%) mutantes dobles; 11 (26.1%) mutantes triples; 3 (7%) mutantes cuádruples; y 5 (11.9%) clones duplicados. Para futuros análisis se descartaron los duplicados. En total, quedaron para el análisis 37 clones, de los que se escogieron las variantes PFEI que mostraron mayor estabilidad (4+) para su expresión, purificación, y análisis. No se apreció una especial concentración de reemplazos en zonas concretas, como sucedía en el caso de los dominios exo y pol de la polimerasa $\phi 29$, sino que aparece una distribución bastante homogénea a lo largo de toda la secuencia de PFEI.

Tabla 4.12. Mutaciones encontradas en los derivados de PFEI seleccionados. La termoestabilidad se evaluó por crecimiento en goteo y se asignaron los valores desde 1+ si crecía solo en cultivo concentrado y 4+ si crecía hasta la dilución 1/1000

Clon	Número de mutaciones	Crecimiento en gota
PFEI-1	2	2+
PFEI-2	1	2+
PFEI-5	2	2+
PFEI-7	2	2+
PFEI-9	3	4+
PFEI-10	2	2+
PFEI-12	3	2+
PFEI-13	3	2+

PFEI-14	1	2+
PFEI-15	2	2+
PFEI-16	3	2+
PFEI-19	1	2+
PFEI-20	1	3+
PFEI-21	3	3+
PFEI-22	2	2+
PFEI-23	2	3+
PFEI-25	4	2+
PFEI-26	1	2+
PFEI-27	1	2+
PFEI-28	3	2+
PFEI-29	3	2+
PFEI-31	1	2+
PFEI-32	2	3+
PFEI-34	2	4+
PFEI-35	3	4+
PFEI-37	3	2+
PFEI-39	2	2+
PFEI-41	2	4+
PFEI-42	3	3+
PFEI-43	1	2+
PFEI-45	4	4+
PFEI-46	1	4+
PFEI-47	3	2+
PFEI-65.3	1	2+
PFEI-60.13	1	3+
PFEI-66.16	4	2+
PFEI-68.3	2	4+

4.3.3. Producción y purificación de las variantes de PFEI seleccionadas

Se expresaron y purificaron las 5 variantes que mostraron mayor termoestabilidad en los ensayos de interferencia (crecimiento 4+) junto con dos variantes de PFEI publicadas de las que se comprobó mayor eficiencia hacia esteres de 4-nitrofenol con cadenas de entre 8 y 10 átomos de carbono [PFEI F125L/F143L/F158L (PFEI-T3), PFEI F158L (PFEI-S7)] (Schließmann *et al.* 2009) y PFEI E81N/K86L/E87D (PFEI-HJ) que ha sido descrita como termoestables,(Jochens *et al.* 2010). Para ello, se amplificó el gen mutante usando como molde la construcción pNCK-PFEI respectiva. Cada mutante se insertó en el plásmido pGASTON con las dianas NdeI/BamHI para dejar en fase la cola de histidinas C-terminal codificada en dicho plásmido. También se construyeron híbridos de estas proteínas con las mutaciones del clon PFEI34 que mostró la mayor resistencia de entre los seleccionados. Las proteínas se expresaron en *E. coli*, durante 18 horas a 22 °C y se purificaron por unión a quelatos metálicos tras la lisis celular (ver Figura 4.31).

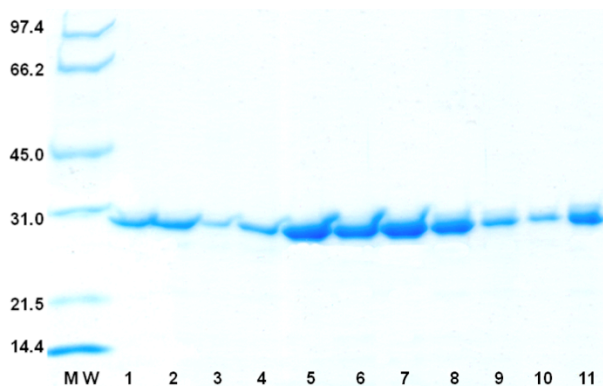


Figura 4.31. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie de las variantes de PFEI (32 kDa) purificadas por afinidad a quelatos metálicos. 1: PFEI silvestre; 2: PFEI-34; 3: PFEI-HJ; 4: PFEI-41; 5: PFEI-46; 6: PFEI-60.13; 7: PFEI-68.3; 8: PFEI-T3; 9: PFEI-T3-34, 10: PFEI-S7; 11: PFEI-S7-34.

4.3.4. Temperatura de desnaturalización de las variantes termoestables.

Debido a que los datos disponibles en la bibliografía para la caracterización de variantes termoestables de PFEI se determinaron mediante dicroísmo circular, comparamos la variante más estable obtenida en este trabajo frente a la hasta ahora variante más estable descrita PFEI-HJ también mediante dicroísmo circular. En primer lugar se determinó el espectro de absorción, no observándose diferencias entre las variantes silvestre, PFEI-HJ y PFEI-34 (Figura 4.32), lo que implica que no se producen grandes variaciones en la estructura secundaria o terciaria de las variantes con respecto a la enzima silvestre.

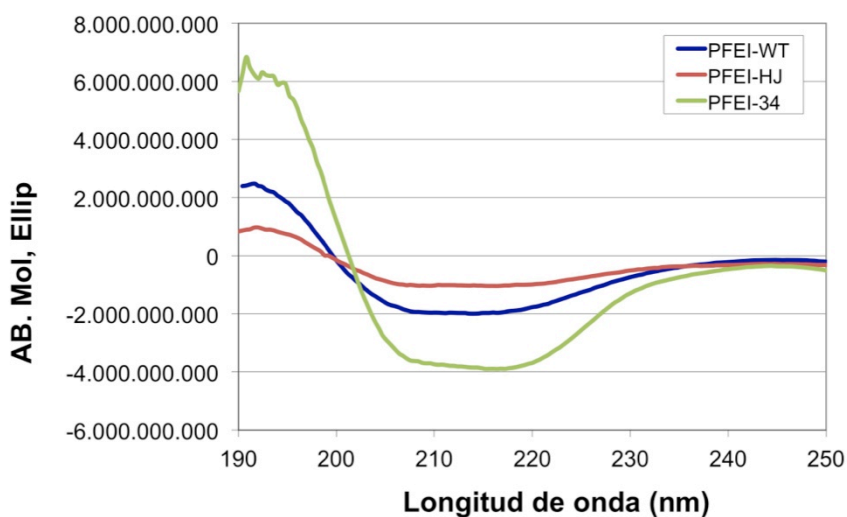


Figura 4.32. Espectros de absorción de las variantes PFEI silvestre, PFEI-HJ y PFEI-24 obtenidos mediante dicroísmo circular.

A continuación se determinó la T_m para la variante PFEI silvestre (71°C) y para PFEI-HJ, (83°C). La T_m de los controles silvestre y PFEI-HJ, son similares a las descritas en la publicación de la variante PFEI-HJ (Jochens *et al.*, 2010). Sin embargo, en el caso de PFEI-34 no fue posible el cálculo de la T_m en estas condiciones debido a que se superó el máximo de temperatura permitido por el equipo utilizado. Debido a estas limitaciones para determinar la T_m de la variante PFEI-34, se realizó la desnaturalización de las variantes en presencia del caotropro cloruro de guanidina a una concentración de 62.5 mM. Como se puede observar en la Figura 4.33, y la Tabla 4.13, la T_m de la variante PFEI-34 en estas condiciones es de 76.5°C, PFEI silvestre 71°C y PFEI-HJ 70.5 °C. Este dato confirma que la variante PFEI-34 es más estable que la variante PFEI silvestre, e incluso que la variante más termoestable descrita PFEI-HJ.

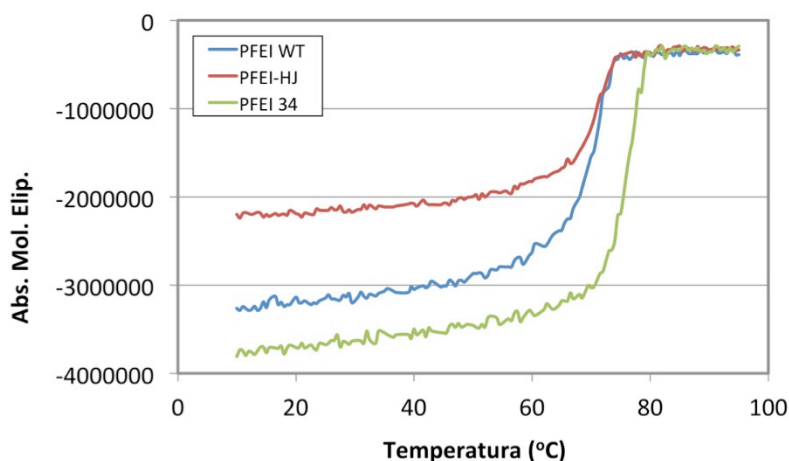


Figura 4.33. Desnaturalización de las variantes de PFEI en presencia de cloruro de guanidina 62.5 mM. PFEIWT: PFEI silvestre, PFEI-HJ: mutantes termoestable de PFEI publicado (Jochens *et al.* 2010). PFEI-34: PFEI-34, doble mutante termoestable seleccionado en el presente trabajo.

Tabla 4.13. T_m de variantes de PFEI en ausencia y presencia de cloruro de guanidinio 62,5 mM.

Variante	T_m (°C)	T_m con cloruro de guanidina (°C)
PFEI silvestre	71	71
PFEI-34	>95	76.5
PFEI-HJ	83	70.5

4.3.5. Estabilidad térmica de las variantes seleccionadas

Para evaluar la estabilidad operacional de las variantes de PFEI, se llevaron a cabo cinéticas de inactivación térmica. Para ello, se incubaron a 65 °C las mejores variantes obtenidas y se fueron retirando muestras para el ensayo de la actividad hidrolítica remanente a distintos tiempos. Las cinéticas de inactivación se ajustaron a curvas exponenciales bifásicas para calcular la vida media de cada enzima en las condiciones de incubación.

Como se puede observar en la Figura 4.34, tres de las variantes seleccionadas PFEI-41, PFEI-60.13 y PFEI-68.3 son menos estables que la variante silvestre en estas condiciones. Por otro lado las variantes PFEI-34 y PFEI-46 presentan mayor vida media que el control, siendo PFEI-34 la más estable con una vida media de 580 minutos, seguida por PFEI-46 (55 minutos) frente a PFEI silvestre que presentó una vida media de 33 minutos. Por tanto, al menos la variante PFEI-34 seleccionada fue hasta 18 veces más estable que la enzima silvestre a 65°C.

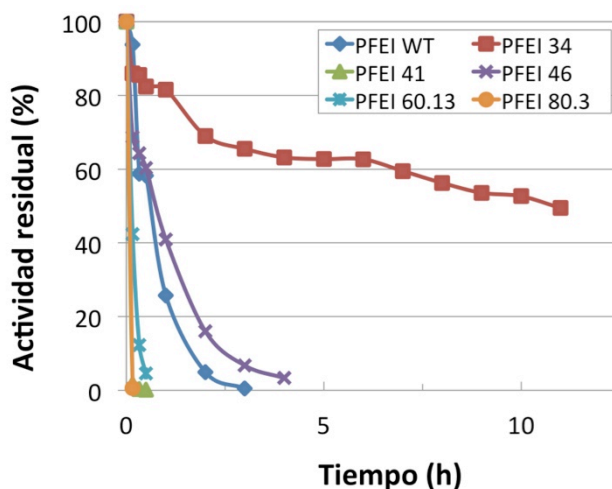


Figura 4.34. Inactivación térmica a 65 °C de variantes de la PFEI seleccionados en *T. thermophilus* HB27. WT: PFEI silvestre, PFEI-34, PFEI-41, PFEI-46, PFEI-60.13 y PFEI-68.3, representan los nombres asignados a los derivados de PFEI seleccionados en *T. thermophilus* HB27.

Para individualizar el efecto de las mutaciones presentes en PFEI-34, se generaron los mutantes individuales segregados PFEI-34.1 y PFEI-34.2 y se sometieron al mismo ensayo de inactivación térmica (Figura 4.35). Como se puede observar, las dos variantes presentan mayor vida media que la PFEI silvestre, siendo sus vidas medias de 61 y 98 minutos respectivamente. Por otro lado, el triple mutante PFEI-34.3 resultante de combinar los dos reemplazos de PFEI-34 con el sencillo de PFEI-46, rindieron una variante con una vida media de 289 minutos, que no presentó mayor estabilidad térmica que PFEI-34. En todo caso, las mutaciones individuales PFEI-34.1 y

PFEI-34.2 confieren claramente termoestabilidad cuando se introducen individualmente.

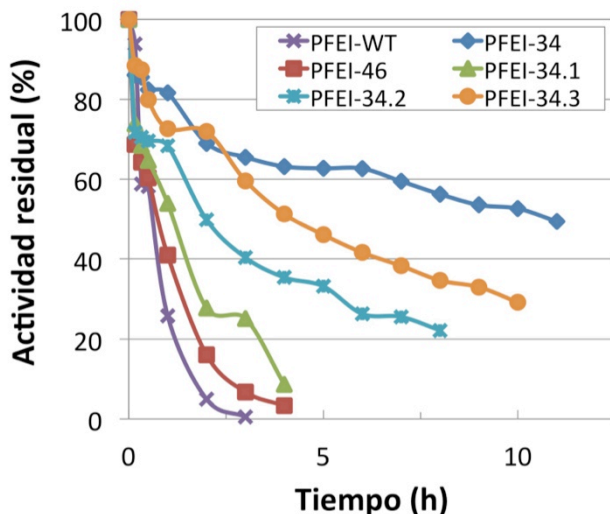


Figura 4.35. Ensayo de inactivación térmica a 65 °C de variantes de PFEI. La actividad se valoró por hidrólisis de 4-nitrofenol acetato a pH 7.5 en tampón fosfato 50 mM. WT: PFEI silvestre; Variantes: PFEI-34, PFEI-46, PFEI-34.1, PFEI-34.2; PFEI-34.3.

Con el objetivo de determinar si este efecto estabilizador de PFEI-34.1 y PFEI-34.2 se podía transponer a variantes de PFEI que ya poseían otras propiedades alteradas, se introdujeron ambas mutaciones sobre dos variantes con mayor eficiencia catalítica hacia esteres de *p*-nitrofenol de cadena media. Para ello, se generaron por mutagénesis dirigida las variantes PFEI-T3-34 (PFEI T3 + PFEI-34) y PFEI-S7-34 (PFEI F158L + PFEI-34). Como se puede observar (Figura 4.36) las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2 confieren mayor estabilidad térmica a las “pseudolipasas” PFEI-T3 y PFEI-158L, mostrando vidas medias de 289 y 50 minutos respectivamente. Es importante hacer notar que todas estas variantes son mucho más estables que la variante PFEI-HJ (Jochens *et al.* 2010).

A modo de resumen, se muestran en la Tabla 4.14 se resumen los datos de estabilidad de todas las variantes ensayadas.

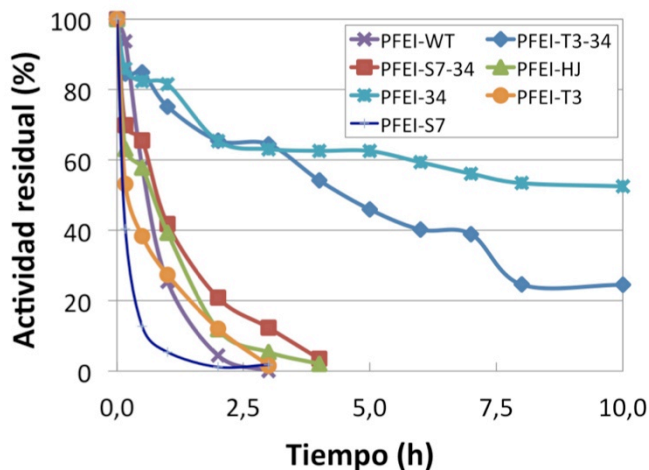


Figura 4.36. Ensayo de inactivación térmica a 65 °C de derivados de PFEI. PFEI-WT: PFEI silvestre; Variantes: PFEI-34; PFEI-HJ: variante termoestable de PFEI publicada (Jochens *et al.*, 2010); PFEI-T3 y PFEI-S7: “pseudolipasas” (Schließmann *et al.* 2009); PFEI-T3-34 y PFEI-S7-34: pseudolipasas estabilizadas con las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2.

Tabla 4.14. Vida media en minutos de las variantes de PFEI, sometidas a inactivación térmica a 65 °C, se incubaron las proteínas en el tampón de reacción a 65 °C y con una agitación de 800 rpm. Se tomaron muestras a intervalos regulares.

Variantes PFEI	Vida media a 65 °C (min)
silvestre	33
PFEI-HJ	42
PFEI-68.3	1
PFEI-41	1,6
PFEI-60.13	8
PFEI-46	45
PFEI-34	580
PFEI-34.1	61
PFEI-34.2	98
PFEI-34.3	289
PFEI-S7	7
PFEI-S7-34	50
PFEI-T3	17
PFEI-T3-34	289

4.3.6. Estabilidad de las variantes de PFEI frente a solventes orgánicos

Otro parámetro que caracteriza a las enzimas termoestables es su resistencia a la presencia de solventes orgánicos miscibles con agua comúnmente utilizados en reacciones de biocatálisis. Por esta razón se

ensayaron los efectos de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y tetrahidrofurano (THF) sobre las variantes de PFEI.

Al incubar las diferentes variantes de PFEI en DMSO 40% a 42 °C, se observó que PFEI-34 y las “pseudolipasas” estabilizadas PFEI-T3-34 y PFEI-S7-34 presentaron mayor estabilidad que los controles. De estos tres las variantes PFEI-34 y PFEI-T3-34 presentaron igual estabilidad con una vida media de 95 minutos, seguidas por PFEI-S7-34 con 35 minutos. Como se mencionó anteriormente todos los controles incluyendo la variante termoestable PFEI-HJ presentaron menor vida media que las variantes que poseen las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2 (Figura 4.37 y Tabla 4.15).

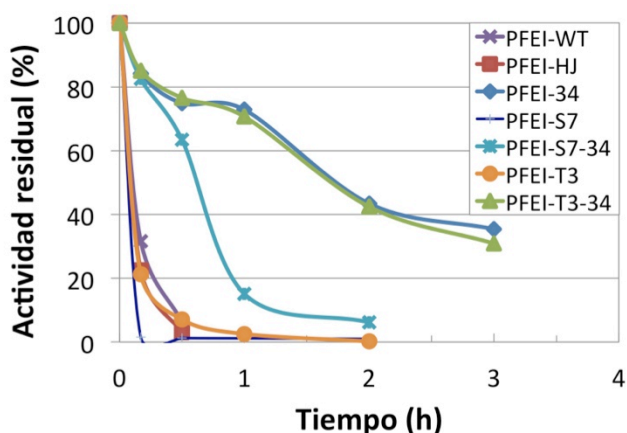


Figura 4.37. Ensayo de inactivación por DMSO 40% (v/v) a 42 °C. Se indican las variantes utilizadas.

Tabla 4.15. Vida media de derivados PFEI en ensayo de inactivación con DMSO 40% a 42 °C.

Variantes PFEI	Vida media (min.)
PFEI silvestre	5
PFEI-HJ	4
PFEI-34	95
PFEI-S7	2
PFEI-S7-34	35
PFEI-T3	2
PFEI-T3-34	95

Cuando se empleó DMF 40% (v/v) a 42°C se observó nuevamente que las variantes de PFEI que presentan las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2 mostraron mayor estabilidad que los controles (ver Figura 4.38 y la Tabla 4.16).

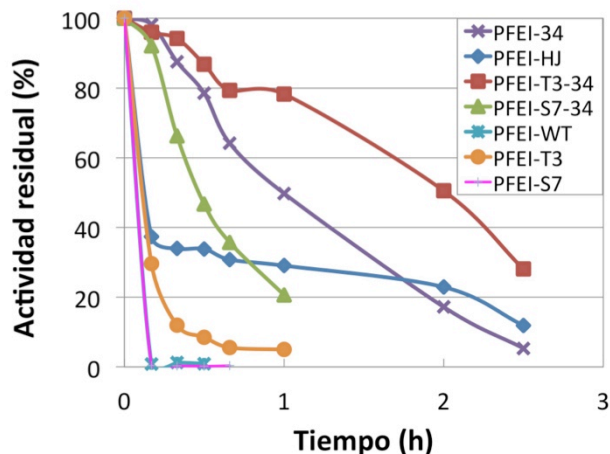


Figura 4.38. Ensayo de inactivación por DMF 40% a 42 °C. Se indican las variantes utilizadas.

Tabla 4.18. Vida media en minutos de derivados PFEI en ensayo de inactivación con DMF 40% a 42 °C.

Variantes PFEI	Vida media (min.)
PFEI silvestre	3
PFEI-HJ	15
PFEI-34	60
PFEI-S7	3
PFEI-S7-34	26
PFEI-T3	5
PFEI-T3-34	120

Por último se evaluó la estabilidad frente a THF 15% a 42°C. Al igual que en los casos de DMSO y DMF, las variantes que presentan las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2 muestran mayor estabilidad (Figura 4.39 y Tabla 4.17). Como se puede observar PFEI-34 y las pseudolipasas PFEI-S7-34 y PFEI-T3-34 que contienen las mutaciones PFEI-34.1 y PFEI-34.2 presentan mayor estabilidad que los controles, pero siendo PFEI-34 mucho más estable (700 minutos frente a 9 del silvestre).

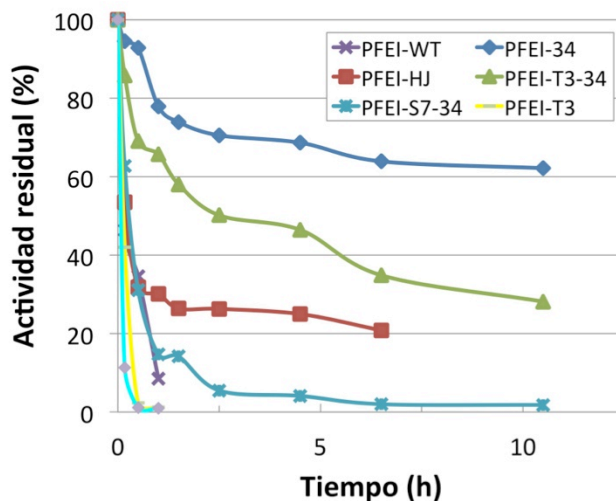


Figura 4.39. Ensayo de inactivación por THF 15 % a 42 °C. Se indican las variantes utilizadas.

Tabla 4.17. Vida media de derivados PFEI en tetrahidrofurano al 15% a 42 °C.

Variantes PFEI	Vida media (min.)
PFEI silvestre	9
PFEI-HJ	15
PFEI-34	700
PFEI-S7	2
PFEI-S7-34	15
PFEI-T3	8
PFEI-T3-34	150

Todos estos datos muestran que la variante PFEI-34 es mucho más estable frente a temperatura y frente a solventes orgánicos que la proteína parental e incluso que la variante más termoestable hasta ahora publicada. Adicionalmente, la introducción de las mutaciones de PFEI-34 en otras variantes incrementa la termoestabilidad, posibilitando su uso en presencia de codisolventes, lo cual resulta especialmente interesante en variantes que han sido mejoradas para la hidrólisis de ésteres de cadena media y larga, que requieren de dichos codisolventes para solubilizarse.

4.3.7. Parámetros cinéticos de las variantes de PFEI

Con el objetivo de valorar el efecto de las mutaciones de la variante PFEI-34 sobre los parámetros cinéticos de los derivados de PFEI se calcularon las constantes cinéticas de las diferentes variantes de PFEI utilizando como sustratos el acetato (Tabla 4.18) de *p*-nitrofenol (pNPA).

Tabla 4.18. Constantes cinéticas de variantes de PFEI para la hidrólisis de p-nitrofenil acetato.

variante	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)
PFEI silvestre	0,61	104,05	170,57
PFEI-HJ	0,28	11,09	39,48
PFEI-34	0,42	25,36	60,38
PFEI-34.1	0,13	43,70	336,15
PFEI-34.2	0,17	27,63	156,54
PFEI-S7	0,023	12,27	524,19
PFEI-S7-34	0,05	17,84	339,89
PFEI-T3	0,043	44,66	1038,55
PFEI-T3-34	0,03	14,70	484,46

Como se puede apreciar en la Tabla 4.18, la introducción de las mutaciones de PFEI-34 redujo 4 veces k_{cat} , mejorando levemente K_m . Para elucidar si el descenso en alguno de estos parámetros era atribuible a alguno de los dos reemplazos en particular, se determinaron los parámetros cinéticos de las variantes PFEI-34.1 y PFEI-34.2, pudiendo atribuir un mayor descenso en k_{cat} al reemplazo PFEI-34.2. Por otra parte, la introducción de ambos reemplazos sobre las variantes S7 y T3 mantuvo K_m en el mismo orden de magnitud (10 veces menor que para PFEI silvestre) y tuvo efectos diferentes sobre k_{cat} . Sin embargo, en ambos casos, la constante de especificidad o eficiencia catalítica se mantuvo superior a la del silvestre, aunque a su vez menor que la de las variantes sin termoestabilizar. A la vista de los parámetros y la estabilidad de las variantes PFEI-34 y mutantes segregados, la mutación menos estabilizante es asimismo la que menos afecta a los parámetros cinéticos y viceversa. Este intercambio de actividad y estabilidad suele tener lugar cuando se selecciona una de dos propiedades en una enzima dejando a la segunda sometida a deriva neutral, como será discutido posteriormente.

4.3.8. Análisis estructural y bioinformático de las mutaciones termoestabilizantes en PFEI

Una vez evaluada la estabilidad térmica y a solventes de los mutantes de PFEI, se procedió al análisis de la base estructural del incremento de termoestabilidad de los mutantes, especialmente a la vista del intercambio de actividad por estabilidad detectado en las variantes PFEI-34 y derivadas. Como primer paso se utilizó el programa Yasara para realizar los modelos estructurales a partir de la estructura 1VA4 mediante sustitución y minimización de la energía. Una vez obtenidos los modelos adecuados, se utilizó el programa PyMol para ver la localización de las mutaciones seleccionadas y compararlas con los residuos de la estructura de PFEI silvestre.

Los datos de estructura indican que no se producen nuevas interacciónes en PFEI.34. Sin embargo, en el modelo de superficie se observa que la

mutación PFEI-34.1 genera una zona hidrofóbica en la superficie de la proteína que no se observa en la PFEI silvestre. Esta nueva zona hidrofóbica en la superficie podría favorecer la agregación de las variantes PFEI-34, lo cual sería congruente con su mayor tendencia a expresarse en *E. coli* como producto insoluble que la enzima parental. Del mismo modo, en los ensayos de dicroísmo circular en ausencia de cloruro de guanidina, no se observó una desnaturalización completa y monofásica de la proteína (datos no mostrados) hasta los 95 °C, lo cual es congruente una vez más con la presencia de una población de monómeros y otra de agregados.

Con respecto a la mutación PFEI-34.2, el nuevo residuo, además de conservar las interacciones existentes en el silvestre, establece un nuevo puente de hidrógeno. A la vista del descenso que provoca en las constantes cinéticas pero el gran incremento que supone en cuanto a termoestabilidad, esta nueva interacción podría generar una estructura más rígida y compacta que explique la estabilidad térmica conferida por dicha mutación.

Con respecto a la mutación presente en la variante PFEI-46, no se observan nuevas interacciones polares con otros residuos de la estructura de PFEI.

Con el objetivo de comparar las predicciones informáticas sobre los posibles residuos de la PFEI que pueden ser objeto de cambios por diseño racional y las mutaciones encontradas experimentalmente por evolución dirigida, se calculó el valor B de los residuos de PFEI, y se realizaron simulaciones de DM sobre la estructura 1VA4. A la vista del número de residuos que suponen la mitad superior del intervalo de valores B (16 sobre 272), PFEI es una proteína en principio más rígida que la polimerasa de $\phi 29$. Otros factores que pueden contribuir a la baja flexibilidad (medida como factor B) son la estructura tridimensional de PFEI, con únicamente dos dominios (por oposición a la estructura multidominio de $\phi 29$) y la cristalización en forma de hexámero, de modo que el empaquetamiento de las moléculas en la red cristalina reduce la flexibilidad de los residuos que forman el contacto entre monómeros. Por otra parte se han seleccionado cambios en muchas otras posiciones de factor B bajo, con lo cual podemos concluir que el método de termoselección es válido para variantes en las que se da rigidificación de residuos flexibles y probablemente para otros mecanismos de termoestabilización, como la restricción de movimiento de elementos de estructura secundaria, dominios, etc.

Con el fin de elucidar las razones para la selección de las mutaciones termoestabilizantes que no fueran fácilmente explicables por criterios de flexibilidad (factor B), se realizó una simulación mediante dinámica molecular a 298 K (Figura 4.45).

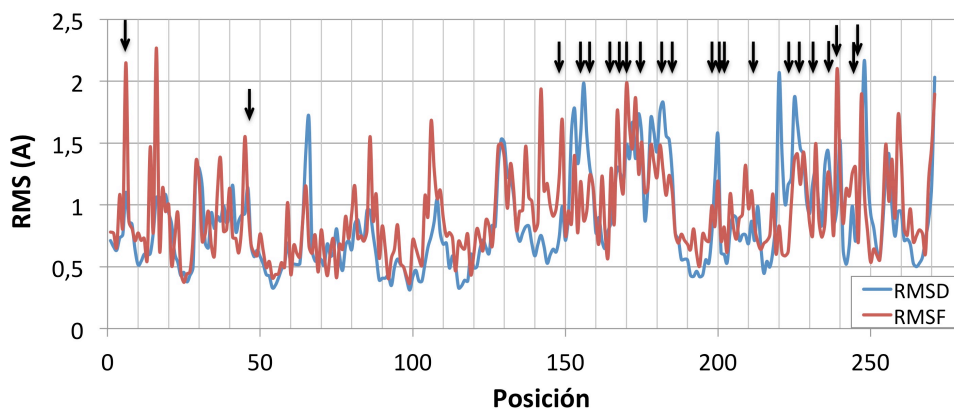


Figura 4.45. RMSD y RMSF calculados para cada aminoácido de PFEI a partir de una simulación de dinámica molecular de 20 ns a 298K en agua como disolvente explícito. Las flechas señalan mutaciones encontradas experimentalmente que coinciden con valores elevados de RMSD o RMSF.

Al igual que en el caso de los dominios exo y pol, muchas de las mutaciones encontradas corresponden a aminoácidos con alta RMSD o RMSF, y muchos de estos aminoácidos se encuentran en la mitad C-terminal de PFEI. Sin embargo la distribución de las mutaciones seleccionadas fue uniforme a lo largo de toda la proteína (Figura 4.29) por lo que no se puede considerar un sesgo. Además en este caso, se ha realizado una doble selección ya que las variantes seleccionadas como termoestables, debían presentar actividad en el ensayo en placa. Por otro lado se puede observar que hay muchas otras mutaciones que no destacan en las simulaciones de DM, entre ellas las mutaciones presentes en las variantes cuya termoestabilidad fue confirmada en los ensayos de inactivación térmica y por solventes PFEI-34 y PFEI-46. De este hecho se puede concluir que el método de termoselección *in vitro* independiente de actividad permite seleccionar variantes que son más termoestables debido a una rigidez incrementada a nivel de aminoácido o a nivel de cadena principal, pero también otras variantes que no se han podido explicar con las técnicas utilizadas.

5. DISCUSIÓN

5.1. RELEVANCIA DE LA TERMOESTABILIDAD EN BIOCATÁLISIS

El papel de las enzimas en muchos procesos biotecnológicos se conoce desde la antigüedad. Su existencia fue asociada con la historia de la antigua Grecia quienes usaban enzimas de microorganismos en la elaboración de cerveza, producción de etanol, producción de queso, etc.

Actualmente el empleo de enzimas como biocatalizadores en procesos industriales presenta ciertas ventajas sobre la química tradicional, como una alta regioselectividad y estereoselectividad, la posibilidad de trabajar en condiciones de reacción más suaves, lo que implica una menor dependencia del empleo de solventes o reactivos contaminantes (Arroyo *et al.* 2003; Rozzell 1999) y la reducción de los pasos necesarios para completar una transformación. Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas, el uso de enzimas procedentes de microorganismos mesófilos en la industria suele estar limitado por el hecho de que las condiciones mínimas necesarias para realizar las transformaciones de interés suelen superar la estabilidad natural de dichas enzimas (Turner 2009). Si bien una alternativa viable sería el uso de enzimas procedentes de microorganismos termófilos (termozimas) que presentan un grado de estabilidad natural, éstas presentan dos claras desventajas: a) no siempre es posible encontrar catalizadores que sustituyan a las enzimas de organismos mesófilos que ya se utilizan de rutina y b) actividad y estabilidad han coevolucionado de modo que la enzima es termoestable pero únicamente funcional a altas temperaturas (Cipolla *et al.* 2012), con los consiguientes problemas de estabilidad de los sustratos y gasto energético. Por lo tanto, la estabilización de enzimas de microorganismos mesófilos sigue siendo la alternativa preferida. Además, dado que las enzimas suelen ser el componente más costoso de un bioproceso, el incremento del “número de recambio total” o TTN (cociente de los moles de producto obtenido por mol de catalizador a lo largo de toda la vida de este último durante la reacción) se hace esencial para rebajar los costes del mismo y éste solo es posible si la enzima mantiene su estabilidad a lo largo de un número mínimo de ciclos (Rogers y Bommarius 2010). Por otra parte, la termoestabilidad en una enzima afecta favorablemente a su “evolucionabilidad”, o la capacidad que tiene una proteína para aceptar mutaciones que alteren sus propiedades catalíticas (Bloom y Arnold 2009; Tokuriki *et al.* 2008; Tokuriki y Tawfik 2009b), lo cual es de gran interés en el desarrollo de biocatalizadores industriales. Otra ventajas operacionales de trabajar a temperaturas superiores a la temperatura ambiente y que podrían aplicarse si utilizamos enzimas termoestabilizadas serían el incremento de las velocidades de reacción (de acuerdo a la ecuación de Arrhenius), de la solubilidad de los sustratos, reducción de la viscosidad del medio y de la contaminación microbiana del reactor (Adamczak y Krishna 2004).

En consecuencia, la estabilización de enzimas es un tema relevante en biotecnología industrial, generalmente resuelto a través de la inmovilización, que permite de manera simultánea la estabilización del catalizador así como su reciclado y fácil separación del medio de reacción. Sin embargo, la inmovilización de una enzima sobre un soporte puede causar alteraciones sobre las propiedades catalíticas, como la selectividad (Fernández-Lorente *et al.* 2001; Segura *et al.* 2004; Terreni *et al.* 2001), de modo que al intentar mejorar una propiedad como la estabilidad se podrían empeorar otras, y viceversa. Con el advenimiento de la ingeniería de proteínas, se hace posible la mejora de una enzima independientemente del proceso de inmovilización, lo cual además permite trabajar en fase homogénea o en células quiescentes.

La mejora de enzimas mediante ingeniería de proteínas sigue un algoritmo darwiniano que consta de una primera etapa de generación de diversidad seguida de una etapa de selección de los individuos más aptos. Hasta ahora se han utilizado con éxito diferentes estrategias para mejorar la estabilidad de las enzimas, desde una randomización mediante epPCR y un ensayo tras incubación a alta temperatura (Kim y Lei 2008), pasando por la introducción de mutaciones puntuales guiadas por secuencia consenso (Lehmann 2001; Polizzi *et al.* 2006; Vázquez-Figueroa *et al.* 2007; Vázquez-Figueroa *et al.* 2008) o parámetros indicadores de la flexibilidad de los aminoácidos como el factor B (Blum *et al.* 2012; Reetz y Carballeira 2007; Reetz *et al.* 2006; Reetz *et al.* 2009; Reetz *et al.* 2010). Como se puede observar, la introducción de información estructural en las estrategias de ingeniería de proteínas conlleva la reducción en la diversidad genética a crear y por lo tanto, en el número de individuos a filtrar o seleccionar (Bornscheuer *et al.* 2012). Sin embargo, dicha información estructural no siempre está disponible, o no siempre es capaz de predecir todos los posibles mecanismos de resistencia a la temperatura y por lo tanto, los métodos basados en la creación de genotecas puramente aleatorias mantienen su relevancia, siempre y cuando se acoplen a una selección con la capacidad suficiente para manejar un alto número de individuos. Este hecho es especialmente relevante cuando se considera la mejora de una propiedad como la termoestabilidad, que depende de diversas interacciones repartidas por toda la estructura de una proteína.

Además de la selección PROSIDE mencionada en la introducción (Martin *et al.* 2001), una alternativa viable en este sentido supone el uso de *Thermus thermophilus* como célula hospedadora (Tamakoshi *et al.* 2001) y más recientemente en un sistema de selección de proteínas termoestables independiente de actividad (Chautard *et al.* 2007). En este sistema se seleccionan variantes del gen de interés clonado en el plásmido pNCK, en el cual el gen a estabilizar se expresa como una fusión con la kanamicina nucleotidil transferasa termoestable (Figura 1.9), asociando la termoestabilidad a la supervivencia de la célula huésped a través del fenómeno de interferencia de plegamiento. Los objetivos de esta tesis han

perseguido la mejora del sistema mediante la construcción de un hospedador mejorado y la profundización en el conocimiento de la capacidad del método para estabilizar proteínas multidominio o de gran tamaño.

5.2. MUTANTES DE *THERMUS THERMOPHILUS* HB27 DEFICIENTES EN PROTEASAS TIPO LON

El primero de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue obtener una cepa en la que no se produjera proteólisis de fusiones a la proteína de selección Kat y mejorar así el procedimiento de selección basado en interferencia de plegamiento. Para ello, nos basamos en un trabajo anterior en el que tras mutar tres potenciales homólogos de *lon* encontraron que la ausencia TTC0746 tenía un efecto positivo en la expresión de enzimas heterólogas en *T. thermophilus* HB27 (Maehara *et al.* 2008). En nuestro caso, necesitábamos un mutante de delección “limpio” no resistente a kanamicina, por lo que empleamos un sistema de doble marcador para primero delecionar el gen objetivo por inserción del cassette *kat*, y después eliminar la resistencia con un segundo plásmido suicida. Los mutantes *T. thermophilus* HB27 Δlon aislados mostraron menos actividad proteolítica que la cepa silvestre y se complementaron parcialmente al expresar el gen correspondiente en trans (Figura 4.3).

Cuando empleamos este mutante para la expresión de las fusiones nos encontramos con un fenómeno de toxicidad aparente muy superior a lo esperado. De hecho, las pocas colonias que se obtenían al expresar una fusión con una proteína termolábil, en realidad correspondían a delecciones en las que no había proteína termolábil. Sin embargo, y dado que la selección empleada se basa en la resistencia a kanamicina, no podemos distinguir si la falta de crecimiento es consecuencia de la toxicidad intrínseca de las proteínas mal plegadas, que podrían incluso poner en peligro la propia síntesis de proteínas por bloqueo de los ribosomas, o si se trata realmente de un proceso de interferencia de plegamiento tan exacerbado que no permite el escape de ninguna copia bien plegada de la proteína reportero.

En todo caso, estos mutantes parecen expresar sin demasiado problema proteínas termoestables como la propia Kat, la α -manosidasa y la glutamato deshidrogenasa de *Pyrococcus horikoshii* o una α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus* sobreexpresadas en un trabajo anterior (Maehara *et al.* 2008), lo que nos lleva a concluir que la proteína codificada por *ttc0746* es una proteasa muy relevante para la eliminación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, carecemos de datos acerca de su posible intervención en algunas respuestas generales como lo hace LonA de *E. coli* frente a la respuesta a choque térmico e incluso en la respuesta SOS (Park y Marqusee 2005).

Debido a la falta de expresión de la fusión *gen-kat* y a la reducción del número de colonias viables luego de ser transformadas con el vector de termoselección (plásmido pNCK) que contiene en gen de la proteína de interés, no se utilizaron las cepas mutantes *T. thermophilus* Δlon en la selección de proteínas termoestables que interesaban en la presente tesis doctoral.

5.3. TERMOESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO E INDUSTRIAL

En esta Tesis, se ha ensayado la termoestabilización mediante técnicas de selección por interferencia de plegamiento de dos proteínas de características y complejidad estructural y funcional muy distintas: una ADN polimerasa y una esterasa. El interés en termoestabilizar la ADN polimerasa del fago $\phi 29$ queda patente cuando se considera su utilización generalizada especialmente en procesos de amplificación isotérmica de muestras ambientales y su baja estabilidad térmica, que dificulta su almacenamiento y transporte. Por otra parte, hasta la fecha no se ha logrado termoestabilizar significativamente ninguna ADN polimerasa procedente de organismos mesófilos mediante ingeniería de proteínas, siendo las estrategias preferidas la adición de estabilizantes como SSB, detergentes, polioles (Carninci *et al.* 1998; Co ; Dabrowski *et al.* 2002) o la búsqueda de polimerasas de microorganismos termófilos. Por otro lado, en aplicaciones previas del método de termoestabilización *in vivo* no se había intentado anteriormente estabilizar una proteína con las complejas características estructurales de la ADN polimerasa del fago $\phi 29$ (Chautard *et al.* 2007). En contraposición, PFEI presenta una estructura muy diferente a la enzima anterior, de carácter globular formada por dos dominios, ambos con una estructura secundaria bien definida (Cheeseman *et al.* 2004). Su interés radica en la gran diversidad de reacciones que cataliza y en el hecho de que es posible evolucionar un ancestro promiscuo a partir de ella, por ejemplo la variante L29P cataliza varias reacciones diferentes como hidrólisis de perácidos o de lactamas (Torres *et al.* 2012b; Yin *et al.* 2010).

A continuación consideraremos como afectan los distintos factores (de secuencia, estructura, actividad) al funcionamiento del método de termoestabilización *in vitro* a través del análisis transversal de los tres casos de estudio analizados en esta tesis doctoral.

5.3.1. Estructura de las proteínas a estabilizar e influencia de los genes codificantes

Las dos enzimas sobre las que se ha aplicado el proceso de selección en esta tesis son muy diferentes en cuanto a estructura, actividad enzimática y gen codificante.

Por un lado, a ADN polimerasa del fago ϕ 29 es una enzima muy compleja con dos dominios capaces de plegamiento y actividad independiente, pero compuestos a su vez de varios subdominios, y dotada de una gran flexibilidad necesaria para “moverse” durante la polimerización del ADN, desplazando una cadena y sintetizando la complementaria con una extraordinaria procesividad, pero a su vez, y quizás a cambio, muy termosensible. Desde el principio resultó evidente que su actividad catalítica podría generar toxicidad al unirse con gran afinidad al ADN, pero esperábamos que al ser expresada a tan alta temperatura, este efecto no fuera excesivamente relevante. Sin embargo, nos encontramos que al aplicar el método de termoselección sobre una genoteca de epPCR sobre el gen completo, pudimos seleccionar un gran número de clones a alta temperatura (67 °C), pero todos ellos de delección, lo que nos llevó a la conclusión de que estábamos ante un fenómeno de toxicidad que forzaba la selección de clones vacíos de la genoteca, a pesar de ser éstos tan minoritarios como para no ser detectables por tinción. Por otra parte, al transformar únicamente con la construcción silvestre (lógicamente libre de clones vacíos) los pocos clones que crecieron a alta temperatura también carecían del gen, siendo este hecho explicable únicamente por fenómenos de recombinación, probablemente favorecida también por el bajo contenido en G+C del gen. Como estrategia alternativa para evitar los fenómenos de toxicidad, se trabajó con los dominios exo y pol por separado, y en el caso de esta última, se utilizó un mutante inactivo como elemento predictor de posible toxicidad. De esta forma, sí fue posible obtener derivados en principio más termoestables y minimizar (que no eliminar completamente) el problema de la selección de variantes de delección.

Por el contrario, en el caso de PFEI, una proteína mucho más compacta y con actividad esterásica no se presentaron problemas de selección de delecciones con tanta facilidad, probablemente debido a su menor toxicidad y, quizás también, a su mayor contenido en G+C, similar al genómico de *Thermus* spp.

5.3.2. Características de las mutaciones seleccionadas

En los tres casos analizados (dominio exonucleasa, polimerasa y PFEI), tras el proceso de selección a 64 y 65 °C, se obtuvieron una serie de sustituciones de aminoácidos que en muchos casos se repetían y representaban la misma mutación presente en algunos clones individuales seleccionados. Las repeticiones en las que se aísla la misma mutación a nivel genético pueden tener dos posibles orígenes. Por un lado las mutaciones incluidas en el primer ciclo de epPCR estarán presentes en el 25% de la genoteca final y de ahí que se lleve a cabo la reacción subdividida en alícuotas de menor volumen que se reúnen tras la misma (Arnold y Georgiou 2003). Por otra parte, los reemplazos repetidos pueden ser producto de la redundancia introducida en la genoteca al unir los clones seleccionados para

realizar la extracción de DNA plasmídico previamente a la secuenciación. Este hecho, que se aprecia especialmente en la genoteca de PFEI (Tabla 4.12) debido a su paso por *E. coli* para poder realizar un cribado por actividad esterasa, puede solventarse adoptando una estrategia de extracción de DNA y transformación individualizada en formato de placa multipocillo (Di Lorenzo *et al.* 2007) o en el caso particular de la actividad esterasa, reduciendo la actividad esterasa intrínseca de *Thermus* mediante delección de los genes correspondientes descritos hasta la fecha (Dominguez *et al.* 2007; Domínguez *et al.* ; Fucinos *et al.* 2011; Fucinos *et al.* 2005; Fuciños *et al.* ; López-López *et al.* 2010). Por otra parte, hemos encontrado casos en los que el reemplazo se produce en la misma posición, pero el aminoácido introducido es diferente y que remarcan la relevancia de esa posición para la termoestabilidad, pero también la flexibilidad de dicha posición para aceptar sustituciones (siempre dentro de la cobertura de secuencia limitada que permite obtener la epPCR). Algunos ejemplos serían los reemplazos T3A/S, F144L/Y, K168M/R en PFEI o E20G/Q, N77K/Y, Y101C/N, K110E/N, L177R/M.

La flexibilidad de reemplazo en una posición ha sido abordada por diversos autores con diferentes estrategias. Algunos autores adoptan una estrategia de secuencia consenso, mediante la cual un aminoácido se reemplaza por el correspondiente en una posición, a partir de un alineamiento múltiple de secuencias (Blum *et al.* 2012; Polizzi *et al.* 2006; Vázquez-Figueroa *et al.* 2007; Vázquez-Figueroa *et al.* 2008). Sin embargo, la termoestabilidad lograda depende estrictamente de los individuos considerados en el alineamiento y supone que el aminoácido más frecuente es el que confiere mayor estabilidad, lo cual no siempre es cierto porque depende de las condiciones operacionales en las que se utilice la enzima. De hecho, la comparación entre secuencias consenso y secuencias homólogas de termozimas no coincide necesariamente (Torres *et al.* 2012a). Otros autores han realizado reemplazos siguiendo la presencia de aminoácidos en secuencias existentes en la naturaleza, dejando fluctuar el reemplazo dentro de los límites marcados por la población presente en la posición equivalente de un alineamiento estructural masivo de superfamilias, bajo la premisa de que todas las sustituciones posibles en una posición han sido ya probadas en la naturaleza (Jochens *et al.* 2010; Kuipers *et al.* 2010). Aunque se logre una reducción del número de individuos en la genoteca y un mayor porcentaje de individuos activos, difícilmente se puede asumir que la naturaleza ha probado las condiciones industriales, sobre todo en lo que refiere a disolventes orgánicos y sustratos no naturales por lo que tanto la diversidad como la mejora ($\Delta\Delta G$) se verían limitadas con este enfoque.

Entre los clones seleccionados se recuperaron variantes que contenían codones de parada, fácilmente explicables si consideramos que permiten un mejor plegamiento de la proteína testigo en el extremo C-terminal de la fusión (Kat). Algunos autores han intentado solventar este problema utilizando fusiones insercionales dentro de proteínas testigo generadas mediante

permutación circular, dado que son incapaces de plegar y no toleran fácilmente inserciones (Cabantous *et al.* 2008). Las variantes recuperadas con mutaciones inactivantes (como en el caso del dominio exo) también son esperables si tenemos en cuenta la toxicidad de la enzima, incluso a altas temperaturas (Figura 4.7).

5.3.3. Localización de las mutaciones seleccionadas

En cuanto a la localización de las mutaciones a lo largo de la secuencia codificante del dominio exo y polimerasa un dato interesante es que el mayor porcentaje de las mutaciones seleccionadas se encuentran agrupadas en zonas muy concretas. En el caso del dominio exo, el 55% de las mutaciones se encuentran en la región 3' de la secuencia. En el caso del dominio pol, también se observa una tendencia a seleccionar mutaciones al final de la secuencia del gen. En este dominio que contiene los últimos 383 residuos de la polimerasa del fago f29, se seleccionaron 80 mutaciones, de las que el 67.5% se encontraba en los últimos 100 residuos. El hallazgo de mayor frecuencia de mutaciones estabilizantes al final del gen de interés (cercano al espaciador de la fusión) cuando la secuencia de la genoteca inicial no presentaba sesgo sobre esta región, puede indicar que el sistema realmente selecciona mutaciones que facilitan el plegamiento de Kat y no necesariamente el plegamiento del gen de interés o la fusión completa, por lo que las mutaciones sobre el gen codificante de exo cercanas a la región espaciadora resultarían en una menor interferencia, al ser amortiguadas por esta región desordenada de enlace entre la proteína “pasajero” (Exo) y la proteína “testigo” (Kat).

En el caso de PFEI, las mutaciones seleccionadas se encontraron repartidas por toda la secuencia codificante, sin concentrarse especialmente en ninguna región. Sin embargo y al contrario que en las genotecas de exo y pol, la genoteca sufrió una segunda selección por criterios de actividad, por lo que las regiones en las que se concentran las mutaciones pueden verse alteradas con respecto a las genotecas exo y pol. Además se ha descrito la existencia de un efecto refractario a la epPCR en zonas ricas en G+C del gen codificante de la PFEI (Hidalgo *et al.* 2008), el cual puede contribuir todavía más a alterar la percepción de la distribución de las mutaciones.

En general, el efecto de la concentración de mutaciones o ausencia de las mismas podría paliarse subdividiendo aun más la proteína o focalizando las mutaciones mediante el uso de oligonucleótidos mutagénicos (Herman y Tawfik 2007; Hidalgo *et al.* 2008) para “compensar” desequilibrios en la genoteca

5.3.4. Estabilidad de las variantes seleccionadas

La termoestabilidad de las variantes seleccionadas se determinó indirectamente a través del ensayo de crecimiento en gota tras extraer el plásmido del clon original y transformarlo de nuevo en *Thermus*. En todos los casos, las variantes seleccionadas facilitaron el crecimiento de *Thermus* en mayor medida que las variantes silvestres (Figuras 4.8 y 4.29). Posteriormente algunas variantes fueron purificadas y su estabilidad ensayada directa o indirectamente.

En el caso de las variantes de exo más frecuentemente seleccionadas (Y109H y Q183R), éstas se reintrodujeron en la polimerasa completa y se realizaron ensayos de amplificación a diferentes temperaturas. Se comprobó que las mutaciones seleccionadas en el dominio exonucleasa reducían la capacidad de la polimerasa $\phi 29$ para funcionar a temperaturas superiores a 30 oC (Figura 4.20) y en algunos casos incluso a 30 °C (Figura 4.19), a pesar de conferir mayor resistencia a kanamicina. Aunque el ensayo induce a concluir que las variantes aisladas son menos termoestables que la proteína parental, el ensayo realizado no se corresponde exactamente con un ensayo de termoestabilidad, en el que se debe incubar la proteína a una temperatura pero se ensaya a su temperatura óptima ni tampoco la actividad ensayada es la misma que la del dominio estabilizado. Alternativamente se podrían determinar parámetros termodinámicos como la T_m , C_p , ΔH o $T\Delta S$ mediante técnicas como el dicróismo circular o la calorimetría diferencial de barrido.

En el caso de PFEI, la termoestabilidad se verificó mediante ensayos de dicróismo circular con la variante más estable (PFEI-34). Dicha estabilidad se confirmó mediante ensayos de estabilidad frente a diferentes agentes inactivantes como la temperatura (Figuras 4.34-4.36) y la presencia de codisolventes orgánicos (Figuras 4.37-4.39). En todos los casos, la variante PFEI-34 demostró ser más estable que la proteína parental y que la variante más estable descrita hasta la fecha en la bibliografía (Jochens *et al.* 2010). Siendo PFEI-34 un mutante doble, se realizó una deconvolución de las mutaciones para estudiar su contribución individual. Cada una demostró ser termoestabilizante con respecto a PFEI silvestre (Figura 4.35) e incluso más estabilizante que las tres mutaciones comprendidas en la variante PFEI-HJ (Tabla 4.14). Sin embargo, el efecto aditivo de los tres reemplazos termoestabilizantes seleccionados no consiguió superar al efecto concertado de PFEI-34. A falta de estudiar la combinación de PFEI-46 con cada una de las mutaciones de PFEI34, se puede concluir que existe un efecto antagónico de PFEI-46 con alguna de ellas.

A pesar de estos resultados en la dirección buscada, también en las genotecas de PFEI se aislaron variantes (PFEI-41, PFEI-60.3, PFEI-68.13) cuya vida media bajo condiciones inactivantes fue menor que la de la enzima parental. A falta de comprobar realmente si la T_m de estas variantes es en realidad menor que la de la proteína parental, la selección de individuos igual o incluso menos termoestables que la enzima parental habría que buscarla en

un fenómeno de “escape” de la selección para el que existen diversas explicaciones posibles. Considerando que el criterio real de selección es la resistencia a kanamicina, y que dicha resistencia viene dada por la capacidad de la célula para modificar el antibiótico a una velocidad tal que permita su supervivencia, dicha velocidad puede deberse a dos factores: enzima funcional (y correctamente plegada) o abundancia de enzima menos funcional. En este último caso, un individuo con mejor productividad de una variante menos eficiente sería capaz de sobrevivir a la selección tan eficazmente como un individuo con peor productividad de una variante más eficiente en la modificación de la kanamicina. También podría ocurrir que algunas de estas variantes fueran seleccionadas como consecuencia de una mayor susceptibilidad a proteasas intracelulares que facilitarían la liberación y plegamiento de Kat. Finalmente, no debemos olvidar que lo que seleccionamos es el plegamiento de una fusión, y podría ocurrir que una mutación fuera termostabilizante en el contexto de la fusión vía interacciones adicionales con el dímero Kat, no siendo eficaz tal mutación en el contexto de la proteína aislada. En una estrategia de cribado o selección para ingeniería de proteínas, la asociación de fenómenos observables a propiedades evolucionables debe ser tan directa como sea posible para evitar seleccionar individuos no deseados (“*you only get what you screen for*”) (Schmidt-Dannert y Arnold 1999).

5.3.5. Actividad de las variantes seleccionadas

Una ventaja del método de termoselección es la independencia del mismo con respecto a la actividad enzimática o biológica de la proteína a mejorar. Este hecho le confiere de un carácter universal que permite su aplicación sobre todo tipo de proteínas con y sin actividad enzimática, ya que no necesitamos unir dicha actividad a la supervivencia del anfitrión. Por un lado, esta independencia nos ha permitido en este trabajo la termoestabilización del dominio polimerasa de $\phi 29$ utilizando una variante inactiva (D428E) del mismo. En caso de no haberlo hecho, las mutaciones recuperadas habrían podido ser a la vez termoestabilizantes e inactivantes. De hecho, trabajar con variantes inactivas de una proteína aporta la evolución de manera neutral de la proteína. La deriva neutral no empeora necesariamente una propiedad, sino que nos permite la exploración de nuevos caminos a través del espacio de secuencia (Amitai *et al.* 2007; Tokuriki y Tawfik 2009a).

Sin embargo, dicha ventaja puede ser vista desde una perspectiva opuesta, como queda ejemplificado al comprobar el empeoramiento de la actividad enzimática en las variantes exo y PFEI seleccionadas. En el primer caso, al introducir en la ADN polimerasa completa los reemplazos seleccionados con mayor frecuencia, y que por lo tanto deberían conferir mayor termoestabilidad, los resultados de amplificación isotérmica a 30 °C

mostraron que todas las mutaciones ensayadas mostraban diferente grado de actividad polimerizante. Mientras que los mutantes Y y Q presentaron un nivel de actividad parecido a la ADN polimerasa silvestre, tres de los mutantes ensayados T, P y M mostraron un nivel de actividad inferior a la ADN polimerasa ϕ 29 silvestre (Figura 4.19). Del mismo modo, en el caso de PFEI, las mutaciones introducidas se traducen en un descenso de k_{cat} como tónica general, aunque en algunos casos sea menos pronunciado que en otros (Tabla 4.18). Uno de los mecanismos más habituales para la termoestabilización es el aumento de afinidad entre la enzima y su sustrato, que contribuye a la estabilidad, pero tiene lugar en detrimento de k_{cat} (D'Amico *et al.* 2006; Feller 2010). Sería plausible entonces que en el caso del dominio exo, al haber incrementado la afinidad DNA, la enzima completa perdiera actividad al no poder desplazarse sobre la hebra molde.

5.3.6. Consideraciones generales sobre el método de termoestabilización *in vivo*

La termoestabilidad es un fenómeno complejo y no puede ser atribuida a un determinante común para todas las proteínas, sino que se debe a la suma de diversos factores tales como un mayor número de interacciones que incluyen enlaces de hidrogeno (Vogt *et al.* 1997), puentes salinos (Karshikoff y Ladenstein 2001), interacciones hidrofobicas (Goodenough y Jenkins 1991), puentes disulfuro (Matsumura *et al.* 1989) y coordinación con metales (Kataeva *et al.* 2003; Vieille 2001), además de modificaciones conformacionales que afectan global o localmente a la estructura de una proteína, tales como el aumento de la rigidez (Li *et al.* 2005), un empaquetamiento más eficiente con menor número de cavidades (Russell *et al.* 1997), el acortamiento de los bucles (Pal y Chakrabarti 1999) (Vieille 2001), un incremento de estructuras secundarias como helices- α (Facchiano *et al.* 1998) y la tendencia a la oligomerización (Lassalle y Hinz 1999; Lassalle *et al.* 1998; Vonnrhein *et al.* 1998). La termoestabilización de proteínas es por lo tanto un fenómeno difícil de predecir a pesar de los avances actuales en biología molecular y bioinformática. En este trabajo se han utilizado diferentes métodos bioinformáticos sencillos para explicar la selección de ciertos reemplazos. Algunos de las sustituciones seleccionadas concuerdan con aminoácidos de alto factor B, es decir, aminoácidos móviles que disminuyen la difracción de rayos X a través de un cristal. Un concepto análogo, pero restringido al ámbito de las simulaciones mediante dinámica molecular es el RMSF, es decir, la fluctuación de un aminoácido en torno a su posición promedio a lo largo de la simulación.

Los resultados de la secuenciación de los derivados seleccionados del dominio exo, pol y PFEI (Tablas 4.4, 4.8 y 4.12) muestran que muchas de las mutaciones encontradas coinciden con las predicciones informáticas obtenidas a través del programa B-fitter (Tablas 4.5, 4.9 y 4.19) y el RSMF

calculado en ensayos de dinámica molecular realizados con el programa Yasara (Figuras 4.10, 4.26 y 4.45). Sin embargo, al evaluar las mutaciones presentes en los derivados de PFEI más estables que se seleccionaron PFEI-34.1, PFEI-34.2 y pFEI-46 los residuos mutados no presentan valores altos de factor-B ni están ubicados en zonas que presentan un nivel alto de flexibilidad o movilidad según la dinámica molecular. Tomando en cuenta que la termoestabilización de proteínas es un fenómeno que aun no está dilucidado en su totalidad, es más recomendable que las estrategias de termoestabilización no se limiten a los residuos con alto valor B o que presentan mayor nivel de fluctuación en los ensayos de dinámica molecular, siempre y cuando se disponga de un ensayo o selección con capacidad suficiente para manejar genotecas de gran tamaño.

El análisis estructural de las mutaciones presentes en la variante PFEI 34 frente a PFEI silvestre, muestran que la mutación PFEI-34.1 que por sí sola aumenta la vida media en el ensayo de inactivación térmica a 65°C de 33 a 61 minutos, mantiene las mismas interacciones que en PFEI silvestre, pero a diferencia de éste, en el modelo de superficie de la proteína se muestra que genera una zona hidrofóbica superficial que favorecería la interacción entre las variantes PFEI-34, explicando en parte el efecto termoestabilizante de esta mutación, ya que está descrito el efecto termoestabilizante de oligomerización (Lassalle y Hinz 1999; Lassalle *et al.* 1998; Vonrhein *et al.* 1998) y de las interacciones de naturaleza hidrofóbica, que suponen un 60% de contribución a la termoestabilidad (Pace *et al.* 2011). Esta interpretación se ve reforzada indirectamente por el hecho de que la introducción de la mutación PFEI-34.1, aumentó la inmovilización de variantes de PFEI en el soporte hidrofóbico octil-agarosa de 44% mostrado por el silvestre a 92% mostrado por las variantes de PFEI que contienen dicha mutación (A. Hidalgo, comunicación personal).

En el caso de la mutación más termoestabilizante, PFEI-34.2 se genera un nuevo puente de hidrógeno. Esto explica el efecto termoestabilizante de dicha mutación ya que el aumento del número de puentes de hidrógeno está implicado en la mayor estabilidad de las enzimas termoestables (Vogt *et al.* 1997). Sin embargo, en las simulaciones no se aprecia una rigidificación en el entorno de los residuos implicados aunque sería necesario un estudio más exhaustivo de dinámica molecular a mayor temperatura tanto de la enzima silvestre como de las variantes PFEI-34, 34.1 y 34.2. Aun pendiente de posterior análisis, no sería sorprendente encontrar que los reemplazos introducidos no aumentan la rigidez de la estructura. De hecho, aunque la rigidez origine termoestabilidad, las proteínas termoestables no tienen por qué ser más rígidas que sus homólogos de mesófilos sino que se considera que ambas son igual de flexibles (“teoría de los estados correspondientes”) cada una a su T_{opt} (Somero 1995). De hecho, la rigidez no aporta ventajas desde un punto de vista estrictamente termodinámico, ya que penalizaría el componente entrópico de la transición de retorno desde el estado desplegado

de la proteína al estado plegado (Lazaridis *et al.* 1997). Estas transiciones hacia un estado semi-desplegado y vuelta a su conformación estable están permitidas por la mayor flexibilidad de ciertas zonas y serían congruentes con los denominados movimientos de “respiración”, es decir de expansión de la proteína termoestable lejos de sus posiciones de equilibrio, pero la vuelta inmediatamente después al estado de equilibrio (Wintrode *et al.* 2003a). Algunos ejemplos de proteínas termoestables con flexibilidad conformacional evidenciada mediante simulaciones son el citocromo P450 de *Sulfoblobus acidocaldarius* (Meharena y Poulos 2010), la adenilato kinasa de *Thermotoga neapolitana* (Krishnamurthy *et al.* 2009) y la lipasa L1 de *Bacillus stearothermophilus* (Abedi Karjiban *et al.* 2009).

En conclusión, el método de termoselección independiente de actividad, es capaz de seleccionar variantes que son termoestables gracias a diferentes mecanismos, los cuales no siempre son predecibles mediante el uso de herramientas bioinformáticas. Adicionalmente, al ser un método independiente de la actividad de la proteína a termoestabilizar, permite la mejora de cualquier tipo de proteína, incluso aquellas que presenta una actividad tóxica para el anfitrión, siempre y cuando se trabaje con una variante inactiva, lo cual no es posible en una selección clásica. De hecho, trabajar con variantes inactivas podría tener ventajas desde el punto de vista de recuperar variantes en las que el intercambio entre actividad y estabilidad sea menor. Sin embargo, el método presenta suficiente capacidad como para filtrar genotecas grandes que permitan a través del ajuste fino del rango dinámico de la selección, como se ha hecho en este trabajo, recuperar suficientes individuos con características suficientemente diversas de modo que uno de ellos cumpla los criterios de actividad y estabilidad requeridos.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones generales

1 La eliminación de la proteasa tipo Lon de código TTC0746 de *T. thermophilus* provoca alta sensibilidad a la expresión de proteínas no termoestables, lo que sugiere su implicación en la eliminación de agregados proteicos, e impide la utilización de mutantes como sistema de termoselección por interferencia de plegamiento.

2 El sistema de selección por interferencia de plegamiento de la kanamicin nucleotidil transferasa puede ser aplicado a proteínas codificadas por genes con un amplio rango de contenido en G + C y grandes diferencias en utilización de codones, y con grandes diferencias en estructura y función.

3 La interferencia de plegamiento a alta temperatura favorece la selección de variantes con mutaciones en el dominio C-terminal, próximo a la región del péptido flexible de unión a Kat, lo que sugiere la existencia de un efecto de distancia durante la interferencia.

4 No todas las mutaciones que pasan la selección por interferencia de plegamiento dan lugar a proteínas más estables que la forma silvestre, siendo frecuente la presencia de proteínas aparentemente menos estables que el parental.

5 Ha sido posible seleccionar variantes de tres proteínas muy distintas que son capaces de expresarse y plegarse a alta temperatura. Sin embargo, los niveles de resistencia que confieren en el hospedador termófilo no parecen ser directamente proporcionales al nivel de termoestabilización adquirido.

6 Muchas de las mutaciones seleccionadas mediante el método de interferencia de plegamiento afectan a zonas de las proteínas de alta flexibilidad, revelada por el cálculo del factor B y mediante dinámica molecular, lo que sugiere que el sistema tiende a seleccionar variantes más rígidas.

7 Ha sido seleccionada un derivado de PFEI (PFEI-34) mucho más estable frente a temperatura y solventes orgánicos que la variante de mayor termoestabilidad descrita hasta la fecha. Las mutaciones termoestabilizadoras encontradas no son predecibles mediante métodos bioinformáticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedi Karjiban, R., *et al.* (2009). "Molecular dynamics study of the structure, flexibility and dynamics of thermostable I1 lipase at high temperatures." The Protein Journal **28**(1): 14-23.
- Acosta, F., *et al.* (2012). "Homogeneous incorporation of secondary cell wall polysaccharides to the cell wall of *Thermus thermophilus* hb27." Extremophiles **16**(3): 485-495.
- Adamczak, M. y S. H. Krishna (2004). "Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis." Food Technology and Biotechnology **42**(4): 251-264.
- Adams, M. W. (1993). "Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 degrees c." Annual Review of Microbiology **47**: 627-658.
- Aharoni, A., *et al.* (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.
- Amerik, A., *et al.* (1991). "Site-directed mutagenesis of la protease. A catalytically active serine residue." FEBS Lett. **287**(1-2): 211-214.
- Amitai, G., *et al.* (2007). "Latent evolutionary potentials under the neutral mutational drift of an enzyme." HFSP Journal **1**(1): 67-78.
- Arnold, F. H. y G. Georgiou, Eds. (2003). Directed evolution library creation. Methods in molecular biology. Totowa, NJ, Humana Press, Inc.
- Arroyo, M. A., *et al.* (2003). "Biotechnological applications of penicillin acylases: State-of-the-art." Applied Microbiology and Biotechnology **60**(5): 507-514.
- Averhoff, B. y A. Friedrich (2003). "Type iv pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria." Arch. Microbiol. **180**(6): 385-393.
- Balkwill, D. L., *et al.* (2004). "Identification of iron-reducing thermus strains as thermus scotoductus." Extremophiles **8**(1): 37-44.
- Becker, P., *et al.* (1997). "Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile bacillus sp. Ihi-91 on olive oil." Applied Microbiology and Biotechnology **48**(2): 184-190.
- Benkovic, S. J. y S. Hammes-Schiffer (2003). "A perspective on enzyme catalysis." Science **301**(5637): 1196-1202.

Bernad, A., *et al.* (1989). "A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases." Cell **59**(1): 219-228.

Bernad, A., *et al.* (1990). "Site-directed mutagenesis of the ycdtds amino acid motif of the phi29 DNA polymerase." Gene **94**(1): 45-51.

Biles, B. D. y B. A. Connolly (2004). "Low-fidelity pyrococcus furiosus DNA polymerase mutants useful in error-prone pcr." Nucleic Acids Res. **32**(22): e176.

Blanco, L. y M. Salas (1985). "Characterization of a 3'---5' exonuclease activity in the phage phi29-encoded DNA polymerase." Nucleic Acids Res. **13**(4): 1239-1249.

Blanco, L. y M. Salas (1996). "Relating structure to function in 29 DNA polymerase." J. Biol. Chem. **271**(15): 8509-8512.

Blasco, M., *et al.* (1992). "Structural and functional studies on ø29 DNA polymerase." Chromosoma **102**(0): S32-S38.

Blasco, M., *et al.* (1993a). "Phi 29 DNA polymerase active site. The conserved amino acid motif "kx3nsxyg" is involved in template-primer binding and dntp selection." J. Biol. Chem. **268**(22): 16763-16770.

Blasco, M. A., *et al.* (1991). "Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage phi 29 DNA polymerase. Involvement of amino acid motifs highly conserved in alpha-like DNA polymerases." J. Biol. Chem. **266**(12): 7904-7909.

Blasco, M. A., *et al.* (1993b). "Phi 29 DNA polymerase active site. Residue asp249 of conserved amino acid motif "dx2slyp" is critical for synthetic activities." J. Biol. Chem. **268**(32): 24106-24113.

Bloch, E., *et al.* (1997). "Pyrolobus fumarii, gen. And sp. Nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees c." Extremophiles **1**(1): 14-21.

Bloom, J. D. y F. H. Arnold (2009). "In the light of directed evolution: Pathways of adaptive protein evolution." PNAS **106** **Suppl 1**: 9995-10000.

Blum, J. K., *et al.* (2012). "Improved thermostability of aeh by combining b-fit analysis and structure-guided consensus method." J. Biotechnol. **160**(3-4): 214-221.

Borges, N., *et al.* (2002). "Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes." Extremophiles **6**(3): 209-216.

- Bornscheuer, U., *et al.* (1994). "Lipase of *pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: Purification, crystallization and characterization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1201**(1): 55-60.
- Bornscheuer, U. T. (2002). "Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis." FEMS Microbiol. Rev. **26**: 73-81.
- Bornscheuer, U. T., *et al.* (1998). "Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of epothilones." Biotechnol. Bioeng. **58**(5): 554-559.
- Bornscheuer, U. T., *et al.* (2012). "Engineering the third wave of biocatalysis." Nature **485**(7397): 185-194.
- Brady, L., *et al.* (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." Nature **343**(6260): 767-770.
- Brock, T. D. y H. Freeze (1969). "Thermus aquaticus gen. N. And sp. N., a nonsporulating extreme thermophile." Journal of Bacteriology **98**(1): 289-297.
- Brouns, S. J., *et al.* (2005). "Engineering a selectable marker for hyperthermophiles." J. Biol. Chem. **280**(12): 11422-11431.
- Bruins, M. E., *et al.* (2001). "Thermozymes and their applications." Applied Biochemistry and Biotechnology **90**: 155-186.
- Cabantous, S. p., *et al.* (2008). "New molecular reporters for rapid protein folding assays." PloS one **3**(6): e2387.
- Cadwell, R. C. y G. F. Joyce (1992). "Randomization of genes by pcr mutagenesis." PCR Methods and Applications **2**: 28-33.
- Cadwell, R. C. y G. F. Joyce (1995). Mutagenic pcr. Pcr primer. A laboratory manual. C. W. Dieffenbach and G. Dveksler. Plainville, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 133-142.
- Calero-Rueda, O., *et al.* (2002). "Production, isolation and characterization of a sterol esterase from ophiostoma piceae." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1599**(1,Ä2): 28-35.
- Cannio, R., *et al.* (2001). "Thermoadaptation of a mesophilic hygromycin b phosphotransferase by directed evolution in hyperthermophilic archaea: Selection of a stable genetic marker for DNA transfer into<small>> sulfolobus solfataricus</small>." Extremophiles **5**(3): 153-159.

Carninci, P., *et al.* (1998). "Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**(2): 520-524.

Cava, F., *et al.* (2009). "Thermus thermophilus as biological model." Extremophiles **13**(2): 213-231.

Cava, F., *et al.* (2007). "Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element nce." Mol. Microbiol. **64**(3): 630-646.

Cava, F., *et al.* (2008a). "Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures *in vivo*: A tool to study extreme thermophile biology." Environ. Microbiol. **10**(3): 605-613.

Cava, F., *et al.* (2008b). "The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus." Environ. Microbiol. **10**(2): 522-533.

Cesar, C. E., *et al.* (2011). "Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria." Int Microbiol **14**(4): 187-199.

Chahiniana, H. y L. Sarda (2009). "Distinction between esterases and lipases: Comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases." Protein Pept. Lett. **16**(10): 1149-1161.

Chautard, H., *et al.* (2007). "An activity-independent selection system of thermostable protein variants." Nat. Methods **4**(11): 919-921.

Cheeseman, J. D., *et al.* (2004). "Structure of an aryl esterase from *Pseudomonas fluorescens*." Acta Crystallographica Section D **60**(7): 1237-1243.

Choi, K. D., *et al.* (1990). "Cloning and nucleotide sequence of an esterase gene from *Pseudomonas fluorescens* and expression of the gene in *Escherichia coli*." Agricultural and Biological Chemistry **54**(8): 2039-2045.

Cipolla, A., *et al.* (2012). "Temperature adaptations in psychrophilic, mesophilic and thermophilic chloride-dependent alpha-amylases." Biochimie **94**(9): 1943-1950.

Co, S.-A. Stabilized compositions of thermostable DNA polymerase and anionic or ...

Coolbear, T., *et al.* (1992). "The enzymes from extreme thermophiles: Bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance." Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **45**: 58-98.

- Cramer, A., *et al.* (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution." Nature **391**(15): 288-291.
- Cramer, A., *et al.* (1996). "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling." Nat. Biotechnol. **14**(3): 315-319.
- D'Amico, S., *et al.* (2006). "Kinetics and energetics of ligand binding determined by microcalorimetry: Insights into active site mobility in a psychrophilic alpha-amylase." J. Mol. Biol. **358**(5): 1296-1304.
- Dabrowski, S., *et al.* (2002). "Novel thermostable ssdna-bindin proteins from thermus thermophilus and thermus aquaticus -expression and purification." Protein Expression Purif. **26**: 131-138.
- Daniel, R. M. y D. A. Cowan (2000). "Biomolecular stability and life at high temperatures." Cellular and Molecular Life Sciences **57**(2): 250-264.
- de Grado, M., *et al.* (1999). "A high-transformation efficiency cloning vector for *thermus*." Plasmid **42**: 241-245.
- De Rosa, M., *et al.* (1986). "Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids." Microbiol Rev **50**(1): 70-80.
- de Vega, M., *et al.* (2000). "Phage phi29 DNA polymerase residues involved in the proper stabilisation of the primer-terminus at the 3'-->5' exonuclease active site." J. Mol. Biol. **304**(1): 1-9.
- de Vega, M., *et al.* (1998). "Mutational analysis of phi 29 DNA polymerase residues acting as ssdna ligands for 3'---5' exonucleolysis." J. Mol. Biol. **279**(4): 807-822.
- Delarue, M., *et al.* (1990). "An attempt to unify the structure of polymerases." Protein Eng. **3**(6): 461-467.
- Di Lorenzo, M., *et al.* (2007). "Enhancement of the stability of a prolipase from *rhizopus oryzae* toward aldehydes by saturation mutagenesis." Appl. Environ. Microbiol. **73**(22): 7291-7299.
- Dodson, G. y A. Wlodawer (1998). "Catalytic triads and their relatives." Trends Biochem. Sci. **23**(9): 347-352.
- Dominguez, A., *et al.* (2007). "Stimulation of novel thermostable extracellular lipolytic enzyme in cultures of thermus sp." Enzyme Microb. Technol. **40**(2): 187-194.
- Domínguez, A., *et al.* "Quantification of intra- and extra-cellular thermophilic lipase/esterase production by thermus sp." Biotechnol. Lett. **26**(9): 705-708.

Edmonds, C. G., *et al.* (1991). "Posttranscriptional modification of trna in thermophilic archaea (archaeobacteria)." Journal of Bacteriology **173**(10): 3138-3148.

Efremov, R. G., *et al.* (2010). "The architecture of respiratory complex i." Nature **465**(7297): 441-445.

Elander, R. P. (2003). "Industrial production of beta-lactam antibiotics." Applied Microbiology and Biotechnology **61**(5-6): 385-392.

Esteban, J. A., *et al.* (1994). "3'-->5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism." Journal of Biological Chemistry **269**(50): 31946-31954.

Facchiano, A. M., *et al.* (1998). "Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: An x-ray based study." Protein Engineering **11**(9): 753-760.

Faria, T. Q., *et al.* (2008). "Design of new enzyme stabilizers inspired by glycosides of hyperthermophilic microorganisms." Carbohydrate Research **343**(18): 3025-3033.

Feller, G. (2010). "Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures." Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal **22**(32): 323101.

Fernández-Herrero, L. A., *et al.* (1995). "*Glms* of *thermus thermophilus* hb8: An essential gene for cell wall synthesis identified immediately upstream the s-layer gene." Mol. Microbiol. **17**(1-12).

Fernández-Lorente, G., *et al.* (2001). "Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **11**: 649-656.

Feyfant, E., *et al.* (2007). "Modeling mutations in protein structures." Protein Sci. **16**(9): 2030-2041.

Fischer, M. y J. r. Pleiss (2003). "The lipase engineering database: A navigation and analysis tool for protein families." Nucleic Acids Res. **31**(1): 319-321.

Fridjonsson, O., *et al.* (2002). "Thermoadaptation of alpha-galactosidase agab1 in *thermus thermophilus*." J. Bacteriol. **184**(12): 3385-3391.

Friedman, S. M. y T. Oshima (1989). "Polyamines of sulfur-dependent archaeobacteria and their role in protein synthesis." J Biochem **105**(6): 1030-1033.

Friedrich, A., *et al.* (2002). "Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium 120

thermus thermophilus strain hb27." Applied and Environmental Microbiology **68**(2): 745-755.

Fucinos, P., *et al.* (2011). "Production and characterization of two n-terminal truncated esterases from thermus thermophilus hb27 in a mesophilic yeast: Effect of n-terminus in thermal activity and stability." Protein Expression Purif. **78**(2): 120-130.

Fucinos, P., *et al.* (2005). "Production of thermostable lipolytic activity by thermus species." Biotechnol. Prog. **21**(4): 1198-1205.

Fuciños, P., *et al.* "Identification of extracellular lipases/esterases produced by thermus thermophilus hb27: Partial purification and preliminary biochemical characterisation." J. Biotechnol. **117**(3): 233-241.

Fuciños, P., *et al.* (2011). "An esterase from thermus thermophilus hb27 with hyperthermoalkalophilic properties: Purification, characterisation and structural modelling." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **70**(3,Äì4): 127-137.

Gargallo, R., *et al.* (2006). "Study of the influence of temperature on the dynamics of the catalytic cleft in 1,3-1,4- β -glucanase by molecular dynamics simulations." Journal of Molecular Modeling **12**(6): 835-845.

Gasson, M. J., *et al.* (1998). "Metabolism of ferulic acid to vanillin." J. Biol. Chem. **273**(7): 4163-4170.

Gaucher, E. A., *et al.* (2010). "Deep phylogeny--how a tree can help characterize early life on earth." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(1): a002238.

Gihring, T. M. y J. F. Banfield (2001). "Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new thermus isolate." FEMS Microbiology Letters **204**(2): 335-340.

Giuliani, S., *et al.* (2001). "Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from aspergillus niger using water-in-oil microemulsions." Biotechnol. Lett. **23**(4): 325-330.

Gliozzi, A., *et al.* (1983). "Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **735**(2): 234-242.

Goldberg, A. L., *et al.* (1994). [25] atp-dependent protease Ia (lon) from escherichia coli. Methods in enzymology. J. B. Alan, Academic Press. **Volume 244**: 350-375.

Gonzalez, M. n., *et al.* (1998). "Lon-mediated proteolysis of the escherichia coli umud mutagenesis protein: In vitro degradation and identification of residues required for proteolysis." Genes Dev. **12**(24): 3889-3899.

- Goodenough, P. W. y J. A. Jenkins (1991). "Protein engineering to change thermal stability for food enzymes." Biochemical Society Transactions **19**(3): 655-662.
- Gounder, K., *et al.* (2011). "Sequence of the hyperplastic genome of the naturally competent thermus scotoductus sa-01." BMC Genomics **12**(1): 577.
- Grogan, D. W. (1998). "Hyperthermophiles and the problem of DNA instability." Molecular Microbiology **28**(6): 1043-1049.
- Gromiha, M. M. y S. Selvaraj (2004). "Inter-residue interactions in protein folding and stability." Progress in Biophysics & Molecular Biology **86**(2): 235-277.
- Grottesi, A., *et al.* (2002). Molecular dynamics study of a hyperthermophilic and a mesophilic rubredoxin, John Wiley & Sons, Inc. **46**: 287-294.
- Gupta, R. S. (2000). "The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes." FEMS Microbiology Reviews **24**(4): 367-402.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on the transformation of *e. Coli* with plasmids." J. Mol. Biol. **166**: 557-580.
- Hari Krishna, S. y N. G. Karanth (2002). "Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media." Catalysis Reviews **44**(4): 499-591.
- Hawkins, P. C. D., *et al.* (2008). "How to do an evaluation: Pitfalls and traps." J. Comput.-Aided Mol. Des. **22**(3-4): 179-190.
- Heikinheimo, P., *et al.* (1999). "Of barn owls and bankers: A lush variety of α/β hydrolases." Structure **7**: R141-R146.
- Henne, A., *et al.* (2004). "The genome sequence of the extreme thermophile thermus thermophilus." Nat Biotech **22**(5): 547-553.
- Hensel, R. y H. König (1988). "Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular ion concentration." FEMS Microbiology Letters **49**(1): 75-79.
- Herman, A. y D. S. Tawfik (2007). "Incorporating synthetic oligonucleotides via gene reassembly (isor): A versatile tool for generating targeted libraries." Protein Eng., Des. Sel. **20**(5): 219-226.
- Hidalgo, A., *et al.* (2008). "A one-pot, simple methodology for cassette randomization and recombination for focused directed evolution (oscarr)." Protein Eng., Des. Sel. **21**(9): 567-576.

- Hong, K. H., *et al.* (1991). "Characterization of *pseudomonas fluorescens* carboxylesterase: Cloning and expression of the esterase gene in *escherichia coli*." Agricultural and Biological Chemistry **55**(11): 2839-2845.
- Horne, I., *et al.* (2002). "Isolation of a *pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase." FEMS Microbiol. Lett. **206**(1): 51-55.
- Horsman, G. P., *et al.* (2003). "Mutations in distant residues moderately increase the enantioselectivity of *pseudomonas fluorescens* esterase towards methyl 3-bromo-2-methyl propanoate and ethyl 3-phenylbutyrate." Chem. Eur. J. **9**: 1933-1939.
- Huang, S.-L., *et al.* (2004). "Pgtdb: A database providing growth temperatures of prokaryotes." Bioinformatics **20**(2): 276-278.
- Huber, R., *et al.* (2000). "Towards the ecology of hyperthermophiles: Biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties." FEMS Microbiology Reviews **24**(5): 615-623.
- Hudson, J. A., *et al.* (1989). "Numerical classification of thermus isolates from globally distributed hot springs." Systematic and Applied Microbiology **11**(3): 250-256.
- Jaeger, K.-E. y M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." Trends Biotechnol. **16**: 396-403.
- Jaeger, K. E., *et al.* (1999). "Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases." Annu. Rev. Microbiol. **53**(1): 315-351.
- Jenney, F. E., Jr. y M. W. Adams (2008). "Hydrogenases of the model hyperthermophiles." Ann. N. Y. Acad. Sci. **1125**: 252-266.
- Jochens, H., *et al.* (2010). "Thermostabilization of an esterase by alignment-guided focussed directed evolution." Protein Engineering Design and Selection **23**(12): 903-909.
- Jochens, H., *et al.* (2009). "Converting an esterase into an epoxide hydrolase." Angew. Chem., Int. Ed. **48**(19): 3532-3535.
- Kamtekar, S., *et al.* (2004). "Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29." Mol. Cell **16**(4): 609-618.
- Karshikoff, A. y R. Ladenstein (2001). "Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: A "traffic rule" for hot roads." Trends in Biochemical Sciences **26**(9): 550-556.

Kashefi, K. y D. R. Lovley (2003). "Extending the upper temperature limit for life." Science **301**(5635): 934.

Kataeva, I. A., *et al.* (2003). "Calcium and domain interactions contribute to the thermostability of domains of the multimodular cellobiohydrolase, cbha, a subunit of the clostridium thermocellum cellulosome." Biochemical Journal **372**(Pt 1): 151-161.

Kates, M. (1993). Membrane lipids of archaea. In: The biochemistry of archaea. Amsterdam, Elsevier.

Kayser, K. J. y J. J. Kilbane, 2nd (2001). "New host-vector system for thermus spp. Based on the malate dehydrogenase gene." Journal of Bacteriology **183**(5): 1792-1795.

Kieft, T. L., *et al.* (1999). "Dissimilatory reduction of fe(iii) and other electron acceptors by a thermus isolate." Applied and Environmental Microbiology **65**(3): 1214-1221.

Kikuchi, A. y K. Asai (1984). "Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA." Nature **309**(5970): 677-681.

Kim, G.-J., *et al.* (2002a). "Screening, production and properties of a stereospecific esterase from pseudomonas sp. S34 with high selectivity to (s)-ketoprofen ethyl ester." J. Mol. Catal. B: Enzym. **17**(1): 29-38.

Kim, M.-S. y X. Lei (2008). "Enhancing thermostability of *escherichia coli* phytase appa2 by error-prone pcr." Appl. Microbiol. Biotechnol. **79**(1): 69-75.

Kim, Y.-H., *et al.* (2002b). "Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant pseudomonas sp." FEMS Microbiol. Lett. **210**(2): 239-244.

Kim, Y. S., *et al.* (1994). "Cloning of *pseudomonas fluorescens* carboxylesterase gene and characterization of its product expressed in *escherichia coli*." Biosci., Biotechnol., Biochem. **58**(1): 111-116.

Kirk, O., *et al.* (2002). "Industrial enzyme applications." Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 345-351.

Koyama, Y., *et al.* (1990). "A plasmid vector for an extreme thermophile, *thermus thermophilus*." FEMS Microbiol. Lett. **72**: 97-102.

Koyama, Y., *et al.* (1986). "Genetic transformation of the extreme thermophile thermus thermophilus and of other thermus spp." J. Bacteriol. **166**(1): 338-340.

- Krebsfänger, N., *et al.* (1998). "Enantioselectivity of a recombinant esterase from *pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids." *J. Biotechnol.* **60**: 105-111.
- Krieger, E., *et al.* (2002). "Increasing the precision of comparative models with yasara nova—a self-parameterizing force field." **47**: 393-402.
- Krishnamurthy, H., *et al.* (2009). "Dynamics in thermotoga neapolitana adenylate kinase: 15n relaxation and hydrogen−deuterium exchange studies of a hyperthermophilic enzyme highly active at 30 °c†." *Biochemistry* **48**(12): 2723-2739.
- Kuipers, R. K., *et al.* (2010). "3dm: Systematic analysis of heterogeneous superfamily data to discover protein functionalities." *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **78**(9): 2101-2113.
- Kuroda, A., *et al.* (2001). "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the lon protease in e. Coli." *Science* **293**(5530): 705-708.
- Kwasigroch, J. M., *et al.* (2002). "Popmusic, rationally designing point mutations in protein structures." *Bioinformatics* **18**(12): 1701-1702.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage t4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lamosa, P., *et al.* (2006). "Occurrence of 1-glyceryl-1-myo-inositol phosphate in hyperthermophiles." *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9): 6169-6173.
- Langworthy, T. A. y J. L. Pong (1986). *Thermophiles: General molecular and applied microbiology*. New York, Wiley-Interscience.
- Laptenko, O., *et al.* (2006). "Ph-dependent conformational switch activates the inhibitor of transcription elongation." *EMBO Journal* **25**(10): 2131-2141.
- Lasa, I., *et al.* (1992a). "Insertional mutagenesis in the extreme thermophilic eubacteria *thermus thermophilus* hb8." *Mol. Microbiol.* **6**: 1555-1564.
- Lasa, I., *et al.* (1992b). "Development of *thermus-escherichia* shuttle vectors and their use for the expression in *thermus thermophilus* of the *cela* gene from *clostridium thermocellum*." *J. Bacteriol.* **20**: 6424-6431.
- Lassalle, M. W. y H. J. Hinz (1999). "Refolding studies on the tetrameric loop deletion mutant rm6 of rop protein." *Biological Chemistry* **380**(4): 459-472.

Lassalle, M. W., *et al.* (1998). "Dimer-to-tetramer transformation: Loop excision dramatically alters structure and stability of the rop four alpha-helix bundle protein." Journal of Molecular Biology **279**(4): 987-1000.

Lazaridis, T., *et al.* (1997). "Dynamics and unfolding pathways of a hyperthermophilic and a mesophilic rubredoxin." Protein Sci. **6**(12): 2589-2605.

Lee, A. Y.-L., *et al.* (2004). "Functional domains of *brevibacillus thermoruber* lon protease for oligomerization and DNA binding." J. Biol. Chem. **279**(33): 34903-34912.

Lee, I. y C. K. Suzuki (2008). "Functional mechanics of the atp-dependent lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1784**(5): 727-735.

Lehmann, M. (2001). "Engineering proteins for thermostability: The use of sequence alignments versus rational design and directed evolution." Curr. Opin. Biotechnol. **12**: 371-375.

Lennox, E. X. (1955). "Transduction of linked genetic chateacters of the host by bacteriophage p1." Virology **1**: 190-206.

Levisson, M., *et al.* (2009). "Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles." Extremophiles **13**(4): 567-581.

Li, A. y V. Daggett (1998). "Molecular dynamics simulation of the unfolding of barnase: Characterization of the major intermediate." J. Mol. Biol. **275**(4): 677-694.

Li, W. F., *et al.* (2005). "Structural features of thermozyμες." Biotechnol. Adv. **23**(4): 271-281.

Liao, H., *et al.* (1986). "Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(3): 576-580.

Liu, A. M. F., *et al.* (2001). "Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: Lipases from *bacillus thermocatenuatus* and *phiostoma piliferum*, esterases from *pseudomonas fluorescens* and *streptomyces diastatochromogenes*." Tetrahedron: Asymmetry **12**: 545-556.

López-López, O., *et al.* (2010). "Heterologous expression of an esterase from *thermus thermophilus* hb27 in *saccharomyces cerevisiae*." J. Biotechnol. **145**(3): 226-232.

Lutz, S. y W. M. Patrick (2004). "Novel methods for directed evolution of enzymes: Quality, not quantity." Curr. Opin. Biotechnol. **15**: 291-297.

Maehara, T., *et al.* (2008). "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.

Martin, A., *et al.* (2001). "In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface." J. Mol. Biol. **309**(3): 717-726.

Masui, R. K., K.; Nakagawa, N.; Tokunaga, F.; Koyama, Y.; Shibata, T.; Oshima, T.; Yokoyama, S.; Yasunaga, T.; Kuramitsu, S.; (2004). "Complete genome sequence of *Thermus thermophilus* hb8

."

Mather, M. W. y J. A. Fee (1992). "Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* hb8: Expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyl-transferase gene." Appl. Environ. Microbiol. **58**: 421-425.

Matsumura, M. y S. Aiba (1985). "Screening for thermostable mutant of kanamycin nucleotidyltransferase by the use of a transformation system for a thermophile, *Bacillus stearothermophilus*." J. Biol. Chem. **260**(28): 15298-15303.

Matsumura, M., *et al.* (1989). "Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds." Nature **342**(6247): 291-293.

Maurizi, M. R. (1992). "Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*." Cell. Mol. Life Sci. **48**(2): 178-201.

Meharena, Y. T. y T. L. Poulos (2010). "Using molecular dynamics to probe the structural basis for enhanced stability in thermal stable cytochromes p450." Biochemistry **49**(31): 6680-6686.

Mesbah, N. M. y J. Wiegel (2008). "Life at extreme limits." Annals of the New York Academy of Sciences **1125**(1): 44-57.

Moller, C. y E. van Heerden (2006). "Isolation of a soluble and membrane-associated Fe(III) reductase from the thermophile, *Thermus scotoductus* (sa-01)." FEMS Microbiology Letters **265**(2): 237-243.

Moore, J. C. y F. H. Arnold (1996). "Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents." Nat. Biotechnol. **14**: 458-467.

Moreno, R., *et al.* (2004). "Use of an antisense rna strategy to investigate the functional significance of Mn-catalase in the extreme thermophile *Thermus thermophilus*." J. Bacteriol. **186**(22): 7804-7806.

Moreno, R., *et al.* (2003). "Development of a gene expression vector for *thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase." Plasmid **49**: 2-8.

Motono, C., *et al.* (2008). Thermodynamic and kinetic determinants of thermotoga maritima cold shock protein stability: A structural and dynamic analysis, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **71**: 655-669.

Nakamura, A., *et al.* (2005a). "In vivo directed evolution for thermostabilization of escherichia coli hygromycin b phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of thermus thermophilus." Journal of Bioscience and Bioengineering **100**(2): 158-163.

Nakamura, A., *et al.* (2005b). "In vivo directed evolution for thermostabilization of escherichia coli hygromycin b phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of thermus thermophilus." J. Biosci. Bioeng. **100**(2): 158-163.

Nardini, M. y B. W. Dijkstra (1999). "A/β hydrolase fold enzymes: The family keeps growing." Curr. Opin. Struct. Biol. **9**: 732-737.

Ness, J. E., *et al.* (2002). "Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently." Nature Biotechnol. **20**: 1251- 1255.

Neuwald, A. F., *et al.* (1999). "Aaa+: A class of chaperone-like atpases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res. **9**(1): 27-43.

Neylon, C. (2004). "Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: Library construction methods for directed evolution." Nucleic Acids Res. **32**(4): 1448-1459.

Niehaus, F., *et al.* (1999a). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." Applied Microbiology and Biotechnology **51**(6): 711-729.

Niehaus, F., *et al.* (1999b). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**: 711-729.

Ollis, D., *et al.* (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." Protein Eng. **5**(3): 197-211.

Oshima, M. y Y. Osawa (1983). "Outer and inner membrane preparations of extreme thermophile and their physico-chemical properties." J Biochem **93**(1): 225-234.

Pace, C. N., *et al.* (2011). "Contribution of hydrophobic interactions to protein stability." J. Mol. Biol. **408**(3): 514-528.

- Pal, D. y P. Chakrabarti (1999). "Estimates of the loss of main-chain conformational entropy of different residues on protein folding." Proteins **36**(3): 332-339.
- Pandey, A., *et al.* (1999). "The realm of microbial lipases in biotechnology." Biotechnol. Appl. Biochem. **29**: 119-131.
- Park, C. y S. Marqusee (2005). "Pulse proteolysis: A simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding." Nat Meth **2**(3): 207-212.
- Pedelacq, J.-D., *et al.* (2006). "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein." Nat. Biotechnol. **24**: 79-88.
- Pelletier, I. y J. Altenbuchner (1995). "A bacterial esterase is homologous with nonhaem haloperoxidases and displays brominating activity." Microbiology **141**(2): 459-468.
- Peñalva, M. A. y M. Salas (1982). "Initiation of phage phi 29 DNA replication in vitro: Formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-damp." Proceedings of the National Academy of Sciences **79**(18): 5522-5526.
- Pereira, S. L., *et al.* (1997). "Archaeal nucleosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(23): 12633-12637.
- Pikkemaat, M. I. G., *et al.* (2002). "Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability." Protein Eng. **15**(3): 185-192.
- Pleiss, J. r., *et al.* (2000). "Lipase engineering database: Understanding and exploiting sequence, structure, function relationships." J. Mol. Catal. B: Enzym. **10**(5): 491-508.
- Polizzi, K. M., *et al.* (2006). "Structure-guided consensus approach to create a more thermostable penicillin G acylase." Biotechnol. J. **1**(5): 531-536.
- Prescott, M., *et al.* (2006). "Recent advances in all-protein chromophore technology." Biotechnol Annu Rev **12**: 31-66.
- Quax, W. J. y C. P. Broekhuizen (1994). "Development of a new *bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs." Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**: 425-431.
- Ramirez-Arcos, S., *et al.* (1998a). "A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *thermus thermophilus* hb8." Biochimica et Biophysica Acta **1396**(2): 215-227.

Ramirez-Arcos, S., *et al.* (1988). "A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *thermus thermophilus* hb8." Biochim. Biophys. Acta **1396**: 215-227.

Ramirez-Arcos, S., *et al.* (1998b). "Anaerobic growth, a property horizontally transferred by an hfr-like mechanism among extreme thermophiles." J. Bacteriol. **180**: 3137-3143.

Reetz, M. T. y J. D. Carballeira (2007). "Iterative saturation mutagenesis (ism) for rapid directed evolution of functional enzymes." Nat. Protocols **2**(4): 891-903.

Reetz, M. T., *et al.* (2006). "Iterative saturation mutagenesis on the basis of b factors as a strategy for increasing protein thermostability." Angewandte Chemie International Edition **45**(46): 7745-7751.

Reetz, M. T., *et al.* (2009). "Knowledge-guided laboratory evolution of protein thermostability." Biotechnol. Bioeng. **102**(6): 1712-1717.

Reetz, M. T., *et al.* (2010). "Increasing the stability of an enzyme toward hostile organic solvents by directed evolution based on iterative saturation mutagenesis using the b-fit method." Chem Commun **46**(45): 8657-8658.

Reetz, M. T., *et al.* (1997). "Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution." Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **36**: 2830-2832.

Richman, S. A., *et al.* (2006). "Development of a novel strategy for engineering high-affinity proteins by yeast display." Protein Engineering Design and Selection **19**(6): 255-264.

Rogers, T. A. y A. S. Bommarius (2010). "Utilizing simple biochemical measurements to predict lifetime output of biocatalysts in continuous isothermal processes." Chem. Eng. Sci. **65**(6): 2118-2124.

Roudiak, S. G. y T. E. Shrader (1998). "Functional role of the n-terminal region of the lon protease from mycobacterium smegmatis." Biochemistry **37**(32): 11255-11263.

Rozzell, J. D. (1999). "Commercial scale biocatalysis: Myths and realities." Bioorganic & Medicinal Chemistry **7**(10): 2253-2261.

Rudyak, S. G., *et al.* (2001). "Mg²⁺-linked oligomerization modulates the catalytic activity of the lon (la) protease from mycobacterium smegmatis." Biochemistry **40**(31): 9317-9323.

- Russell, R. J. M., *et al.* (1997). "The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution†,‡." Biochemistry **36**(33): 9983-9994.
- Sadeghi, M., *et al.* (2006). "Effective factors in thermostability of thermophilic proteins." Biophys. Chem. **119**(3): 256-270.
- Sakaki, Y. y T. Oshima (1975). "Isolation and characterization of a bacteriophage infectious to an extreme thermophile, *thermus thermophilus* hb8." J. Virol. **15**(6): 1449-1453.
- Sambrook, J., *et al.* (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savile, C. K., *et al.* (2010). "Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture." Science **329**(5989): 305-309.
- Schließmann, A., *et al.* (2009). "Increased enantioselectivity by engineering bottleneck mutants in an esterase from *pseudomonas fluorescens*." ChemBioChem **10**(18): 2920-2923.
- Schmid, U., *et al.* (1999). "Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis." Biotechnol. Bioeng. **64**(6): 678-684.
- Schmidt-Dannert, C. y F. H. Arnold (1999). "Directed evolution of industrial enzymes." Trends Biotechnol. **17**: 135-136.
- Scholz, S., *et al.* (1992). "Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: A new inositol phosphate isolated from *pyrococcus woesei*." FEBS Letters **306**(2-3): 239-242.
- Schrag, J. D. y M. Cygler (1997). Lipases and alpha/beta hydrolase fold. Methods in enzymology. E. A. D. Byron Rubin, Academic Press. **Volume 284**: 85-107.
- Schwarzenlander, C. y B. Averhoff (2006). "Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *thermus thermophilus* hb27." FEBS Journal **273**(18): 4210-4218.
- Segura, R. d. L., *et al.* (2004). "Different properties of the lipases contained in porcine pancreatic lipase extracts as enantioselective biocatalysts." Biotechnol. Prog. **20**(3): 825-829.
- Sellek, G. A. y J. B. Chaudhuri (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles - negatively charged groups artificially introduced into alpha-chymotrypsin provide additional activation and stabilisation effects." Enzyme Microb. Technol. **25**: 471-482.

Selmer, M., *et al.* (2006). "Structure of the 70s ribosome complexed with mrna and trna." Science **313**(5795): 1935-1942.

Shoichet, B. K., *et al.* (1995). "A relationship between protein stability and protein function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States **92**: 452-456.

Sieber, V., *et al.* (1998). "Selecting proteins with improved stability by a phage-based method." Nat Biotech **16**(10): 955-960.

Soengas, M. S., *et al.* (1992). "Site-directed mutagenesis at the exo iii motif of phi 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities." EMBO J. **11**(11): 4227-4237.

Soheilifard, R., *et al.* (2008). "Critical evaluation of simple network models of protein dynamics and their comparison with crystallographic b-factors." Physical Biology **5**(2): 026008.

Somero, G. N. (1995). "Proteins and temperature." Annu. Rev. Physiol. **57**: 43-68.

Steitz, T., *et al.* (1994). "A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and rna polymerases." Science **266**(5193): 2022-2025.

Stemmer, W. P. C. (1994). "Rapid evolution of a protein by *in vitro* DNA shuffling." Nat. Biotechnol. **370**: 389-391.

Stumpp, T., *et al.* (2000). "Ein neues, l-rhamnose-induzierbares expressionssystem für *escherichia coli*." Biospektrum **1**: 33-36.

Takesawa, Y., *et al.* (1990). "Heat-induced precipitation of cell homogenates: An investigation of the recovery of thermostable proteins." Enzyme and Microbial Technology **12**(3): 184-189.

Tamakoshi, M., *et al.* (2001). "Selection of stabilized 3-isopropylmalate dehydrogenase of *saccharomyces cerevisiae* using the host-vector system of an extreme thermophile, *thermus thermophilus*." Extremophiles **5**: 17-22.

Tamakoshi, M., *et al.* (1997). "A new *thermus-escherichia coli* shuttle integration vector system." J. Bacteriol. **179**(15): 4811-4814.

Tamakoshi, M., *et al.* (1995). "Screening of stable proteins in an extreme thermophile, *thermus thermophilus*." Mol. Microbiol. **16**: 1031-1036.

- Tamakoshi, M., *et al.* (1999). "An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *thermus thermophilus*." FEMS Microbiology Letters **173**(2): 431-437.
- Terreni, M., *et al.* (2001). "Modulation of penicillin acylase properties via immobilization techniques: One-pot chemoenzymatic synthesis of cephamandole from cephalosporin c." Bioorg. Med. Chem. **11**: 2429-2432.
- Tian, J., *et al.* (2010). "Predicting changes in protein thermostability brought about by single- or multi-site mutations." BMC Bioinformatics **11**(1): 370.
- Tokuriki, N., *et al.* (2008). "How protein stability and new functions trade off." PLoS Comput Biol **4**(2): e1000002.
- Tokuriki, N. y D. S. Tawfik (2009a). "Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution." Nature **459**(7247): 668-673.
- Tokuriki, N. y D. S. Tawfik (2009b). "Stability effects of mutations and protein evolvability." Curr. Opin. Struct. Biol. **19**(5): 596-604.
- Torres, L. L., *et al.* (2012a). "Functional expression of a penicillin acylase from the extreme thermophile *thermus thermophilus* hb27 in *escherichia coli*." Microbial Cell Factories **11**(1): 105.
- Torres, L. L., *et al.* (2012b). "Promiscuous enantioselective (-)-[gamma]-lactamase activity in the *pseudomonas fluorescens* esterase i." Organic & Biomolecular Chemistry.
- Trevino, S. R., *et al.* (2007). "Increasing protein conformational stability by optimizing β -turn sequence." J. Mol. Biol. **373**(1): 211-218.
- Trivedi, S., *et al.* (2006). "Protein thermostability in archaea and eubacteria." Genetics and molecular research : GMR **5**(4): 816-827.
- Truniger, V., *et al.* (1998). "Phi29 DNA polymerase requires the n-terminal domain to bind terminal protein and DNA primer substrates." J. Mol. Biol. **278**(4): 741-755.
- Tsilibaris, V., *et al.* (2006). "Biological roles of the lon atp-dependent protease." Res. Microbiol. **157**(8): 701-713.
- Turner, N. J. (2009). "Directed evolution drives the next generation of biocatalysts." Nat Chem Biol **5**(8): 567-573.
- van de Vossenberg, J. L., *et al.* (1998). "The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids." Extremophiles **2**(3): 163-170.

Van Melderen, L. y A. Aertsen (2009). "Regulation and quality control by ion-dependent proteolysis." Res. Microbiol. **160**(9): 645-651.

Vázquez-Figueroa, E., *et al.* (2007). "Development of a thermostable glucose dehydrogenase by a structure-guided consensus concept." ChemBioChem **8**(18): 2295-2301.

Vazquez-Figueroa, E., *et al.* (2008). "Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media." Protein Engineering, Design and Selection **21**(11): 673-680.

Verger, R. (1997). "Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts." Trends Biotechnol. **15**(1): 32-38.

Verschueren, K. H. G., *et al.* (1993). "Refined x-ray structures of haloalkane dehalogenase at ph 6.2 and ph 8.2 and implications for the reaction mechanism." J. Mol. Biol. **232**(3): 856-872.

Vieille, C. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: Sources, use and molecular mechanisms for thermostability." Microbiology and molecular biology reviews **65**(1): 1-43.

Vieira, J. y J. Messing (1982). "The puc plasmids, an m13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers." Gene **19**(3): 259-268.

Vogt, G., *et al.* (1997). "Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs." Journal of Molecular Biology **269**(4): 631-643.

Vonrhein, C., *et al.* (1998). "The structure of a trimeric archaeal adenylate kinase." Journal of Molecular Biology **282**(1): 167-179.

Waldo, G. S., *et al.* (1999). "Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein." Nat. Biotechnol. **17**: 691-695.

Wang, J., *et al.* (1997). "Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage rb69." Cell **89**(7): 1087-1099.

Wintrode, P. L., *et al.* (2003a). "Protein dynamics in a family of laboratory evolved thermophilic enzymes." J. Mol. Biol. **327**(3): 745-757.

Wintrode, P. L., *et al.* (2003b). "Protein dynamics in a family of laboratory evolved thermophilic enzymes." Journal of Molecular Biology **327**: 745-757.

Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol Rev **51**(2): 221-271.

Wu, D., *et al.* (2009). "A phylogeny-driven genomic encyclopaedia of bacteria and archaea." Nature **462**(7276): 1056-1060.

Wu, H.-Y., *et al.* (2003). "Improved production of (s)-ketoprofen ester hydrolase by a mutant of *trichosporon brassicae* cgmcc 0574." J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **30**(6): 357-361.

Yamagishi, A., *et al.* (1996). "Pyrimidine biosynthesis genes (pyre and pyrF) of an extreme thermophile, *thermus thermophilus*." Applied and Environmental Microbiology **62**(6): 2191-2194.

Yin, D. L., *et al.* (2010). "Switching catalysis from hydrolysis to perhydrolysis in *pseudomonas fluorescens* esterase." Biochemistry **49**(9): 1931-1942.

Yokoyama, A., *et al.* (1996). "Thermocryptoxanthins: Novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *thermus thermophilus*." Archives of Microbiology **165**(5): 342-345.

Yu, M. X., *et al.* (2006). "Isolation and characterization of *thermus* bacteriophages." Arch. Virol. **151**(4): 663-679.

Yusupov, M. M., *et al.* (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution." Science **292**(5518): 883-896.