



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Expresión y estudio de enzimas
termoestables de interés biotecnológico**



TESIS DOCTORAL

Eloy Roberto Ferreras Puente

Madrid 2011

Memoria presentada por Eloy R. Ferreras Puente para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid bajo la dirección del Dr. José Berenguer Carlos, en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid 2011



ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	VIVIR EN CONDICIONES EXTREMAS	1
1.1.1	Organismos termófilos: Adaptación a la vida a altas temperaturas	2
1.1.1.1	Relevancia de los estudios sobre los organismos termófilos	2
1.1.1.2	Mecanismos de adaptación a las altas temperaturas	3
	A. Solutos compatibles	3
	B. Estabilización de ácidos nucleicos	4
	C. Membranas	4
	D. Mecanismos de estabilización de las proteínas	5
	E. Otras estrategias	5
1.1.1.3	El límite térmico de la vida	6
1.1.1.4	El género <i>Thermus</i>	6
1.1.1.5	Herramientas genéticas disponibles para <i>T. thermophilus</i>	8
1.1.1.5.1	Genes de selección positiva	8
1.1.1.5.2	Vectores	8
1.1.1.6	La GFP como herramienta de localización celular	9
1.2	APLICACIONES DE ENZIMAS DE TERMÓFILOS EN BIOCATÁLISIS	9
1.2.1	Biocatálisis	9
1.2.2	Producción de termozimas	11
1.3	HIDROLASAS DE AZÚCARES	12
1.3.1	Clasificación de las glicosidasas	12
1.3.2	Mecanismo de reacción	13
1.3.3	Hidrólisis de oligo y polisacáridos	13
1.3.4	Síntesis de oligosacáridos	14
1.4	LIPASAS/ESTERASAS TERMOESTABLES	15
1.4.1	Interés biotecnológico.	16
1.4.2	Diferencias entre lipasas y esterasas	15
1.4.3	Estructura	16
1.4.4	Mecanismo catalítico	16
1.4.5	Producción de lipasas y esterasas	17



1.5	PENICILIN ACILASAS	17
1.5.1	Penicilína G acilasa	18
1.5.1.1	Procesamiento y maduración de la penicilín acilasa de <i>E. coli</i>	19
1.5.1.2	La enzima madura	20
1.5.1.3	Mecanismo catalítico de la penicilina G acilasa	21
1.5.1.4	Regulación y papel metabólico	21
1.5.1.5	Interés industrial	22
1.5.1.6	Actividad penicilín acilasa en <i>Thermus thermophilus</i>	23
2.	OBJETIVOS	25
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	27
3.1.1	Cepas	27
3.1.2	Plásmidos	28
3.1.2.1	De otras investigaciones	28
3.1.2.2	Construidos en este trabajo	29
3.1.3	Antisueros	34
3.2	MATERIAL QUÍMICO Y BIOLÓGICO	35
3.2.1	Tampones y otras soluciones	35
3.3	MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	37
3.3.1	Condiciones de crecimiento y conservación de estirpes bacterianas	37
3.3.2	Transformación bacteriana	38
3.3.3	Expresión de proteínas	39
3.3.3.1	Expresión en <i>E. coli</i>	39
3.3.3.2	Expresión en <i>Streptomyces lividans</i>	40
3.3.3.3	Expresión en <i>T. thermophilus</i>	40
3.3.4	Generación de mutantes en <i>T. thermophilus</i>	41
A.	Mutantes de inserción	41
B.	Mutantes de delección	42
3.4	MANIPULACIÓN DEL DNA	43
3.4.1	Preparación de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	43
3.4.2	Preparación de DNA cromosómico de <i>T. thermophilus</i>	43
3.4.3	Técnicas de amplificación y clonaje	43
3.4.4	Secuenciación del DNA	44



3.4.5	Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA	45
3.4.6	Método de generación de mutaciones puntuales: Quick-Change	45
3.5	MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	45
3.5.1	Preparación de extractos para electroforesis	45
3.5.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida	46
3.5.3	Western blot	46
3.5.4	Ensayos de retardo en gel (EMSA)	47
3.5.5	Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad	47
3.5.6	Medida de actividades enzimáticas	48
3.5.6.1	Actividad esterasa en gel de acrilamida	49
3.5.6.2	Actividad β -galactosidasa en extractos de <i>T. thermophilus</i>	49
3.5.7	Pruebas de accesibilidad a la tripsina	50
3.5.8	Separación de fracciones celulares	50
3.5.9	Solubilización diferencial de componentes de membrana	51
3.6	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	51
3.7	HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	51
4.	RESULTADOS	53
4.1	ESTUDIO DE POTENCIALES GLICOSIDASAS DE <i>Thermus thermophilus</i> HB27	53
4.1.1	Potenciales amilasas	55
	TTC1198	55
	TTC1828	57
	TTC1283	58
4.1.2	Gluco y galactosidasas	60
	TTP0220	60
	TTP0221	61
	TTP0222	63
4.1.3	TTC0107	63
4.1.4	TTP0072	66
4.1.5	TTP0042	69
4.2	EXPRESIONES EN <i>Thermus thermophilus</i>	73
4.3	EXPRESIONES EN <i>Streptomyces lividans</i>	75



ÍNDICE

4.4	MUTANTES EN GLICOSIDASAS	79
4.5	EL OPERÓN DE TTP0042	81
4.5.1	Mutantes en los genes del operón	82
4.5.2	Clonaje y actividad de posibles promotores	83
4.5.3	El regulador transcripcional TTP0038	86
4.6	POTENCIALES ESTERASAS Y LIPASAS	90
4.6.1	TTC0552	90
4.6.2	TTC0904	91
4.6.3	TTC1341	93
4.6.4	TTC1494	94
4.6.5	TTC01787	95
4.7	PENICILÍN ACILASA	97
4.7.1	Expresión y procesamiento de la PAC en <i>Thermus thermophilus</i>	98
4.7.2	Localización celular de la penicilín acilasa	100
4.7.2.1	Utilización de la sGFP	101
4.7.2.2	Localización de PAC mediante fraccionamiento celular	104
4.7.3	Accesibilidad a la tripsina	106
4.7.4	Expresión de una quimera (PS _{Eco} -PAC _{Th})	107
4.7.5	Generación de mutantes de delección amino terminal y complementación al mutante Δ PAC	108
4.7.5.1	Generación de un mutante limpio HB27 Δ PAC	109
4.7.5.2	Expresión de los mutantes de delección carboxilo terminal	110
4.7.6	Generación de mutantes de homología y ensayos de actividad de la PAC de <i>T. thermophilus</i>	111
5.	DISCUSIÓN	115
5.1	GLICOSIDASAS DE <i>Thermus thermophilus</i>	116
5.2	POTENCIALES ESTERASAS Y LIPASAS	122
5.3	PENICILÍN ACILASA	123
6.	CONCLUSIONES	127
7.	BIBLIOGRAFÍA	129



8. ANEXO I

9. ANEXO II



ÍNDICE

ABREVIATURAS



ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
6-APA	Ácido 6 aminopenicilánico
Amp ^r	Resistente a Ampicilina
Bleo ^r	Resistente a Bleomicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Dideoxynucleótido tri-fosfato
EMSA	Ensayos de movilidad en gel
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
GH	Glicosil Hidrolasas
Hyg ^r	Resistente a Higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-Tiogalactopiranosido
Kan ^r	Resistente a la Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
NIPAB	N-(3-Carboxy-4-nitronitrofenil)fenilacetamida
ONPG	2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
PGA	Penicilina G acilasa de <i>E. coli</i>
PAC	Penicilina G acilasa de <i>T. thermophilus</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PNPB	4-Nitrofenil butirato
PNPG	4-Nitrofenil α-D-galactopiranosido
Sarcosil	N-lauroilsarcosina
RBS	Ribosome Binding Site (sitio de union del ribosoma)
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
sGFP	Superfolded Green Fluorescent Protein
Tat	Sistema de transporte de dos argininas (Twin arginine transport system)
TB	Medio de cultivo rico para <i>Thermus</i>



SUMMARY



The genus *Thermus* has become one of the most used models for bacterial thermophiles because of its easy handling in the laboratory, its high cultures yields under aerobic conditions, and its natural competence. These properties, and the ability of its thermophilic enzymes and supramolecular complexes to crystallize at room temperatures, make some strains of the genus excellent laboratory models to study the molecular basis of thermophilia being on the basis of the most relevant accomplishment in recent years in the structural biology. This genus also continues to be a source of thermophilic enzymes of great biotechnological interest and, more recently, due to the development of new plasmids and up to four thermostable antibiotic selection markers, a tool for the over-expression of thermophilic enzymes and for the selection by directed evolution of thermostable mutants from mesophilic proteins.

The main aim of this Thesis was the screening of the already available *Thermus thermophilus* HB72 genome for biotechnological relevant enzymes. We choose 9 genes encoding hypothetical glycosidase (chapter 4.1) and 5 putative lipases/esterases (chapter 4.6). We cloned these genes in *E. coli* and attempted to overexpress and purify them. On the other hand, we tested the availability of alternative host systems such as *Streptomyces lividans* (chapter 4.3) and *Thermus thermophilus* (chapter 4.2) in order to express the proteins that could not be overexpressed in active form in *E. coli*.

In the chapter 4.4 we identify the gene TTP0042 as the responsible for the increasing in the β -galactosidase and β -fucosidase activity observed in *T. thermophilus* cultures growing in nutrient-limited medium supplemented with cellobiose 0,2%. This gene belongs to a gene cluster that encodes homologues to proteins implicated in the detection and transport of glycosides. We made insertional mutants of all the genes and analyzed the inducibility of the enzymatic activity. We finally identified the main promoter of the cluster and confirmed the binding to it of a LacI homologue, likely implicated in its regulation.

On the last chapter we analyzed a gene encoding a putative penicillin acylase from *Thermus thermophilus* HB27, its expression, maturation and activity. First of all, we cloned and overexpressed the amino and carboxyl-terminal fragments separately in order to obtain antibodies that allowed us to observe the processing of the enzyme. We made a deletion mutant and made a trans complementation with carboxyl-terminal mutants of the enzyme. We defined the cellular location of the mature enzyme using a fusion of the enzyme with a thermostable GFP variety and found that, unlike homologues from other bacteria, this PAC remains attached to the periplasmic surface of the cytoplasmic membrane.



SUMMARY

INTRODUCCIÓN



1. 1 VIVIR EN CONDICIONES EXTREMAS

En las últimas dos décadas se han descubierto microorganismos que viven en unos nichos que antes, y desde nuestro punto de vista antropocéntrico, nos parecían imposibles, seres que han sido capaces de colonizar lugares límite como chimeneas hidrotermales abisales, valles secos en la Antártida, lagos salados, almacenes de residuos radiactivos, o las rocas de las profundidades de la litosfera. Hoy en día de hecho se considera que cualquier nicho, por inhóspito que nos pueda parecer, podría albergar vida, siendo el único requisito indispensable para ésta la disponibilidad de agua líquida (Rothschild y Mancinelli, 2001).

A estos ambientes inhóspitos se les denomina "extremos", y a los organismos que viven en ellos "extremófilos" debido a que su nivel de adaptación suele ser tal que requieren obligatoriamente de estas condiciones para su supervivencia, (Macelroy, 1974). Dicho esto cabe preguntarse ¿Qué es exactamente un ambiente extremo? Aunque resulte una cuestión a priori evidente, el concepto de lo que supondría un medio extremo es muy relativo, ya que se haría definiendo un punto de comparación y, en nuestro caso, esa referencia está en lo que es normal para el ser humano, por lo que se hace necesario contar con una definición más objetiva de lo que son estos ambientes. La definición más extendida emplea como referencia el grado de diversidad biológica que en éstos se encuentre, considerando como extremos aquellos ambientes en los que ésta es baja; pudiendo darse el caso de contar con un solo género, o incluso una única cepa de microorganismo presente (Chivian y cols., 2008; Cristina Vallés y cols., 2002). Para otros autores estos ambientes se corresponderían con aquellos que requieren una modificación significativa de los organismos que los habitan con respecto a sus antecesores inmediatos (Boston, 1999).

Podemos encontrar varios tipos de ambientes extremos y, dentro de éstos, distintos tipos de organismos. Así tenemos barófilos, que soportan altas presiones, osmófilos (sacarófilos y halófilos) que pueden sobrevivir en ambientes hipertónicos, acidófilos, que crecen normalmente entre pH 0 y pH 5, y alcalófilos, que crecen entre pH 8.5 y pH 11.5; organismos que viven a bajas temperaturas o psicrófilos y sus antagonistas, organismos capaces de vivir a temperaturas elevadas, o termófilos, organismos radiotolerantes, etc. Tampoco es excepcional encontrar organismos que prosperen en nichos en los que se combinan dos o más de estos factores extremos, como por ejemplo temperatura alta y pH ácido o alta osmolaridad (Madigan y cols., 2003; Rothschild y Mancinelli, 2001).

Los organismos extremófilos presentan un interés científico diverso. De entrada son frecuentemente taxones nuevos, que en el momento de su descubrimiento vienen a completar el conocimiento filogenético de los seres vivos y a enriquecer los debates relativos al origen y a los límites de la vida. Además, sus biomoléculas suelen ser resistentes a las condiciones específicas de su entorno, lo que no sólo desemboca en intensos trabajos para



1. INTRODUCCIÓN

intentan comprender los mecanismos íntimos de resistencia, sino también en estudios con la perspectiva del desarrollo de aplicaciones industriales.

1.1.1 Organismos termófilos: Adaptación a la vida a altas temperaturas.

De entre todos los factores ambientales, puede que la temperatura sea el que mayor efecto ejerce sobre la funcionalidad de las moléculas y estructuras biológicas y, en consecuencia, sobre la actividad y evolución de los organismos.

La mayoría de los organismos crecen en un estrecho rango de temperatura que va de los 20° C a los 45° C, son los denominados mesófilos; pero se han encontrado organismos creciendo a temperaturas que superan incluso los 100° C o tan bajas que rozan la congelación. Los organismos con una temperatura óptima de crecimiento situada por debajo de los 20° C se denominan psicrófilos, y los que crecen a temperaturas por encima de los 45° C son llamados termófilos. Éstos podemos subdividirlos en los moderados (entre 45 y 65° C), extremos (entre 65 y 80° C) e hipertermófilos, con temperaturas óptimas superiores a los 80° C (<http://pgtdb.csie.ncu.edu.tw/>).

1.1.1.1 Relevancia de los estudios sobre los organismos termófilos

Recientes descubrimientos están consiguiendo que estemos dejando atrás una época en la que los organismos termófilos eran considerados meras curiosidades biológicas, rarezas microbianas en oscuros y escasamente explorados nichos ecológicos, y que comencemos a darnos cuenta de las posibilidades que ofrecen, entre otras cosas, como base de nuevas innovaciones biotecnológicas (de Miguel Bouzas y cols., 2006; Haki y Rakshit, 2003; Vieille y Zeikus, 2001; Niehaus y cols., 1999).

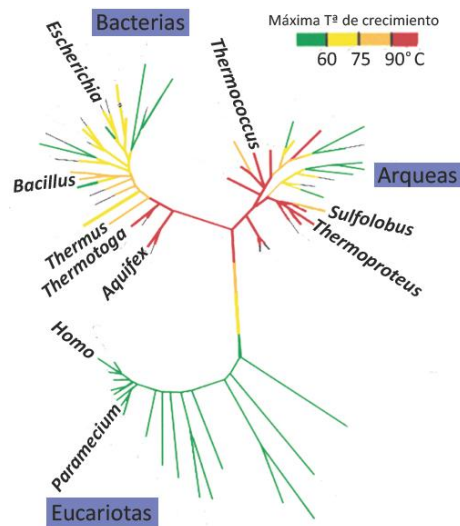


Figura 1. 1 **Árbol filogenético bacteriano:** Simplificación del árbol filogenético basado en secuencias de rRNA (Schwartzman y Lineweaver, 2004).

Estos organismos suelen pertenecer a las ramas más cortas y próximas a la raíz de la evolución (Fig. 1.1) en árboles filogenéticos basados en estudios del rRNA16s lo que, además de sustentar un origen termófilo de la vida, los convierte en una rica fuente de inesperados mecanismos adaptativos que pueden alimentar la posterior comprensión de la evolución y los complejos mecanismos que les afectan (Huber y cols., 2000). Además, al estar toda

su maquinaria molecular adaptada a trabajar a altas temperaturas, su estudio nos puede proporcionar conocimientos fundamentales sobre los mecanismos que permitirán la termoadaptación de otras proteínas.



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 al ser más fácilmente cristalizables que sus homólogas mesófilas, debido a su gran rigidez estructural a temperatura ambiente. Hay múltiples ejemplos de grandes complejos biológicos procedentes de termófilos cuya estructura ha sido determinada a alta resolución, antes que los de organismos mesófilos mejor conocidos, como el ribosoma 70s (Yusupov y cols., 2001), la RNA polimerasa bacteriana (Selmer y cols., 2006; Severinov 2000) o el complejo respiratorio I (Sazanov y Hinchliffe, 2006; Efremov y cols., 2010) de *Thermus* sp. Esta característica de las proteínas termófilas 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). Sin embargo, a pesar del creciente interés de termófilos e hipertermófilos, no son muchas las bacterias o arqueas termófilas que hayan sido sometidas a procesos de manipulación genética dignos de reseñar (Cava y cols., 2009).

1.1.1.2 Mecanismos de adaptación a las altas temperaturas.

Dado que su pequeño tamaño no permite ningún aislamiento térmico, todos los componentes celulares de los termófilos deben enfrentarse con el desensamblaje y la descomposición debidos a las duras condiciones en las que se desarrollan, para lo que han de utilizar una combinación de estrategias.

A. 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 (Santos y cols., 2008; Adams, 1993; Oshima, 1983) y cuya síntesis está sujeta a una fuerte regulación dentro de la bacteria (Borges y cols., 2002). Estos "termosolutos" están, generalmente, cargados negativamente y la mayoría incluidos en 2 categorías: unos son derivados de hexosas con el grupo hidroxilo del carbono uno generalmente bloqueado en una configuración α , y otros son poli-fosfodiésteres (Santos y cols., 2008; Lamosa y cols., 2006) y no han sido identificados en bacteria o arquea que crezca en un rango de temperaturas más moderado. Esto, junto con la observación *in vitro* de que el manosilglicerato y el di-glico-fosfato son capaces de proteger proteínas mesófilas de la desnaturalización por calor en ensayos *in vitro*, fortalece la idea de que juegan un papel en la protección de componentes celulares contra la desnaturalización térmica (Borges y cols., 2002; Santos y da Costa, 2002). Aunque el tema sigue siendo objeto de debate, cada vez hay un mayor número de datos que muestran que estos solutos son los responsables de la respuesta a situaciones de estrés en la bacteria tales como estrés térmico u oxidativo (da Costa y cols., 1998; Argüelles, 2000; Benaroudj y cols., 2001).



B. Estabilización de ácidos nucleicos

Los organismos termófilos tienen que vérselas con una gran carga de daño al DNA, ya sea por alteración química, desnaturalización de su arquitectura o por la unión covalente de metabolitos reactivos (Lindahl, 1993), procesos que se ven acelerados tremendamente a altas temperatura (Forterre, 1996) y en cuya protección no parece tener ninguna importancia la proporción relativamente alta de guanina y citosina (G+C) (Lieph y cols., 2006; Hurst y Merchant, 2001; Galtier y Lobry, 1997). Hay varios mecanismos propuestos para explicar la protección del material genético, como son las altas concentraciones locales de sales (Adams, 1993), la aparición de poliaminas distintivas (Oshima, 2007; Terui y cols., 2005), la unión de proteínas catiónicas en arqueas (Pereira y cols., 1997) o la existencia de gran variedad de mecanismos específicos de reparación del DNA de una alta capacidad (Makarova y cols., 2002; Brüggemann y Chen 2006). Todos los hipertermófilos y algunos termófilos (Brochier-Armanet y Forterre, 2007, Brüggemann y Chen 2006), producen un tipo particular de DNA topoisomerasas llamadas DNA girasas reversas, que introducen superenrollamientos positivos en el DNA (Kikuchi y Asai, 1984) y que, aunque no son imprescindibles para la termofilia (Atomi y cols., 2004; López-García y Forterre, 2000; Guipaud y cols., 1997), podrían estar relacionadas con la protección del DNA contra la degradación química u otras formas de deterioro del DNA (Kampmann y Stock, 2004; Napoli y cols., 2004).

En la estabilización estructural de los ácidos ribonucleicos son particularmente importantes las modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs y rRNAs y la estructura secundaria con alto contenido en G-C en los tallos de doble cadena (Kowalak y cols., 1994; Daniel y Cowan, 2000).

C. Membranas

Los lípidos de membrana juegan un papel fundamental en la termofilia de estos organismos y su composición se debe adaptar a las fluctuaciones en la temperatura ambiente para mantener sus funciones sin perder el compromiso con la estabilidad química necesaria para evitar la disolución a alta temperatura (Ray y cols. 1971; Brock 1985).

Los mecanismos de termoadaptación utilizados en los lípidos de arqueas y bacterias son análogos (formación de lípidos gigantes) pero no homólogos (tienen diferente estereoquímica y diferente química) (Forterre, 1996). En las arqueas, los enlaces éster son sustituidos por enlaces éter y, en los hipertermófilos, la bicapa es reemplazada por una monocapa generada por cadenas transmembrana de fitanil C₄₀ derivadas del di(bifitanil)-diglicerol (Kates 1992), que cubren todo el ancho de la membrana (Gliozzi y cols., 1983). En bacterias, los mecanismos termoadaptativos también incluyen la presencia de ácidos grasos



saturados, ramificaciones y/o ciclación (Itoh y cols. 2001; Tolner y cols., 1998) y, en las arqueas, de dieter con alcoholes lipídicos, tetraesteres y dioles alifáticos de cadena larga, todos ellos con gran variedad de fosfo-, glico-, sulfoglico-, sulfofosfo- y fosfoglico-derivados (Daniel y Cowan 2000).

D. Mecanismos de estabilización de las proteínas

Las proteínas de organismos termófilos también necesitan de mecanismos que les permitan tener la estabilidad suficiente para conservar su estructura tridimensional y 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 nuevas interacciones intra o intermoleculares, o de estructuras que ayuden a la preservación del plegamiento. Al contrario, parece que el efecto aditivo de las mismas fuerzas que cursan en el mantenimiento de la estructura de las proteínas mesófilas es lo que mantiene a las de termófilos, siendo suficientes unas pequeñas modificaciones estructurales para incrementar la estabilidad (Sadeghi y cols., 2006). En general las proteínas de organismos termófilos tienen una superficie más polar (Cambillau y Claverie, 2000), un núcleo más apolar y mejor empaquetado (Paiardini y cols., 2008; Lieph y cols., 2006), un número mayor de interacciones iónicas, puentes de sulfuro (Dehouck y cols., 2008; Robinson-Rechavi y cols., 2006; Beeby y cols., 2005; Matsumura y cols., 1989), y una optimización de estructuras secundarias, dando lugar a unas proteínas más pequeñas (Chakravarty y Varadarajan, 2002; Tekaiia y cols., 2002), con un núcleo hidrofóbico mucho más compacto minimizando o eliminando cavidades dentro de la proteína y bucles en el exterior de ella (Chang y cols., 1999; Thompson y Eisenberg, 1999).

E. Otras estrategias

Existen otras estrategias generales que se cree contribuyen a la adaptación de estos extremófilos al medio en el que viven, como el rápido recambio de los metabolitos y estructuras dañadas, la expresión de proteínas de estrés térmico, la canalización metabólica (Van de Castele y cols., 1990 y 1997), la utilización de una vía metabólica alternativa o la sustitución de compuestos termolábiles dentro de la misma vía, como en el caso de la sustitución del ATP por ADP o pirofosfatos en rutas glicolíticas (Siebers y Hensel, 1993; Kengan y cols., 1994), o el uso de proteínas de hierro sin grupo hemo, en lugar de NAD(P) en reacciones redox (Daniel y Danson, 1995). También se especula con la existencia de protección de metabolitos en microambientes (Daniel y Cowan, 2000).



1. INTRODUCCIÓN

1.1.1.3 El límite térmico de la vida

El límite de temperatura en el cual la vida ya no es posible representa un parámetro fundamental para delimitar cuándo y dónde la vida puede haber evolucionado desde una tierra aún joven y caliente o la vida potencial en medios ambientes termófilos extraterrestres y es una cuestión aún envuelta en una encendida controversia.

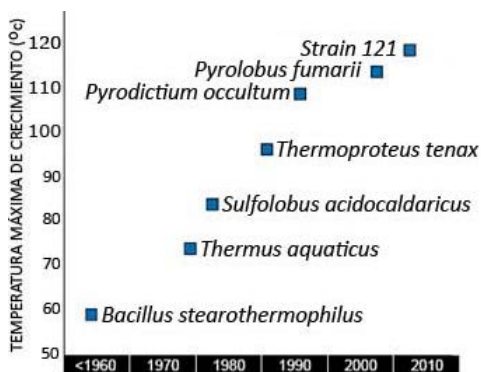


Figura 1. 2 Evolución del límite superior de temperatura para la vida. Los puntos indican fechas en las que se describieron nuevos organismos que superaron significativamente el anterior límite de temperatura. (Cowan, 2004).

Varias han sido las ocasiones en las que el descubrimiento de una nueva especie nos ha llevado a replantearnos este límite, con microorganismos que marcaban un nuevo récord de temperatura; el último la cepa 121 descrita en el año 2003 (Kashefi y Lovley, 2003). De hecho es probable que la determinación de la temperatura óptima de crecimiento realizada en laboratorio, realmente esté subestimando la temperatura real

de crecimiento de esos organismos.

Son los experimentos sobre la estabilidad de las biomoléculas los que están dando una idea más real de dónde podríamos dibujar el límite para la proliferación de la vida, estudios que sugieren que son las pequeñas moléculas y no las macromoléculas las que dictan ese límite (Adams, 1993; Jaenicke y cols., 1996). El consenso es que la vida podría mantenerse hasta un límite máximo de 140-150° C, ya que a esta temperatura está comprometida la estabilidad de biomoléculas tan importantes como el ATP o el NAD⁺ (Stetter, 1998; Madigan y cols., 2003).

1.1.1.4 El género *Thermus*

El género *Thermus* spp. (Brock y Freeze, 1969) es uno de los más extendidos dentro de las bacterias termófilas. Incluye aislados de bacterias termófilas moderadas y extremas, generalmente aerobias, con una pigmentación amarillo-anaranjada o rojiza (Yokoyama y cols., 1996), que presentan tinción Gram-negativa y con un contenido en G+C entorno al 70 %. Han sido aisladas en fuentes termales neutras o ligeramente básicas en diferentes puntos del planeta (Hudson y col., 1989, Oshima e Imabori, 1974). El género está compuesto por formas bacilares, inmóviles, que tienden a filamentar en cultivos jóvenes, con un rango de temperaturas de crecimiento desde los 50 hasta los 85° C. Tienen un metabolismo quimioorganotrófico y no requieren vitaminas aunque precisan de algunos oligoelementos (Brock, 1978a; Brock, 1978b).



La secuencia de su rRNA 16S, así como la de muchas proteínas habitualmente empleadas como relojes moleculares, permiten situar filogenéticamente al género *Thermus* estrechamente relacionado con los cocos Gram-positivos del género *Deinococcus* (da Costa y cols., 2001) dentro del phylum de los Deinococcales (Omelchenko y cols., 2005; Weisburg y cols., 1989) que constituiría una de las ramas más antiguas de la filogenia bacteriana (Woese, 1987) (Fig. 1.1). Aunque esto constituye hoy en día la corriente más aceptada, existen diferentes interpretaciones basadas en el análisis de la ultraestructura de las envolturas celulares y en comparaciones de secuencia de genes ortólogos, que situarían este género como un intermediario evolutivo entre las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas (Ciccarelli y cols., 2006; Gupta, 2000).

Aunque inicialmente se describieron como bacterias aerobias, se han descubierto algunos aislados capaces de crecer en condiciones anaerobias, como la cepa de *T. thermophilus* NAR1, capaz de crecer utilizando nitrato como aceptor final de electrones (Ramírez-Arcos y cols., 1998). A día de hoy ya se han descrito aislados capaces de crecer con, o al menos reducir, virtualmente todo el espectro posible aceptores de electrones inorgánicos (Moller y van Heerden, 2006; Balkwill y cols., 2004; Gihring y Banfield, 2001; Kieft y cols., 1999).

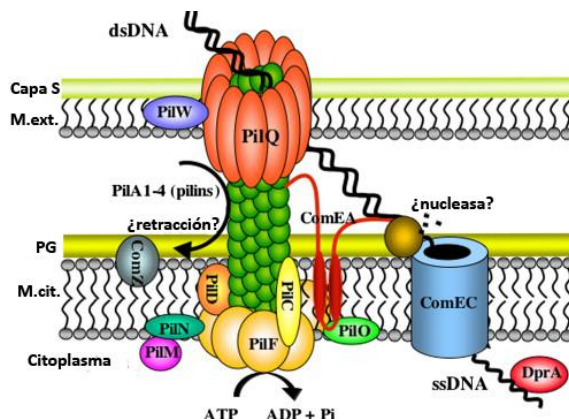


Fig. 1. 3 Modelo de la translocación del DNA exógeno en *T. thermophilus* HB27 (Averhoff, 2009).

Estas bacterias poseen una serie de características adicionales que las convierten en un sujeto idóneo para el trabajo en el laboratorio, como la capacidad de crecer hasta elevadas densidades de cultivo, con unos tiempos de generación relativamente cortos (unos 30 a 60 minutos) y la posibilidad formar colonias aisladas en medio sólido. Adicionalmente, algunas cepas presentan competencia natural mediada por un sistema en el que intervienen al menos 16 proteínas, algunas con homología a proteínas del pili tipo IV, de sistemas de

secreción tipo II y del sistema de competencia de bacterias mesófilas (Averhoff, 2009; Friedrich y cols., 2002; Koyama y cols., 1986) (Fig. 1.3). El aparato de competencia se expresa independientemente del ciclo celular (Hidaka y cols., 1994) en un proceso dependiente de cationes divalentes y pH (Koyama y cols., 1986; Hidaka y cols., 1994). Este sistema es de una enorme eficiencia, permitiendo velocidades de entrada de DNA lineal o circular muy elevadas (40 kb/s y célula en algunas cepas) (Schwarzenlander y cols., 2006).



1.1.1.5 Herramientas genéticas disponibles para *Thermus thermophilus*

1.1.1.5.1 Genes de selección positiva

En el año 1990 comenzaron a aparecer los primeros intentos de uso de genes seleccionables en *T. thermophilus*, que se basaban en la complementación de auxotrofías. En un principio se utilizó el gen *trpB* (Koyama y cols., 1990a) y después genes de síntesis de pirimidina (Yamagishi y cols., 1996) o leucina (Tamakoshi y cols., 1997). También se ha utilizado con éxito el gen de la malato deshidrogenasa (Kayser y Kilbane, 2001). Es interesante destacar que el sistema de selección de genes capaces de complementar la síntesis de uracilo (*pyrE*) puede a su vez contraseleccionarse con ácido 5-fluoroótico, aportando un sistema de inserción – deleción aplicable (“pop-in”, “pop-out”) y repetible de forma secuencial (Tamakoshi y cols., 1999).

El primer sistema de selección termorresistente por antibiótico fue el correspondiente a una kanamicin nucleotidil transferasa mutante (Liao y cols., 1986) empleado en *Thermus* en 1992 (Lasa y cols., 1992; Mather y Fee, 1992) y fue el único disponible hasta que en el año 2005, mediante evolución dirigida, se consiguieron otras 2 resistencias útiles para su aplicación en *T. thermophilus*, una a bleomicina (Brouns y cols., 2005) y otra a higromicina B (Nakamura y cols., 2005). Ya en el 2007 se utilizó un doble mutante en el gen *rpsI* para conseguir un plásmido que no sólo confería resistencia, sino también dependencia a estreptomicina (Blas-Galindo y cols., 2007a y b) y que puede emplearse también para selección negativa.

1.1.1.5.2 vectores

Varias de las cepas aisladas de *Thermus* ssp. contienen plásmidos crípticos de distintos tamaños y, en general, bajo número de copias, de los que se han obtenido diferentes orígenes de replicación (Koyama y cols., 1990a; de Grado y cols., 1998; Hishinuma y cols., 1978; Vásquez y cols., 1983; González y cols., 1984, Kobayashi y cols., 2005), a partir de los cuales se han construido vectores bifuncionales *Thermus-E. coli*, que permiten tanto la manipulación genética de *Thermus* como su utilización como factoría de proteínas (Takayama y cols., 2004; Moreno y cols., 2003; de Grado y cols., 1999; Tamakoshi y cols., 1999; Koyama y cols. 1990b).

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. (Yu y cols., 2006), aunque aún no se ha descrito su posible utilización como vectores.



1.1.1.6 La GFP como herramienta de localización celular

A pesar de los importantes avances a la hora de utilizar la GFP en bacterias, la elevada temperatura constituía un problema importante a la hora de implementar su uso en organismos termófilos. Recientemente se ha demostrado que la variante llamada sGFP ("superfolder") (Pédelacq y cols., 2006) es funcional en *T. thermophilus* a la hora de localizar tanto proteínas solubles en el citoplasma o periplasma como unidas a la membrana (Cava y cols., 2008). La formación del fluoróforo de la GFP suele ser lenta (Heim y cols., 1994), y su maduración debe estar restringida al citoplasma celular, es por esto que también es una herramienta que puede ser utilizada 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 (Thomas y cols., 2001).

1. 2 APLICACIONES DE ENZIMAS DE TERMÓFILOS EN BIOCATÁLISIS

Una de las características más interesantes de estos microorganismos desde el punto de vista biotecnológico, deriva de que sus enzimas son capaces de catalizar reacciones bioquímicas en condiciones extremas, con óptimos de actividad próximos a las temperaturas de crecimiento del organismo de procedencia (Coolbear y cols., 1992). Una termoestabilidad que, a su vez, viene acompañada de resistencia a detergentes, solventes orgánicos y otras características que luego detallaremos y que las hacen elementos muy relevantes para su utilización en biocatálisis industrial.

1.2.1 Biocatálisis

Los microorganismos han sido utilizados durante milenios para la producción de importantes productos alimenticios, pero sólo algunas décadas atrás se comenzaron a implementar las primeras aplicaciones de la biocatálisis en la industria química mediada por enzimas purificadas. Desde entonces la síntesis o degradación enzimática de productos específicos se ha convertido en un aspecto fundamental de la biotecnología moderna, que va ganando importancia con el paso del tiempo, en detrimento de las clásicas transformaciones químicas (Panke y cols., 2004).

Este abordaje biocatalítico presenta varias ventajas sobre la ingeniería química tradicional, como son: la posibilidad de alcanzar una mayor riqueza del producto buscado, el menor derroche de productos, la menor necesidad de aporte energético, el menor vertido de



1. INTRODUCCIÓN

productos químicos al medio ambiente (Elander, 2003), y la que quizás sea la mayor ventaja de la biocatálisis sobre la síntesis química, que es la precisión química, gracias a la regio y estereo-selectividad de las enzimas, lo que provoca una mejor producción de estereoisómeros individuales, menores reacciones laterales, una simplificación en la separación de los productos y una menor contaminación (Rozzell, 1999). A pesar de esto, la biocatálisis presenta algunas limitaciones, como son la disponibilidad y coste de estos biocatalizadores, el rango limitado de sustratos utilizables y la estabilidad operacional en las duras condiciones que suelen ser necesarias para los procesos en los que son utilizados (Schoemaker, y cols., 2003).

En estas circunstancias, las enzimas de los organismos termófilos presentan una serie de ventajas que les hacen prevalecer sobre sus homólogas de mesófilos, incluso teniendo en cuenta concesiones hechas a la velocidad catalítica. Algunas de las ventajas con las que cuentan las termozimas son:

- Presentan una mayor resistencia frente a diversos agentes químicos como solventes orgánicos, detergentes y diferentes pH (Leuschner y Antranikian, 1995; Li y cols., 2005; Sellek y Chaudhuri, 1999; Vieille y Zeikus, 2001). Y también frente a proteólisis (Daniel y cols., 1982).
- Mayor estabilidad y una vida media más prolongada, lo que hace que disminuya la necesidad de sustitución en los procesos y abarata su almacenamiento (Coolbear y cols., 1992).
- La viscosidad de los medios de reacción es menor cuanto más elevamos la temperatura, con las consiguientes mejoras, que de esto se deriva, en la mezcla y bombeo de sustratos.
- Aumenta la solubilidad de sustratos y productos, de tal manera que se puede incrementar su concentración.
- Posibilidad de reducir la necesidad de refrigeración en procesos de fermentación a gran escala, en los que se generan elevadas temperaturas que resulta costoso disminuir.
- La posibilidad de contaminación, a lo largo de los procesos que requieren esterilidad, se ve disminuida al aumentar la temperatura (Cristina Vallés y cols., 2002).
- Se facilita mucho su purificación, tras la expresión heteróloga en un organismo mesófilo, con un tratamiento previo por calor (Kirk y Cowan, 1995; Takesawa y cols., 1990).

A pesar de que aún hoy en día la mayor parte de las enzimas con interés industrial proceden de organismos mesófilos o de termófilos moderados (Hough y Danson, 1999), en muchos casos modificadas mediante evolución dirigida para mejorar sus propiedades, ya se



utilizan con éxito algunas de termófilos e hipertermófilos (Haki y cols., 2003; Bruins y cols., 2001; Demirjian y cols., 2001).

1.2.2 Producción de termozimas

Cuando queremos utilizar una enzima para alguna actividad industrial necesitamos que el proceso de obtención sea rentable, por lo tanto, ésta debe poder ser producida en cantidades suficientes en un organismo que no sea excesivamente costoso de cultivar y que su purificación sea relativamente sencilla. Tradicionalmente los biocatalizadores se habían obtenido mediante el cultivo de organismos en grandes cantidades en fermentadores, pero la obtención de enzimas y biomasa a partir de organismos extremófilos está muy condicionada por la dificultad que supone su cultivo en un laboratorio o en una planta industrial. Para mejorar la producción de biomasa, diferentes grupos de investigación han adoptado distintas aproximaciones, tales como optimización de la composición del medio, (Gomes y cols., 2003; Gomes y Steiner, 1998; Gomes y cols., 2000), el empleo de fermentadores especiales (Schiraldi y De Rosa, 2002; Schiraldi y cols., 1999), o la modificación de las estrategias de fermentación (Schiraldi y De Rosa, 2002).

Para obviar estos problemas, se prefiere la utilización de sistemas recombinantes modelo. En la actualidad la forma más común de producir enzimas termófilas es por expresión heteróloga en organismos mesófilos (Ishida y cols., 1997; Vieille y Ziekus., 1996; Coolbear y cols., 1992), como *S. lividans* (Kieser y cols., 2000; Binnie y cols., 1997), *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, esto no siempre resulta posible, se calcula que menos del 20 % de las ORFs de cualquier genoma se podrían expresar de forma estable y correctamente plegadas en *E. coli* (Jenney y Adams, 2008). Una solución alternativa que ha sido propuesta es la expresión en otro organismo termófilo modelo como *T. thermophilus*. Ya existen varios ejemplos de sobreexpresión de proteínas utilizando este organismo como factoría celular (Hidalgo y cols., 2004; Koyama y cols., 1990b; Lasa y cols., 1992; Moreno y cols., 2005; Park y cols., 2004, Takayama y cols., 2004), en algunos casos obteniendo valores de sobreexpresión similares, o incluso mayores a los de *E. coli* (Moreno y cols., 2005). Recientemente se han construido mutantes en proteasas, similares a los que ya contamos para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, que podrían dar un empujón más a la utilización de este organismo como factoría proteica (Maehara y cols., 2007).

La cantidad de actividades enzimáticas que encontramos en organismos termófilos es limitada y no siempre es posible encontrar la adecuada para los propósitos que se buscan. El "dorado" de la ingeniería de proteínas sería poder diseñar "de novo", partiendo de unas determinadas necesidades, enzimas a la carta. Lamentablemente eso aún no es posible, pero se han desarrollado métodos para modular las características de las enzimas existentes, principalmente dos, la mutagénesis dirigida, cuyo fin es la introducción de cambios al azar en el gen, consiguiendo una librería de mutantes entre los que buscar el que más se ajuste a



nuestro requerimiento; y el diseño racional, que trata de predecir, utilizando un diseño teórico, los cambios necesarios en la estructura de una proteína para modular sus características. En los últimos años se ha demostrado la eficacia de la utilización de una combinación de ambas tácticas. Además existen otras vías minoritarias, como la creación de proteínas híbridas, (Arraztio García, 1997), la inmovilización, utilización de chaperoninas termoestables (Bergeron y cols., 2009; Kohda y cols., 2006; Teshima y cols., 2000), o la adición de solutos compatibles (Ramos y cols., 1997; Borges y cols., 2002; Faria y cols., 2008).

1. 3 HIDROLASAS DE AZÚCARES

Las glicosidasas o glicosil hidrolasas (EC 3.2) engloban una gran cantidad de enzimas capaces de hidrolizar compuestos con enlaces O-, S- (EC 3.2.1) y N-glicosilo (EC 3.2.2). Son enzimas fundamentales del catabolismo de los organismos y extremadamente comunes en la naturaleza, pudiendo encontrarlas en todo tipo de seres vivos, tanto intracelular como extracelularmente, cumpliendo funciones muy variadas, como conversión de biomasa, ruptura de glicolípidos y glucósidos exógenos, defensa, catabolismo de oligosacáridos de la pared celular, interacciones planta-microbio y planta-insecto, etc. (Ketudat Cairns y Esen, 2010).

1.3.1 Clasificación de las glicosidasas

Los carbohidratos tienen gran variabilidad estereoquímica y pueden ser ensamblados de muchas maneras diferentes (Laine, 1994) lo que deriva en una gran diversidad de azúcares y, como consecuencia, en una gran cantidad de enzimas implicadas en su metabolismo. Debido al gran número y variedad de estas enzimas y al rápido incremento de las estructuras resueltas, la lista de glicosidasas está constantemente sujeta a cambios, y su clasificación se ha convertido en una compleja tarea que se encuentra en constante revisión. El servidor CAZy (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) proporciona versiones de la clasificación actualizadas regularmente.

Esta clasificación puede hacerse atendiendo a distintos factores, uno de los más importantes es el análisis comparativo de las distintas secuencias (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch 1996), lo que nos permite agruparlas en 118 familias. Atendiendo a su estructura terciaria se pueden subdividir en 14 grupos o "clanes", con similitud en sus residuos catalíticos y en su mecanismo, que habrían evolucionado a partir de un ancestro común (Henrissat y Davies, 1997). También se clasifican en función de su actividad específica, de su mecanismo de reacción, o si son exo- o endo- glicosidasas (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) (Cantarel y cols., 2009).



1.3.2 Mecanismo de reacción

La hidrólisis enzimática de los enlaces glicosídicos tiene lugar mediante una catálisis ácida general que requiere la participación de dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo (Davies y Henrissat, 1995). Según la hidrolasa de la que se trate, la ruptura del enlace glicosídico puede llevarse a cabo vía dos mecanismos mayoritarios, uno que da lugar a una retención de la configuración anomérica y otro que da lugar a una inversión de ésta. En ambos, la posición del protón donador es idéntica, pero en el primero la base nucleófila está más cercana al carbono anomérico del azúcar, situándose a unos 5.5 Å, mientras que en el segundo caso deben acomodar una molécula de agua entre la base y el azúcar y la distancia se hace mucho mayor, de unos 10 Å.

1.3.3 Hidrólisis de oligo y polisacáridos

In vivo, el papel de estas enzimas es la hidrólisis de enlaces glicosídicos, actividad que representa una notable importancia económica en biotecnología, donde las glicosidasas de microorganismos, sobre todo las de organismos extremófilos, están despertando un gran interés.

Tabla 1. 1 Principales glicosidasas de organismos termófilos y sus aplicaciones (Haki y Rakshit, 2003; Demirjian y cols., 2001; Niehaus y cols., 1999).

Enzima	Utilidad	Organismo productor
Pululanasa, α -amilasa y β -amilasa	Enzimas encargadas de la degradación del almidón para la producción de glucosa o maltosa en la industria alimentaria. También se utilizan en la fabricación de detergentes	<i>Thermococcus aggregans</i> <i>Bacillus acidopullulyticus</i> <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> <i>Thermus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylothermus marinus</i>
β -galactosidasas	Industria alimentaria. Producción de alimentos deslactosados.	<i>Haloferax alicantei</i>
Celulasas	Degradación de celulosa a glucosa. Fabricación de detergentes, pretratamiento de residuos industriales.	<i>Clostridium absonum</i> <i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Pyrococcus horikoshi</i>
Xilanasas	Degradan xilano. Importantes en la fabricación de papel.	<i>Bacillus</i> sp. <i>Pyrococcus furiosus</i> <i>Thermotoga maritima</i>
Quitinasas	Limpieza de aguas residuales, cosméticos, producción de papel, productos fotográficos, cementos, agentes quelantes de metales pesados, industria textil.	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp. BG-11 <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-250



1.3.4 Síntesis de oligosacáridos

Las complejas estructuras que poseen los carbohidratos hacen que su síntesis mediante química clásica sea muy compleja, por lo que está perdiendo terreno con respecto a la síntesis enzimática, más sencilla y respetuosa con el medio ambiente, y mediante la cual se puede conseguir la regio- y estéreo-selectividad necesaria sin tener que recurrir a la protección de grupos funcionales. Hay dos grupos principales de enzimas que se emplean en la síntesis de oligosacáridos: glicosil transferasas (EC 2.4) y glicosidasas (EC 3.2) (Trinconne y Giordano, 2006), aunque la limitada cantidad de las primeras junto con el alto coste de sus sustratos y su inestabilidad, unido al escaso rendimiento que ofrecen las segundas en la relación síntesis/hidrólisis y su no siempre suficiente selectividad, hacen de éstas enzimas muy poco recomendables en la producción de oligosacáridos a gran escala.

Para disminuir el ratio de hidrólisis/síntesis en las glicosidasas, además de recurrir a la mejora mediante ingeniería genética del catalizador, se pueden adoptar otras estrategias, como son la optimización de las concentraciones de donador/aceptor (Reuter y cols., 1999), la utilización de donadores glicosil activados (Wymer y Toone, 2000), la modificación del medio de reacción mediante la adición de cosolventes, (López y cols., 1991) o trabajando en disolventes orgánicos monofásicos, (Chen y cols., 2003). Es en estas condiciones donde las enzimas de termófilos pueden resultar más interesantes, al ser resistentes a mayores concentraciones de solventes orgánicos.

En los últimos años se ha buscado introducir modificaciones en el centro activo que permitan dirigir la actividad de las glicosidasas hacia una actuación puramente sintética (Daines y cols., 2004), creando un grupo nuevo de enzimas, las glicosintasas que no hidrolizan los productos formados y permiten aumentar el rendimiento y la selectividad. Sin embargo por el momento sólo han podido ser empleadas a nivel de laboratorio (Kim y cols., 2005, Moracci y cols., 2001a y b).

Estas enzimas tienen una gran importancia en la industria farmacéutica ya que además de la formación de oligosacáridos, pueden catalizar la de glicoconjugados con un grupo aglucón distinto a un azúcar, en los que el residuo glicosídico puede ser crucial para la actividad de estos o simplemente mejorar sus parámetros farmacocinéticos. La variedad de compuestos sintetizados es muy amplia, como antibióticos glicosídicos (entre los que se encuentran la estreptomina, gentamicina, vancomicina, etc...), vitaminas glicosiladas que presentan varias, como son su mejor solubilidad, estabilidad frente a luz ultravioleta, sabor etc.; glicósidos alcaloides, como los glucurónidos de morfina; glicosidos de esteroides y terpenoides; o glicósidos de polifenol muchos de los cuales son importantes componentes de medicinas tradicionales (Kren y Martínková, 2001).



1. 4 LIPASAS/ESTERASAS TERMOESTABLES

Las carboxil esterasas (EC 3.1.1.1) y las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis y síntesis de ésteres carboxílicos y que podemos encontrar en muchos organismos, incluyendo animales, plantas, hongos y, por supuesto, bacterias. Aunque sus funciones fisiológicas no están muy definidas, generalmente se asocian con la patogenicidad y la detoxificación o el aprovechamiento de diversas fuentes de carbono, como los polihidroxicarboxilatos (Papaneophytou y cols., 2009; Berger y cols., 1998). En general ambas actúan con una alta regioselectividad y estereoselectividad, son estables y activas en disolventes orgánicos, poseen una gran especificidad de sustrato y no precisan cofactores, lo que facilita el proceso de escalado (Jaeger y cols., 1994, 1999; Jaeger y Reetz 1998, Kazlauskas y Bornscheuer, 1998; Pandey y cols., 1999; Beisson y cols., 2000; Gupta, 2000; Jaeger y Eggert, 2002).

1.4.1 Interés biotecnológico. Productos

Lipasas y esterasas tradicionalmente fueron utilizadas en la hidrólisis de grasas y aceites, pero esta reacción se puede revertir modificando sus condiciones, y en medios con bajo contenido en agua es posible desplazar el equilibrio promoviendo reacciones de esterificación alcohólica o acidólica de diversos sustratos, lo que hace estas enzimas mucho más versátiles y las convierte en las más ampliamente utilizadas en química orgánica (Vulfson, 1994). Sus aplicaciones industriales son muy variadas. En la industria de detergentes, en las que es fundamental su estabilidad por las duras condiciones en las que se produce el lavado, con altos pH y temperaturas y la presencia de aditivos como surfactantes y proteasas (Jaeger y Reetz, 1998). En la industria alimenticia para modificar las propiedades físicas y el valor sensorial de los alimentos que consumimos (Haki y Rakshit, 2003; Bech, 1992) y para enriquecer en ácidos grasos poliinsaturados, de gran valor biomédico, productos animales o vegetales. También se utilizan en la industria de la pulpa y del papel y en el campo de la química fina, y particularmente en la industria farmacéutica para obtener fármacos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas (Kazlauskas y Bornscheuer, 1998; Gill y Valivety, 1997). Una de las aplicaciones de las lipasas que está tomando mayor relevancia en los últimos años, es su papel en la fabricación de biodiesel mediante la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales con alcoholes de cadena corta. Estas enzimas son capaces de catalizar tanto la alcoholisis de los triglicéridos como la esterificación de los ácidos grasos en el mismo reactor, produciendo sólo ésteres y glicerol, que es fácilmente purificable y reduce los costes (Salis y cols., 2007).

La mayor parte de los procesos industriales en los que las lipasas son empleadas funcionan a temperaturas que exceden los 45°C (Klaus, 1998) por lo que requieren la utilización de lipasas termotolerantes. Es por ello que se está dedicando mucho esfuerzo, no sólo a la inmovilización en matrices sol-gel hidrofóbicas y la evolución *in vitro* para tratar de



incrementar su estabilidad y la enantioselectividad, sino también en la búsqueda de enzimas intrínsecamente estables procedentes de organismos termófilos (Lagarde y cols., 2002).

1.4.2 Diferencias entre lipasas y esterasas

Aunque lipasas y esterasas muestran una estructura molecular y un mecanismo de acción semejante, y 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 acilgliceroles con cadenas cortas y ausencia de activación interfacial, presentando un mecanismo clásico de Michaelis-Menten (Hari Krishna y Karanth, 2002), mientras que las lipasas serían aquellas que hidrolizarían acilgliceroles de cadena larga (más de 8 carbonos) y presentarían activación interfacial (Verger, 1997; Jaeger y cols., 1999; Hotta y cols., 2002), aunque la mayoría de las lipasas son perfectamente capaces de hidrolizar sustratos de esterasas (Jaeger y cols., 1999). El hecho de que en la actualidad se conozcan las propiedades bioquímicas de un gran número de esterasas y lipasas posibilita el establecimiento de nuevos criterios para diferenciarlas, como el perfil electrostático (Fojan y cols., 2000), la K_m o la diferente distribución de aminoácidos hidrofóbicos en la vecindad de su sitio activo (Chahinian y Sarda, 2009).

1.4.3 Estructura

Esterasas y lipasas son α/β hidrolasas cuyo patrón de plegamiento viene caracterizado por un núcleo de, al menos, 5 láminas β (típicamente 8) paralelas o antiparalelas flanqueadas en ambas caras por una serie de hélices α . La disposición espacial de las últimas α -hélices varía considerablemente de una lipasa a otra, de manera que la superposición de las estructuras de diferentes enzimas con este tipo de plegamiento, basándose en la zona central de láminas β , generalmente da lugar a un pobre alineamiento de las correspondientes α -hélices (Ollis y cols., 1992).

Su maquinaria catalítica está típicamente formada por la triada Ser-His-Asp (Brady y cols., 1990). Este residuo de Ser está localizado en la zona C-terminal de la lámina β_5 , junto con un pentapéptido altamente conservado GX SXG, formando el motivo característico β -giro- α llamado el codo nucleofílico.

1.4.4 Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico es similar al descrito para las serin proteasas y ocurre en varias etapas (Dodson y Wlodawer, 1998), que incluyen la formación de un complejo acil-enzima y de dos intermediarios tetraédricos. Si en lugar de agua es un alcohol el que realiza el ataque nucleofílico en el intermediario tetraédrico 2, se liberará un éster y, en lugar de la reacción de hidrólisis, se producirá una transesterificación.



1.4.5 Producción de lipasas y esterasas

Tradicionalmente las enzimas lipolíticas fueron obtenidas a partir de plantas y tejidos animales, pero las cantidades eran pequeñas, y no podían ser utilizadas en la industria farmacéutica debido a requerimientos legales (Grunwald, 2009). En la actualidad se obtienen principalmente a partir de bacterias, levaduras y hongos fundamentalmente mediante la aplicación de técnicas fermentativas (Gupta y cols. 2004). Las lipasas de origen microbiano utilizadas son, en general, enzimas inducibles (Lotti y cols., 1998), por lo que la producción natural está muy influenciada por factores como la temperatura, el pH, sales inorgánicas, agitación, concentración de oxígeno disuelto, fuentes de nitrógeno (Brune y Gotz, 1992; Aires-Barros y cols., 1994; Jaeger y cols., 1994; Kim y cols., 1996) y la presencia de lípidos en su medio de cultivo (Ghosh y cols., 1996; Dharmsthiti y Kuhasuntisuk, 1998; Shirazi y cols., 1998; Bradoo y cols., 1999; Rathi y cols., 2001) o la de otras fuentes alternativas de carbono (Ghanem y cols., 2000; Rashid y cols., 2001).

Otra vía para la obtención de este tipo de enzimas es su producción heteróloga (Nthangeni y cols., 2001; Eggert y cols., 2000; Kim y cols., 2000; Rúa y cols. 1998), aunque el plegamiento y la secreción de muchas de estas enzimas son procesos muy específicos que necesitan de la participación de otras proteínas (Jaeger y Reetz, 1998) y normalmente no funcionan correctamente en estos sistemas (Rosenau y Jaeger, 2000).

En los organismos termófilos tradicionalmente se pensaba que estas actividades se daban intracelularmente y en bajos niveles (Lagarde y cols. 2002, Kim y cols., 1997). Sin embargo hoy en día se han descrito niveles significativos de actividad lipolítica extracelular en varios organismos termófilos (Domínguez y cols., 2004). Debido a las dificultades asociadas al cultivo a gran escala de estos organismos, y su escaso rendimiento, una vía alternativa utilizada para la producción de estas esterasas y lipasas es su expresión en organismos mesófilos (Hotta y cols., 2002; Ewis y cols., 2004; Schmidt-Dannert y cols., 1996; Schlieben y cols., 2004; Zhang y cols., 2003; Park y cols., 2006).

1. 5 PENICILÍN ACILASAS

La bencil y la fenoximetil penicilina son productos del metabolismo secundario de algunos hongos y son precursores de una gran variedad de antibióticos semisintéticos. La modificación química de estos productos se inicia con la eliminación del grupo acilo, quedando el núcleo penicilínico de 6-APA al que se le pueden añadir distintos grupos acilos sintéticos con lo que se consigue conferir nuevas propiedades al antibiótico generado (Elander, 2003). El método más utilizado para la obtención de este 6-APA, es la utilización de "penicilín acilasas" (PAC) (Spence y Ramsden, 2007; Arroyo y cols., 2003).



Las penicilín acilasas son miembros de la superfamilia de las nucleófilo hidrolasas N-terminales que comparten una esteroquímica equivalente en el sitio activo, donde el nucleófilo es un residuo de cisteína, de treonina o de serina, y una estructura terciaria común en su dominio catalítico (Brannigan y cols., 1995). Poseen un plegamiento típico que correspondería a una estructura secundaria tipo $\alpha\beta\beta\alpha$, formada por dos láminas β -antiparalelas y recubiertas por una capa de α -hélices a cada lado (Onionen y Rouvinen, 2000). Otra característica importante de esta superfamilia es que sufren un proceso autocatalítico para su activación (Kasche y cols., 1999, Xu y cols., 1999; Guan y cols., 1996). Estas penicilín acilasas se pueden encontrar en un amplio número de organismos tanto de bacterias, actinomiceto, levaduras y hongos (Sudhakaran y Borkar, 1985a, b) y pueden ser periplásmicas, en el caso de Gram-negativas (*E. coli*, *K. citrophila*, *P. rettgeri* o *A. faecalis*), secretadas al medio extracelular en el caso de Gram-positivas (*B. megaterium* o *A. viscosus*) e incluso intracelulares (*Bacillus* spp.) (Arroyo y cols., 2003; Parmar y cols., 2000).

Basándonos en su especificidad de sustrato se suelen subdividir generalmente en 3 grupos, las penicilina G acilasas, que hidrolizan preferentemente penicilina G (o bencilpenicilina); las penicilina V acilasas, que hidrolizan preferentemente penicilina V y las ampicilín acilasas, que hidrolizan específicamente ampicilina, aunque se debe tener en cuenta la posibilidad de aparición de nuevos grupos que diversifiquen esta división (Arroyo y cols., 2003; Torres-Guzmán y cols., 2002; McVey y cols., 2001; Torres y cols., 1999;).

1.5.1 Penicilín G acilasa (PGA)

Las penicilinas G acilasas (penicilín amidohidrolasas, EC 3.5.1.11), fueron descubiertas en el año 1960 (Claridge y cols., 1960; Huang y cols., 1960; Bauer y cols., 1960; Rolinson y cols., 1960) y desde entonces han sido descritas en una amplia variedad de especies de microorganismos, incluidos *E. coli* (Cole, 1969), *Alcaligenes faecales* (Verhaert y cols., 1997) *Actinomyces viscosus* (Ohashi y cols., 1989) o *Kluyvera citrophila* (Álvaro y cols., 1992) entre otros. Estas enzimas han sido utilizadas comercialmente para hidrolizar el grupo acilo de la penicilina G, su sustrato principal, o de la cefalosporina G, para dar ácido 6-aminopenicilánicos o ácido 7-amino-sesactoxicefalosporánicos, respectivamente, dos precursores en la producción industrial de derivados β -lactámicos (Fig. 1.4) (Arroyo y cols., 2003; Elander, 2003; Zaks, 2001). Pero aparte de estos dos sustratos primordiales, una gran variedad de aminoácidos fenilacetilados y péptidos pueden ser utilizados como sustratos para la PGA (Ferrero y cols., 1991; Cole 1969 a-d; Cole y cols., 1975; Kaufman 1964; Kaufmann y Bauer 1964; Lucente y cols., 1964).

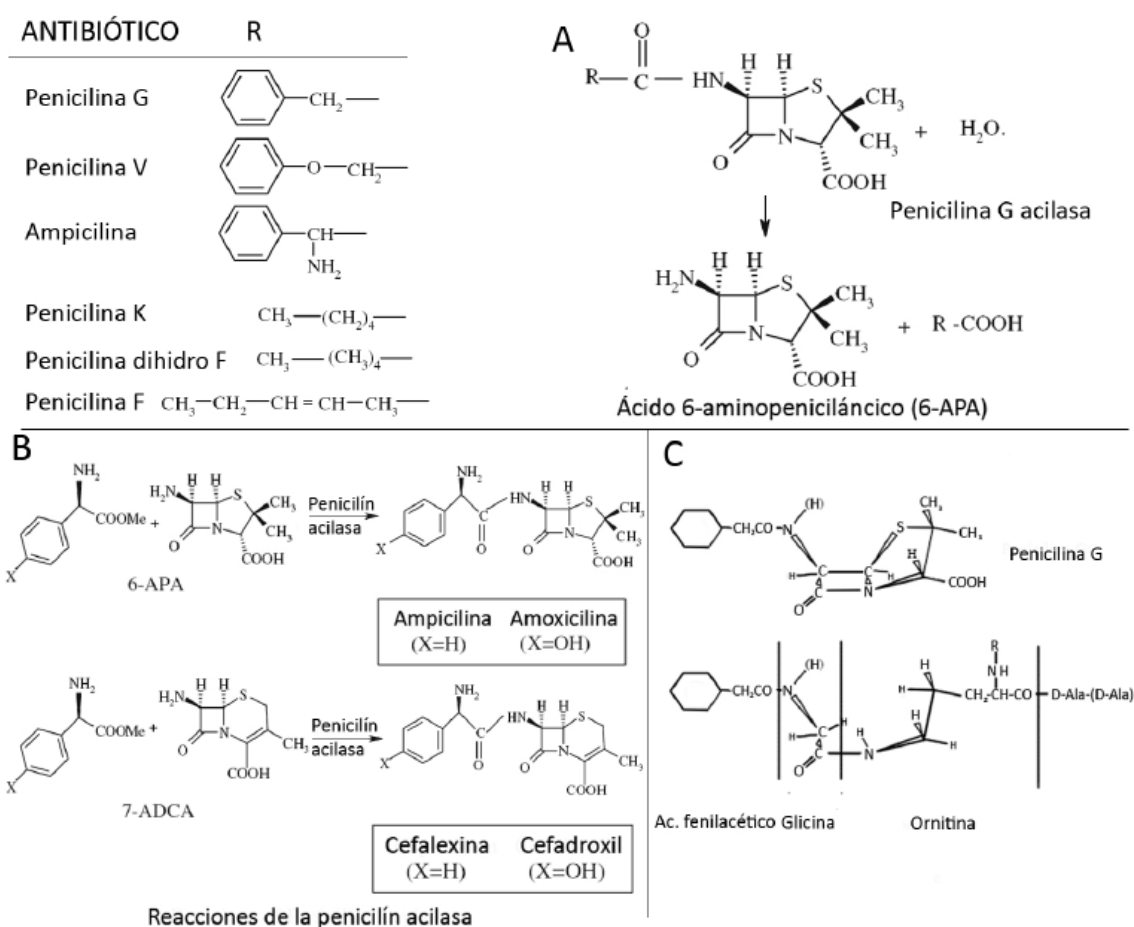


Figura 1. 4 Clasificación de las penicilín acilasas. (A) Hidrólisis de la penicilín G acilasa para dar 6-APA. **(B)** Mecanismo de condensación del anillo betalactámico para producir enzimáticamente antibióticos β -lactámicos semisintéticos (Spence y Ramsden, 2007). **(C)** Comparación entre la estructura de la penicilina G y los residuos de ácido fenilacético, glicina y ornitina del peptidoglicano de *T. thermophilus* (Quintela y cols., 1995).

1.5.1.1 Procesamiento y maduración de la penicilín acilasa de *E. coli*.

Para que la penicilín acilasa de *E. coli* llegue a ser una proteína madura y activa, ha de sufrir un complejo procesamiento postraduccional muy similar al que ocurre en la preproinsulina y otras hormonas de organismos eucariotas (Bruns y cols., 1985), pero que no es muy común en bacterias. La enzima se traduce como un solo precursor con 4 dominios estructurales: un péptido señal y dos subunidades separadas por un péptido espaciador. El péptido señal dirige la Pre-pro-enzima a la membrana citosólica donde es translocada al periplasma mediante el sistema Tat (Ignatova y cols., 2002), para lo que la presencia de un ión Ca^{2+} coordinado por residuos de ambas subunidades (Kasche y cols., 2005; Hewitt y cols., 2000) se antoja fundamental para estabilizar la interfase entre ambas cadenas (Ignatova y cols., 2005; Kasche y cols., 2005).



1. INTRODUCCIÓN

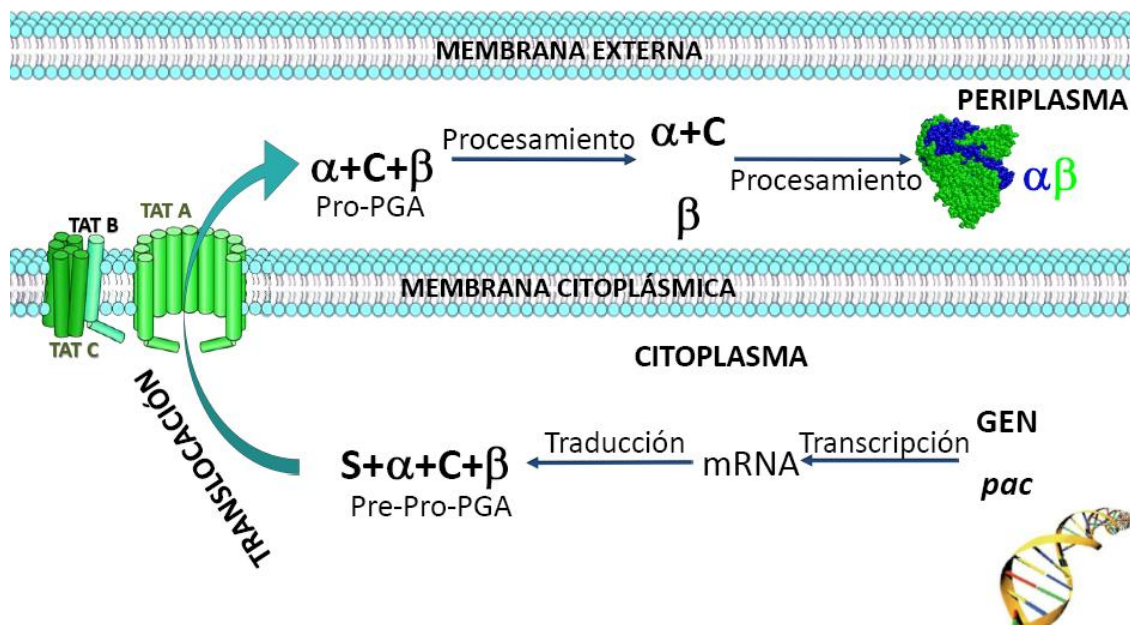


Figura 1. 5 Esquema del procesamiento que sufre la PGA de *E. coli* hasta llegar a ser una enzima madura en el periplasma. S: Péptido señal, α : Subunidad α de la PGA, C: Péptido espaciador, β : Subunidad β de la PGA.

La autoproteólisis dentro de la enzima es un proceso que ocurre durante la translocación o inmediatamente tras esta (Ignatova y cols., 1998; Hewitt y cols., 2000). El primer paso es muy rápido, produciéndose un corte que libera la subunidad β (Kasche y cols., 1999; Ignatova y cols., 2005) y el residuo de Serina N-terminal (Duggleby y cols., 1995), dejando la subunidad α unida al espaciador. El siguiente es un proceso lento intra e inter molecular que ocurre en el periplasma y en el que se produce un acortamiento secuencial del péptido espaciador desde su C-Terminal (Kasche y cols., 1999) produciendo diversos intermediarios de transición (Kasche y cols., 2003), hasta liberar la subunidad α .

Este procesamiento tiene ciertos requerimientos: una zona carboxilo terminal intacta, un péptido espaciador del tamaño adecuado, la integridad de los 3 residuos que preceden al sitio de corte en la enzima (Choi y cols., 1992), además de ciertas regiones de la subunidad β (Sizmann y cols., 1990), como la Ser catalítica (Kim y Kim 2001; Duggleby y cols., 1995). El péptido espaciador entre las cadenas α y β , además de ser necesario para este procesamiento, bloquea el acceso al sitio activo y es necesario para el correcto plegamiento de la proteína (Ignatova y cols., 2005). Al existir una íntima relación entre la actividad enzimática y el procesamiento del prepéptido, se ha dado la circunstancia de que la mayoría de los intentos por alterar los residuos del sitio activo, dan lugar a defectos en el procesamiento (McVey y cols., 2001).

1.5.1.2 La enzima madura

La PGA presenta una estructura piramidal en la que las dos subunidades se encuentran muy entrelazadas y unidas entre sí por fuerzas no covalentes (McVey y cols.,



2001), con una profunda depresión central al fondo de la cual se localiza el centro activo. El sitio de unión al sustrato está formado por residuos hidrofóbicos de ambas subunidades y define la especificidad por el grupo fenilacetilo de la penicilina G (Alkema y cols., 2002a y b). Mediante estudios de mutagénesis, modificación química y modelado molecular se han identificado los residuos que tienen mayor importancia en la actividad catalítica de la enzima, tanto para la unión al sustrato (Phe β 57, Phe β 47, Ser β 67, Arg α 145 y Arg β 263) como el residuo catalítico (Ser β 1) (Guncheva y cols, 2004; Morillas y cols., 2003; Alkema y cols. 2002a y b; Alkema y cols., 2000; Onionen y Rouvinen, 2000).

1.5.1.3 Mecanismo catalítico de la penicilín G acilasa

Este mecanismo, muy similar al de las lipasas y las serin proteasas (van Rantwijk y Sheldon, 2004), implica la formación de un intermediario acil-enzima que corta el enlace amida de su sustrato a través de un ataque nucleofílico realizado por el O γ de la Ser N-terminal de su subunidad β (Duggleby y cols., 1995; McVey y cols., 2001). El grupo hidroxilo de la Ser del extremo amino de la subunidad β es activado mediante un puente de hidrógeno, por su propio grupo α -amino. El oxígeno de la Ser reacciona con el átomo de carbono del grupo acilo del sustrato, formando un tetraedro intermediario estabilizado a través de puentes de hidrógeno con los residuos Asn β 241 y Ala β 69 (hueco oxianiónico) (Peräkylä y Kollman, 1997; Peräkylä y Rouvinen, 1996). El reagrupamiento electrónico provoca el colapso del intermediario dando lugar a la liberación del grupo saliente y al acil enzima. Seguidamente, la enzima es deacilada por un nucleófilo liberando la enzima y el producto de acilación del nucleófilo (Duggleby y cols., 1995). En el caso de que el nucleófilo presente sea el agua, la hidrólisis del antibiótico dará lugar al núcleo libre junto con el ácido carboxílico de la cadena lateral. Sin embargo, si en la reacción está presente como donador de acilo un sustrato activado (éster o amida), el ataque nucleofílico originará un antibiótico semisintético.

1.5.1.4 Regulación y papel metabólico

La síntesis de la PAC es, probablemente, uno de los más mecanismos complejos para enzimas bacterianas descritos hasta la fecha, sujeto a sofisticados controles tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional (Gang y Shaikh, 1976; Hewitt y cols., 2000; Merino y cols., 1992; Rao y García 1999; Stojcevic y cols., 2001). Hay 3 mecanismos fundamentales implicados en su regulación: inducción por ácido fenilacético, represión catabólica, y termorregulación. En *E. coli*, el gen *pac*, se encuentra localizado cerca de un agrupamiento de genes que codifica la vía de degradación del ácido 3 y 4-hidroxifenilacético (Díaz y cols., 2001; Prieto y cols., 1996) y su expresión está regulada por el represor Paax de la vía catabólica del fenilacetato, dependiendo de la síntesis de fenilacetil coenzima A, el primer intermediario de la vía catabólica del ácido fenilacético (Galán y cols., 2004). Dentro del gen *pac* hay un gen regulador *pacR* que se transcribe en la dirección opuesta a él, cuyas mutaciones provocan una expresión constitutiva, no dependiente de ácido fenilacético (Dai y



1. INTRODUCCIÓN

cols., 2001). Además el gen *pac* está sujeto a represión catabólica por glucosa, en una vía que incluiría la acción de la proteína de unión a AMP cíclico (CAP, CRP), que también estaría involucrada en su activación por Ácido fenilacético (Valle y cols., 1986; Rao y García, 1999).

La temperatura representa otro elemento de control de la actividad penicilín acilasa que es detectable cuando la bacteria crece entre 20 y 30°C, pero no por encima de esas temperaturas (Savidge y Cole, 1975), debido a un proceso proteolítico (Oh y cols., 1987) y a un plegamiento incorrecto (Lindsay y Pain, 1991), más que a una regulación a nivel transcripcional, ya que, aunque el gen se transcribe, no da lugar a enzima activa (Dai y cols., 2001).

Aunque el papel de esta enzima en la bacteria aún no está claro, se ha sugerido su función como “carroñeros” metabólicos para compuestos naturales que contuvieran un residuo de fenilacetato o hidroxifenilacetato unido con enlace éster o amida, para utilizar como fuente de carbono (Merino y cols., 1992; Valle y cols., 1991). Tampoco se descarta la posibilidad de su implicación en mecanismos de “Quórum quenching”, degradando N-acil homoserín lactonas, las principales moléculas implicadas en “Quórum sensing” en Gram-negativas (Miller y Bassler, 2001). Muchos patógenos utilizan el “Quórum sensing” para regular su virulencia, por lo que resultan obvias las implicaciones de estas enzimas en el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas (Bokhove y cols., 2010; Martin y cols., 2008; Molina y cols., 2003).

1.5.1.5 Interés industrial

Para hacernos una idea de lo que representan estos antibióticos β -lactámicos, basta indicar que suponen un porcentaje del 65% de todo el mercado de antibióticos a nivel mundial (Chandel y cols. 2008; Elander, 2003). En un principio el proceso de producción de la PGA no era muy rentable, la productividad era muy baja y el biocatalizador era desechado tras su uso, por lo que pronto ese proceso fue sustituido por un método químico para la obtención del 6-APA. Mediante recientes avances en biotecnología, búsqueda en nuevos microorganismos o la manipulación de la PGA y modificaciones del proceso de fermentación, se ha conseguido una mayor rentabilidad en la producción de la enzima, además de una mejora en su resistencia y la actividad lo que, unido a una inmovilización que permite el reciclado del catalizador, permitió que el proceso de hidrólisis enzimática de la penicilina G comenzara a desplazar al químico (Van De Sandt y De Vroom, 2000).

La PGA es una enzima versátil que puede utilizarse en numerosas reacciones de interés en química orgánica:

- Resolución de mezclas racémicas de compuesto quirales, incluyendo alcoholes secundarios, aminoácidos, β -amino ésteres y aminas, mediante reacciones enantioselectivas de hidrólisis o síntesis (Rocchietti y cols., 2002; Roche y cols., 1999; Van Langen y cols., 2000).



- Acilación inespecífica de nucleófilos (Basso y cols., 2001).
- Protección y deprotección de grupos amino de aminoácidos para síntesis de péptidos y otras aplicaciones (Didziapetris y cols., 1991).
- Síntesis de derivados de penicilinas y cefalosporinas (Arroyo y cols., 2003; Wegman y cols., 2002).

Pero una de las funciones que posee esta enzima y que le da una importancia fundamental es su capacidad de catalizar la síntesis de antibióticos por condensación del núcleo β -lactámico con el donador acil adecuado (Gabor y cols., 2005). El principal obstáculo en la síntesis cinéticamente controlada es que viene acompañada tanto de la hidrólisis del donador acilo como del producto. La eficacia del proceso vendría pues determinada por la razón síntesis/hidrólisis (Bruggink y cols., 1998).

Si bien la PGA de *E. coli* se utiliza actualmente a escala industrial en la hidrólisis de penicilina G o de cefalosporina G, la productividad del biocatalizador aumentaría si se pudiese mejorar la estabilidad de la enzima, especialmente en reacciones de condensación (Giordano y cols., 2006; Parmar y cols., 2000). Encontrar una proteína termófila homóloga supondría un gran avance, ya que el aumento de la temperatura haría posible incrementar la velocidad de reacción y desplazar los equilibrios termodinámicos, permitiendo, además, el uso de codisolventes orgánicos, que resultan fundamentales para favorecer el desplazamiento del equilibrio de la reacción (Gololobov y cols., 1992).

1.5.1.6 Actividad penicilín acilasa en *Thermus thermophilus*

En el peptidoglicano de *T. thermophilus* sorprende una proporción bastante significativa de muropéptidos con ácido fenilacético (alrededor del 23%), que aumenta al incrementar la temperatura de crecimiento de 60 a 70°C, pero no se ve influenciada por la adición de ácido fenilacético en el medio, lo que implica que su proporción está regulada por la célula (Quintela y cols., 1995). Este muropéptido pentapeptídico con ácido fenilacético unido a la cadena lateral presenta una gran similitud estructural con una hipotética penicilina doble (Fig. 1.4C).

La presencia de ácido fenilacético plantea inmediatamente el problema de su incorporación al peptidoglicano. En principio, cabrían dos posibilidades: que se produzcan precursores con ácido fenilacético que se incorporen al peptidoglicano por la ruta biosintética normal, o que tenga lugar una incorporación postinsercional a partir de un precursor que se pueda exportar al espacio periplásmico para ser sustrato de un sistema enzimático que podría incluir una enzima con actividad penicilina acilasa. El rastreo mediante herramientas bioinformáticas del genoma de *T. thermophilus* HB27, dio como resultado el descubrimiento de un gen con homología de secuencia con penicilín acilasas de distintos microorganismos. Posteriores experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que, aunque la



1. INTRODUCCIÓN

inactivación de este gen no afectaba a la composición en fenilacético del peptidoglicano, tenía una baja actividad enzimática sobre la penicilina G cuando se expresaba en *E. coli*, resultando como producto de esta reacción la aparición de ácido fenilacético (Moreno R., 2004). A esta enzima la denominamos PAC y ha sido objeto de estudio en esta tesis.

OBJETIVOS



Los organismos termófilos están cobrando gran interés en la última década por las especiales características que presentan sus enzimas y que las convierten en importantes biocatalizadores con gran potencial biotecnológico.

Es por esto que uno de los principales objetivos de este trabajo residía en la identificación y producción de enzimas de origen termófilo, con potencial interés biotecnológico, en concreto las producidas por *Thermus thermophilus* HB27:

- 1-** Localización en el genoma de *Thermus thermophilus* HB27 de enzimas con potencial actividad glicosidasa y esterasa/lipasa, para su sobreproducción, purificación en *E. coli*.
- 2-** Sobreexpresión de estos genes en *Thermus thermophilus* HB27 y *Streptomyces lividans*.
- 3-** Ensayar y caracterizar preliminarmente las enzimas producidas
- 4-** Estudio de la inducibilidad de la actividad glicosidasa en respuesta a disacáridos y del mecanismo de regulación de las actividades más interesantes.
- 5-** Caracterización de la expresión de la PAC de *T. thermophilus*.



2. OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS



3. 1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Cepas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. 1 Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

ESTIRPE	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.</i>	Hanahan, 1983.
<i>E. coli</i> InV α F'	F' <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA</i>	Invitrogen.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λcl^{ts}857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 Gene1)</i>	Rosenberg y cols., 1987.
<i>E. coli</i> BL21 (C41)	Mutante procedente de BL21 (DE3)	Miroux y Walker, 1996.
<i>E. coli</i> BL21 (C43)	Mutante procedente de BL21 (DE3)	Miroux y Walker, 1996
<i>T. thermophilus</i> HB27	Cepa aerobia Silvestre	Cedida por el Dr. Koyama.
<i>T. thermophilus</i> HB27c	HB27 Cm ^r ::nar	Ramírez-Arcos y cols., 1998.
<i>T. thermophilus</i> HB27ΔPAC	Mutante de delección en TTC1972	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> PAC:KAT	Mutante de inserción de TTC1972	Tesis doctoral Renata Moreno, 2004.
<i>T. thermophilus</i> NAR1 ΔSlpA	Mutante de delección en <i>SlpA</i>	Castán y cols., 2002
<i>T. thermophilus</i> 42:KAT	Mutante de inserción TTP0042:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 41:KAT	Mutante de inserción TTP0041:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 40:KAT	Mutante de inserción TTP0040:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 39:KAT	Mutante de inserción TTP0039:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 38:KAT	Mutante de inserción TTP0038:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 72:KAT	Mutante de inserción TTP0072:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 220:KAT	Mutante de inserción TTP0220:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 222:KAT	Mutante de inserción TTP0222:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> 107:KAT	Mutante de inserción TTC0107:: <i>Kat</i>	Este trabajo.
<i>T. thermophilus</i> NAR1	Silvestre. Elemento NCE. Facultativo.	Cava y cols., 2007.
<i>S. lividans</i> JI66(DSM 46482)	Cepa silvestre SLP2 ⁺ SLP3 ⁺	Kieser y cols., 2000.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.2 Plásmidos

3.1.2.1 En la siguiente tabla se resumen los principales plásmidos, heredados de otras investigaciones, que fueron utilizados en la realización de este trabajo.

Tabla 3. 2 Plásmidos conseguidos de otras investigaciones.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN
pGEMT	Amp ^r , <i>plac-lacZ'</i> Promotores T7 y Sp6. Vector de clonaje de productos de PCR.	Promega.
PCR2.1	Amp ^r , Kan ^r , <i>plac-lacZ'</i> Promotores T7 y Sp6. Vector de clonaje de productos de PCR.	Invitrogen.
pUC18/19	Amp ^r , <i>plac-lacZ'</i> Vector de clonaje.	Vieira y Messing, 1982.
pUC118/119	Amp ^r , <i>plac-lacZ'</i> Vector de clonaje.	Vieira y Messing, 1982.
pBluescriptKS	Amp ^r , <i>plac-lacZ'</i> Vector de clonaje. Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR.	Stratagene.
pET22b(+)	Amp ^r , expresión de genes. Dependiente de la RNA polimerasa de T7. Permite la adición de una etiqueta de 6 histidinas en la zona Carboxilo terminal de la proteína.	Novagen.
pET28b(+)	Kan ^r , expresión dependiente de la RNA polimerasa de T7. Fusión con una etiqueta de 6 Histidinas en amino terminal.	Novagen.
pK18	Kan ^r . pUC118 modificado para sustituir la resistencia a ampicilina por kanamicina.	Fernández-Herrero (datos de laboratorio).
pWUR112/77-1	Bleo ^r . Vector de expresión constitutiva desde el promotor <i>PslpA</i> . Modificación del pMK18 en el que se ha eliminado el cassette de resistencia a kanamicina, sustituyéndolo por la resistencia a bleomicina.	Brouns y cols., 2005.
pMH184	Hyg ^r . Derivado del plásmido pMK184. El gen de resistencia frente a higromicina (<i>hph5</i>) sustituye al <i>kat</i> (<i>NdeI-BglII</i>).	Cava y cols., 2007.
pMKsGFP	Kan ^r . Vector derivado de pMK18 que expresa la forma termoestable de la GFP (<i>sgfp</i>) bajo el control del promotor <i>PslpA</i> .	Cava y cols., 2007.
pMKPnqosGFP	Derivado de pMKPnqobgaA por inserción del gen que codifica sGFP en sustitución de <i>bgaA</i> , clonado a <i>NdeI/HindIII</i> .	Cava y cols., 2007.
pMKEβGAL	Derivado de pMKE por inserción del gen <i>bgaA</i> , para su expresión controlada por <i>Pnar</i> en <i>Thermus</i> . Gen testigo citoplásmico.	Moreno y cols., 2003.
pMKE2	Kan ^r , promotor de la nitrato reductasa de <i>T. thermophilus</i> NAR1 (<i>Pnar</i>). Plásmido bifuncional capaz de replicarse en <i>E. coli</i> y distintas especies de <i>Thermus</i> , y permite la expresión controlada de genes heterólogos en <i>T. thermophilus</i> . Incluye posibilidad de fusión traduccional en el extremo amino terminal.	Moreno y cols., 2003.



pIJ702	Tsr ^r , mel ⁺ , vector de clonaje para <i>Streptomyces lividans</i>	Katz y cols., 1983.
--------	---	---------------------

3.1.2.2 En la siguiente tabla se resumen los principales plásmidos construidos durante la realización de este trabajo.

Tabla 3. 3 Plásmidos construidos durante la realización de este trabajo.

NOMBRE	MARCADORES/ORIGEN/CONSTRUCCIÓN/USO	DESCRIPCIÓN
pTTP0042	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTP0042 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para su expresión en <i>E. coli</i> con una cola de 6 histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.5
pXTGAL1	Construido a partir del vector pIJ702 mediante la inserción del gen TTP0042 bajo el control del promotor de la xilanasasa <i>xysA</i> (<i>xysAP</i>).	Fig. 4.31
pET28-72	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTP0072 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para su expresión en <i>E. coli</i> con una cola de 6 histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.4
pET28-107	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC0107 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para su expresión en <i>E. coli</i> con una cola de 6 histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.3
pET22-107	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC0107 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.1.3
pET28-220	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTP0220 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.2
pET22-220	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTP0220 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.1.2
pET22-221	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTP0221 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.1.2
pET28-221	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTP0221 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.2
pET28-222	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTP0222 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.2
pET22-222	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTP0222 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.1.2
pET22-552	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC0552 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.6.1



3. MATERIALES Y MÉTODOS

pET28-552	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC0552 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.6.1
pET22-904	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC0904 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.6.2
pET28-904	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC0904 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.6.2
pET28-1198	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1198 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.1
pET28-1283	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1283 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.1
pET22-1341	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC1341 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.6.3
pET28-1341	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1341 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.6.3
pET22-1494	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC1494 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.6.4
pET28-1494	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1494 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.6.4
pET22-1787	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC1787 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.6.5
pET28-1787	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1787 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.6.5
pET22-1828	Construido a partir del pET22b(+) por inserción del gen codificante de TTC1828 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión de la forma nativa de la proteína en <i>E. coli</i> .	Sección 4.1.1
pET28-1828	Construido a partir del pET28b(+) por inserción del gen codificante de TTC1828 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> para la expresión en <i>E. coli</i> con una cola de histidinas en la región amino terminal de la proteína.	Sección 4.1.1
pET22-38NS	Construido a partir del pET22b(+) por la inserción del gen codificante de TTP0038, clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , sin el codón de terminación, para introducir una etiqueta de histidinas en carboxilo terminal.	Sección 4.5.4
pWUR-38	Construido a partir del pWUR por la inserción del gen TTP0038 con una RBS, clonado a <i>XbaI/EcoRI</i> .	Sección 4.5.3
pMKE2-42	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTP0042 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la	Fig. 4.28



	proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	
pMKE2-107	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTC0107 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKE2-220	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTP0220 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKE2-221	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTP0221 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKE2-222	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTP0222 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKE2-1198	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTC1198 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKE2-1283	Construido a partir del pMKE2 por la inserción del gen codificante de TTC1283 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la proteína con una cola de histidinas en la región amino terminal.	Fig. 4.28
pMKPnqo-72	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTP0072 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-107	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTC0107 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-220	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTP0220 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-221	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTP0221 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-222	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTP0222 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-1198	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTC1198 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pMKPnqo-1828	Construido a partir del pMKPnqo por la inserción del gen codificante de TTC1828 clonado a <i>NdeI/HindIII</i> , para la expresión en <i>Thermus</i> de la forma nativa de la proteína.	Fig. 4.28
pK18 Δ PAC	Construido a partir del pK18 con las regiones anterior y posterior del gen <i>pac</i> de <i>T. thermophilus</i> . Utilizado para la consecución de un mutante de delección en esa proteína.	Fig. 4.75
pMKEP β GLIC	Construido a partir del pMKE β GAL por la sustitución de la β -galactosidasa por la β -glucosidasa TTP0042 y del promotor <i>Pnar</i> por PI.	Fig. 4.41



3. MATERIALES Y MÉTODOS

	Utilizado como intermediario para construir el vector pMHP1βGLIC.	
pMKPEIβGLIC	Construido a partir del pMKEβGAL por la sustitución de la β-galactosidasa por la β-glicosidasa TTP0042 y del promotor <i>Pnar</i> por PII. Utilizado como intermediario para construir el vector pMHP1βGLIC.	Fig. 4.41
pMKPEIIIβGLIC	Construido a partir del pMKEβGAL por la sustitución de la β-galactosidasa por la β-glicosidasa TTP0042 y del promotor <i>Pnar</i> por PIII. Utilizado como intermediario para construir el vector pMHP3βGLIC.	Fig. 4.41
pMHP1βGLIC	Construido a partir del pMH184 por la inserción del promotor PI controlando la expresión de la enzima TTP0042. Utilizado para probar la expresión de la enzima de una forma regulada por celobiosas	Fig. 4.41
pMHP2βGLIC	Construido a partir del pMH184 por la inserción del promotor PII controlando la expresión de la enzima TTP0042. Utilizado para probar la expresión de la enzima de una forma regulada por celobiosas	Fig. 4.41
pMHP3βGLIC	Construido a partir del pMH184 por la inserción del promotor PIII controlando la expresión de la enzima TTP0042. Utilizado para probar la expresión de la enzima de una forma regulada por celobiosas	Fig. 4.41
pK18MUT42	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0042, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT41	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0041, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT40	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0040, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT39	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0039, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT38	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0038, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT72	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0072, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT220	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0220, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT222	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTP0222, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pK18MUT107	Construido a partir del pK18, insertando el fragmento central del gen TTC0107, para conseguir un mutante de inserción del mismo en la cepa HB27 de <i>T. thermophilus</i> .	Fig. 4.34
pWURPAC	Construido a partir de pWUR, por inserción del gen <i>pac</i> clonado a <i>XbaI/EcoRI</i> , junto con una RBS.	Fig. 4.78



pWUR Δ SP	Construido a partir de pWUR por inserción del gen <i>pac</i> sin su péptido señal, clonado a <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI, junto con una RBS.	Fig. 4.78
pWURL279F	Construido a partir de pWURPAC mutando la leucina 279 por fenilalanina dentro del gen <i>pac</i> .	Fig. 4.78
pWUR2MUTPAC	Construido a partir de PWURPAC mutando dos residuos en el gen <i>pac</i> . L279F e I312F.	Fig. 4.78
pMKPnqo-HPAC	Construido a partir del plásmido pMKPnqosGFP, mediante la sustitución del gen <i>sgfp</i> por el híbrido con el péptido señal de la <i>pac</i> de <i>E. coli</i> y la <i>pac</i> de <i>T. thermophilus</i> HB27 sin el péptido señal.	Fig. 4.72 Sección 4.7.4
pET22 α PAC	Construido a partir del pET22b+, insertando el fragmento α del gen <i>pac</i> con las dianas <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI, para su expresión en <i>E. coli</i> .	Sección 4.7.1
pET22 β PAC	Construido a partir del pET22b+, insertando el fragmento β del gen <i>pac</i> con las dianas <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI, para su expresión en <i>E. coli</i> .	Sección 4.7.1
pET28 α PAC	Construido a partir del pET28b+, insertando el fragmento α del gen <i>pac</i> con las dianas <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI, para su expresión en <i>E. coli</i> .	Sección 4.7.1
pET28 β PAC	Construido a partir del pET28b+, insertando el fragmento β del gen <i>pac</i> con las dianas <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI, para su expresión en <i>E. coli</i> .	Sección 4.7.1
pWUR Δ 10PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 10 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 20PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 20 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 30PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 30 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 40PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 40 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 60PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 60 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 80PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 80 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pWUR Δ 100PAC	Construido a partir del pWUR insertando el gen <i>pac</i> con una deleción de 100 aa en la región carboxilo terminal. Se utilizó para complementar el mutante HB27 Δ PAC.	Fig. 4.74 Sección 4.7.5
pMK-42sGFP	Construido a partir del pMKPnqosGFP por inserción del gen TTP0042 de <i>T. thermophilus</i> HB27 a <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI.	Fig. 4.65
pMK-SPsGFP	Construido a partir del pMKPnqosGFP por inserción del péptido señal de la penicilín acilasa de <i>T. thermophilus</i> HB27 a <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI.	Fig. 4.65



3. MATERIALES Y MÉTODOS

pMK-PACsGFP	Construido a partir del pMKPnqosGFP por inserción de la penicilín acilasa de <i>T. thermophilus</i> HB27 a <i>NdeI/EcoRI</i> .	Fig. 4.65
pMK-ΔSPsGFP	Construido a partir del pMKPnqosGFP por inserción de la penicilín acilasa de <i>T. thermophilus</i> HB27 sin péptido señal a <i>NdeI/EcoRI</i> .	Fig. 4.65

3.1.3 Antisueros

Para la detección de proteínas durante la realización de este trabajo, fue necesario recurrir a técnicas de inmunodetección. En la siguiente tabla se resumen los antisueros utilizados en este trabajo.

Tabla 3. 4 Antisueros utilizados.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra, anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano. Anticuerpo secundario en Western-blot.	Biorad.
GAM-HRP	Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Usado como anticuerpo secundario en Western-blot.	Biorad.
HIS PROBE	Anticuerpo policlonal de conejo contra etiqueta de histidinas, utilizado en ensayos de Western-blot.	Santa Cruz Biotechnology.
α PAC	Anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad α de la penicilín acilasa desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> . Utilizado en ensayos de Western-blot.	Este trabajo.
β PAC	Anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad β de la penicilín acilasa desnaturalizada de <i>T. thermophilus</i> . Utilizado en ensayos de Western-blot.	Este trabajo.
α -DrpA	Anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína DrpA de <i>T. thermophilus</i> NAR1.	Datos de laboratorio.
α -nqo1	Anticuerpo policlonal contra la subunidad 1 de la NDH periplásmica tipo I (Nqo) de <i>T. thermophilus</i> .	Cedido por el Dr. Yano.
α -nqo6	Anticuerpo policlonal contra la subunidad 6 de la NDH periplásmica tipo I (Nqo) de <i>T. thermophilus</i> .	Cedido por el Dr. Yano.
α -GFP	Anticuerpo monoclonal contra proteína GFP de <i>Aqueorea victoria</i> utilizado en ensayos de Western-blot.	Invitrogen.
α -SlrA	Anticuerpo monoclonal utilizado en la inmunodetección de la proteína SlrA de <i>T. thermophilus</i> NAR1 mediante Western blot.	Fernández-Herrero, 1997.



3. 2 MATERIAL QUÍMICO Y BIOLÓGICO

3.2.1 Tampones y otras soluciones

La composición y la utilidad de los principales tampones usados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3. 5 Tampones y otras soluciones utilizados.

NOMBRE	COMPOSICIÓN	UTILIDAD
Tampón TAE 1x	Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM.	Electroforesis en geles de agarosa.
Tampón TE 1x	Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM.	Lavado de extractos celulares.
Tampón de carga Laemmli 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 carga 5X para nativo	Tris-HCl 300 mM pH 6.8, glicerol 50%	Carga de muestras en geles de retardo.
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 semisecco.
Tampón de stripping	62'5 mM Tris-HCl pH 6'7, 100 mM de β mercaptoetanol, 2% SDS	Eliminar interacción anticuerpo proteína en membrana.
Solución de revelado	1.25 mM Luminol, 36 μ M Luciferina y 0.022% H_2O_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 DNA 10X	TAE 10X, glicerol 30%, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol FF.	Preparación de muestras para electroforesis de DNA.
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 DNasas.	Eliminación de RNA de muestras.
TES	Tris 25 mM pH 7.5, sacarosa 50 mM, EDTA 5 mM.	Lavado de células, purificación de DNA genómico.
LE	Tris-HCl 50 mM pH 8, 25 mM NaCl, 25 mM EDTA	Lavado y resuspensión de extractos celulares.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

TS 1x	Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5.	Lavado de células.
TBE 5X	Tris 0'45 M, Ácido bórico 0'45 M, EDTA(Na ₂) 12'5 M	Geles de retardo.
Tampón de unión	HEPES 20 mM pH 7.0, 50 mM NaCl, 1mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0'1 mg/ml BSA.	Interacción DNA-Proteína en ensayos de retardo.
Tampón Z 1x	Tampón fosfato pH 7, KCl 10 mM, MgSO ₄ 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM.	Actividad galactosidasa.
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.
Tampón de lisis	Fosfato 50 mM pH7.0, 200 mM NaCl, inhibidores de proteasas, lisozima.	Ruptura de bacterias para purificación de proteínas.
Tampón de lavado	Fosfato 50 mM pH7.0, 300 mM NaCl, inhibidores de proteasas, lisozima, 20 mM Imidazol.	Eliminación de interacciones inespecíficas en la columna de Níquel.
Tampón de Elución	Fosfato 50 mM pH7.0, 300 mM NaCl, inhibidores de proteasas, lisozima, 200 mM Imidazol.	Liberar la proteína de la columna de Níquel.
Solución I de minipreps	Tris 25 mM pH7.5, Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM.	Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina
Solución II de minipreps	NaOH 0,2 M, 1% SDS.	Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina
Solución III de minipreps	3 M de Acetato potásico, 0,5 M ácido acético glacial	Purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina
Tampón P	Tampón complejo compuesto de varias sales y sacarosa (Okanishi y cols., 1974; Hopwood y Wright 1978).	Generación de protoplastos en <i>Streptomyces</i> .
Tampón T	Tampón complejo compuesto de varias sales, sacarosa y polietilenglicol (Thompson y cols., 1982).	Transformación de protoplastos de <i>Streptomyces</i> .
R2YE	Medio complejo descrito por Thompson y cols. En 1980.	Crecimiento de <i>Streptomyces</i> .
YES	Extracto de levadura 1%, glucosa 10,3%, 5 mM MgCl ₂ (Ruiz-Arribas y cols., 1995).	Expresión de proteínas en <i>Streptomyces</i> .



3. 3 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1 Condiciones de crecimiento y conservación de estirpes bacterianas

T. thermophilus fue crecido a 60 ó 70°C en medio TB (tripticasa BBL 8g/l, extracto de levadura Gibco 4 g/l y NaCl 3 g/l, pH7.5) (Fernández-Herrero, 1995a). El crecimiento en aerobiosis fue realizado en matraces rellenos con medio de cultivo hasta 1/5 de su capacidad con una agitación de 150 rpm. Para su crecimiento en medio sólido se añadió agar (Pronadisa) a una concentración de 1.5% p/v, y se incubaron las placas a la temperatura indicada, en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del medio.

Para la realización de los ensayos de inducibilidad de glicosilasas mediante azúcares y los ensayos de actividad de los promotores, se utilizó el medio TB diluido 1/8 o 1/5 en agua milli-Q estéril, y con 0,2% de cada azúcar probado o glucosa para la realización de los controles. Para la sobreexpresión de proteínas bajo el control del promotor *Pnar* (en pMKE2), se añadió al medio 40 mM final de KNO₃, y se paró la agitación del cultivo durante un periodo de tiempo que osciló entre 4 y 16 horas.

E. coli fue crecido a 37°C en LB (Lennox, 1955) líquido en matraces o tubos rellenos con medio de cultivo hasta 1/4 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 expresión de proteínas. 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 μ g/ml en las placas de selección.

Los cultivos líquidos de *Streptomyces lividans* se llevaron a cabo a 28°C en medio YES (1% de extracto de levadura, 10,3% de sacarosa, 5 mM de MgCl₂, a pH 7; Ruiz-Arribas y cols., 1995), suplementado con 1% de xilosa y fueron crecidos en matraces indentados con 0,1 % de volumen de medio y 250 rpm en un agitador orbital para asegurar una buena aireación del cultivo.

Se utilizaron varios antibióticos cuando se requería seleccionar algún clon determinado. Estos fueron: Ampicilina (concentración de 100 μ g/ml), Kanamicina (concentración de 30 μ g/ml), Higromicina (a una concentración de 100 μ g/ml) y Bleomicina (a unas concentraciones de 3 μ g/ml en el caso de *E. coli* y de 15 μ g/ml en el caso de *T. thermophilus*). En el caso de *Streptomyces lividans* se utilizó tiostreptona a una concentración de 5-10 μ g/ml.

El crecimiento en líquido de los cultivos se siguió midiendo la densidad óptica a 550 nm (DO₅₅₀) 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 a temperatura ambiente cuando se trataba de *T. thermophilus*. Cuando se requería conservar durante largos periodos de tiempo se mantenían a -70°C en medio de crecimiento en presencia de glicerol 40% (v/v). Las células de *Thermus* se conservaron a -20°C en forma de precipitados compactos semi-secos.

3.3.2 Transformación bacteriana

La competencia en células de *E. coli*, se indujo siguiendo el método de Inoue (Inoue y cols., 1990) para todas las estirpes utilizadas. La transformación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1985).

En el caso de *T. thermophilus*, tanto para la estirpe silvestre como para sus mutantes, sus células fueron transformadas por competencia natural (Koyama y cols., 1986), añadiendo 0.1-1 µg de DNA a 0.5 ml de cultivo en fase exponencial (aprox. 0.5 DO₅₅₀) en medio de crecimiento TB preparado con agua mineral rica en sales.

Tanto para *E. coli* como para *T. thermophilus* cuando, en casos excepcionales, necesitábamos una alta eficiencia de transformación, se utilizó la electroporación para transformar las células. Para ello se dejaron crecer los cultivos hasta una DO₅₅₀ de aproximadamente 0,5 se lavaron en glicerol 10% en H₂O MiliQ (dos lavados para *E. coli*, tres lavados para *Thermus*) y las células fueron resuspendidas en 1/100 del volumen inicial en esa misma solución. 100 µl de estas células fueron incubadas con el DNA durante 15-20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente fueron sometidas a un pulso corto (5 ms) en un campo eléctrico de 12500 V/cm (Equipo, 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 entre 30 y 60 minutos en el caso de la Ampicilina y de 60 a 90 minutos si se empleaba Kanamicina, Higromicina o Bleomicina. Para *Thermus*, el tiempo siempre fue de 4 horas. Tras este período de incubación, los cultivos se extendieron en placas de selección con el antibiótico correspondiente y se dejaron crecer los transformantes durante 24-48 horas a la temperatura de crecimiento escogida.

En *Streptomyces* no se ha desarrollado un sistema de competencia inducido por un choque frío y un tratamiento con calcio, similar al de *E. coli*. En su lugar, los trabajos iniciales de Okanishi y colaboradores (1974) en la formación, regeneración y transfección de los protoplastos, llevaron al descubrimiento de que esos protoplastos eran transformados por DNA plasmídico a una muy alta frecuencia en presencia de polietilenglicol (Bibb y cols.,



1978). Para la generación de esos protoplastos, se siguieron las directrices de Kieser y colaboradores (Kieser y cols., 2000). Se añadieron 25 ml de medio YEME (34% de sacarosa, 5 mM MgCl₂, 0,5% de glicina) a un matraz indentado de 250 ml y se inoculó con 0,1 ml de una suspensión de esporas y se incubó durante 36-40 horas a 30°C en un incubador orbital. Se centrifugó el cultivo crecido durante 10 minutos a 1000 g, tras lo que se examinó en busca de alguna posible contaminación. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento en 15 ml de sacarosa 10,3 % dos veces. Tras esto, se resuspendió el micelio en 4 ml de solución de lisozima a una concentración de 1 mg/ml en tampón P (Okanishi y cols., 1974; Hopwood y Wright, 1978) y se incubó a 30°C durante 15-60 minutos. Se pasó por una pipeta de 5 ml 3 veces y se incubó otros 15 minutos, tras los que se añadió 5 ml de tampón P y se repitió el paso por la pipeta de 5 ml. Se filtraron los protoplastos a través de un paño de algodón, y se sedimentaron mediante centrifugación durante 7 minutos a 10.000 g. Se volvió a descartar el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de tampón P (Okanishi y cols., 1974; Hopwood y Wright, 1978).

Una vez obtenidos los protoplastos se tomaron 50 µl de éstos a una concentración de 10¹⁰ ml⁻¹, y se añadieron 5 µl de la solución de DNA plasmídico que se mezcló inmediatamente. Tras esto se añadieron 200 µl de tampón T (Thompson y cols., 1982). Se plaquéó la suspensión de protoplastos en 2 placas R2YE (Thompson y cols., 1980) secas y con el antibiótico necesario, y se incubó a 30°C durante 14-20 horas.

3.3.3 Expresión de proteínas

3.3.3.1 Expresión en *E. coli*.

Los plásmidos utilizados para la expresión de estas enzimas en *E. coli* fueron pET22b(+) y pET28b(+) (Novagen), en los que se introdujeron las distintas enzimas amplificando mediante PCR las secuencias codificantes, 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 3.6. En algunos casos se recurrió a la ayuda de vectores comerciales de clonaje tipo topo o PCR 2.1 o pBluescript, como paso intermedio antes de pasar al plásmido de expresión.

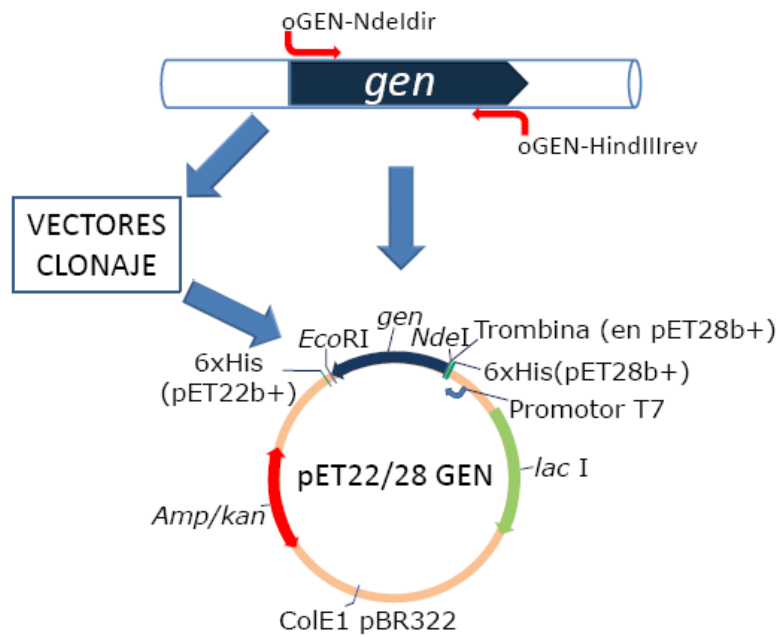


Figura 3. 1 Esquema de las construcciones realizadas para la expresión de las enzimas de *T. thermophilus* HB27 en *E. coli*.

Una vez obtenidas, las construcciones fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3, C41 o C43) y se crecieron en medio LB a una temperatura que osciló entre los 21 y los 37°C en función de las características de la proteína. Al preinóculo se le añadió un 0,8% de Glucosa y al inóculo un 0,05% para reprimir catabólicamente la expresión de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control de *P_{lac}*, y así tener el control sobre el momento de la expresión de la proteína y poder evitar, en la medida de lo posible, reacciones de toxicidad durante el crecimiento del cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{550} de 0,4-0,7, una vez más dependiendo de la expresión de la proteína, se indujo la expresión del promotor *P_{lac}* con una concentración de IPTG entre 0.1 y 1 mM y se dejó en agitación entre 3 y 16 h, a la temperatura correspondiente.

3.3.3.2 Expresión en *Streptomyces lividans*.

Para la expresión de proteínas desde *S. lividans* se clonaron los genes codificantes de éstas bajo el promotor xilanasa *xysA* (*xysAP*) de *Streptomyces halstedii*, por lo que la expresión de las enzimas se realizó a 28°C y 250 rpm en medio YES con 1% de xilosa para la inducción del promotor. Se tomaron muestras tanto a los 4 como a los 6 días de crecimiento, y se analizaron los extractos celulares y el medio.

3.3.3.3 Expresión en *T. thermophilus*.

Existen en la actualidad diversos vectores de expresión de proteínas, tanto inducibles como constitutivos, que pueden funcionar en *T. thermophilus*, cada uno cuenta con un promotor diferente que debe ser tratado según sus peculiaridades.



De ese modo, en el caso de la inducción del promotor de la nitrato reductasa, se dejaron los cultivos de *T. thermophilus* NAR1 o HB27c en microaerofilia. Iniciamos el crecimiento en aerobiosis y cuando el cultivo se encontraba a 0.45-0.8 unidades de DO₅₅₀, añadimos nitrato potásico 40 mM (Merck) al medio y paramos la agitación. De esta forma conseguimos la microaerofilia al perderse la aireación y consumirse el oxígeno disuelto en el medio. El tiempo de inducción en microaerofilia fue de cuatro horas. Como comprobación de que el promotor *Pnar* había sido inducido, se midió la concentración de nitrito producido mediante un método colorimétrico con N-(1-naftil) etilendiamina 0.02% (Sigma) y con sulfanilamida 1% en HCl 2.5 N (Sigma) (Snell y Snell, 1949).

En el caso de expresión constitutiva desde el promotor del gen de la proteína de capa S, *PslpA*, se inició el crecimiento del cultivo en aerobiosis y se dejó hasta que se alcanzó la saturación en el crecimiento. Para la expresión desde región promotora del operón *nqo*, se inició el cultivo del mismo modo que el anterior pero se paró mucho antes, a una DO₅₅₀ de 0,2-0,4.

Para los ensayos de inducción del promotor sensible a celobiosa *Pcel*, utilizamos el mismo medio de crecimiento pero diluido 1/5 y se añadió celobiosa 0.2% p/v, dejando que el cultivo alcanzara una alta densidad óptica, de tal modo que pudiera acabar con los nutrientes existentes forzándole a consumir la celobiosa.

3.3.4 Generación de mutantes en *T. thermophilus*

Se utilizaron dos metodologías cuando se quería eliminar la expresión de una determinada proteína en *T. thermophilus*, la primera interrumpiendo el gen seleccionado mediante la inserción de un elemento génico que dotaba al organismo receptor de resistencia a kanamicina. La segunda metodología consistía en la eliminación completa del gen del genoma bacteriano.

A. Mutantes de inserción

Para la generación de estos mutantes se utilizó un plásmido no replicativo en *T. thermophilus* con un gen de resistencia a Kanamicina, el pK18, en el que se clonó la zona central del gen que se deseaba interrumpir, con un tamaño tal que permitía la recombinación homóloga con la copia que se encontraba en el genoma del organismo a mutar.

Para ello utilizamos oligonucleótidos denominados de manera general oMutgenEcoRI dir como directo y oMutgenHindIII rev como reversos respectivamente, para amplificar una región del interior de cada uno de los genes a mutar y clonamos esta zona central en el vector pK18, generando los distintos vectores mutagénicos. Con éstos seleccionamos los transformantes de *T. thermophilus* capaces de crecer en presencia de



3. MATERIALES Y MÉTODOS

kanamicina. La comprobación de la correcta integración del plásmido se realizó mediante PCR. Un esquema de la realización de estos mutantes y la comprobación de la correcta integración se puede ver en la figura 4.34.

Tabla 3. 6 Mutantes de inserción en *T. thermophilus*. Detalle de las posiciones de los nucleótidos y el tamaño del fragmento de cada gen clonado en pK18 para la realización de los mutantes de inserción de *T. thermophilus* HB27 GEN:KAT.

Mutante	Fragmentos clonados. Posiciones nucleótidos.	Tamaño (pb.)
<i>T. thermophilus</i> 38:KAT	181 – 824	644
<i>T. thermophilus</i> 39:KAT	281 – 1025	745
<i>T. thermophilus</i> 40:KAT	191 – 741	561
<i>T. thermophilus</i> 41:KAT	155 – 704	550
<i>T. thermophilus</i> 42:KAT	280 – 1020	741
<i>T. thermophilus</i> 72:KAT	317 – 1116	800
<i>T. thermophilus</i> 220:KAT	431 – 1295	865
<i>T. thermophilus</i> 222:KAT	501 – 1549	1049
<i>T. thermophilus</i> 107:KAT	361 – 1200	840

B. Mutantes de delección

Para generar este tipo de mutantes se utilizó también el plásmido no replicativo pK18. Dentro de este plásmido se clonaron las regiones anterior y posterior (1 kpb de cada uno aproximadamente) del gen a interrumpir, que servían como zonas de recombinación homóloga para la integración del plásmido en el genoma del organismo. Una vez construido el vector, se transformó con él la cepa de *T. thermophilus* a mutar seleccionando por crecimiento en kanamicina eran las que habían integrado el plásmido. Una vez comprobado mediante PCR que la integración había ocurrido en el lugar deseado, se procedió a crecer el clon obtenido en un medio líquido carente de antibiótico durante 2-5 ciclos de crecimiento. La comprobación de la eliminación de la resistencia al antibiótico se realizó estriando colonias aisladas tanto en medio con antibiótico como en un medio sin él. Dentro de éstas había algunas que habían recuperado el fenotipo silvestre y otras que presentaban un fenotipo mutante. La discriminación entre las dos poblaciones se realizó tanto por Western blot, como por PCR.



3. 4 MANIPULACIÓN DEL DNA

3.4.1 Preparación de DNA plasmídico de *E. coli*

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

3.4.2 Preparación de DNA cromosómico de *T. thermophilus*

El DNA cromosómico de *Thermus* fue aislado a partir de 2-10 ml de cultivo en fase estacionaria, siguiendo el protocolo descrito por Marmur (Marmur, 1961). Las células recogidas por centrifugación fueron lavadas (Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM) y resuspendidas en 50 μ l de un tampón conteniendo Tris 25 mM pH 7.5, glucosa 50 mM, EDTA 5mM, al que se le añadió RNAsa A 0.1 mg/ml (Roche) y lisozima 0,1 mg/ml (Roche, preparada en EDTA 0,25 M); y se dejó actuar 1 hora a 37° C. Posteriormente el volumen fue incrementado con TE 1X y las células fueron lisadas con sarcosil 0.5% (Sigma) y pronasa E 0,1 mg/ml (Merck) a 56° C durante una hora, seguidas de un tratamiento con proteinasa K 3 mg/ml (Sigma) a 37° C durante 30 minutos. Tras este tratamiento, las preparaciones fueron sometidas a sucesivos ciclos de congelación a -70°C utilizando nieve carbónica y descongelación a 40° C, seguidos de agitación fuerte, tras los que siguieron varias extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1) y posteriormente con cloroformo:isoamílico (24:1). El DNA obtenido fue precipitado con dos volúmenes de etanol puro (Merck) o 0.7 volúmenes de isopropanol (Merck) y acetato amónico pH 5 hasta una concentración final de 100 mM, y finalmente resuspendido en 20 μ l de agua Milli-Q. Mediante este protocolo se obtienen habitualmente fragmentos de DNA de un tamaño medio de 25 kpb, apropiados para ser utilizados como molde en ensayos de PCR.

En determinadas ocasiones, en las que no se requería una gran pureza del DNA, se recurrió a un método alternativo de extracción del DNA. Partiendo de un cultivo crecido a una D.O.₅₅₀ de 0,5, se tomaron 50 ml de éste y se resuspendieron en 200 ml de agua Milli-Q, se congeló la suspensión en nieve carbónica y se descongeló a 42°C, para después agitar vigorosamente (vórtex durante 20 segundos). Se repitió el proceso 4-5 veces. Tras esto se hirvieron las muestras durante 10 minutos y se centrifugaron 10 minutos a 14.000g. El sobrenadante se utilizó como molde para reacciones de PCR.

3.4.3 Técnicas de Amplificación y clonaje

Para la amplificación de DNA utilizamos la DNA polimerasa de 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 del fragmento amplificado. Se utilizó 1 unidad de la enzima, con el tampón suministrado por la



3. MATERIALES Y MÉTODOS

casa comercial, 10% DMSO, entre 3 y 5 mM de Cl_2Mg , 0,5 mM de una mezcla igualada de dNTP y 50 pmol de cada oligonucleótido (Isogen y Sigma-Aldrich) cuya secuencia se muestra en el anexo I, con un volumen final de reacción de 25 o 50 μl . Para la amplificación se han utilizado varios termocicladores, principalmente el modelo iCycler de Bio-Rad, pero también los modelos 2400 y 9600 de Perkin Elmer. Como molde utilizamos DNA plasmídico, DNA cromosómico, DNA procedente de una PCR previa o directamente cultivos celulares. Las condiciones de PCR fueron optimizadas siguiendo las recomendaciones descritas por Ausubel y colaboradores (Ausubel y cols., 1994).

La digestión del DNA, 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. (New England Biolabs, Roche y MBI Fermentas).

La ligación de fragmentos de DNA fue llevada a cabo con la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs), utilizando las condiciones recomendadas por la casa comercial, con 0'5 unidades en un volumen final de 10 μl , ajustando la relación vector:inserto a 1:4. Las muestras fueron incubadas a 16°C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas. Estas ligaciones fueron utilizadas para transformar 50 μl de células competentes.

Para disminuir la cantidad de vector religado los extremos de éste fueron defosforilados, utilizando para ello Fosfatasa Alcalina de intestino de ternera (New England Biolabs). Se realizó una incubación a 37° C durante 2-4 horas siguiendo las recomendaciones de la casa distribuidora.

En determinadas ocasiones, y aprovechando la propiedad de la Taq polimerasa de añadir una deoxiadenosina al finalizar la síntesis de un fragmento de DNA, los productos de PCR obtenidos se subclonaron en el vector PCR 2.1 (Invitrogen) linealizado, que presenta una deoximidina desapareada en sus extremos 3', lo que le permite unirse a estos fragmentos.

3.4.4 Secuenciación del DNA

El DNA (plasmídico o procedente de PCR) fue secuenciado de forma automática mediante una variante del método de terminación por dideoxinucleótidos (Sanger y cols., 1977) que utiliza marcadores fluorescentes para la detección de los fragmentos de DNA, "Byg Dye Terminators" ABI PR15M 377.



3.4.5 Electroforesis y purificación de fragmentos de DNA

La separación electroforética de fragmentos de DNA fue realizada en geles de agarosa 0.8-2% (p/v) (Sigma Low EEO) en tampón TAE 1X (tabla 3.5). La purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa fue realizada mediante el kit PCR-Prep de Promega (Wizard SV gel and PCR clean-up system) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.6 Método de generación de mutaciones puntuales: Quick-Change

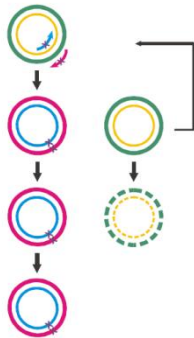


Figura 3. 1 Esquema de generación de mutantes mediante Quick-Change (Stratagene).

Para la realización de mutaciones puntuales, se utilizó el kit de Stratagene, QuikChange II Site-Directed mutagenesis Kit. Se amplificó el gen a mutar junto con el plásmido correspondiente en el que estuviera clonado, con la enzima Pfu plus de Eurx, utilizando los oligonucleótidos correspondientes portadores de la mutación. Tras esto se utilizó la enzima de restricción *DpnI*, que digiere DNA metilado, para eliminar el DNA parental, durante 2 horas. A continuación se transformaron células de *E. coli* DH5 α con el resultado de la digestión y se seleccionaron los mutantes.

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 *Thermus*, 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 (tabla 3.5). 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 ambos microorganismos, las células fueron recogidas y lavadas como en el caso anterior, posteriormente el precipitado 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 proteína, en un volumen variable entre 0,3-1 ml, y siempre a una temperatura cercana a los 4°C. La suspensión celular fue sonicada mediante 2 pulsos de 30 segundos – 1 minuto a 18 μ m 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, 3 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.

3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación electroforética de proteínas fue realizada mediante geles SDS-PAGE discontinuos (10-15%) (Laemmli y Favre, 1973). 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 ("Immobilón-P", Millipore), prehumedecida en metanol y equilibrada en "tampón de transferencia" (Tabla 3.5). 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 (Tabla 3.5) durante 1 h, y después se incubaron durante otra hora con el anticuerpo indicado a la concentración estimada en cada caso. 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 quimio-luminiscencia, que se puso en contacto con la membrana durante una hora, y utilizando la solución reveladora de Western blot (Tabla 3.5).

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 (tabla 3.5) a 50°C y con agitación durante 30 minutos. Tras esta incubación se lavó abundantemente con TBS-TWEEN (tabla 3.5).



3.5.4 Ensayos de retardo en gel (EMSA)

Para la realización de los ensayos de retardo se utilizó un oligonucleótido reverso marcado en la región 5' con un fluoróforo (Bonsai Biotechnologies) cuyos espectros de absorbancia y emisión se muestran en la figura 3.2

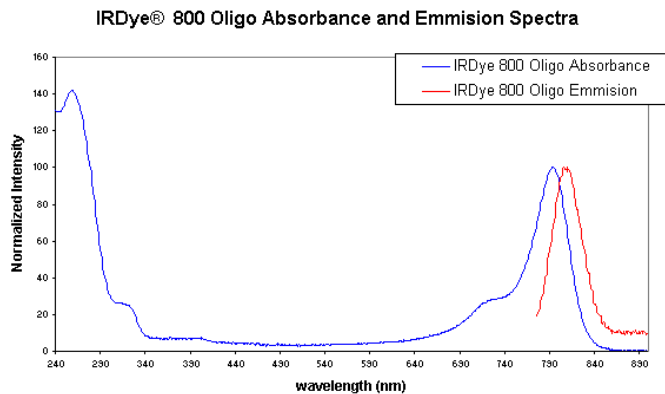


Figura 3. 2 Espectros de absorción y emisión del fluoróforo utilizado para marcar el DNA en los ensayos de retardo en gel.

Este oligonucleótido se utilizó como cebador en un par de reacciones de PCR en las que se amplificaron los fragmentos de DNA requeridos para el ensayo, que se correspondían con dos fragmentos de desigual tamaño del mismo promotor, uno de 83 y

otro de 151 nucleótidos. Para la realización de este ensayo se

utilizó, además del DNA marcado, proteína unida a una cola de histidinas en carboxilo terminal y purificada por cromatografía de afinidad, como se detalla en el apartado 3.5.5 de Materiales y Métodos. Esta proteína fue luego dializada frente a tampón tris 20 mM pH 7.5, y se añadió Urea 3M para la solubilización de la proteína y Glicerol al 30% como crioprotector.

Para estos ensayos se utilizaron 0,25 picomoles del DNA marcado y cantidades crecientes de la proteína en el tampón de unión detallado en la tabla 3.5. La cantidad final de proteína soluble utilizada fue difícil de determinar al no poder saber la cantidad de proteína que quedó soluble tras añadir la urea, en un principio se utilizaron unas relaciones 1:1, 1:4 y 1:6, pero es una mera aproximación. La unión se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Como DNA competidor se utilizó poli dC-dI y DNA de esperma de salmón (5 µg), dependiendo del caso, y como controles distintas concentraciones de celobiosa y DNA sin marcar a una concentración 6 veces superior a la del DNA marcado. Una vez transcurrido el tiempo determinado para el ensayo se cargaron las distintas muestras utilizando el tampón de carga para geles nativos (tabla 3.5), en un gel de Acrilamida-bisacrilamida al 8% en TBE 0,25X previamente precorrido en vacío al menos media hora, y se dejó corriendo en oscuridad y a temperatura ambiente entre 4 y 6 horas. Los resultados del experimento se revelaron en el escáner de infrarrojos ODISSEY (Li-cor Biosciences), excitando el fluoróforo a 787 nm y midiendo la emisión a 812 nm.

3.5.5 Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

Para purificar aquellas enzimas que se expresaban en forma soluble, se partió de extractos de *E. coli* BL21 que estaban sobreexpresando la proteína indicada. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación suave (3000 g durante 5 minutos) y lavadas



3. MATERIALES Y MÉTODOS

con tampón TE 1x (tabla 3.5) y posteriormente se resuspendieron y se sonicaron en tampón fosfato 20 mM pH8 con 250 mM NaCl y entre 10 y 20 mM de Imidazol (Merck). Tras eliminar las células no rotas y separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles del modo ya indicado en el apartado 3.5.1, el extracto que contenía las proteínas solubles fue sometido a un tratamiento térmico, a 70°C durante 30 minutos, lo que provoca la precipitación de la mayor parte de las proteínas termolábiles de *E. coli* eliminadas posteriormente mediante centrifugación (14.000 g, 15 min, 4°C) (Takesawa y cols., 1990). En algunas ocasiones se repitió 2-3 veces el calentado/centrifugado de la fracción soluble para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas mesófilas que estuvieran contaminando el extracto. Una vez realizado esto, se puso la fracción soluble, en contacto con la resina de afinidad de Ni-NTA-Agarosa (Quiagen), equilibrada con el mismo tampón. Se dejó la resina con la fracción soluble girando en una noria entre 2h y 12 h a 4°C, y después se procedió al lavado de la resina para eliminar las interacciones no específicas de otras proteínas. Para ello se utilizó el mismo tampón pero con 50 mM de imidazol y hasta 500 mM de NaCl. Tras esto se eluyó la proteína utilizando el mismo tampón con 250 mM de Imidazol.

Las alícuotas donde se encontraba la proteína purificada fueron dializadas toda la noche a 4°C frente a tampón fosfato 50 mM pH 7,5 y 50 mM de NaCl, para eliminar los restos de imidazol y el exceso de sales, y fueron almacenadas en ese tampón a 4°C o a menos 20°C, añadiendo en tal caso glicerol al 40% como crioprotector.

3.5.6 Medida de actividades enzimáticas

Se utilizaron distintos sustratos colorimétricos para la determinación de las distintas actividades enzimáticas ensayadas. Utilizamos ONPG (2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) para β -glicosilasas y PNPG (4-Nitrofenil α -D-galactopiranosido) para las α -glicosilasas, ambos preparados a una concentración de 0,8 mg/ml, PNPB (4-Nitrofenil butirato) a una concentración de 0,4 mg/ml para las esterasas, y NIPAB (N-(3-Carboxy-4-nitronitrofenil) fenilacetamida) para la penicilina G acilasa. Las actividades se midieron en distintos tampones, tampón Z (Tabla 3.5) para las glicosilasas y en Tris-HCl 50 mM pH 8, 40 mM CaCl₂, para las esterasas. Las medidas se realizaron utilizando el fluorímetro Fluostar optima de BMG labtech.

Para la determinación de la temperatura óptima de funcionamiento de las enzimas, se utilizó el mismo tampón usado durante el ensayo. Se precalentó la enzima en el tampón durante 5 minutos a la temperatura a la que se iba a realizar el ensayo, se añadió el sustrato colorimétrico y se dejó transcurrir la reacción durante 15 minutos, deteniéndola por bajada de temperatura a 4°C y mediante la adición de Na₂CO₃ 0,23 M en el caso de utilizar ONPG o PNPG. Después se determinó la cantidad de sustrato degradado por la enzima midiendo en el espectrofotómetro a 420 nm. Siempre se llevó en paralelo un control con tampón y sustrato sin enzima para tener en cuenta la degradación propia del sustrato debida únicamente a la temperatura.



La medida de la actividad de la penicilina G acilasa se realizó mediante el método colorimétrico de Kutzbach y Ravenbush (1974). Las muestras a analizar se añadieron a una solución 0,15 mM de ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzoico (NIPAB) pH 7,5 en tampón fosfato sódico 50mM. La aparición de ácido 6-nitro-3-aminobenzoico fue medida por espectroscopia a 405 nm. Se llevó en paralelo una reacción en iguales condiciones pero a 37°C usando como control una penicilina G acilasa de *E. coli*.

Para observar la influencia del pH sobre la funcionalidad de cada enzima se utilizaron distintos tampones, dependiendo del rango de pH en el que se estuviera trabajando. Citrato-Fosfato para los pH ácidos (4 a 8), Fosfato para los pH neutros (6 a 8.5) y Tris-HCl para los pH básicos (7 y 10). La medida de la actividad se realizó del mismo que en el caso anterior a la temperatura máxima calculada para cada proteína.

Para los ensayos de inactivación térmica, se incubó la proteína en el tampón de reacción a distintas temperaturas durante distintos tiempos. Tras esto se mantuvieron las muestras a 4°C hasta el momento de realizar el ensayo de actividad, que se llevó a cabo a la temperatura y pH óptimos.

3.5.6.1 Actividad esterasa en gel de acrilamida

El extracto que contenía las proteínas solubles tras la expresión de las posibles esterasas fue sometido a un tratamiento térmico como ya se ha indicado y la fracción de proteínas solubles fueron cargadas en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para la renaturalización de las proteínas en el gel se utilizó un tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8,0 con 0,5% (p/v) de Tritón X-100 en el que se incubó el gel durante 20 minutos en agitación a 65°C (Fuciños y cols., 2005a). Tras este proceso se procedió a la incubación del gel durante al menos 30 minutos en una solución mezcla en proporciones 1:1 de la solución A y B de revelado de actividad esterasa (tabla 3.5), en agitación a temperatura ambiente, lo que provocaría la aparición de una zona teñida de rojo donde se encontrara enzima hidrolíticamente activa (Schmidt-Dannert y cols., 1996).

3.5.6.2 Actividad β -Galactosidasa en extractos de *T. thermophilus*

Se realizaron ensayos cualitativos de actividad directamente sobre cultivo bacteriano. Para ello se tomaron 50 ml de cultivo crecido y se le añadieron 50 ml de SDS 0,2%, esta mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C. Tras este tratamiento preliminar, se añadió el sustrato hasta dejarlo a una concentración final de 4 mM, y se incubó a 70°C hasta la aparición de color. La medida de la actividad se realizó a 410 nm.



3.5.7 Pruebas de accesibilidad a la tripsina

En los ensayos de accesibilidad a la tripsina se tomaron cultivos de *T. thermophilus* NAR1 Δ SlpA crecidos hasta saturación a 70°C en condiciones aeróbicas. Estos cultivos se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 5000g y se lavaron en tampón Tris 10 mM pH 8.0. Tras esto, el precipitado se resuspendió en tris 10 mM pH 8.0 con sacarosa 250 mM a una concentración de 10^{10} células/ml. Este medio isotónico con la célula garantiza la integridad de las bacterias en las condiciones de digestión utilizadas. Las células así obtenidas, fueron tratadas con tripsina (50 mg/ml disuelta en HCl 1mM) a diferentes concentraciones, en presencia de EDTA 5 o 10 mM. Tras incubar diferentes tiempos a 37°C se procedió al análisis de las muestras mediante Western blot. Como controles se utilizaron tanto las células sin tratar como extractos sonicados en presencia de EDTA y de HCl. La reacción se paró mediante la adición de tampón de Laemmli y hervido de las muestras.

3.5.8 Separación de fracciones celulares

Para determinar la localización celular de las proteínas se procedió a la separación de fracciones celulares. Para ello se tomó un cultivo de *T. thermophilus* en fase exponencial y se recogieron las células por centrifugación suave. Se lavó el sedimento con tampón TE 1x y se resuspendió en el mismo, concentrando la muestra 100 veces, para luego proceder a su sonicación como se detalla en el apartado 3.5.1 de Materiales y Métodos. Una vez sonificado se sometió a centrifugación suave (3000 g durante 5 minutos) con el fin de retirar las células íntegras, que fueron desechadas. El resto fue sometido a centrifugación en una ultracentrífuga Beckman TL-100 a 60.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante de esta centrifugación se tomó como fracción de proteína soluble y el sedimento se lavó con tampón tris 10 mM pH 7.5 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, obteniendo la fracción de membrana.

Cuando fue necesario obtener la fracción de proteínas periplásmicas de *T. thermophilus*, se utilizaron mutantes que presentaban una deficiencia en la formación de la Capa S (Castán y cols., 2002). Cuando el cultivo se aproxima a su fase estacionaria, estos organismos, forman cuerpos multicelulares rodeados por una envuelta común que puede ser rota liberando el gran espacio periplásmico en el que se encuentran embebidos. Tomamos un cultivo de estos mutantes crecido en medio rico con una agitación muy lenta. Mediante una centrifugación suave (3000 g durante 3 minutos) se separaron las bacterias aisladas de los cuerpos multicelulares que quedan encima de éstas. Una vez se obtuvo un cultivo enriquecido en estos cuerpos multicelulares, se procedió a su ruptura mediante un repetido pipeteo. Tras la ruptura de la envuelta externa, se separó la fracción periplásmica de las bacterias no rotas mediante centrifugación (5000 g durante 5 minutos), en las que se procedió a separar la fracción de membrana de la fracción citoplásmica como se ha detallado anteriormente.



3.5.9 Solubilización diferencial de componentes de membrana

Una vez obtenida la fracción de membrana como se detalla en el apartado anterior, se incubaron en un tampón Tris 10 mM pH 7,5 con un 1% de tritón o de sarcosil (p/v), dejando actuar el detergente durante 30 minutos a 37°C y se centrifugó a 60.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. A continuación se realizó otro lavado con el mismo tampón y una segunda centrifugación en las mismas condiciones para posteriormente obtener las dos fracciones.

3. 6 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Cepas de *T. thermophilus* HB27 fueron transformadas con los plásmidos conteniendo las fusiones de las proteínas de interés con la sGFP y después fueron puestas a crecer en las condiciones indicadas para la expresión de proteínas desde el promotor *Pnqo*, hasta una DO₅₅₀ de 0,2-0,4. Tras esto las bacterias fueron recolectadas mediante una suave centrifugación (3000 g durante 5 minutos) y lavadas en repetidas ocasiones con H₂O Milli-Q, para eliminar todo vestigio de medio, se resuspendieron en H₂O Milli-Q y se extendieron en un portaobjetos dejando secar la muestra. Se añadió Mowiol como medio de montaje para la microscopía y se dejó secar 16 horas.

La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss) o a un microscopio vertical Axio Imager.Z1 M (Zeiss). Las secciones-Z fueron obtenidas cada 0,2 micras con el objetivo Zeiss 63X 1.4NA y los parámetros apropiados para cumplir con el criterio Nyquist para tratamiento de imágenes. Las imágenes fueron sometidas a deconvolución lineal utilizando el software Huygens System 2.2 (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum. The Netherlands). Para el ensamblaje final de las imágenes se utilizaron los programas Adobe Photoshop e Image J (Wayne Rasband, NIH, USA).

3. 7 HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Para el ensamblado, comparación, y traducción de secuencias génicas, se utilizaron diferentes programas: "Gene Jockey II" (para Macintosh), Chromas Lite junto con ClustalW (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute), además de Bioedit (Tom Hall Ibis Therapeutics) y Vector NTI (Invitrogen).

Para el análisis del contexto genético de las distintas proteínas se utilizó el "BacMap Genome Atlas" a través del servidor de la universidad de Alberta (<http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/>).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

La comparación de secuencias peptídicas, búsqueda de proteínas homólogas o análisis de proteínas, como cálculo de su punto isoeléctrico, su masa molecular o la predicción de posibles fragmentos transmembrana de proteínas, se realizó con los paquetes de programas del servidor ExpASy (BLAST, pI/MW) y otros programas en distintos servidores como "DAS" (Cserzo y cols., 1997), "HMMTOP" (Tusnády y Simon, 1998), "TMMOD" (Kahsay y cols., 2005), etc.

Para el modelado de la estructura tridimensional de la penicilín acilasa de *T. thermophilus* se utilizaron como modelos estructuras de otras proteínas depositadas en las bases de datos y con las que compartían alta homología de secuencia. Para realizar el modelado se utilizaron el Swiss-model, Modbase y Yasara para el modelado por homología y Fugue, Phyre, Raptor y Tasser para el "threading".

RESULTADOS



Como se ha comentado previamente en la introducción, las enzimas de microorganismos termófilos presentan altos niveles de resistencia adicional a distintos solventes y condiciones ambientales, haciéndolas interesantes objetivos para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Entre las enzimas que despertaban más interés para nuestro grupo se encontraban aquellas que podrían participar en la hidrólisis, síntesis o modificación tanto de oligo como de polisacáridos (como α o β -glucosidasas y galactosidasas) por sus potenciales aplicaciones en la industria alimentaria. También nos interesaban potenciales esterasas y lipasas por sus aplicaciones en la síntesis de compuestos orgánicos (Sangeetha y cols., 2011; Hasan y cols., 2006).

4. 1 ESTUDIO DE POTENCIALES GLICOSIDASAS DE *Thermus thermophilus* HB27

En un cribado realizado en diversas cepas de *T. thermophilus* se detectaron actividades α y β -galactosidasa, α y β -glucosidasa y β -fucosidasa en extractos celulares obtenidos de cultivos crecidos en medio rico. Una de las cepas que presentó actividades más intensas y de mayor interés en este análisis fue la cepa HB27 (Pérez-Sánchez, 2009).

Tabla 4. 1 Cribado de actividades glicosidasas intracelulares a partir de extractos celulares de diversas cepas de *T. thermophilus*. Los valores están mostrados como unidades enzimáticas (\pm 5%) por millón de células. El cribado se realizó en colaboración con el laboratorio de la Dra. María José Hernaiz del grupo de Biotransformaciones de la UCM (Pérez-Sánchez, 2009).

Sustrato	CC16	NR17	PRQ16	VG7	B	NAR1	HB27	RQ1	PRQ25	HN1.11
pNP- α -Gal	-	191	140	-	123	131	174	-	-	101
pNP- β -Gal	104	494	286	252	225	103	146	86	216	60
pNP- α -Glc	161	513	948	618	590	489	422	444	337	560
pNP- β -Glc	105	-	343	269	172	66	130	41	215	-
pNP- α -Man	-	-	-	-	-	-	-	86	-	-
pNP- β -Man	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pNP- α -Fuc	-	97	-	-	-	-	-	-	-	-
pNP- β -Fuc	180	673	531	326	410	134	293	130	236	103
pNP- α -GalNAc	-	259	-	-	-	-	-	-	-	-
pNP- β -GalNAc	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pNP- α -GlcNAc	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pNP- β -GlcNAc	53	-	-	-	-	-	-	107	70	-

Dado el interés biotecnológico de este tipo de enzimas y gracias a que el genoma de este microorganismo había sido secuenciado (Henne y cols., 2004) y a que poseíamos diversas herramientas genéticas para su manipulación y expresión de proteínas, nos



4. RESULTADOS

inclinamos por iniciar la búsqueda de posibles enzimas candidatas entre las codificadas por *T. thermophilus* HB27.

Ya que el estudio se había llevado a cabo a partir de células crecidas en medio rico decidimos intentar una búsqueda de posibles sustratos que pudieran inducir alguna de las actividades glicosidasas que habíamos detectado. Para ello utilizamos diferentes disacáridos, como sacarosa, lactosa, maltosa, celobiosa y melibiosa, así como glucosa como posible represor catabólico, a un 0,2% (p/V) final, y realizamos el crecimiento en medio TB diluido 1/8. Como sustratos cromogénicos para la detección de las distintas actividades utilizamos ONPG, PNP_G y pNF- β -Fuc, como indicadores de actividades α -glicosidasa, β -glucosidasa y β -fucosidasa, esta última poco frecuente y de gran interés biotecnológico.

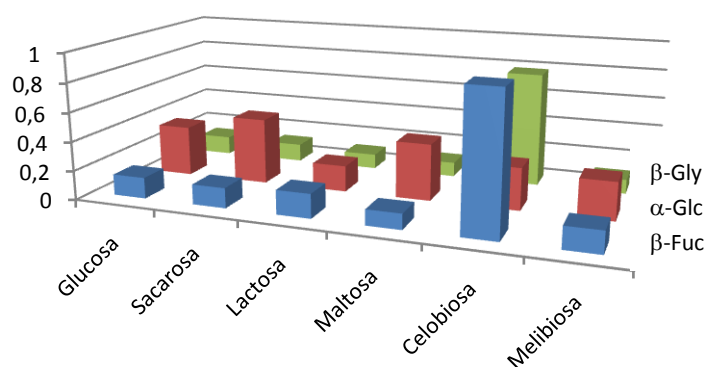


Figura 4. 1 Actividad glicosidasa en *Thermus*. Representación de las actividades β -Galactosidasa, α -Glucosidasa y β -Fucosidasa medidas en extractos totales de *T. thermophilus* HB27 en respuesta a la presencia de distintos disacáridos en medio diluido.

Como se puede deducir de los resultados de estos ensayos, el disacárido que parecía afectar más significativamente a los niveles de actividades ensayados era la celobiosa, aumentando más de 6 veces tanto la actividad β -galactosidasa como la actividad β -fucosidasa (Fig. 4.1). Por el contrario, la actividad α -glicosidasa sólo parecía activarse, aunque muy levemente, con sacarosa y maltosa con respecto al control con glucosa.

Rastreando en busca de pautas abiertas de lectura que pudieran presentar similitud de secuencia con enzimas ya conocidas y de potencial interés biotecnológico, encontramos 9 ORFs codificantes de genes con potencial actividad glicolítica, utilizando para ello la anotación realizada por los autores de la secuenciación y el programa BLAST del Instituto Bioinformático Suizo.



Tabla 4. 2 Glicosidasas. Hipotéticas enzimas con posible actividad glucosidasa encontradas en el genoma de *T. thermophilus* HB27.

NOMBRE	ACTIVIDAD PREDICHA	TAMAÑO TEÓRICO (kDa)	POSIBLE LOCALIZACIÓN
Enzimas codificadas dentro del plásmido pTT27			
TTP0042	β -Glicosidasa	48,61	Soluble
TTP0072	α -Galactosidasa	53,64	Soluble
TTP0220	β -galactosidasa	64,2	Soluble
TTP0221	α -Glucosidasa	88,56	Membrana
TTP0222	β -Galactosidasa	77,6	Soluble
Enzimas codificadas dentro del cromosoma			
TTC0107	α -Glucosidasa	61,8	Soluble
TTC1198	Pululanasa	47	Membrana
TTC1283	Maltodextrina glucosidasa	65,3	Soluble
TTC1828	Amilopululanasa	112,34	Membrana

4.1.1 Potenciales amilasas

TTC1198

Este gen se encuentra en el cromosoma de la bacteria y codifica una proteína de 416 aminoácidos y 47 kDa casi idéntica a la pululanasa (EC 3.2.1.41) AmyA de *Bacillus flavocaldarius* (con una identidad del 99%) (Anexo II) cuyos principales sustratos son el pululano, la amilopectina, la β -dextrina límite y el almidón soluble. También presenta gran similitud con una neopululanasa de *Geobacillus stearothermophilus*. Estas enzimas, que entrarían dentro de la familia 13 de las glicosidasas, pueden ser de 2 tipos, las de tipo I, a las que pertenecería la TTC1198, hidrolizan específicamente enlaces α -D-(1-6)-glucósidos, mientras que las de tipo II lo hacen con enlaces α -D-(1-4). El análisis del contexto genético de TTC1198 la sitúa aislada, dado que se encuentra rodeada por genes codificados en la hebra contraria del DNA (Fig. 4.2), tratándose, por lo tanto, de un gen transcrito en un mRNA monocistrónico.

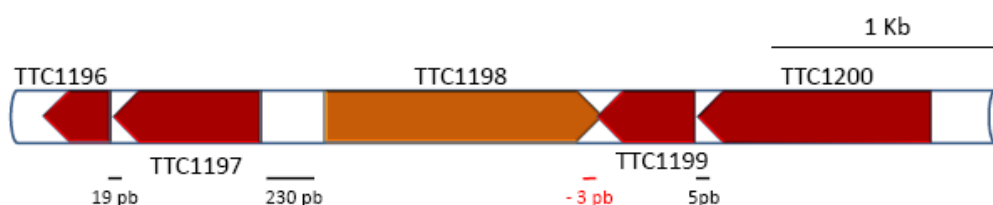


Figura 4. 2 Contexto genético de la enzima TTC1198.

A la hora de tratar de predecir la topología de la proteína TTC1198, se utilizaron varios programas cuyos resultados parecían prever la existencia de una región transmembrana en la zona central de la proteína (Fig. 4.3), lo que sería coherente con la hipotética función de esta proteína como enzima encargada de la degradación del pululano,



4. RESULTADOS

un polímero de gran tamaño que, más que probablemente, no pueda entrar como tal dentro de la bacteria y deba ser degradado en el periplasma, o inclusive fuera de la propia célula. No obstante, la secuencia no codificaba ningún péptido señal. En este sentido la pululanasa AmyA tampoco parece presentar un péptido señal, y ha sido purificada de la fracción soluble de *Bacillus flavocaldarius* (Suzuki y cols., 1991) y expresada en forma soluble en *E. coli* (Kashiwabara y cols., 1999).

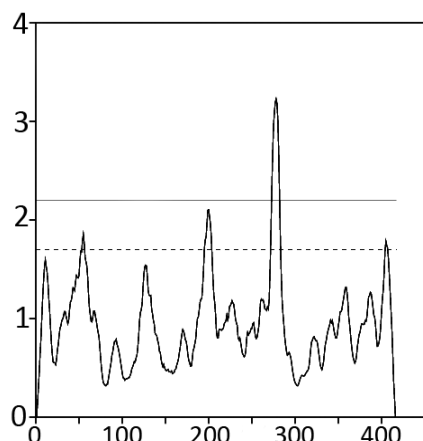


Figura 4. 3 Predicción de posibles regiones transmembrana de la proteína TTC1198. Imagen producida por "DAS" - TM server. Un servicio de predicción basado en el algoritmo DAS ("Dense alignment surface") (Cserzo y cols., 1997).

Utilizando los oligonucleótidos α TTC1198NdeI como directo y α TTC1198HindIII como reverso amplificamos el gen a partir del DNA cromosómico de *T. thermophilus* HB27, para después, aprovechando las dianas para enzimas de restricción que habíamos puesto en los extremos, clonarlo en el vector pET28b(+), generando el plásmido de sobreexpresión pET28-1198.

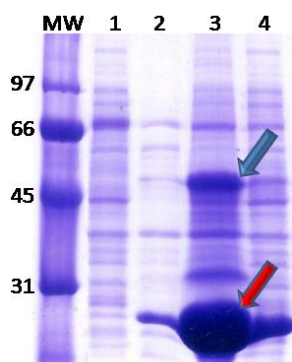


Figura 4. 4 Expresión de la enzima TTC1198 con cola de histidinas en amino terminal en *E. coli*. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Fracción particulada del control, 2: Fracción soluble del control, 3: Fracción particulada de la expresión, 4: Fracción soluble de la expresión. La flecha azul indica la banda correspondiente a la expresión de la proteína. El control negativo se realizó con la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET28b(+) sin ningún fragmento externo, a la que se sometió al mismo tratamiento de inducción de la expresión.

La expresión de la proteína en *E. coli* BL21 (DE3) fue corroborada tanto en gel de acrilamida teñido con Coomassie (Fig. 4.4), como con Western blot utilizando anticuerpos anti Histidinas (datos no mostrados). En las distintas condiciones de expresión probadas (37°C, 21°C y distintas concentraciones de IPTG) sólo se consiguió observar una proteína del tamaño esperado en la fracción particulada (Fig. 4.4). Acompañando siempre a ésta en la fracción particulada, aparecía otra de menor tamaño y que podría ser atribuible a un procesamiento proteolítico de la proteína expresada. La abundancia de este posible



fragmento era tal que, cuando se analizó el gel de acrilamida, pudo observarse como contaminaba los carriles adyacentes (Fig. 4.4).

Los ensayos de actividad realizados sobre extractos totales de *E. coli* sobrexpresando la proteína resultaron negativos, tanto para ONPG como para PNPG, lo que, unido a la insolubilidad mostrada, sugiere que la enzima no pliega correctamente en el contexto del hospedador mesófilo utilizado.

TTC1828

El gen TTC1828 se encuentra situado en el cromosoma de *T. thermophilus* HB27, tiene 2985 pares de bases y codifica una posible amilopululanasa de 112,34 kDa, que parece pertenecer, por comparación de secuencias, a la familia 57 de glicosil hidrolasas que incluye enzimas α -amilasas (EC:3.2.1.1), 4-glucanotransferasas (EC:2.4.1.-) y amilopululanasas (Anexo II). El análisis del contexto genético de la enzima no reveló nada reseñable ya que el gen se encuentra acompañado de proteínas hipotéticas sin homología reseñable con otras disponibles en las bases de datos (Fig. 4.5).

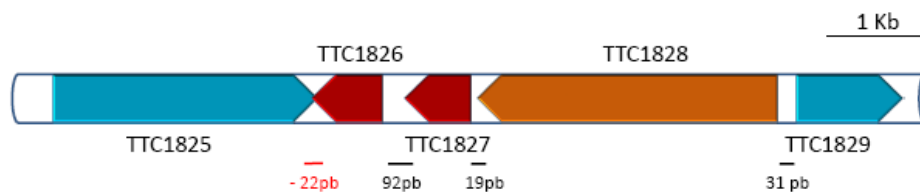


Figura 4. 5 Contexto genético de la proteína TTC1828 (en amarillo). Las otras dos proteínas que se aparecen en rojo acompañando a la amilopululanasa son pautas abiertas de lectura de función desconocida.

Al analizar la secuencia mediante herramientas de predicción de topología, se reveló en la zona amino terminal de la proteína, una región (en rojo) que podría corresponderse con un péptido señal, o con una región de anclaje a la membrana bacteriana (Fig. 4.6).

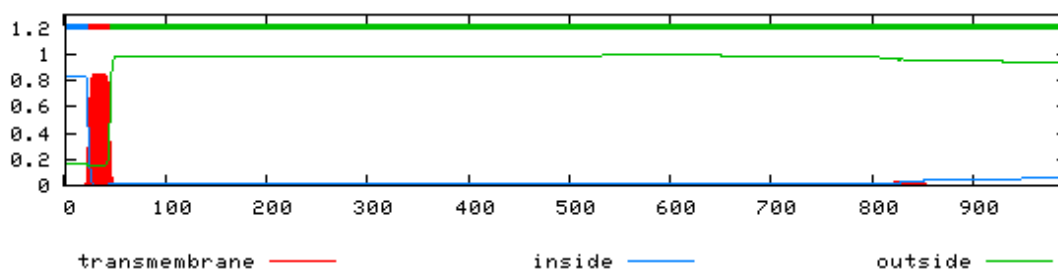
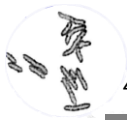


Figura 4. 6 Predicción de regiones transmembrana de la proteína TTC1828. Se refleja la posibilidad de que haya una región transmembrana en la zona amino terminal, que podría ser un péptido señal. Imagen producida por el programa TMMOD desarrollado por Kahsay y colaboradores basándose en modelo "Hidden Markov" (Kahsay y cols., 2005).



4. RESULTADOS

Un análisis más profundo de esa región mostró que probablemente el inicio propuesto para esta proteína en su anotación oficial fuera erróneo, dado que 19 aminoácidos más abajo y precedido por una buena secuencia RBS, aparece un codón GTG que da inicio a un posible péptido señal del tipo SecB-dependiente finalizado en una secuencia LAQ (Fig. 4.7). Ésta es idéntica a la de proteínas secretadas al periplasma de *T. thermophilus*, indicando su posible actividad extracelular sobre polímeros.

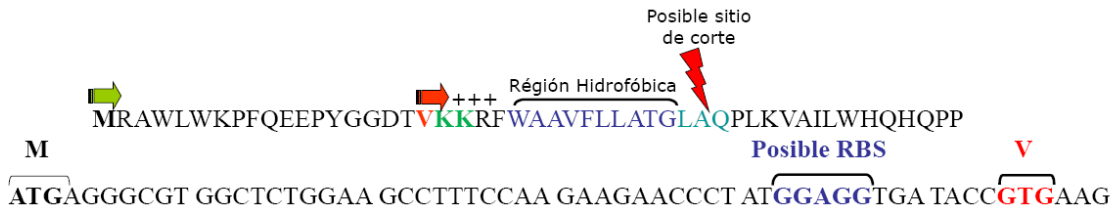


Figura 4. 7 Análisis de la secuencia de aminoácidos (arriba) y de nucleótidos (abajo) de la región amino terminal de la proteína **TTC1283**. Están señalados los dos posibles comienzos de la proteína (M y V) con una secuencia RBS y lo que podría ser el péptido señal y la zona de corte.

En cualquier caso, decidimos iniciar el clonaje desde esta metionina propuesta en los vectores pET28b(+) y pET22b(+), para lo que utilizamos los oligonucleótidos oTTC1828NdeI como directo y oTTC1828HindIII como reverso, y a partir de ahí, generar los plásmidos pET28-1828 y pET22b-1828. En este caso no conseguimos expresión detectable de la enzima ni mediante tinción en geles de acrilamida ni en inmunodetección mediante anticuerpos anti histidinas, en la expresión desde pET28-1828 en ninguna de las condiciones probadas.

TTC1283

El gen **TTC1283**, de 1713 nucleótidos codifica una posible maltodextrina glucosidasa (EC 3.2.1.20) de 65,3 kDa. Estas enzimas, pertenecientes a la familia 13 de las glicosidasas, catalizan la hidrólisis de enlaces α -D(1-4)glucosídicos de los extremos no reductores liberando α -D-glucosa.

El estudio de la topología de la proteína no reveló, ninguna región transmembrana ni nada que pudiera hacer pensar en la existencia de un péptido señal. En cuanto a su entorno genético, se encuentra en la proximidad de posibles proteínas implicadas en el transporte, **TTC1286** y **TTC1287**, y unión de maltosa, **TTC1288**, lo que podría indicar que forma parte de un elemento genético de internalización y degradación de este disacárido (Fig. 4.8).

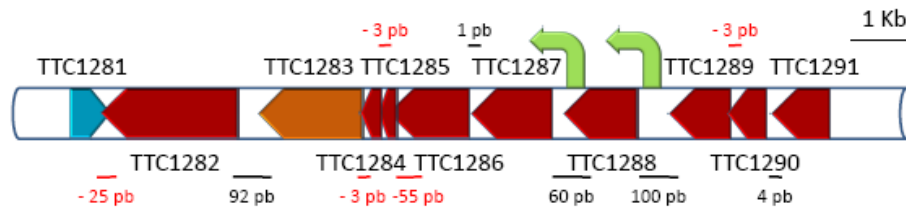


Figura 4. 8 Contexto genético de la posible maltodextrina glucosidasa de *T. thermophilus*, TTC1283 (en amarillo).

El resto de los genes, de izquierda a derecha, codifican homólogos de: TTC1282: una proteína de reparación del DNA (mutS), TTC1284: Nucleotidil transferasa, TTC1285: Nucleotidil transferasa, TTC1286: Permeasa de sistema de transporte de maltosa (malG), TTC1287: Permeasa de sistema de transporte de maltosa (malF), TTC1288: Proteína de unión a maltosa/maltodextrina, TTC1289: Proteína hipotética, TTC1290: Nucleósido trifosfatasa. TTC1291: Octaprenil difosfato sintasa. Las flechas indican los dos posibles promotores que podría haber en el operón.

Se utilizaron los oligonucleótidos oTTC1283NdeI como directo y oTTC1283HindIII como reverso para la amplificación del gen desde el cromosoma de *Thermus* y se generó el plásmido pET28-1283. Tras utilizar esta nueva construcción para transformar *E. coli* BL21 (DE3), se procedió a la expresión de la proteína con 1 mM de IPTG durante 4 horas a una temperatura de 37°C. Como se puede observar en la figura 4.9, los niveles de expresión conseguidos fueron demasiado bajos para ser detectados por tinción con azul de Coomassie, necesiándose recurrir a inmunodetección utilizando anticuerpos contra la etiqueta de 6 histidinas. Una proteína del tamaño esperado aparecía en la fracción particulada, no detectándose nada en la fracción soluble (Fig 4.9).

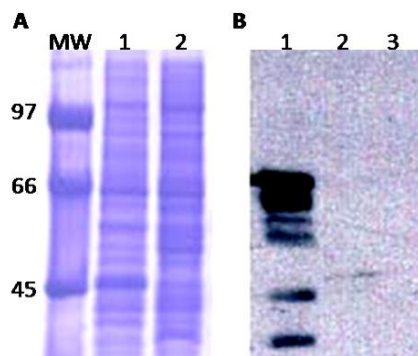


Figura 4. 9 Expresión de TTC1283. (A) Gel de acrilamida teñido con Coomassie de la expresión de la proteína TTC1283 en *E. coli*. 1: Extracto total expresando la proteína, 2: Extracto total del control negativo, que consistió en un cultivo sin inducir con IPTG. (B) Western-blot utilizando un anticuerpo anti cola de histidinas para la inmunodetección de la expresión de la proteína. 1: Fracción particulada, 2: Fracción soluble, 3: Fracción soluble sometida a tratamiento térmico.

Aunque los datos obtenidos parecían sugerir que la proteína no plegaba correctamente al ser expresada en *E. coli*, decidimos realizar una prueba de actividad sobre los sustratos colorimétricos ONPG y PNPg, utilizando para ello extractos totales de *E. coli* sobreexpresando la proteína, pero en ninguna de las condiciones ensayadas hubo actividad hidrolítica medible.



4. RESULTADOS

4.1.2 Gluco y galactosidasas

Son 3 enzimas que presentan cierta similitud de secuencia con enzimas con actividad glicosidasa, en concreto, β -galactosidasa para TTP0220 y TTP0222 y α -glucosidasa para la TTP0221. Se encuentran codificadas por genes situados en el plásmido pTT27, en un entorno genético que podría constituir uno o dos operones de internalización y degradación de azúcares (Fig. 4.10), que incluyen dos posibles transportadores de azúcares (TTP0219 y TTP0223).

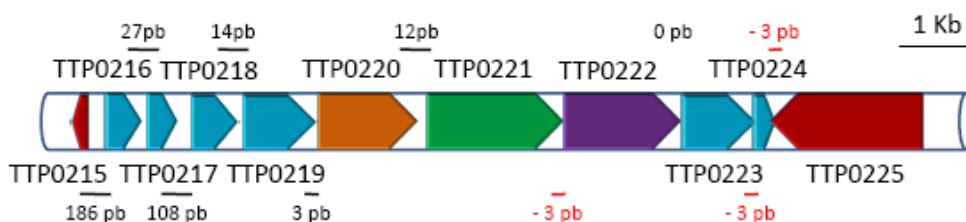


Figura 4. 10 Contexto genético de las glicosidasas TTP0220, TTP0221 y TTP0222. De izquierda a derecha, los genes son: TTP0216, TTP0217 y TTP0218: proteínas hipotéticas, TTP0219: posible transportador de azúcares. TTP0220: posible β -galactosidasa (en amarillo), TTP0221: probable α -glucosidasa (en verde), TTP0222: probable β -glucosidasa (en morado), TTP0223: probable transportador de azúcares, TTP0224: proteína hipotética.

TTP0220

TTP0220 es una posible β -galactosidasa de 64,2 kDa codificada por un gen de 1725 pb, y que no parecía presentar ningún péptido señal o segmento transmembrana, por lo que suponíamos que podría ser citoplásmica. Por comparación de secuencias parece pertenecer a la familia 2 de las glicosil hidrolasas, familia que engloba actividades β -galactosidasas, β -manosidasas y β -glucuronidasas.

Se utilizaron los oligonucleótidos oTTP0220NdeI como directo y oTTP0220HindIII como reverso para clonar este fragmento de DNA en vectores de expresión para *E. coli*, generando las construcciones pET28-220 y pET22-220, que expresaban una forma con 6 histidinas en amino terminal y la forma nativa de la proteína, respectivamente. La expresión de la proteína en su forma soluble desde pET28-220 no fue demasiado abundante, pero sí lo suficiente como para proceder a su purificación mediante cromatografía de afinidad.

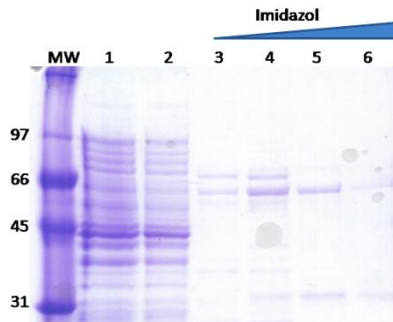
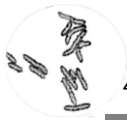


Figura 4. 11 Purificación de TTP0220. Purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de Níquel, de la enzima con cola de histidinas en amino terminal. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Proteína no unida a la columna, 2: Lavado, 3: Primera elución con 150 mM de Imidazol, 4: Segunda elución con 200 mM de Imidazol, 5: Tercera Elución con 250 mM de Imidazol, 6: Cuarta elución con 500 mM de Imidazol.

El rendimiento de la purificación, como ya esperábamos al observar los geles de expresión, no fue demasiado alto, además, como se puede observar en la Fig. 4.11 la proteína no quedó completamente pura. Los ensayos de actividad realizados utilizando tanto ONPG como PNPG resultaron negativos. Dado que la adición de histidinas en la zona amino terminal de la enzima podría estar interfiriendo en la actividad enzimática, decidimos probar la actividad de la enzima nativa, expresada desde el vector pET22-220. Los resultados de la expresión no fueron mucho mejores que los obtenidos anteriormente, y los ensayos de actividad con esta proteína sobre extractos sometidos a un tratamiento térmico para eliminar la mayor cantidad posible de enzimas de *E. coli*, tampoco dieron muestra de actividad con ninguno de los sustratos ensayados.

TTP0221

Este gen tiene un tamaño de 2382 pb y codifica una proteína de 88,56 kDa que muestra homología con α -glucosidasas de tipo II, pertenecientes a la familia 31 (GH31) de las glicosil hidrolasas, enzimas que suelen mostrar actividad exo- α -1,4-glucosidasa y oligo-1,6-glucosidasa. Enzimas homólogas a esta han sido caracterizadas en *Bacillus thermoamyloliquefaciens* donde forman un homohexámero (Kashiwabara y cols., 2000) y también en *Sulfolobus sulfataricus* (MalA) y *Picrophilus torridus* (la α -glucosidasa AgIA) (Anexo II). Un análisis mediante herramientas informáticas para tratar de predecir la posible topología de la proteína reveló la presencia de una zona con alta hidrofobicidad en la zona amino terminal de la proteína (Fig. 4.12) que podría corresponderse con un péptido señal o bien una zona de anclaje de la proteína a la membrana, aunque un análisis de la secuencia no revelaba una clara zona de corte. También aparecían otras 4 regiones transmembrana adicionales en nuestra predicción, lo que indicaba que probablemente nos encontrábamos ante una proteína insoluble, posiblemente integral de membrana.



4. RESULTADOS

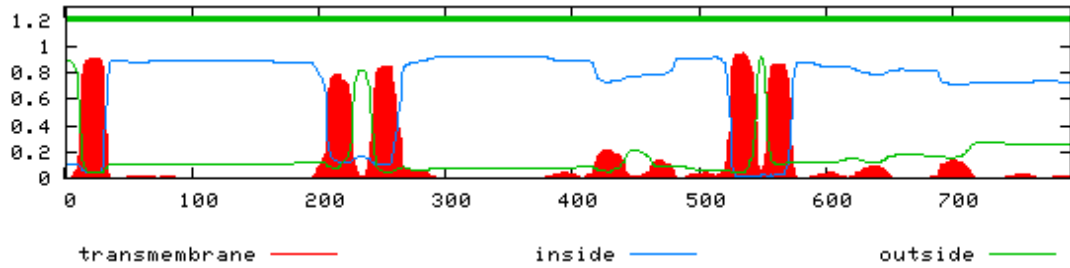


Figura 4. 12 Predicción de regiones transmembrana de la proteína TTP0221. Este análisis refleja la posible existencia de un péptido señal, y algún otro fragmento transmembrana. Imagen producida por el programa TMMOD desarrollado por Kabsay y colaboradores basándose en modelo "Hidden Markov" (Kabsay y cols., 2005).

Para la amplificación de este gen se utilizaron los oligonucleótidos oTTP0221NdeI como directo y oTTP0221HindIII como reverso y posteriormente se procedió a su clonaje en el vector pET28b(+) y pET22b(+), generando los plásmidos de expresión pET28-221 y pET22-221.

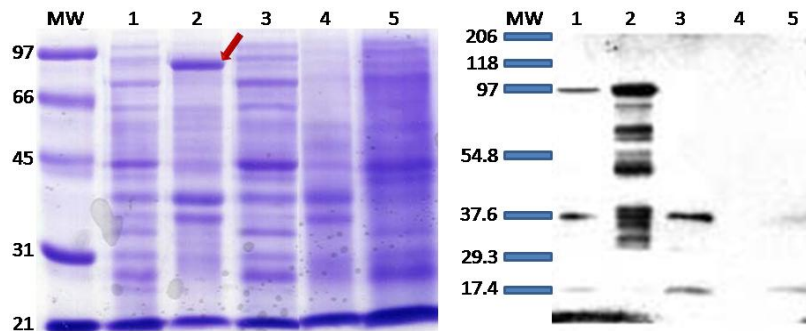


Figura 4. 13 Expresión de TTP0221 (88,56 kDa). Gel de la expresión con cola de histidinas en amino terminal en *E. coli* BL21 (DE3). MW: Marcadores de peso molecular. En la parte izquierda: Gel de acrilamida teñido con Coomassie. Derecha: resultado del Western-blot utilizando anticuerpo contra la etiqueta de histidinas 1: Extracto total de células inducidas, 2: Fracción particulada de células inducidas, 3: Fracción soluble de células inducidas, 4: Fracción particulada del control negativo, 5: Fracción soluble del control negativo. El control negativo se realizó sobre la misma construcción pero sin inducir con IPTG.

Al examinar los geles de acrilamida correspondientes a la expresión desde pET28-221 se observó la expresión de una proteína del tamaño esperado (Fig. 4.13), corroborada al realizar la inmunodetección de la cola de histidinas que lleva la proteína. Esta sobreexpresión sólo puede ser observada en la fracción particulada (Fig. 4.13 carril 2), lo que podría indicar que esta proteína plegaba incorrectamente o que se quedaba anclada a la membrana tal y como se podía predecir del análisis de la secuencia.

Un análisis de actividad de esta enzima sobre ONPG y PNPG realizado con extractos totales de *E. coli* sobreexpresando la enzima no reveló hidrólisis de los sustratos empleados en ninguna de las condiciones testadas.



TTP0222

Esta enzima es una posible β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) de 77,6 kDa, perteneciente a la familia 2 de las glicosil hidrolasas, que está codificada en un gen de 2049 pb. El análisis de la secuencia de aminoácidos no reveló la existencia de ninguna secuencia que pudiera actuar como péptido señal, ni de segmentos transmembrana (datos no mostrados).

Se utilizaron los oligonucleótidos oTTP0222NdeI y oTTP0222HindIII para la amplificación de este y se generaron los vectores pET28-222 y pET22-222 para producir proteína con 6 histidinas en amino terminal o nativa, respectivamente.

La proteína que poseía la extensión de polihistidinas en amino terminal se sobreexpresó en cantidad suficiente para su observación con azul Coomassie en la fracción soluble (Datos no mostrados), por lo que se procedió a su purificación utilizando una columna de Níquel-agarosa.

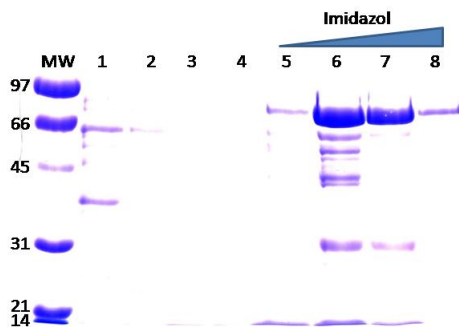


Figura 4. 14 Purificación de TTP0222. Gel de la purificación por columna de afinidad de la enzima expresada con cola de histidinas en *E. coli* BL21(DE3). MW: Marcadores de peso molecular. 1: Fracción de las proteínas no unidas a la columna, 2, 3 y 4: Lavados, 5: Primera elución con 65 mM de imidazol, 6: segunda elución con 125 mM de imidazol, 7: Tercera elución con 250 mM de imidazol, 8: Cuarta elución con 500 mM de imidazol. Condiciones de la expresión: 0,5 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C.

El resultado de la purificación nos ofreció una proteína bastante pura y en una buena concentración (Fig. 4.14 carriles 7 y 8) que utilizamos para realizar ensayos de actividad, empleando como sustratos distintos paranitrofenilglicósidos (pNF- β -Glc, pNF- β -Gal, pNF- α -Man, pNF- β -GlcNAc). Encontramos actividades relativamente bajas de tipo β -glicosidasa (39,7 U/mg prot), β -galactosidasa (55,84 U/mg prot), α -manosidasa (21,5 U/mg prot) y β -nacetilglucosaminidasa (65,09 U/mg proteína) (Unidades en μ moles de sustrato hidrolizado/minuto).

4.1.3 TTC0107

El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma bacteriano, tiene un tamaño de 1587 pb y codifica una posible α -glucosidasa/glicosil hidrolasa (EC 3.2.1.20) de 61,8 kDa perteneciente a la familia 31 de glicosil hidrolasas (GH31), de la superfamilia de las α -amilasas. El análisis de secuencia reveló que carece de péptido señal o de dominios transmembrana. El contexto genético en el que se encuentra este gen (Fig. 4.15) indica la probable existencia de un operon TTC0107-TTC0108-TTC0109 de función no predecible dada



4. RESULTADOS

de la falta de homología de las otras dos proteínas implicadas, con enzimas de función conocida.

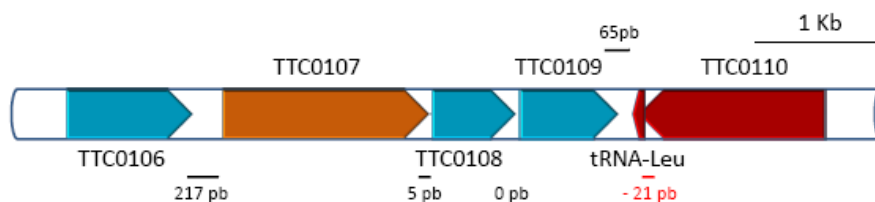


Figura 4. 15 Contexto genético de la enzima TTC0107. De izquierda a derecha tenemos la TTC0106: Proteína Veg136, TTC0107: Posible α -glicosidasa, TTC0108: Metiltransferasa, TTC0109: Proteína hipotética, TTC3001: tRNA-Leu, TTC110: Apolipoproteína N-aciltransferasa.

Esta enzima se encuentra muy conservada en otras especies de termófilos, presentando gran homología de secuencia con otras α -amilasas como las de *Thermus aquaticus*, oligo glucosidasa de *Bacillus flavocaldarius* (Kashiwabara y cols., 1998) o α -glucosidasas como la de *Thermus caldophilus* (Nashiru y cols., 2001), y también con una Fosfo- α (1,1)glucosidasa de *Bacillus subtilis* (Gotsche y cols., 1995) (AnexoI).

Para su amplificación se utilizaron los oligonucleótidos oTTC0107NdeI como directo y oTTC0107HindIII como reverso (Anexo I) y posteriormente se procedió a su clonaje en el vector pET28b(+) para formar el pET28-107 y en el vector pET22b(+) para formar el pET22-107. Con estas construcciones se transformaron células de *E. coli* BL21 y se indujo la expresión de la proteína con 1mM de IPTG, a 37°C durante 4 horas. Como ocurría en otras expresiones probadas de proteínas termófilas en *E. coli*, gran parte de la proteína expresada aparecía como agregados en la fracción particulada (Datos no mostrados); aun así, su presencia en la fracción soluble era suficiente como para proceder a su purificación (Fig. 4.16).

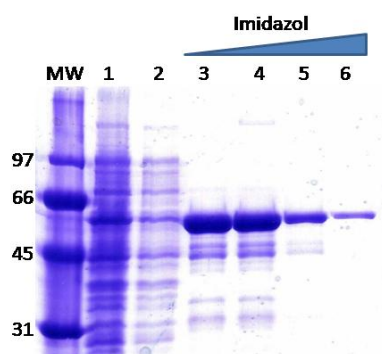


Figura 4. 16 Purificación de TTC0107. Purificación mediante cromatografía de afinidad, utilizando una resina de Níquel, de la enzima con cola de histidinas en amino terminal. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Proteína no unida a la columna, 2: Lavado de la columna, 3: Primera elución con 150 mM de Imidazol, 4: Segunda elución con 200 mM de Imidazol, 5: Tercera elución con 250 mM de Imidazol, 6: Cuarta elución con 500 mM de Imidazol.

Una vez obtenida la fracción altamente enriquecida en la enzima se procedió a la realización de los primeros ensayos enzimáticos, observándose actividad sobre PNPg, lo que confirmaría la predicción bioinformática que indicaba una posible actividad α -glicosidasa. La



actividad específica de la fracción enriquecida de la enzima sobre PNPG fue de 8753 U/mg de proteína (Unidades en μ moles de sustrato hidrolizado por minuto).

Dada esta elevada actividad específica mostrada por la enzima pudimos abordar el estudio de su temperatura óptima y su estabilidad térmica. La temperatura óptima de funcionamiento de la enzima, con PNPG como sustrato en tampón fosfato a pH 7,3 señaló que rondaba los 80°C, 8°C por encima de la temperatura óptima de crecimiento de *T. thermophilus* HB27 (Fig. 4.17).

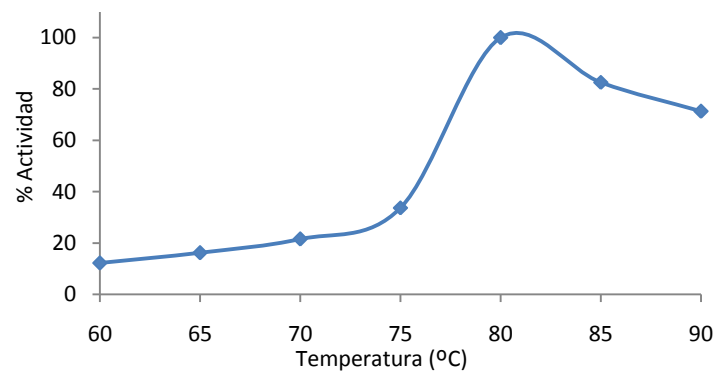


Figura 4. 17 Efecto de la temperatura en la actividad α -glucosidasa de TTC0107. En el eje de ordenadas se representa la actividad de la proteína en porcentaje con respecto al máximo obtenido y en abscisas la temperatura a la que se llevaron a cabo las reacciones.

Los ensayos de estabilidad térmica de la proteína se llevaron a cabo en el mismo tampón que en el apartado anterior y se analizaron los resultados tras distintos períodos de incubación a 60, 70 y 80°C, midiendo posteriormente la actividad a 80° C. La mayor estabilidad se observó a 60°C con una caída en las primeras horas del ensayo de aproximadamente el 20% de la actividad inicial, para luego mantenerse estable incluso a las 24 horas de iniciado el experimento. Para 70 y 80°C se observan resultados similares, primero una pronunciada caída que dejaría la actividad de la enzima en un 40-50% de la inicial, para luego mantenerse o iniciar un suave descenso que le lleva a mantener hasta un 40% de la actividad pasadas 24 horas (Fig. 4.18).



4. RESULTADOS

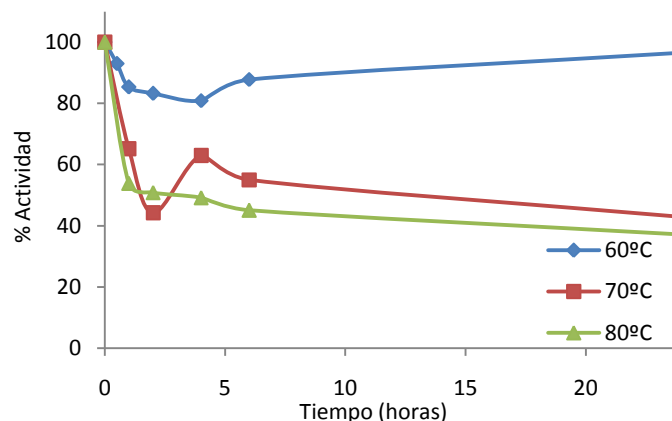


Figura 4. 18 Estabilidad térmica de TTC0107. Representación gráfica de la inactivación térmica de la enzima a 60, 70 y 80°C. Los valores representados son porcentuales con respecto al mayor observado en cada una de las series.

También se realizó la expresión de la enzima nativa desde el pET22-107 para ver si la etiqueta de histidinas podría afectar de algún modo la actividad de la enzima. Al no portar las 6 histidinas que nos permitieron la purificación de la proteína sobre la resina de níquel-agarosa, el enriquecimiento del extracto celular en la enzima se realizó mediante un tratamiento térmico de la fracción soluble de *E. coli* para desnaturar las proteínas del organismo mesófilo hospedador. Al realizar la comparativa entre las dos enzimas, no sólo no se observó un descenso en la actividad de la proteína marcada con las histidinas, si no que ésta parecía incluso aumentar, llegando a ser el doble que en la enzima nativa, 8753 U/mg frente a 4075 U/mg de proteína total respectivamente. Además, la forma nativa, parecía desarrollar la capacidad de hidrolizar, aunque con mucha menor actividad específica, enlaces tipo β , pero la enzima no parece activa sobre sustratos N-acetilados (Pérez-Sánchez, 2009).

Durante la realización de este trabajo, en el año 2008, Alarico y colaboradores expresaron y purificaron esta enzima concluyendo que su sustrato principal era la trealosa, aunque es una enzima capaz de hidrolizar otros azúcares como isomaltosa, palatinosa, kojibiosa, nigerosa, turanosa, sacarosa, etc. Asimismo, por comparación de secuencia con otras α -glicosidasas de la misma familia descritas, determinaron las 7 regiones conservadas comunes a la familia 13 de glicosido hidrolasas, los 3 residuos catalíticos, que serían Asp197, Glu264 y Asp326, y las histidinas de unión al sustrato, His100 y His325 (Alarico y cols., 2008).

4.1.4 TTP0072

El gen que codifica esta enzima se encuentra en el megaplásmido pTT27 y tiene una longitud de 1431 pb. Está anotada como una probable α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) de 53.64 kDa perteneciente a la familia 31 de las glicosil hidrolasas. La predicción de zonas hidrofóbicas dentro de la proteína no reveló la presencia de péptido señal ni de fragmentos transmembrana.



Al analizar su contexto genómico observamos varios genes codificantes de hipotéticas proteínas de función desconocida y otra enzima potencialmente implicada en la modificación e hidrólisis de galactosa con UDP (TTP0071) (Fig. 4.19).

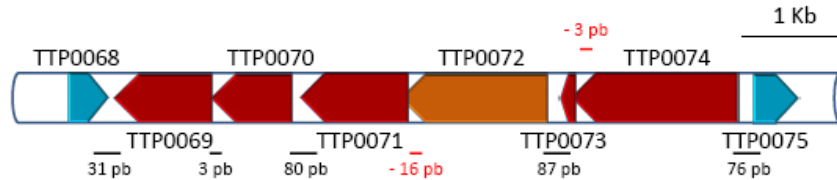


Figura 4. 19 Contexto genético de la α -glicosidasa TTP0072 (en amarillo). La enzima se encuentra acompañada por las proteínas (en rojo, comenzando por la izquierda), TTP0069: Proteína hipotética, TTP0070: Proteína hipotética, TTP0071: Posible galactosa 1-fosfato uridiltransferasa, TTP0072: Posible α -galactosidasa, TTP0073: Proteína hipotética, TTP0074: aidB acil-coA deshidrogenada.

Se utilizaron los oligonucleótidos oTTP0072NdeI y oTTP0072HindIII para amplificar el gen TTP0072 y el fragmento amplificado se clonó dentro del plásmido pET28b, con el que se transformó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión. Aunque la expresión de la proteína en este sistema no fue muy abundante, y la mayor parte aparecía en la fracción particulada como agregados insolubles, se consiguió producir suficiente cantidad como para proceder a su purificación. Se trató de utilizar los mutantes de *E. coli* denominados C41 y C43 (Miroux y Walker, 1996) para obtener una expresión mayor de proteína en forma soluble y tratar de evitar, en la medida de lo posible, la formación de los cuerpos de inclusión y la posible toxicidad que la expresión de la proteína pudiera provocar en la bacteria hospedadora, pero los niveles de expresión obtenidos en estas cepas no diferían mucho de los observados para la BL21 DE3 en las condiciones ensayadas.

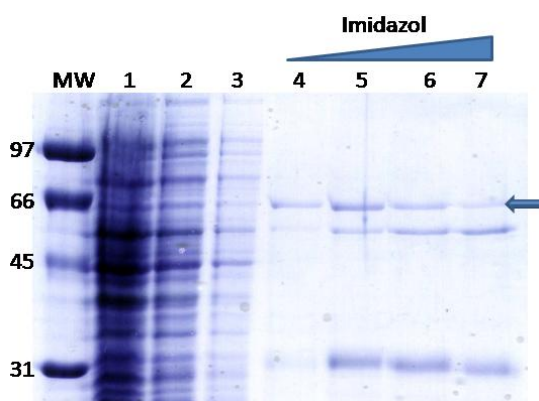


Figura 4. 20 Purificación de TTP0072. Gel de la purificación de la proteína con cola de histidinas, mediante cromatografía de afinidad. A partir de una sobreexpresión controlada en *E. coli* BL21 desde el plásmido pET28-72 con 0,3 mM IPTG, durante 3 horas a 37°C. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Paso de muestra de la columna, 2 y 3: lavados de la columna. 4: Primera elución con 65 mM de Imidazol, 5: Segunda elución con 125 mM de imidazol, 6: tercera elución con 250 mM de imidazol, 7: Cuarta elución con 500 mM de imidazol. La flecha marca la banda correspondiente a la enzima.

Como se puede observar en la figura 4.20, la enzima no parecía poder separarse de los contaminantes que la acompañaban con ningún lavado, ni tras la elución con 0,5 M de imidazol, quizá porque pertenecen a distintos fragmentos de la misma proteína que se encuentra degradándose dentro de la bacteria, ya que, no sólo se copurificaban sino que habían soportado el tratamiento térmico; demostrando una termoestabilidad similar a la de



4. RESULTADOS

la enzima purificada. Además, como preveíamos por su escasa expresión, no se consiguió obtener una gran cantidad de proteína pura.

A pesar de que el rendimiento no fue muy alto y la cantidad de proteína obtenida era escasa se realizaron unas pruebas de actividad utilizando el sustrato colorimétrico PNPg en tampón fosfato 50 mM pH 7,3, comprobando que esta enzima era capaz de hidrolizar este sustrato, resultando una actividad específica de 106 U/mg de proteína (Unidades en $\mu\text{moles de sustrato} \times \text{min}^{-1}$). Una vez confirmada la actividad nos dispusimos a caracterizar la temperatura óptima.

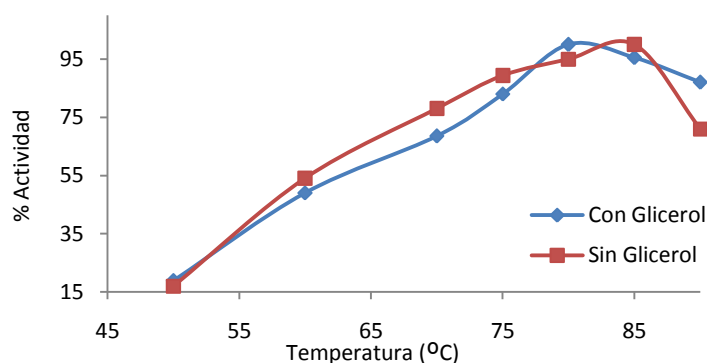


Figura 4. 21 Efecto de la temperatura en la actividad α -glucosidasa de TTP0072. En el eje de ordenadas se representa la actividad de la proteína en porcentaje con respecto al máximo obtenido y en abscisas se representa la temperatura a la que se llevaron a cabo las distintas reacciones.

Como se puede observar en la figura 4.21 la temperatura óptima detectada para la proteína fue de unos 80-85°C, que se correspondería con unos 8-12 °C más que la óptima de crecimiento para *T. thermophilus* HB27.

Una vez determinada la temperatura óptima de trabajo de la enzima, el siguiente paso fue averiguar el rango de pH al que podía desarrollar su actividad, para lo que utilizamos diferentes tampones según el intervalo de pH en el que estuviéramos trabajando, y escogimos una temperatura de 80°C.

El pH de trabajo de la enzima reveló estar próximo a 6, aunque mantuvo una destacable actividad en el rango de pH 4 ay pH 7,5. Al utilizar el tampón Tris-HCl, se inhibió casi por completo la actividad de la enzima (Fig. 4.22).

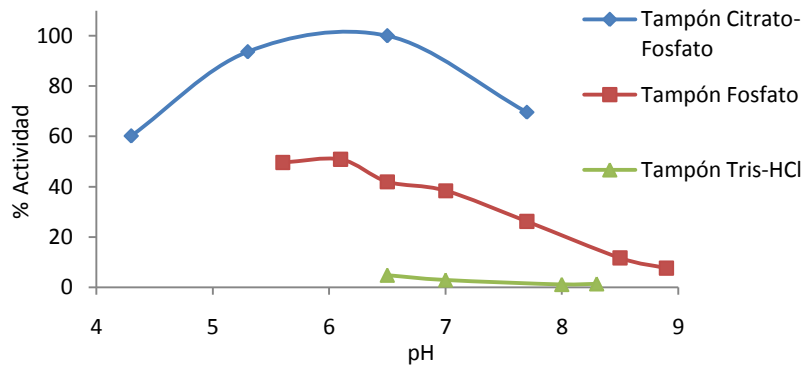


Figura 4. 22 pH óptimo de la enzima TTP0072. Se utilizó PNPg a una temperatura de 75°C. En el eje de ordenadas se representan los porcentajes de actividad con respecto al máximo obtenido y en el de abscisas los valores de pH a los que se llevaron a cabo las actividades.

Para realizar el estudio sobre la termoestabilidad de la enzima utilizamos un tampón fosfato a pH 6 y medimos actividad enzimática a 80°C y 5 minutos después de incubar la enzima a diferentes temperaturas (70, 80 y 90° C).

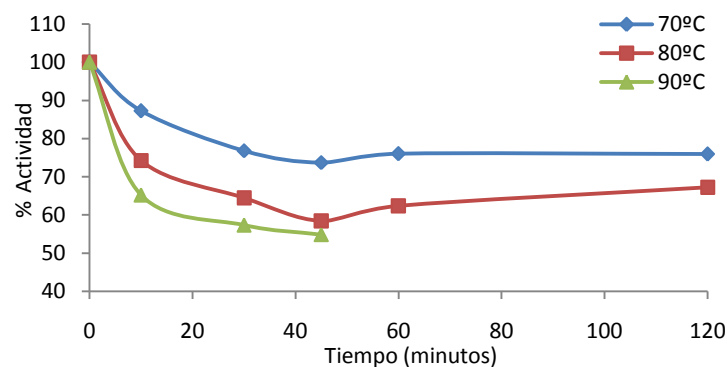


Figura 4. 22 Estabilidad térmica de la enzima TTP0072. Los valores representados son porcentuales con respecto al mayor observado en cada una de las series. En ordenadas está el porcentaje de actividad con respecto al máximo de la serie y en abscisas el tiempo de incubación previo al ensayo enzimático, en minutos.

Dependiendo de la temperatura utilizada los ensayos de inactivación térmica revelaron un descenso de entre un 20 y un 40% en la actividad de la enzima en los primeros minutos de incubación, para después mantenerse durante el resto del tiempo que duró el ensayo (2 horas). Inclusive a 90°C se mantiene más del 50% de la actividad después de una hora de incubación (Fig. 4.23).

4.1.5 TTP0042

El gen que codifica esta enzima se encuentra en el plásmido pTT27, tiene una longitud de 1295 pb y codifica una posible β -glicosidasa (EC 3.2.1.21) de 48,6 kDa, perteneciente a la familia 1 de glicosil hidrolasas. La predicción de zonas hidrofóbicas dentro de la proteína hace suponer que se trata de una proteína soluble del citoplasma bacteriano.



4. RESULTADOS

El análisis del contexto genómico (Fig. 4.37) en el que se encuentra este gen revela que pertenece a un posible operón que estaría encargado de la detección de azúcares en el medio, su internalización y su posterior degradación. El estudio de este operón se describe en el capítulo 4.5

Para sobreexpresar la proteína codificada por este gen utilizamos los oligonucleótidos oTTP0042NdeI como directo y oTTP0042HindIII como reverso para su amplificación, y lo clonamos en el vector pET28b(+) generando el plásmido pTTP0042. Con éste se consiguió una expresión considerable en BL21 (DE3), detectada en geles de acrilamida teñidos con azul Coomassie y mediante inmunodetección con anticuerpos anti histidinas, aunque gran parte de esa expresión pertenecía a la fracción particulada, posiblemente como cuerpos de inclusión. La fracción soluble obtenida se purificó mediante tratamiento térmico y cromatografía de afinidad en columnas de níquel-agarosa (Fig. 4.24).

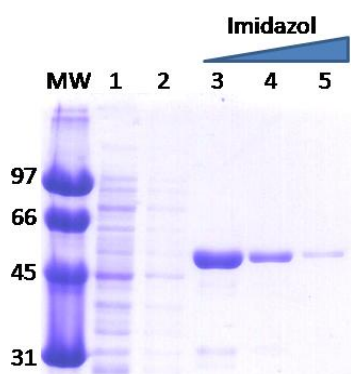


Figura 4. 23 Purificación de TTP0042. Gel de acrilamida teñido con Coomassie de la purificación de la β -glicosidasa expresada con cola de Histidinas en *E. coli* con 0,3 mM de IPTG durante 4h a 37°C. MW: Marcadores de peso molecular. 1 y 2: lavados, 3: Elución con 125 mM de imidazol, 4: Elución con 250 mM de imidazol, 5: Elución con 500 mM de imidazol.

La enzima resultó ser activa en la hidrólisis de ONPG a 70°C. Es reseñable que esta actividad no se ve modificada por cationes divalentes como ocurre con otras glicosidasas, (Kengen y cols., 1993; Bronnenmeier y Staudenbauer, 1988), ya que es posible eluirla de la columna de Níquel-agarosa con EDTA, sin pérdida de actividad. En la Tabla 4.4 se muestran los resultados obtenidos utilizando distintos sustratos cromogénicos.



Tabla 4. 3 Actividad de la enzima TTP0042. Actividad sobre distintos sustratos de la enzima con cola de histidinas en amino terminal, expresada en *E. coli* y purificada mediante cromatografía de afinidad (Pérez-Sánchez, 2009). Definimos unidades de actividad específica como μ moles de sustrato hidrolizado por minuto.

SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg prot.)
p NF- α -Glc	-
p NF- β -Glc	1130
p NF- α -Gal	-
p NF- β -Gal	1761
p NF- α -Fuc	-
p NF- β -Fuc	2325
p NF- α -Man	-
p NF- β -Man	190
p NF- α -GlcNAc	-
p NF- β -GlcNAc	-
p NF- α -GalNAc	-
p NF- β -GalNAc	-

Como se puede deducir de estos resultados, TTP0042 es muy específica para la hidrólisis de disacáridos con enlaces tipo β , siendo especialmente interesante su gran actividad β -glucosidasa y β -galactosidasa. Mostró también cierta actividad β -manosidasa.

Una vez comprobado que la enzima era activa lo siguiente que se hizo fue determinar su temperatura óptima de funcionamiento. Utilizamos 5 μ g de enzima en tampón Z (Tabla 3.5) y medimos la actividad a varias temperaturas.

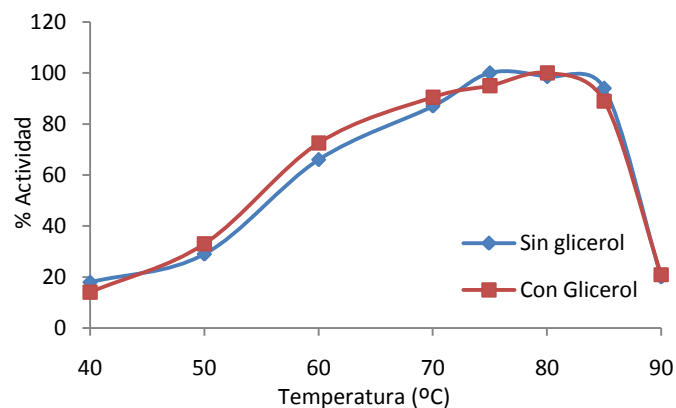


Figura 4. 24 Efecto de la temperatura en la actividad β -glucosidasa de TTP0042. En el eje de ordenadas se representa la actividad de la proteína en porcentaje con respecto al máximo obtenido y en abscisas se representa la temperatura a la que se llevaron a cabo las distintas reacciones.

Como se puede observar en la figura 4.25, la actividad de la enzima crece de una manera continua desde los 40°C, donde tiene algo menos del 20% de su actividad máxima,



4. RESULTADOS

hasta alcanzar su máximo rondando los 80°C, para luego desplomarse si se aumenta la temperatura hasta los 90°C. Al utilizar glicerol como crioprotector para guardar alícuotas de enzima durante largos períodos de tiempo, debíamos comprobar si éste tenía algún efecto sobre la actividad enzimática, por lo que se probaron en paralelo alícuotas de la enzima purificada almacenadas en tampón fosfato 20 mM pH 7.5 a 4°C y con glicerol al 40% a menos 20°C. Como se observa en la fig. 4.25 el almacenamiento a -20°C con glicerol al 40% no afecta a la actividad de la enzima.

Para determinar el pH óptimo de la enzima, realizamos los ensayos en diferentes tampones con 5 µg de proteína pura a 80°C. Los resultados sugirieron un rango bastante amplio de pH de actividad máxima y con un valor óptimo a pH 6,5 (Fig. 4. 26).

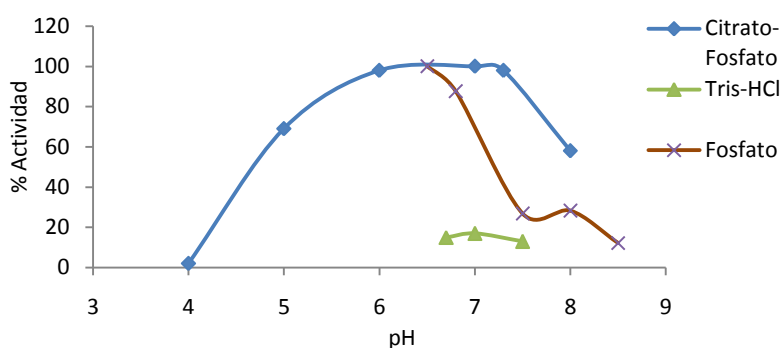


Figura 4. 25 pH óptimo de la enzima TTP0042. Se utilizó como sustrato ONPG y las medidas de actividad se realizaron a 80°C. En el eje de ordenadas se representan los porcentajes de actividad con respecto al máximo obtenido y en el de abscisas los valores de pH a los que se llevaron a cabo las actividades.

Al igual que ocurría con la enzima TTP0072, la TTP0042 es fuertemente inhibida por el tampón Tris-HCl.

La medición de la estabilidad térmica de la proteína, se realizó mediante la incubación de la enzima a 60, 70 y 80°C durante diferentes tiempos para después medir su actividad en tampón Z a 80°C.

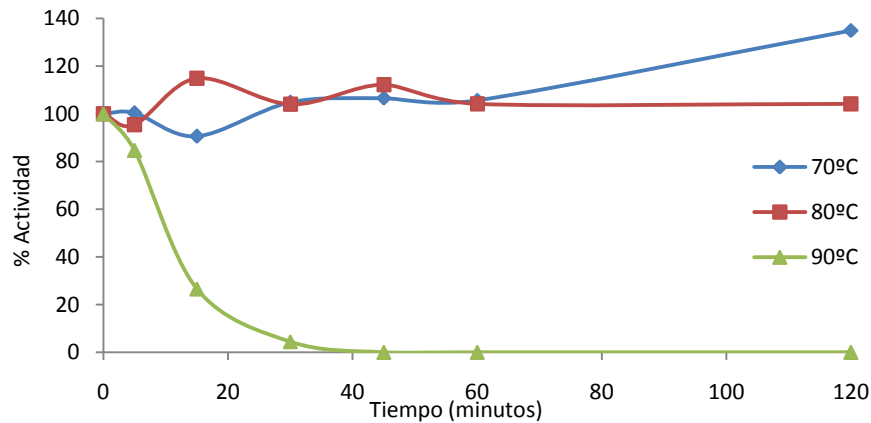


Figura 4. 26 Estabilidad térmica de TTP0042. Representación gráfica de la inactivación térmica de la enzima TTP0042 a 70, 80 y 90°C. Los valores representados en el eje de ordenadas son porcentuales con respecto al mayor observado en cada una de las series y en el de abscisas el tiempo de incubación a la temperatura indicada, previo a la realización del ensayo, en minutos.

Como se puede observar en la figura 4.27, la enzima mantuvo su actividad inicial después de 2 horas de incubación a 70 u 80°C. A 90°C la actividad caía rápidamente, reduciéndose hasta el 50% en 10 minutos y viéndose completamente inactivada en menos de 40 minutos.

4. 2 EXPRESIONES EN *Thermus thermophilus*

Para analizar si la ausencia de actividad observada en la expresión en *E. coli* de muchas de las enzimas seleccionadas era debida a la diferencia de hospedador, procedimos a ensayar su expresión en *T. thermophilus*.

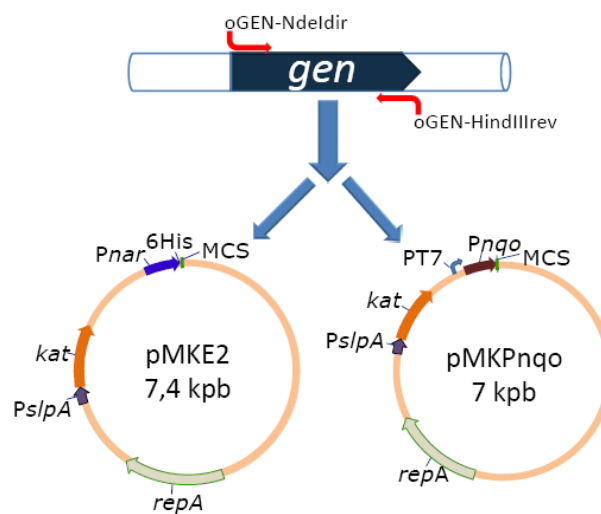


Fig. 4. 27 Esquemas de los clonajes en los vectores pMKE2 y pMKPnqo.



4. RESULTADOS

Inicialmente decidimos utilizar el plásmido pMKE2 (Fig. 4.28) que permite la expresión de genes desde el promotor *Pnar*. Este promotor del operón de la nitrato reductasa de respiración anaerobia se induce por nitrato en condiciones de anoxia (Moreno y cols., 2003). El vector permite también fusionar una cola de histidinas en el extremo amino de la proteína para facilitar su purificación.

Utilizando los mismos oligonucleótidos que en las construcciones para *E. coli*, se construyeron los plásmidos pMKE2-42, pMKE2-107, pMKE2-220, pMKE2-221 pMKE2-222, pMKE2-1198 y pMKE2-1283, para la expresión de TTP0042, TTC0107, TTP0220, TTP0221, TTP0222, TTC1198 y TTC1283, respectivamente. Con estas construcciones transformamos las cepas de *T. thermophilus*, HB27c y NAR1, que tienen la maquinaria capaz de expresar proteínas bajo el control de *Pnar*, e indujimos la expresión de las proteínas, tanto a 60 como a 70°C según se describe en Materiales y Métodos (3.3.3.3)

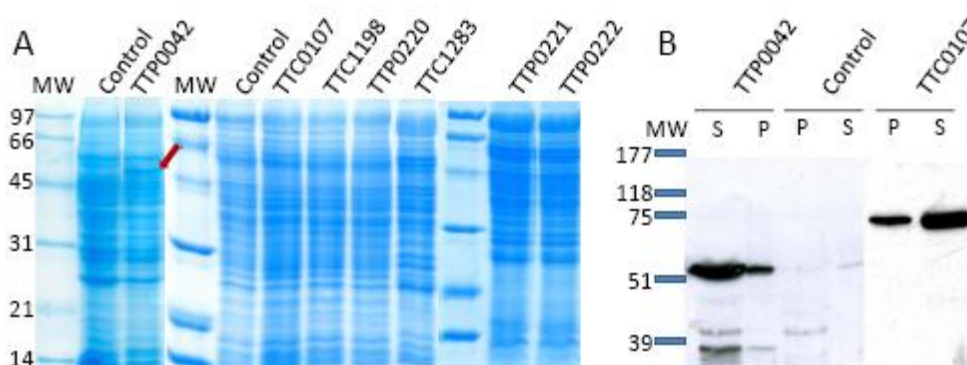


Figura 4. 28 Expresión homóloga d proteínas en *T. thermophilus* desde el promotor *Pnar*. Geles de la expresión de proteínas en *T. thermophilus* utilizando el plásmido pMKE2. MW: marcadores de peso molecular. **(A)** Gel SDS-PAGE teñido con azul Coomassie, **(B)** Inmunodetección utilizando anticuerpos que reconocen la cola de histidinas. Controles: la cepa correspondiente de *T. thermophilus* transformada con un pMKE2 vacío y sometida al mismo tratamiento de expresión. S: Fracción particulada del extracto, P: Fracción soluble.

Las únicas proteínas de las que se consiguió una expresión observable fueron TTP0042 y la TTC0107, que ya habíamos expresado en *E. coli* en forma activa. Con respecto a las demás no se pudo observar nada, ni en los geles de acrilamida, ni mediante inmunodetección de la etiqueta de histidinas. Ante la posibilidad de que, aun habiendo expresión, nosotros no pudiéramos detectarla por haberse procesado la cola de histidinas, se hicieron ensayos enzimáticos con los extractos, utilizando ONPG y PNPG como sustratos no observándose diferencias con respecto al control, salvo para la expresión de TTP0042 y TTC0107.

La siguiente opción que escogimos para tratar de expresar estas proteínas en *Thermus*, fue la utilización del plásmido pMKPnqo (Fig. 4.28), que permite una expresión constitutiva de proteínas en *Thermus*, en condiciones de oxigenación, desde el promotor *Pnqo* de la NDH deshidrogenasa respiratoria. De este modo, utilizando los mismos oligonucleótidos que en el resto de ocasiones, generamos los plásmidos pMKPnqo-72,



pMKPnqo-107, pMKPnqo-220, pMKPnqo-221, pMKPnqo-222, pMKPnqo-1198, pMKPnqo-1828, con los que transformamos *T. thermophilus* HB27 y tratamos de detectar las proteínas.

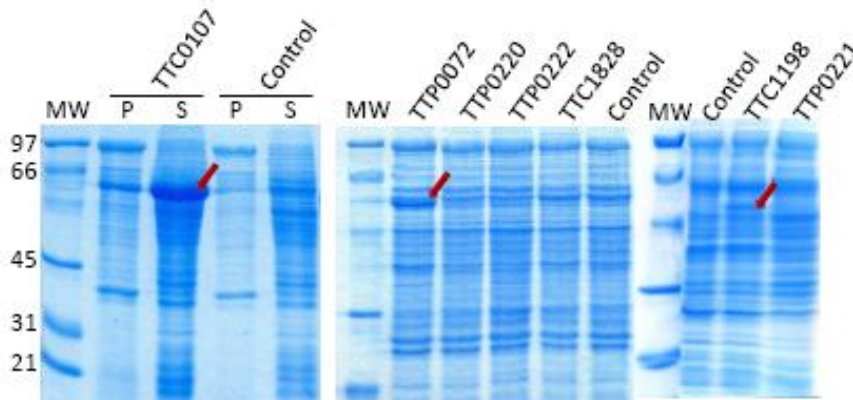


Figura 4. 29 Expresión homóloga de proteínas en *T. thermophilus* desde el promotor Pnqo. Geles de acrilamida teñidos con Coomassie de las expresiones de las glicosidasas en *T. thermophilus* desde el plásmido pMKPnqo. MW: Marcadores de peso molecular, P: Fracción particulada, S: Fracción soluble.

En esta ocasión no existía la posibilidad de inmunodetección de las proteínas expresadas ya que, ni tenían una etiqueta de histidinas, ni disponíamos de anticuerpos para las proteínas. Observando los geles de acrilamida, las únicas proteínas que parecían estar expresándose en niveles suficientes como para ser detectadas mediante tinción con azul de Coomassie fueron TTC0107, TTP072 y TTC1198, siendo particularmente relevantes los altos niveles de expresión observados para la proteína TTC0107 en su forma soluble que contrasta con su tendencia a formar agregados insolubles cuando expresamos esta proteína en *E. coli* (Fig. 4.30). Aun así, podría ser que, aun habiendo sobreexpresión, esta se diera en niveles por debajo de los del límite de detección mediante este tipo de técnicas. Decidimos pues intentar, una vez más, realizar ensayos enzimáticos utilizando ONPG y PNPg como sustratos de las enzimas, sólo observando un aumento de la actividad con respecto al control en el caso de TTC0107 y TTP0072.

En resumen, podemos decir que empleando vectores específicos de *Thermus*, pudimos observar la expresión de TTP0042, TTP0072, TTC0107 y TTC1198, detectándose actividad únicamente en las tres primeros, en las que ya habíamos observado actividad al ser expresadas en *E. coli*.

4. 3 EXPRESIONES EN *Streptomyces lividans*

Diversas especies de *Streptomyces* han demostrado ser buenos hospedadores para la producción de proteínas heterólogas (Zhu y cols., 2011; Sianidis y cols., 2006; Béki y cols., 2003; Geueke y Hummel, 2003; Pozidis y cols., 2001), sobre todo proteínas periplásmicas o extracelulares, ya que, gracias a sus eficientes sistemas de secreción, son capaces de secretar al medio grandes cantidades de proteína (van Wely y cols., 2001). De entre todas las especies, *S. lividans* JI66 es la más frecuentemente utilizada debido a dos razones, la



4. RESULTADOS

primera es que su sistema de restricción permite la entrada y propagación de vectores provenientes de *E. coli*, y porque, además, muestra unos niveles muy bajos de actividad proteolítica extracelular (Díaz y cols., 2004). Por estas razones y por contar con alto contenido en G-C en su genoma, decidimos probar este sistema para la expresión de algunas de las glicosilasas de *Thermus*, en colaboración con el grupo del Dr. R. Santamaría del Instituto de Microbiología Bioquímica (CSIC-USAL).

Las enzimas escogidas fueron la β -glicosidasa TTP0042, que ya habíamos conseguido expresar y caracterizar en *E. coli* y, como control y para probar la capacidad de este organismo para la expresión de enzimas de *Thermus* señaladas para ser exportadas, escogimos la fosfatasa alcalina periplásmica PhoA, de la cual ya conocíamos que podía ser expresada y exportada en este sistema (Castán y cols., 2002). Los plásmidos de expresión para *Streptomyces* de las enzimas se obtuvieron en 2 pasos. Primero los genes se obtuvieron a partir de los plásmidos pTTP0042 y pET22PA mediante digestión con *Nde*I y *Hind*III y con *Sal*I y *Nde*I, respectivamente y los fragmentos aislados fueron clonados en pXHis1 (Adham y cols., 2001). En un segundo paso estos cassettes de expresión se aislaron mediante digestión con *Bgl*II y fueron transferidos al vector multicopia de *Streptomyces* pIJ702 (Katz y cols., 1983), bajo el control del promotor de la xilanasa *xysA* (*xysAP*) de *Streptomyces halstedii* y entre los terminadores de transcripción *mmrt* (T1) y *fdt* (T2), dando lugar a los plásmidos pTXGAL1 y pTXF1 (Fig. 4.31), con los que se transformaron los protoplastos de *S. lividans* JI66.

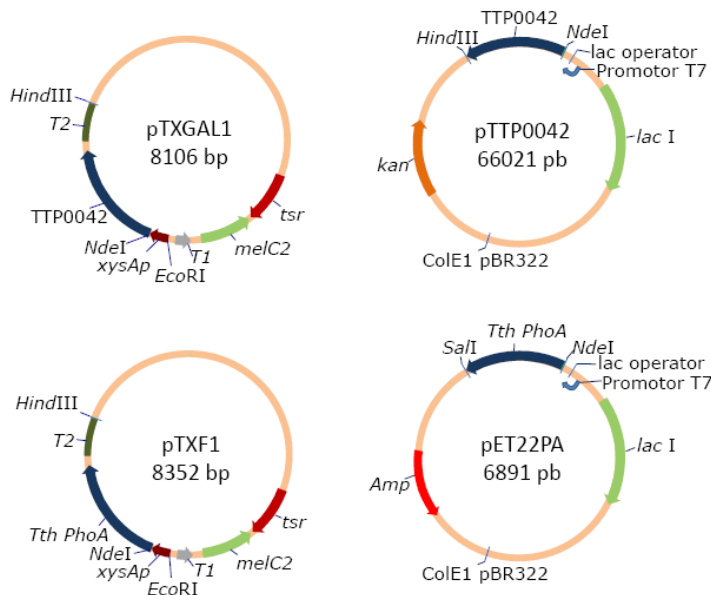


Figura 4. 30 Plásmidos de expresión construidos. Plásmidos para la expresión de las enzimas TTP0042 (pTXGal1) y fosfatasa alcalina (pTXF1) y *E. coli* de la TTP0042 (pTTP0042) y la fosfatasa alcalina (pET22PA) *tsr*: Resistencia a tiostreptona, *melC2*: gen de la tirosinasa, T1: terminador transcripcional *mmrt*, *xysAp*: promotor de la xilanasa, TTP0042: glicosidasa de *T. thermophilus* HB27, T2: terminador transcripcional *fdt*, *kan*: resistencia a la kanamicina, *lacI*: gen de la galactosidasa, Promotor T7: Promotor de la polimerasa del fago T7.

Una vez obtenidos los transformantes se procedió a la inducción de la expresión de las proteínas como viene detallado en Materiales y Métodos (3.3.3.2). Se tomaron muestras



del cultivo a los 4 y 6 días para analizarlas y se comparó la producción de la enzima con una inducción de la misma en *E. coli* BL21 (DE3).

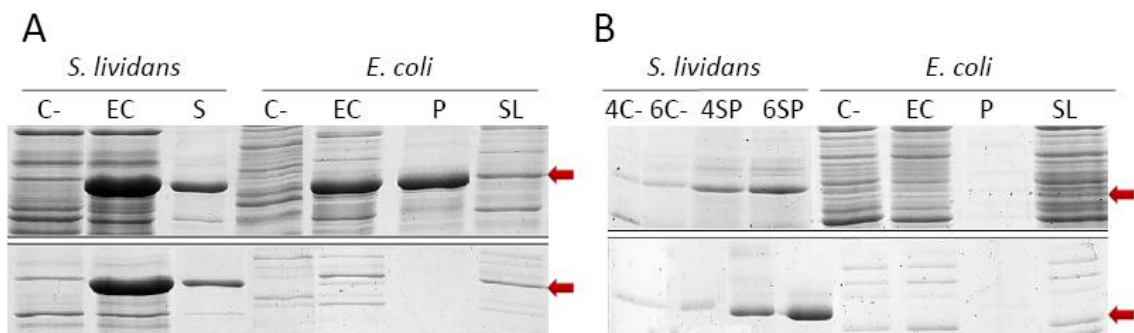


Figura 4.31 Comparación de la producción de la β -glucosidasa TTP0042 (A) y la fosfatasa alcalina PhoA (B) de *T. thermophilus* HB27 en *S. lividans* y *E. coli*. Transformaciones con pTXGAL1, pTXF1, pTTP0042 y pET22PA, respectivamente. C-: Expresiones con los plásmidos vacíos, EC: Extractos celulares completos, S: extracto extracelular, P: Fracción particulada, SL: fracción de proteínas solubles tras romper las células. Abajo: proteínas restantes tras el tratamiento térmico, de 70°C durante 30 minutos. 4C-: Control negativo a los 4 días, 6C-: Control negativo a los 6 días, 4SP: Sobrenadante a los 4 días, 6SP: Sobrenadante a los 6 días. Abajo, proteínas restantes tras el tratamiento térmico, de 70°C durante 30 minutos. Las flechas indican la posición de la proteína (Díaz y cols., 2008).

Para el gen TTP0042 se observó una buena producción de la enzima en los geles teñidos con azul de Coomassie tanto en *Streptomyces* como en *E. coli* (fig. 4.32), aunque en este último caso gran parte de esa producción quedaba como precipitados insolubles, como ya habíamos observado en anteriores ocasiones. Sin embargo en el caso de *Streptomyces*, casi toda la enzima producida aparecía soluble dentro de la bacteria, con una actividad específica de 4933 U/mg de proteína (Unidades en μ moles de ONPG hidrolizado/minuto). Sorprendentemente una pequeña porción quedaba soluble en el medio extracelular aun tratándose de una proteína citosólica en su huésped natural, resultando una actividad medible en el medio de cultivo de 528 U/mg de proteína (Unidades en μ moles de ONPG hidrolizado/minuto). La secuencia amino terminal de la proteína secretada fue determinada como "TENAEKFL", que se corresponde con la esperada de la proteína, sólo faltando la Met inicial, por lo que la proteína localizada en el medio externo no es procesada por algún sistema de secreción desconocido. La producción intracelular no difería considerablemente entre las muestras tomadas a 4 ó 6 días (datos no mostrados). En el caso de *E. coli*, la actividad específica presente en la bacteria es relativamente baja (1363 U/mg de proteína) aun apareciendo una buena expresión de la proteína. Esto parece debido a que gran parte de la expresión se produce como agregados insolubles de proteínas incorrectamente plegadas que carecen de actividad, y que no se recuperan tras el tratamiento térmico.

Para la fosfatasa alcalina también se tomaron muestras del cultivo a los 4 y 6 días y se comparó la producción de la enzima en *Streptomyces* y *E. coli* BL21 (DE3), tanto en extractos celulares como en el medio, antes y después de someter las muestras a tratamiento térmico. El patrón de proteínas obtenido fue analizado mediante SDS-PAGE (Fig. 4.32) y medida de la actividad fosfatasa. Se observó una acumulación de una banda del



4. RESULTADOS

tamaño esperado para la proteína (54,7 kDa) en el sobrenadante de los cultivos que habían sido transformados con pTXF1 (Fig. 4.32 carriles 4 y 6 SP), pero no en los cultivos utilizados como control negativo. La secuenciación del amino terminal de este fragmento se reveló idéntica a la de la proteína PhoA purificada directamente desde el periplasma de *T. thermophilus* (Castán, 2004), confirmando que se trataba de la proteína que buscábamos. Sólo una pequeña fracción de esta enzima se observó en los extractos celulares, mostrando la eficiencia de este sistema a la hora de transportar enzimas de *Thermus* al exterior celular.

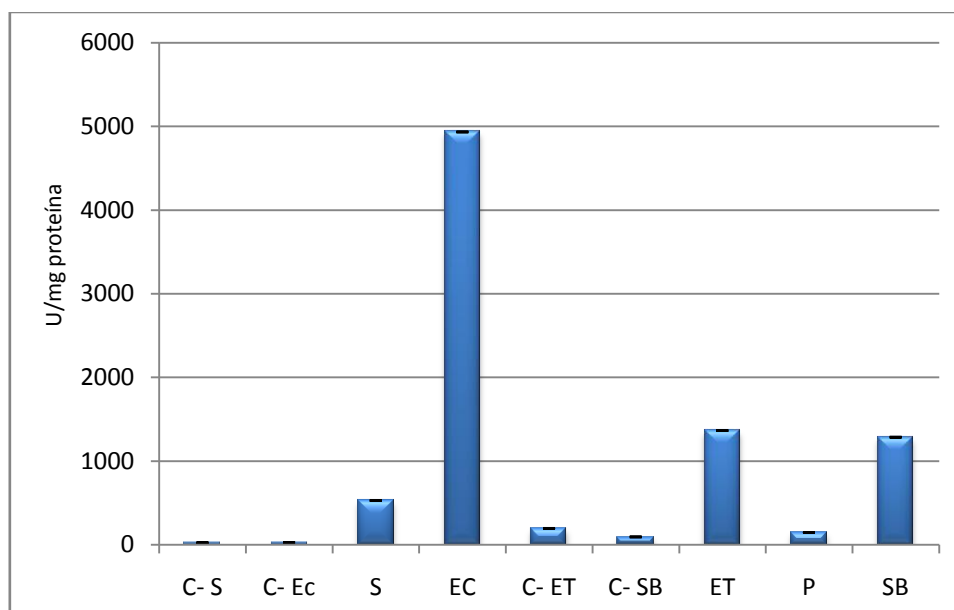


Figura 4. 32 Actividad glicosidasa sobre las diferentes fracciones utilizando como sustrato ONPG. Unidad de actividad, expresada en μ moles de ONPG hidrolizado por minuto. C-: Control negativo, S: Fracción extracelular del cultivo de *Streptomyces* a los 4 días, Ec: Extracto celular del cultivo de *Streptomyces* a los 4 días, ET: Extracto Total de *E. coli*, P: Fracción particulada de *E. coli*, SL: Fracción soluble de *E. coli*.

Ya demostrada la capacidad de *Streptomyces lividans* para expresar proteínas de *T. thermophilus*, tanto citoplásmicas como exportadas, decidimos intentar la expresión de aquellas que no habíamos podido expresar anteriormente, y sobre todo las que parecían tener un péptido señal. Utilizando las parejas de oligonucleótidos oTTP0221NdeI y oTTP0221XbaIrev, oTTC1828NdeI y oTTC1828XbaIrev, para amplificar los genes TTP0221, TTC1828, respectivamente, así como dos posibles esterases y una posible penicilín acilasa respectivamente. Clonamos éstos en el vector de expresión pNUF5 para su expresión controlada desde el promotor *pstS* que responde a altas concentraciones (>3%) de determinados azúcares (Díaz y cols., 2005), y se generaron los plásmidos pNUF5-221 y pNUF5-1828. Con estos plásmidos se transformó *Streptomyces* y se trató de reproducir cada una de las enzimas, recogiendo muestras a los 4 y 6 días de crecimiento del cultivo. En ningún caso detectamos una producción de estas proteínas ni mediante geles de SDS-PAGE ni mediante las pruebas de actividad realizadas con los sustratos colorimétricos ONPG y PNPG utilizados para detectar actividad glicosidasa (datos no mostrados).



4. 4 MUTANTES EN GLICOSIDASAS

Para comprobar si alguna de las enzimas con las que estábamos trabajando era la responsable de los incrementos en la actividad β -glucosidasa y β -fucosidasa que habíamos detectado en respuesta a la presencia de celobiosa en el medio de cultivo (Fig. 4.1), decidimos hacer mutantes de todas las enzimas estudiadas. Nos decidimos por hacer mutantes de inserción según se explica en Materiales y Métodos (3.3.4), por ser un método mucho más rápido y sencillo para eliminar la función de una enzima en *T. thermophilus* que una delección completa del gen, y porque era perfectamente válido para lo que pretendíamos observar.

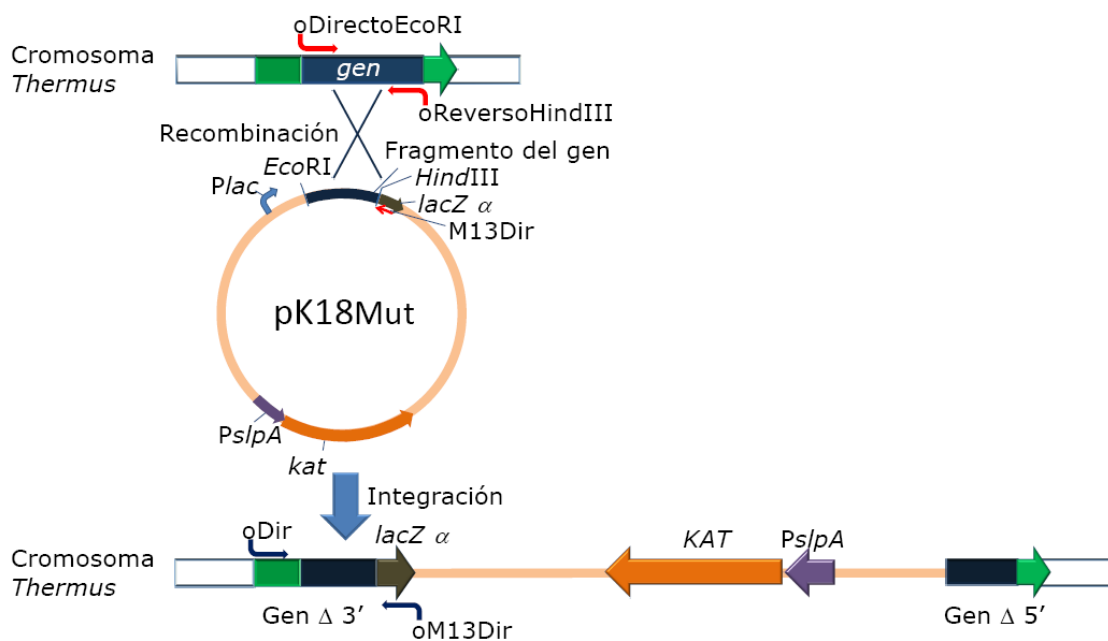


Figura 4. 33 Sistema de generación de mutantes de inserción en *T. thermophilus*. *kat*: gen de resistencia a la kanamicina, *PslpA*: Promotor de la proteína SlpA de la capa S de *Thermus*. Los oligonucleótidos utilizados en la comprobación de los mutantes mediante PCR están marcados en azul como *oDir* y *oM13Dir* sobre la secuencia del cromosoma de *Thermus*.

Construimos mutantes simples de inserción en *T. thermophilus* para las enzimas más prometedoras que habíamos visto en los ensayos anteriores, TTP0042, TTP0072, TTP0220, TTP0222 y TTC0107. Utilizamos los oligonucleótidos *oMUT(GEN)EcoRI* y *oMUT(GEN)HindIII* (Anexo I) en las diferentes amplificaciones de las regiones centrales de los genes. Una vez obtenidos los fragmentos respectivos (Tabla 3.7) se procedió a su clonaje en el plásmido integrativo para *Thermus* *pK18*, generándose los vectores: *pK18Mut42*, *pK18Mut72*, *pK18Mut220*, *pK18Mut222* y *pK18Mut107*. Transformamos *T. thermophilus* HB27 con estas construcciones y seleccionamos los clones por resistencia a kanamicina.



4. RESULTADOS



Figura 4. 34 Comprobación de mutantes. Gel que muestra la correcta interrupción de cada una de las enzimas.

Para comprobar que efectivamente se había producido la integración en el lugar adecuado y que teníamos un mutante de inserción en la enzima seleccionada, se recurrió a la comprobación mediante PCR (Fig. 4.35) utilizando un oligonucleótido que hibridaba dentro del plásmido, el universal M13 directo, y otro dentro del cromosoma de *Thermus* pero en una región externa a la clonada en el vector pK18, que en cada caso fue oTTP0042NdeI, oTTP0072NdeI, oTTP00220NdeI, oTTP00222NdeI y oTTC0107NdeI (Anexo I) y cuya posición se muestra en la figura 4.34. En todos los casos, los tamaños amplificados, coinciden con lo esperado. Una vez obtenidos todos los mutantes de inserción, denominados *T. thermophilus* 42:KAT, 72:KAT, 220:KAT, 222:KAT, 107:KAT, repetimos los ensayos de inducción de actividad glicosidasa con celobiossa para todos ellos.

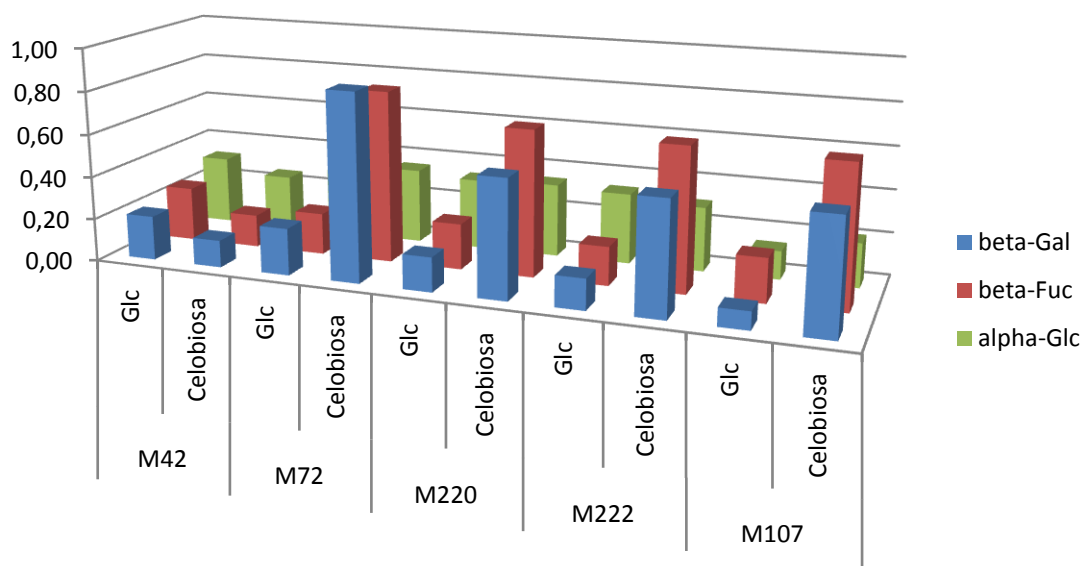


Figura 4. 35 Actividad glicosidasa de los mutantes. Medida de la actividad β -glucosidasa (en azul), β -fucosidasa (en rojo) y α -glucosidasa, en los distintos mutantes generados de *T. thermophilus*. La actividad está representada por miligramo de enzima utilizada.

En la figura 4.36 se puede observar cómo en casi todos los casos se produce, en mayor o menor grado, una inducción de las actividades β -glucosidasa y β -fucosidasa conjuntamente cuando se encuentra presente la celobiossa, en comparación con los



crecimientos en los que lo que hay en el medio es glucosa. Sin embargo en el caso del mutante *T. thermophilus* M42:KAT, desaparece la inducción de ambas. Esto indica que es la enzima TTP0042 la responsable de la actividad β glicolítica inducida por celobiosa y, adicionalmente, reafirma la información obtenida *in vitro* que mostraba que poseía tanto actividad β -fucosidasa como β -glicosidasa.

4. 5 EL OPERÓN DE TTP0042

Ahora que sabíamos cuál era la enzima responsable de la actividad glicosidasa inducible por celobiosa, decidimos estudiar con más detalle el entorno genético y la inducibilidad de esta actividad enzimática.

TTP0042 se encuentra precedida de genes codificantes de posibles proteínas de unión (TTP0039) y transporte de azúcares (TTP0040 y TTP0041), además de un hipotético regulador (TTP0038). Sospechábamos que todas estas proteínas, formaban un sistema completo para la degradación de celobiosa (Fig. 4.37). En dicho sistema TTP0038 podría ser equivalente a LacI, el represor inactivable por lactosa de *E. coli*, con quien comparte similitud. A su vez, TTP0039, TTP0040 y TTP0041 podrían constituir un sistema de transporte dependiente de ATP en el que TTP0039 sería una proteína periplásmica de unión a sustrato, TTP0040 y TTP0041 serían proteínas con 6-7 hélices transmembrana encargadas del transporte. Las distancias entre las secuencias codificantes de estas proteínas muestran hasta tres posibles sitios de inicio de transcripción, aunque no se detectan los motivos clásicos de los promotores de otros organismos.

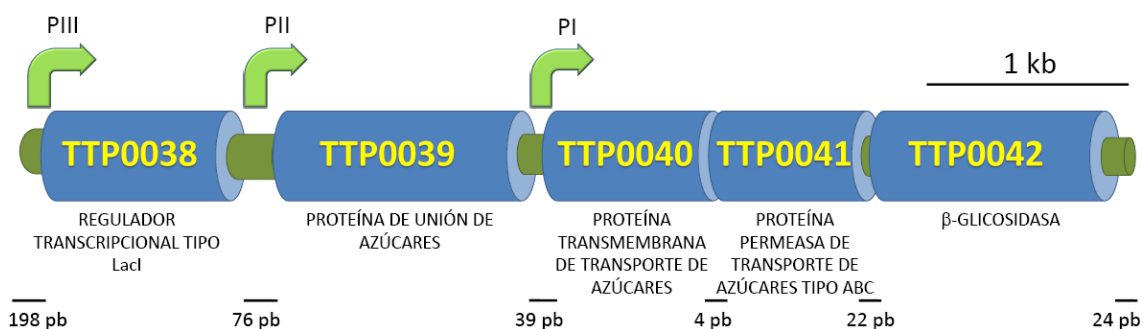


Figura 4. 36 Representación esquemática del operón de internalización y degradación de azúcares en el que se encuentra la β -glicosidasa TTP0042. Se indica la posible función de cada una de las proteínas que conformarían este operón, además de las distancias intergénicas y la localización de 3 eventuales promotores.



4. RESULTADOS

4.5.1 Mutantes en los genes del operón

Para comprobar si realmente se trataba de un operón transcrito desde un único promotor, y para el posterior estudio del papel en la inducción por celobiosa que podrían tener los hipotéticos promotores, decidimos hacer mutantes polares de inserción en cada uno de los genes que conformaban este agrupamiento, utilizando para ello la misma metodología empleada para mutar las distintas glicosidasas. Para comprobar que la integración se había producido en el sitio correcto se recurrió a la técnica de PCR sobre el genoma total del organismo utilizando los oligonucleótidos o38NdeI_{dir2}, oTTP0039F_{wd}, oTTP0040F_{wd}, oTTP0041F_{wd} y oTTP0042NdeI (Anexo I), que hibridarían dentro del genoma de *Thermus* y el oligonucleótido universal M13 directo dentro del plásmido (Figs. 4.34 y 4. 38). En todos los casos, los tamaños amplificados, coinciden con lo esperado.

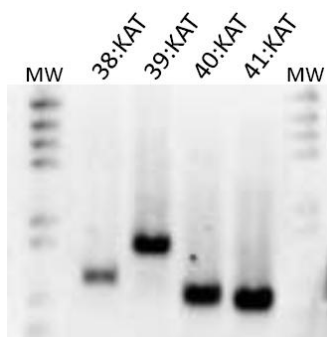


Figura 4. 37 Comprobación de mutantes. Gel que muestra la correcta interrupción de cada una de las enzimas.

Una vez obtenidos los mutantes de inserción, 38:KAT, 39:KAT, 40:KAT y 41:KAT, volvimos a realizar los ensayos de inducción de la actividad glicosidasa en respuesta a presencia de celobiosa empleando cultivos con glucosa como control negativo de la inducción (Fig. 4.39).

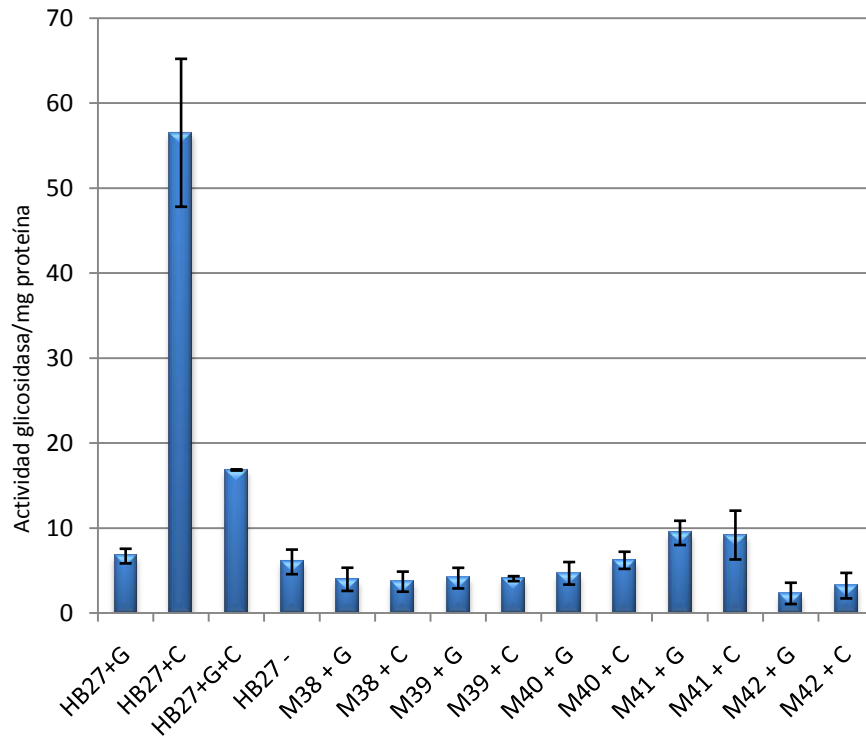


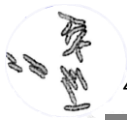
Figura 4. 38 Actividad glicosidasa en los mutantes de inserción de HB27. Medida de la actividad β -glicosidasa utilizando ONPG en extractos de *T. thermophilus* HB27 silvestre y de los mutantes M38:KAT, M39:KAT, M40:KAT, M41:KAT y M42:KAT crecidos en medio TB 1/5 suplementado con 0,2% de Glucosa (G) o Celobiosa(C) a 70°C.

Como se aprecia en la figura 4.39, como en el caso del mutante 42:KAT que afecta a la enzima hidrolítica, en el resto se puede observar una fuerte caída de la actividad. Esto implica, probablemente, que todos los genes se transcriben mayoritariamente desde el promotor que hemos denominado PIII en la figura 4.37. Alternativamente, y en el caso de que existieran promotores internos significativos, estos datos habría que interpretarlos en base a la pérdida de la funcionalidad de las correspondientes enzimas, como por ejemplo falta de permeabilidad a la celobiosa. Para aclarar este punto decidimos caracterizar funcionalmente los que creíamos tenían más posibilidad de ser posibles promotores

También se puede observar cómo la glucosa reprime la expresión de la actividad β -galactosidasa incluso en presencia de celobiosa, aunque los niveles no llegan a bajar hasta los que se observan cuando el disacárido no está presente.

4.5.2 Clonaje y actividad de posibles promotores

En el operón existían 3 zonas susceptibles de contener alguna región promotora encargada de la expresión de parte, o todo el conjunto de genes, nombrados como PI, PII y PIII en la figura 4.37. Para comprobar cuál de estas regiones era la que respondía a celobiosa, decidimos incluirlos en un plásmido de prueba de promotores que controla la expresión de la β -glicosidasa TTP0042.



4. RESULTADOS

PI

GAGCTCCTCAAGTACCTGGGAAGCCCCGAGGCCAGGTCCGCTACGCCAGATGACGGGGATGCTCCCCGGCC
TGCGCTCCGCCTGGAGCGATCCAGCTTCCAGCAGAACCCCCTGCTCCGCACCTTCATCCAGGCCGCTCAGTT
CGGCCGCACCTACCCCTCCTTGGCGGGCTGGGGCGGGGTGGAGAACCTGGCGGTGCAGCACCTCGGCATGGCT
TGGGACCTGGTGGCCAGGGCAGGCTCACCCGTGAGGCCCTGAAGGACCTCATGGACAAGGCCTCCGCGGCCA
TCAACCAGGCCCTGAGGTGAGGCGTAGGGGGGCTCGAGGCCCCCCTTTTTCTTCCCCATG

PII

CGCCGCCAACGACCAGACGGCCTTCGGCGCCAGGCTTTACCTCTACGAGCAAGGGCTTCGCGTGCCCGAGGAC
GTCTCCCTCGTGGGGTTTGGACGACATCGCCCTTAGCGCTACCAGATCCCCCGCTCACCACCGTGCGCCAGC
CCATCCAAGACATCGGAATAGCCCTGGGCCGCGCGCTCCGGGCGGTCTCGCGGGGGAGGTGCCACCCTGCC
CCGCTGGAGCTCCGGCTGGTGGAAAGGGCTCGGTAAGGGAGGTGAGAGCCTGAGGAAACGGCGGCCCTTA
GGCCCTAGGCCCTCGGCCACCCCGAAAAGGGGTGGTGGACGCGAAAGGAGGTTCCCATG

PIII

CCATCACCGCACGGATTCCCATGGGACGCTGGGCGAGGCCCGAGGAGATCGCCCGCTGGCCGCGGTCTCTG
CGGGGACGAGGCGGAGTACCTCACGGCCAGGCGGTGGCGGTGGACGGGGGCTTCCTCGCCTACTAGAGGAGG
GCGTAGGGGGGGTTTCGCGCGTTCCTTGAGCGTGCCCATCCTGGCCCCGCGGACCGAGGCCTAAAGGGGTG
GGCGCCGCCGAAAACGGCCACCGATCCCCCTCATGCCCGCGTCTCTAGGGGCCAGATCCCGGGGCGCGA
GGGGAGGAGGGCTCGAGGCCCCCCTCTTGCAAGCGCTTCAACAGATG

Figura 4. 39 Secuencias clonadas de los posibles promotores del operón. El final de la secuencia de la ORF anterior al posible promotor se encuentra sombreada.

Para la amplificación de los posibles fragmentos promotores mediante PCR, cuyas secuencias se detallan en la figura 4.40, utilizamos los oligonucleótidos oProm42XbaIFrwd-I y oProm42NdeIRev-I para amplificar el PI, oProm42XbaIFrwd-II y oProm42NdeIRev-II para el PII y oProm42XbaIFrdw38 y oProm42NdeIRev38 para PIII. Para la amplificación de TTP0042 se utilizaron oTTP0042NdeI y oTTP0042HindIII. Partimos del plásmido pMKE β GAL, en el que eliminamos la β -galactosidasa BgaA mediante digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII* y la sustituimos por la enzima TTP0042. Seguidamente intercambiamos el promotor *Pnar* por cada uno de los posibles candidatos a ser el promotor sensible a Celobiosa, PI, PII y PIII. De este modo fabricamos los plásmidos pMKEPI β GLIC, pMKEPII β GLIC y pMKEPIII β GLIC (Fig. 4.41). A partir de éstos, y mediante digestión con las enzimas *XbaI* y *HindIII* obtuvimos los distintos fragmentos de DNA que consistían en la enzima TTP0042 aguas abajo de cada uno de los promotores, y los clonamos en el plásmido pMH184, que confiere resistencia termoestable a Higromicina, generando los vectores pMHPI β GLIC, pMHPII β GLIC y pMHPPIII β GLIC, que nos servirían para transformar los distintos mutantes en un entorno génico de resistencia a kanamicina.

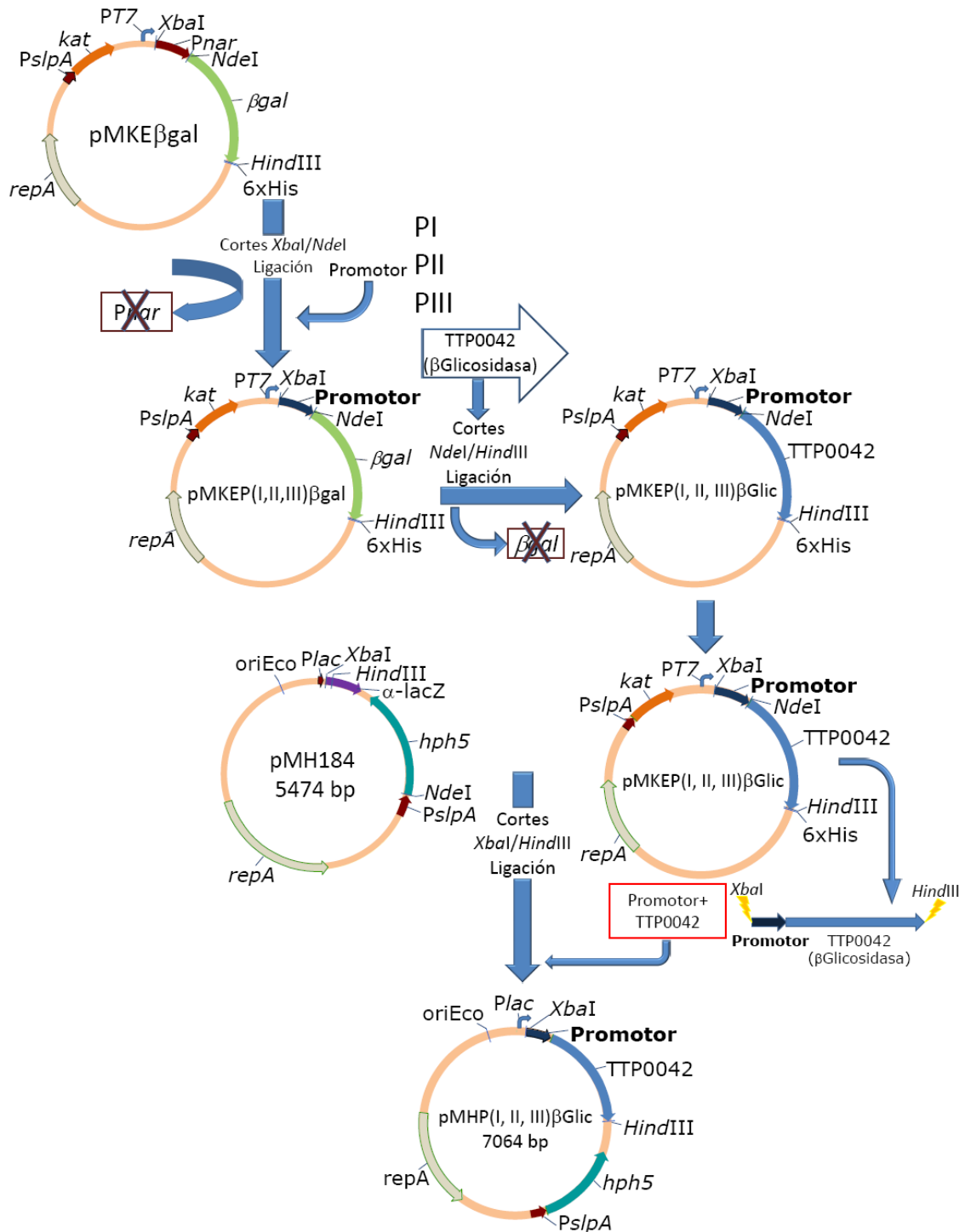


Figura 4. 40 Esquema de la construcción de los plásmidos de prueba de promotores sensibles a celobiosa.

Estos plásmidos se utilizaron para transformar las cepas mutantes y se crecieron en condiciones de inducción para celobiosa. Una vez obtenidos los cultivos crecidos, se procedió a analizar su actividad utilizando como sustrato el ONPG. Como control se utilizaron los cultivos crecidos en las mismas condiciones a los que se añadió un 0,2% (p/v) de glucosa para intentar disminuir en la medida de lo posible la activación de los promotores clonados.



4. RESULTADOS

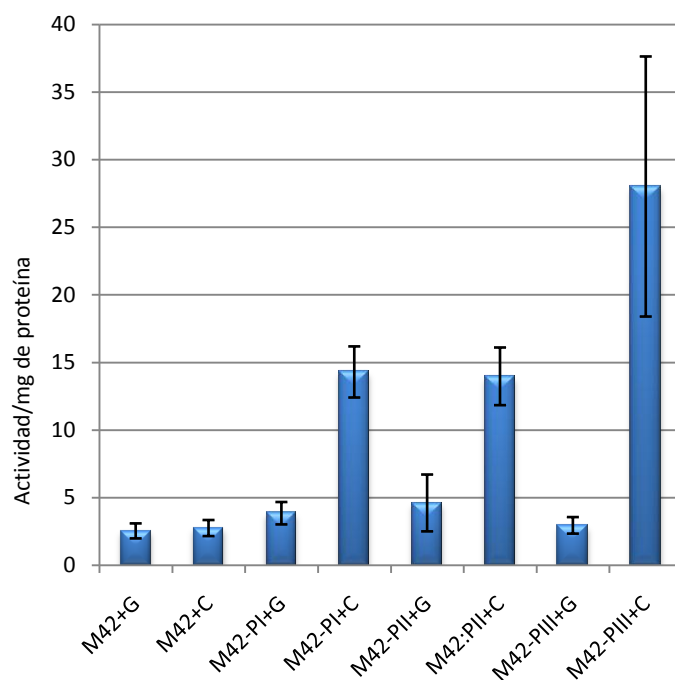


Figura 4. 41 Prueba de actividad de los distintos promotores. Resultados de la medida de actividad glicosidasa en cultivos de *T. thermophilus* 42:KAT expresando la proteína TTP0042 bajo el control de los 3 posibles promotores en medio TB 1/5 a 70°C. G: Medio suplementado con 0,2% (p/v) de glucosa, C: Medio suplementado con 0,2 (p/v) de celobiosa.

Al introducir los plásmidos pMHPI β GLIC, pMHPII β GLIC y pMHPIII β GLIC en el mutante 42:KAT recuperamos algo de actividad β -galactosidasa en presencia de celobiosa con los 3 promotores, aunque el que produjo mayor actividad fue el PIII, que se induce más del doble que los demás, indicando que la mayor parte de la enzima se expresa a partir de él.

4.5.3 El regulador transcripcional TTP0038

La proteína TTP0038, que se encuentra al comienzo de este posible operón, muestra homología con reguladores de la familia LacI (Anexo II), y tiene dos zonas bien diferenciadas, una, la zona amino terminal, muestra similitud con dominios H-T-H (hélice-giro-hélice) de unión al DNA, típico de este tipo de reguladores, y la zona carboxilo terminal, sería la zona de unión al catabolito.

Para tratar de ver el efecto de la proteína TTP0038 *in vivo* se clonó su gen codificante en el vector pWUR para su expresión constitutiva en *Thermus*. Se amplificó el gen utilizando los oligonucleótidos o38NdeI_{dir2} y o38EcoRI_{rev}, y se clonó a NdeI/EcoRI en el plásmido pET22b(+) generando el vector pET22-38. A partir de éste, y mediante digestión con XbaI y EcoRI, se obtuvo el gen precedido por una RBS y se clonó en pWUR, obteniendo



el plásmido pWUR-38, con el que se transformó la cepa silvestre y el mutante 38:KAT y se crecieron los cultivos en condiciones de inducción con celobiosa y con glucosa (Fig. 4.42).

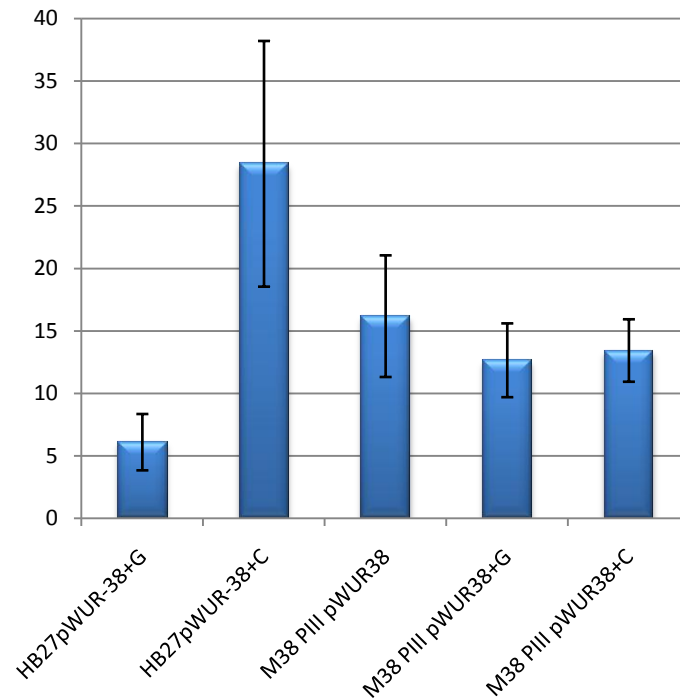


Figura 4. 42 Actividad glicosidasa en la sobreexpresión del regulador. Medida de la actividad β -glicosidasa utilizando ONPG en extractos de *T. thermophilus* HB27 silvestre y el mutante 38:KAT, ambos sobreexpresando de forma constitutiva el regulador transcripcional TTP0038. Crecimiento realizado a 70°C en medio TB diluido 1/5 y suplementado con 0,2% de glucosa o celobiosa.

Para estudiar la posible función reguladora que podría desempeñar esta proteína decidimos tratar de expresarla en *E. coli* e intentar su purificación. Para ello escogimos el vector de expresión pET22b+ y fusionamos una cola de histidinas en carboxilo terminal, ya que, si como sospechábamos, la zona amino terminal tenía un papel fundamental en la unión al DNA, una etiqueta de histidinas colocada en esa zona para su purificación podría impedir su unión al DNA. Utilizando los oligonucleótidos o38NdeI dir2 como directo y o38HindIII revNS como reverso, se amplificó el gen TTP0038 sin su señal de terminación de la traducción y con dianas *NdeI* y *HindIII* en sus extremos, que sirvieron para clonarlo en pET22b+, generando el plásmido pET22-38Ns.

Tras clonar esta construcción en las células productoras BL21 (DE3) intentamos realizar una típica expresión utilizando IPTG como inductor, pero no conseguimos producción de la proteína en ninguna de las condiciones testadas (diferentes temperaturas, concentraciones de IPTG, etc.).

Como hemos apuntado, la proteína parecía ser un represor tipo LacI, lo que nos hizo sospechar que podría estar uniéndose al promotor *P_{lac}* inhibiendo su propia producción, ya que en el sistema de producción la RNA polimerasa del fago T7 se encuentra bajo el control



4. RESULTADOS

de *Plac*. Al encontrarse TTP0038 dentro de un operón que parecía responder a la presencia de celobiosa en el medio (Fig. 4.37) decidimos tratar de utilizar este disacárido para intentar eliminar la función represora de esta proteína, y conseguir así producirla en *E. coli*. Como se puede observar en la figura 4.43, la proteína sí pudo ser expresada en *E. coli* al añadir celobiosa a los cultivos inducidos por IPTG a 37°C. Es de destacar que a 21°C no observamos expresión.

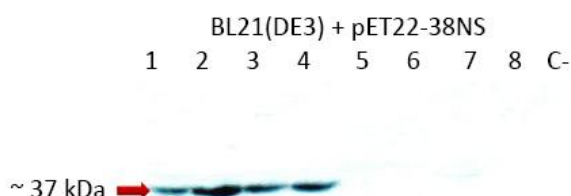


Figura 4. 43 Expresión de TTP0038 en *E. coli* BL21 (DE3) con cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal. Inmunodetección utilizando anticuerpos anti cola de histidinas, mostrando el resultado de la expresión de la proteína con IPTG como inductor y celobiosa. 1-4: Expresiones de distintos clones realizadas a 37°C, 5-8: Expresiones en distintos clones realizadas a 21°C, C-: Control negativo de la expresión, realizado en las mismas condiciones pero con el pET22b(+) vacío y a 37°C.

Una vez comprobado que habíamos conseguido producir la proteína en *E. coli*, el siguiente paso fue purificarla, para lo que procedimos a realizar un tratamiento térmico y una unión a columna de níquel como se detalla en Materiales y Métodos (3.5.6), obteniendo gran cantidad de proteína con un buen nivel de pureza (Fig. 4.44).

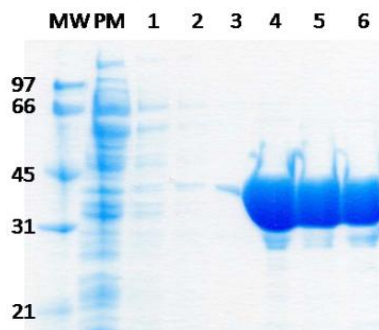


Figura 4. 44 Purificación de TTP0038. Purificación por cromatografía de afinidad en columna de níquel-agarosa de la proteína unida a cola de histidinas en carboxilo terminal, expresada en *E. coli* a partir del pET22-38NS. MW-Marcadores de peso molecular (kDa), PM: Fracción no unida a la columna, 1-3: Lavados de la columna, 4-6: Eluciones de la proteína con 250 mM de Imidazol.

Al llegar a este punto surgió una complicación ya que la proteína, una vez eluida de la columna, tendía a precipitar por agregación. La utilización de diferentes tampones, un aumento de la temperatura o la disminución de una concentración que, a tenor de lo observado en el gel de acrilamida, presumíamos excesiva, no consiguió rescatar la proteína de este estado. Decidimos pues utilizar urea, añadida progresivamente al tampón en el que se encontraba la enzima, para intentar solubilizarla, cosa que, al menos parcialmente, se consiguió.

Una vez obtenida la proteína pura. Decidimos comprobar si era capaz de unirse al DNA, para lo que resolvimos realizar ensayos de retardo en gel de acrilamida. A la vista de



los resultados obtenidos en los ensayos de búsqueda del, o de los promotores que podrían responder a celobiosa dentro del operón, se decidió escoger la zona anterior al gen TTP0038 como la que más probablemente fuera el promotor al que esta proteína se uniría.

Ya que el éxito de esta prueba dependía, en gran medida, del tamaño del fragmento de DNA, pues los mejores resultados en este tipo de ensayos suelen obtenerse con fragmentos pequeños, decidimos utilizar dos fragmentos de diferente tamaño y realizar dos experimentos paralelos. Utilizamos, como oligonucleótido reverso común el oPIIIDY-782Rev que, además de servirnos como un cebador normal en la reacción de PCR para amplificar el promotor lleva en la región 5' un fluoróforo infrarojo que se excita a 787 nm y emite fluorescencia a 812 nm. Como oligonucleótidos directos utilizamos oPIIIFrw y oPIIIFrw2, que darían lugar a un fragmento de DNA de 83 y de 151 nucleótidos, respectivamente. Una vez obtenidos los fragmentos de DNA se procedió a realizar el ensayo de retardo como viene especificado en Materiales y Métodos (3.5.5).



Figura 4. 45 Geles de retardo mostrando la interacción entre TTP0038 y PIII. Fluorescencia detectada en los geles de retardo. Carriles 1 y 10: Tampón de carga. 2: Sólo proteína. 3: Sólo promotor. 4-6: Promotor + regulador en proporciones 1:4, 1:6 y 1:8. 7: Promotor + Regulador (1:8) + 1mM de celobiosa. 8: Promotor + Regulador (1:8) + 2 mM de celobiosa. 9: Promotor + Regulador (1:8) + DNA frío. Como competidor se utilizó DNA de esperma de salmón en el caso de PIII(1) y poli dc/di en el caso de PIII(2).

Como se puede observar en la figura 4.45, al poner en contacto el promotor con la hipotética proteína represora, se produce un retraso en la movilidad que se ve acompañado, especialmente en el caso de PIII(2), de un descenso en la señal correspondiente al promotor libre. Al añadir celobiosa se produce un leve descenso de la unión (carriles 7 y 8) pero no la liberación total de la unión que esperábamos, aunque sí sucede un cambio aparente en la movilidad del fragmento retrasado. También disminuye algo la unión al añadir un exceso de DNA sin marcar (carril 9).



4. RESULTADOS

4. 6 POTENCIALES ESTERASAS Y LIPASAS

Las carboxil esterases (EC 3.1.1.1) y las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que en solución acuosa catalizan la ruptura hidrolítica de ésteres al ácido y alcohol correspondientes; sin embargo, en solventes orgánicos se ven facilitadas las reacciones de transesterificación (Niehaus y cols., 1999) y tienen gran interés en industrias peleteras, farmacéuticas, de detergentes, alimentarias, incluso en la nueva formación de biodiesel. Una vez más analizamos el genoma secuenciado de *T. thermophilus* HB27 buscando posibles enzimas con una homología destacable con alguna de estas enzimas, apareciendo 5 secuencias relevantes, todas en el cromosoma del organismo, que se correspondían con las claves TTC0552, TTC0904, TTC1341, TTC1494 y TTC1787 (Tabla 4.4).

Tabla 4. 4 Hipotéticas enzimas con posible actividad Lipasa/Esterasa encontradas en el genoma de *T. thermophilus* HB27.

NOMBRE	ACTIVIDAD PREDICHA	TAMAÑO TEÓRICO (kDa)	POSIBLE LOCALIZACIÓN
TTC0552	Esterasa	15,16	Soluble
TTC0904	Esterasa	35,56	Membrana
TTC1341	Carboxilesterasa	25,7	Soluble
TTC1494	Esterasa	15	Soluble
TTC1787	Carboxilesterasa	56,2	Membrana

4.6.1 TTC0552

Se trata de una pequeña proteína, de 15,16 kDa, que presenta homología con otras esterases (Anexo II). El análisis de su secuencia no revela la existencia de un posible péptido señal ni de regiones transmembrana. En la siguiente figura se muestra el contexto genómico de la enzima.

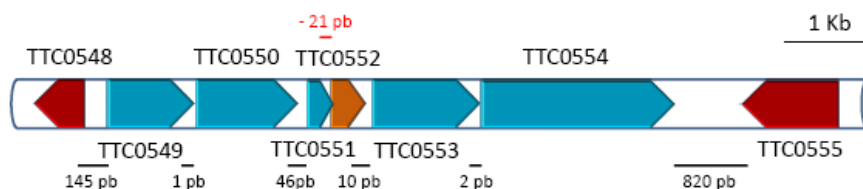


Figura 4. 46 Contexto genómico de la posible esterasa TTC0552 (en amarillo). De izquierda a derecha, las posibles actividades de las proteínas son TTC0548: Proteína BioY, TTC0549: Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa, TTC0550: Fosfoglicerato kinasa, TTC0551: Proteína hipotética, TTC0552: Esterasa, TTC0553: Ornitina aminotransferasa, TTC0554: Exoribonucleasa II, TTC0555: Proteína hipotética.



Utilizamos los oligonucleótidos oTTC0552NdeI como directo y oTTC0552HindIII como reverso para la amplificación del gen con las dianas de restricción en sus extremos. Se clonó este gen en los plásmidos pET22b(+) y pET28b(+), generando el pET22-552 y el pET28-552, que se utilizaron para transformar células de *E. coli* BL21 (C41) y se expresó la proteína con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. La cantidad de proteína obtenida con cola de histidinas en amino terminal fue la suficiente como para intentar su purificación.

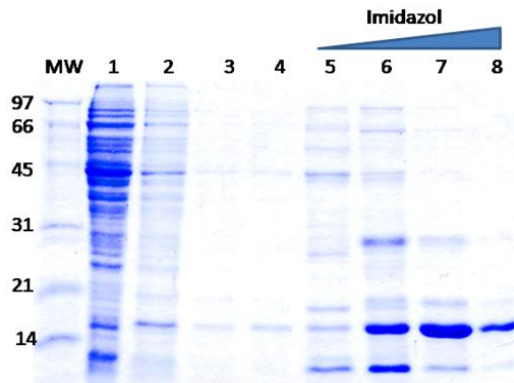


Figura 4. 47 Purificación de TTC0552. SDS-PAGE de la purificación de la proteína (15,16 kDa) con cola de histidinas, mediante cromatografía de afinidad. A partir de una sobreexpresión en *E. coli* BL21 (C41) desde el plásmido pET28-552. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Fracción de proteína no unida a la columna, 2, 3 y 4: lavados de la columna. 5: Primera elución con 65 mM de Imidazol, 6: Segunda elución con 125 mM de imidazol, 7: tercera elución con 250 mM de imidazol, 8: Cuarta elución con 500 mM de imidazol.

Tomamos la fracción que aparecía más pura en el gel de acrilamida (Fig. 4.47 carril 8) para tratar de realizar los ensayos enzimáticos, pero al dializar la enzima para eliminar el imidazol, ésta precipitaba siendo después irrecuperable. Como el imidazol utilizado interfería en las medidas, decidimos intentar detectar la actividad de la enzima en extractos totales de *E. coli* sobreexpresando tanto la forma nativa como la forma con cola de histidinas. Se utilizó como control negativo un extracto de *E. coli* BL21 (C41) y como sustrato PNPB, pero la labilidad del mismo dificultó la observación de la posible actividad hidrolítica de la enzima. Tras no poder comprobar la actividad enzimática por este medio, se procedió a tratar de renaturalizar la enzima en un gel de acrilamida y revelar ahí su actividad tal y como se detalla en Materiales y Métodos 3.5.8, pero el resultado de la prueba fue negativo.

4.6.2 TTC0904

Este gen, que se encuentra dentro del cromosoma de *Thermus*, codifica una proteína con homología con esterasas y de una masa molecular de 35,56 kDa. El análisis de su contexto genómico parece indicar que esta enzima se encuentra aguas abajo de un operón codificante de una ATP sintasa (Fig. 4.48).



4. RESULTADOS

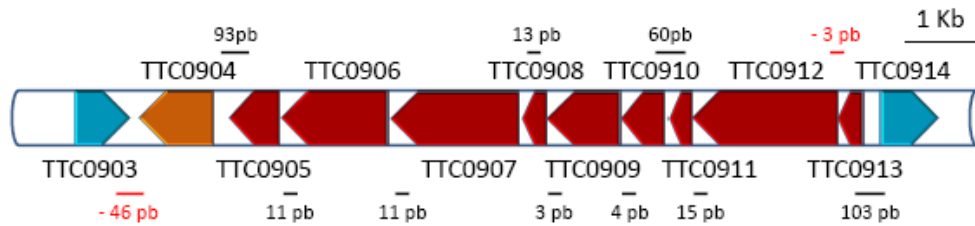


Figura 4. 48 Contexto genómico de la posible esterasa TTC904 (en amarillo). Los genes que la acompañan, parecen codificar diferentes subunidades de una ATP sintasa tipo V: TTC905 subunidad D, TTC906 subunidad B, TTC907 subunidad A, TTC908 subunidad F, TTC909 subunidad C, TTC910 subunidad E, TTC911 subunidad K, TTC912 subunidad I, TTC903 y TTC914 son proteínas hipotéticas de función desconocida.

El estudio de la posible topología de la proteína muestra una zona transmembrana en la zona amino terminal de la proteína que podría corresponderse con un péptido señal o con una zona de anclaje a la membrana, así como otras posibles zonas de interacción con la membrana (Fig. 4.49).

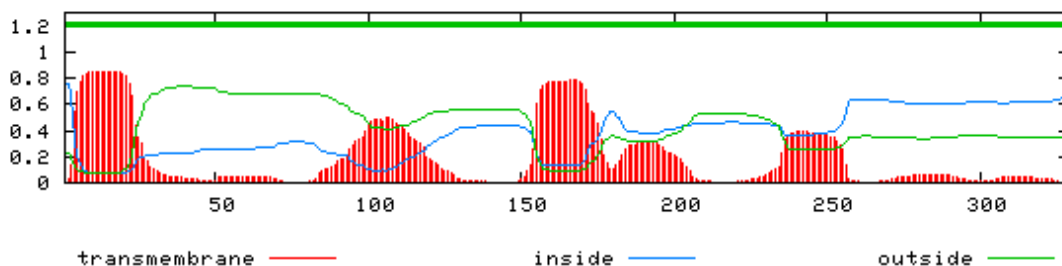


Figura 4. 49 Predicción de regiones transmembrana de la proteína TTC904. Se refleja la posible existencia de un péptido señal, y algún otro fragmento transmembrana. Imagen producida por el programa TMMOD desarrollado por Kahsay y colaboradores basándose en el modelo "Hidden Markov" (Kahsay y cols., 2005).

Un análisis más profundo de la región amino terminal de la enzima muestra la existencia de una secuencia LAQ, consenso para corte de péptidos señal en *T. thermophilus*, tras una región hidrofóbica (Fig. 4.50), lo que parece corroborar la existencia de un péptido señal en esta proteína, que indicaría que esta proteína estaría anclada en la membrana o bien sería excretada.

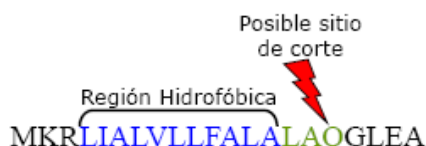


Figura 4. 50 Esquema de la secuencia amino terminal de la enzima TTC904.

Se amplificó el gen con los cebadores oTTC904NdeI como directo y oTTC904HindIII como reverso y se generaron los vectores pET22-904 y pET28-904 que se utilizaron para transformar *E. coli* BL21 (DE3) y sobreexpresar la proteína tanto nativa, en el primer caso, como con una cola de histidinas en amino terminal en el segundo. La cantidad



de proteína obtenida fue bastante baja con ambos plásmidos, no detectable en geles de acrilamida teñidos. Sólo mediante inmunodetección de la etiqueta de polihistidinas pudimos observar una proteína del tamaño esperado en la fracción particulada de la bacteria (Fig. 4.51), lo que concordaba con los datos obtenidos "in silico" sobre la predicción de la topología de la enzima.

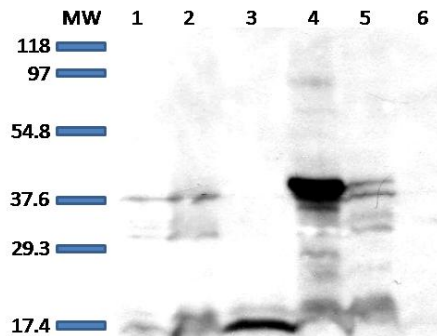


Figura 4. 51 Expresión de TTC0904 en *E. coli*. Inmunodetección utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas de la expresión de la proteína. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Fracción particulada del control negativo, 2: Fracción soluble del control negativo, 3: Fracción soluble sometida a tratamiento térmico del control negativo, 4: Fracción particulada de la expresión, 5: Fracción soluble de la expresión, 6: Fracción soluble sometida a tratamiento térmico de la expresión.

Se realizaron ensayos de actividad con extractos totales de *E. coli* sobreexpresando esta enzima, utilizando como sustrato PNPB y también ensayos de actividad en gel de acrilamida, dando resultados negativos en todos los casos.

4.6.3 TTC1341

Este gen de 639 pb, codifica una posible carboxilesterasa con una masa molecular teórica de 25,71 kDa, que aparentemente no presenta péptido señal ni otros fragmentos transmembrana. El contexto genético se muestra en la siguiente figura.

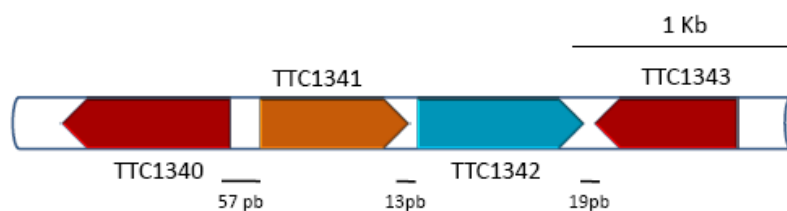


Figura 4. 52 Contexto genético de la posible carboxilesterasa TTC1341 (en amarillo). El gen TTC1342 (en azul) codifica un posible transportador de cationes divalentes de metales pesados.

Para el clonaje del gen se utilizaron los oligonucleótidos oTTC1341NdeI como directo y oTTC1341HindIII como reverso, generándose los plásmidos pET22-1341 y pET28-1341, con los que se transformó *E. coli* BL21 (DE3) y se procedió a la expresión de la enzima con 1mM de IPTG a 37°C durante 4 horas. Tanto mediante geles de acrilamida como por inmunodetección, se comprobó la expresión de la proteína en la fase soluble y se procedió a la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína con las 6 histidinas.



4. RESULTADOS

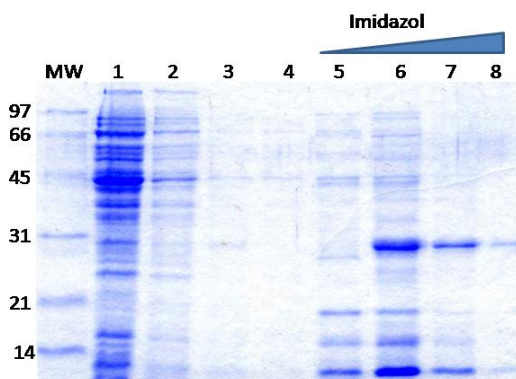


Figura 4. 53 Purificación de la proteína TTC1341 (25,71 kDa) con cola de histidinas, mediante cromatografía de afinidad. Sobreexpresión en *E. coli* BL21 (DE3) desde el plásmido pET28-1341. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Fracción de proteína no unida a la columna, 2, 3 y 4: lavados de la columna. 5: Primera elución con 65 mM de imidazol, 6: Segunda elución con 125 mM de imidazol, 7: tercera elución con 250 mM de imidazol, 8: Cuarta elución con 500 mM de imidazol.

Como se aprecia en la figura 4. 53 la enzima siempre parecía copurificarse con otra proteína de menor tamaño y termorresistente, que podría corresponderse con una forma truncada de la misma. Al igual que ocurrió con la enzima TTC0552, esta proteína precipitó al tratar de dializarla para extraer el imidazol, por lo que tratamos de detectar actividad en extractos crudos calentados y realizando las pruebas utilizando PNPB como sustrato a hidrolizar. En este caso se detectó, cualitativamente, actividad sobre el sustrato, comparando extractos de *E. coli* que sobreexpresaban la enzima, con otros que no sobreexpresaban nada. Lamentablemente la labilidad del PNPB a las temperaturas empleadas en los ensayos impidieron la caracterización preliminar de la enzima.

También, como en los casos anteriores, se intentó detectar la actividad en geles de acrilamida, pero los resultados fueron negativos.

4.6.4 TTC1494

Este gen del cromosoma de *Thermus*, codifica una proteína de masa molecular 15 kDa, que presenta homología con otras esterasas y que, tras analizar su posible topología, no parece tener en su secuencia péptido señal ni fragmentos transmembrana. El contexto genómico de la enzima que se muestra en la siguiente figura sugiere que se expresa de manera aislada.

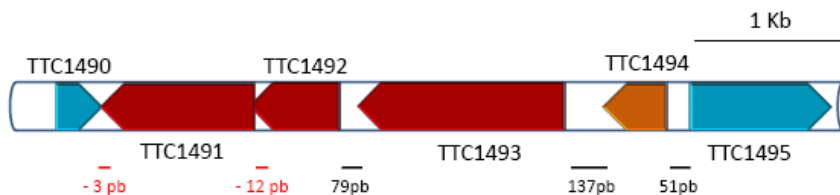


Figura 4. 54 Contexto genómico de la posible esterasa TTC1494 (en amarillo). TTC1491 posible antranilato fosforibosiltransferasa. TTC1492 probable componente II de antranilato sintasa/ componente II de para-aminobenzoato sintasa glutamina amidotransferasa. TTC1493 posible componente I de antranilato sintasa. TTC1494 posible esterasa.



Utilizando los oligonucleótidos α TTC1494NdeI como directo y α TTC1494HindIII como reverso, se amplificó el gen que sirvió para generar los plásmidos pET22-1494 y pET28-1494, para la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) tanto de la forma nativa de la enzima (como de ésta con una etiqueta de 6 histidinas en amino terminal, respectivamente). Las mejores condiciones de expresión probadas fueron con 1mM de IPTG a 37°C durante 4 horas, con lo que se consiguió expresar ambas formas de la proteína en forma soluble, cosa que fue comprobada mediante gel de acrilamida teñido con Coomassie e inmunodetección de la cola de histidinas, en el caso de pET28-1494, lo que nos permitió purificar la enzima, mediante cromatografía de afinidad (Fig. 4.55).

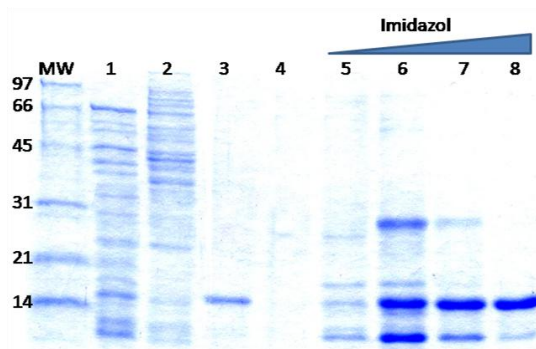
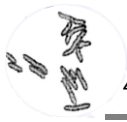


Figura 4. 55 Purificación de la proteína TTC1494 (15 kDa) con cola de histidinas, mediante cromatografía de afinidad. Sobreexpresión en *E. coli* BL21 (DE3) desde el plásmido pET28-1494. MW: Marcadores de peso molecular, 1: Fracción de proteína no unida a la columna, 2, 3 y 4: lavados de la columna. 5:Primera elución con 65 mM de Imidazol, 6: Segunda elución con 125 mM de imidazol, 7: tercera elución con 250 mM de imidazol, 8: Cuarta elución con 500 mM de imidazol.

De igual modo que ocurría con las proteínas TTC0552 y TTC1341, la proteína precipitó al intentar eliminar el imidazol con el que había sido eluida, lo que nos impidió realizar los ensayos enzimáticos con la proteína pura, de hecho, incluso parecía precipitar también en extractos totales tratados térmicamente de *E. coli*, en los que tratamos de detectar actividad utilizando PNPB como sustrato, pero no parecía haber actividad ni en extractos sobreexpresando la proteína nativa ni en los que lo hacían con la proteína con la cola de histidinas. Los ensayos de actividad en gel de acrilamida tampoco arrojaron ningún resultado positivo de actividad.

4.6.5 TTC1787

Este gen se encuentra en el cromosoma de *T. thermophilus* y codifica una proteína de 56,2 kDa de masa molecular que presenta homología con carboxilesterasas. La predicción de la topología de la proteína revela la posible existencia de un péptido señal amén de varias zonas susceptibles de ser fragmentos transmembrana (Fig. 4.56).



4. RESULTADOS

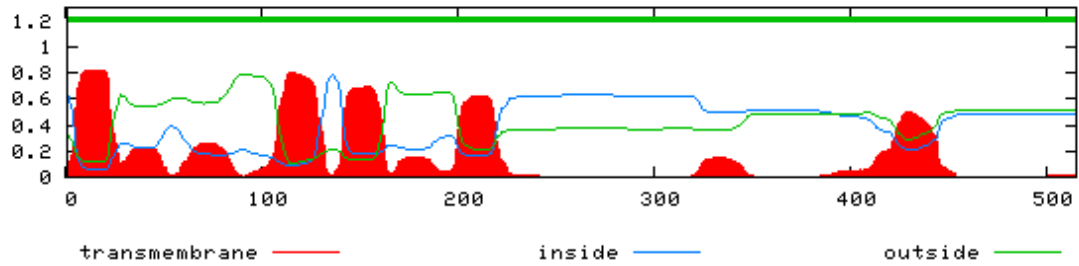


Figura 4. 56 Predicción de regiones transmembrana de la proteína TTC1787. Se observa la presencia de un probable péptido señal además multitud de posibles fragmentos transmembrana. Imagen producida por el programa TMMOD desarrollado por Kabsay y colaboradores basándose en modelo "Hidden Markov" (Kabsay y

Un análisis más profundo de la región amino terminal de la enzima muestra la existencia de una secuencia LAQ, consenso para corte de péptidos señal en *T. thermophilus*, tras una región hidrofóbica (Fig. 4.57), lo que parece corroborar la existencia de un péptido señal en esta proteína, lo que significaría que esta proteína estaría anclada en la membrana o bien, sería excretada hacia la membrana externa.

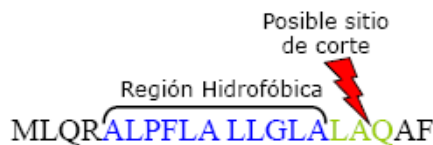


Figura 4. 57 Esquema de la secuencia amino terminal de la enzima TTC1787.

En la siguiente figura se puede observar un esquema del contexto genómico en el que está situada esta enzima.

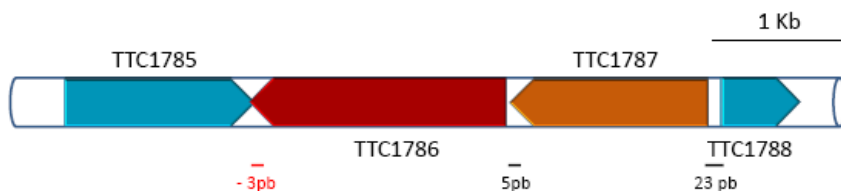


Figura 4. 58 Contexto genómico de la enzima TTC1787. TTC1786 (en azul): probable molibdopterin oxidoreductasa. TTC1787 (en amarillo): posible carboxilesterasa.

Utilizamos los oligonucleótidos oTTC1787NdeI como directo y oTTC1787HindIII como reverso para amplificar el gen de *Thermus*, y generar los plásmidos pET22-1787 y pET28-1787 con los que transformamos *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de la proteína con y sin cola de histidinas. La comprobación de la expresión se realizó tanto mediante geles de acrilamida teñidos con Coomassie como, cuando era posible por inmunodetección de la etiqueta de histidinas colocada en amino terminal.

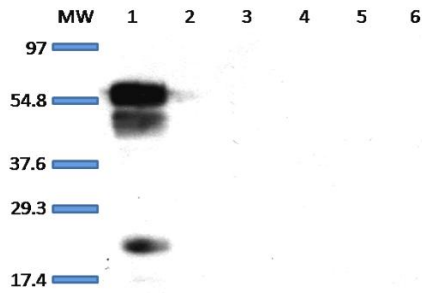


Figura 4. 59 Expresión de TTC1787. Inmunodetección utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas de la expresión de la proteína en *E. coli*. MW: Marcadores de peso molecular. 1: Fracción particulada de la expresión, 2: Fracción soluble de la expresión, 3: Fracción soluble sometida a tratamiento térmico de la expresión, 4: Fracción particulada del control negativo, 5: Fracción soluble del control negativo, 6: Fracción soluble sometida a tratamiento térmico del control negativo.

Toda la expresión de la proteína se produjo en la fracción particulada de los extractos (Fig. 4.59), lo que concuerda con los resultados teóricos de la predicción de la topología de la proteína. Se intentaron ensayos de actividad utilizando PNPG como sustrato de la enzima pero no se obtuvieron resultados positivos.

4. 7 PENICILÍN ACILASA

Como ya se comentó en la introducción, el genoma de *T. thermophilus* HB27 codifica una proteína homóloga a la penicilín acilasa de *E. coli* (PGA), a la que denominamos PAC para distinguirla de ésta (1.5.1.6).

El análisis del contexto genético del gen de *Thermus* parece indicar que el gen está aislado, ya que se transcribe a partir de la cadena complementaria que los genes que tiene alrededor (Fig. 4.60).

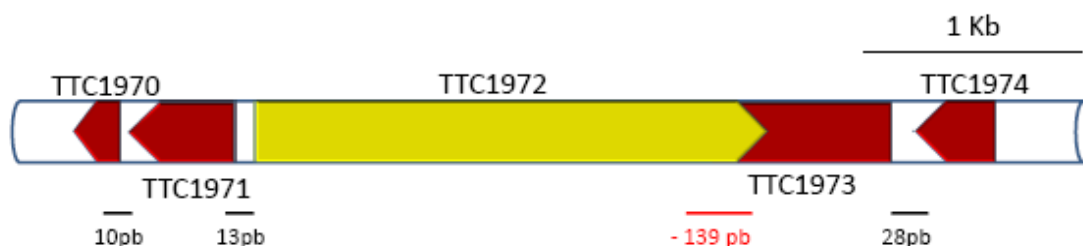
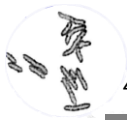


Figura 4. 60 Contexto genómico de *pac* en *T. thermophilus* HB27. TTC1970 y TTC1971: Proteínas hipotéticas de función desconocida, TTC1972: Penicilín acilasa, TTC1973: Proteína con dominio CBS de función desconocida, TTC1974: Proteína hipotética de función desconocida.

Aprovechando la gran similitud de secuencia que tenía la PAC de *Thermus* con la PGA de *E. coli*, cuya estructura tridimensional ya ha sido resuelta, decidimos crear un modelo tridimensional de la enzima. Utilizando el servidor "SwissModel" (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>) se realizó un modelado de la posible estructura de la PAC de *T. thermophilus* HB27, utilizando para ello como modelo la estructura de un mutante PGA de *E. coli* (Hewitt y cols., 2000) (Código PDB 1E3A) que presenta un procesamiento más lento que la silvestre. En el modelo creado puede localizar la posible



4. RESULTADOS

posición de las dos subunidades (α y β) y un péptido espaciador que estaría bloqueando el centro activo y la Serina catalítica (Fig. 4.61), aunque su inicio no puede predecirse con precisión.

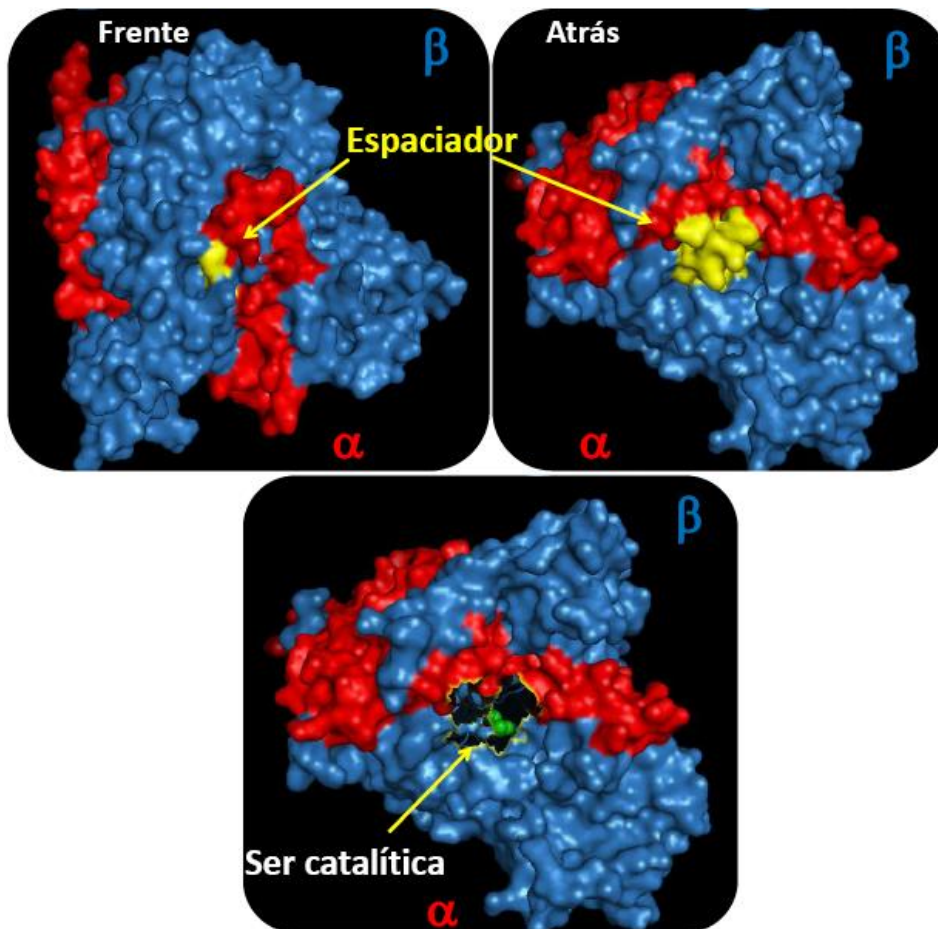


Figura 4. 61 Modelado de la estructura tridimensional de la penicilín acilasa de *T. thermophilus* HB27. La subunidad α está coloreada en rojo, la subunidad en azul y el péptido espaciador, que se encuentra bloqueando el centro activo, en amarillo. En la figura inferior se puede observar un detalle de la Serina catalítica.

4.7.1 Expresión y procesamiento de la PAC en *Thermus thermophilus*

Uno de los primeros pasos que nos propusimos dar para abordar el estudio de esta enzima, sobre todo en lo referente a su producción, exportación y maduración, fue la generación de anticuerpos contra cada una de las distintas subunidades que suponíamos debería formar, lo que nos permitiría observar su procesamiento y maduración.

Para ello decidimos clonar una región de cada uno de los extremos, amino y carboxilo terminales del gen, que llamamos α y β como las de *E. coli*, en un vector de expresión.

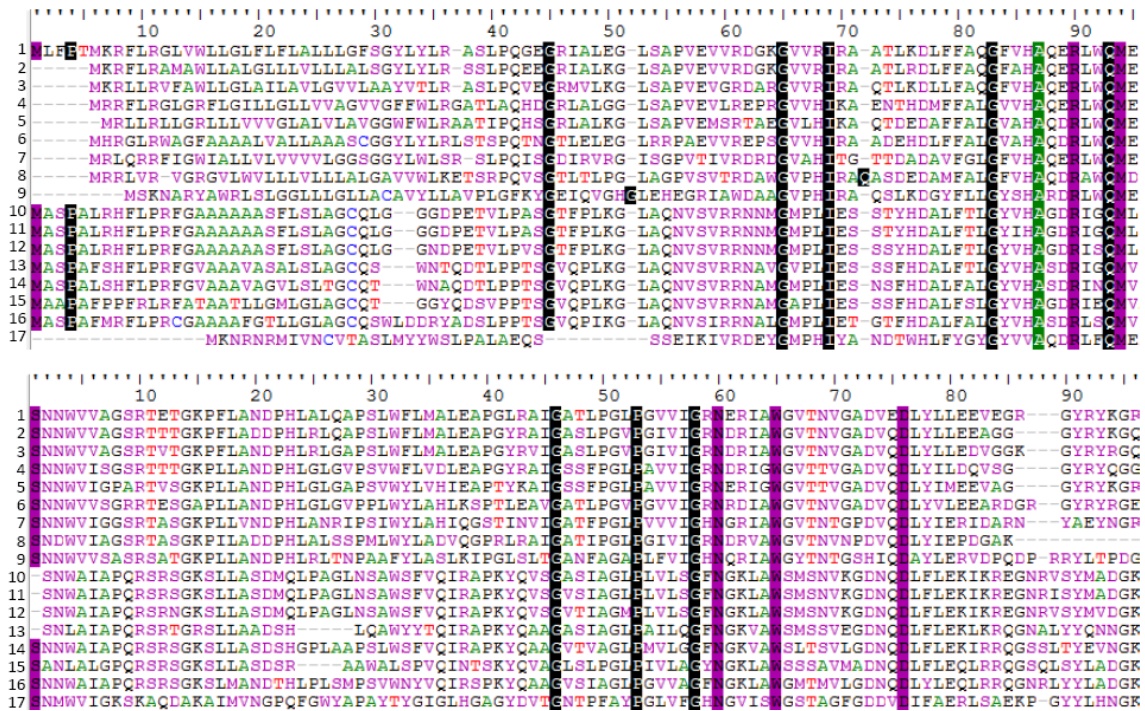
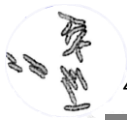


Figura 4.62 Alineamiento de la zona amino terminal y péptido señal (Arriba) y de la subunidad β (abajo) de algunas nucleotidil amidohidrolasas. (1) TTC1972: β PAC [*Thermus thermophilus* HB27], (2) TaqDRAFT_4937: peptidase S45 penicillin amidase [*Thermus aquaticus* Y51MC23], (3) TSC_c04470: penicillin acylase [*Thermus scotoductus* SA-01], (4) Mesil_0788: peptidase S45 penicillin amidase [*Meiothermus silvanus* DSM 9946], (5) Mrub_2155: peptidase S45 penicillin amidase [*Meiothermus ruber* DSM 1279], (6) Rxyl_2001: penicillin amidase [*Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941], (7) Caur_3748: peptidase S45 penicillin amidase [*Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl], (8) Dgeo_0269: penicillin amidase [*Deinococcus geothermalis* DSM 11300], (9) PLES_34311: putative penicillin acylase [*Pseudomonas aeruginosa* LESB58], (10) QUIP_PSESM: Acyl-homoserine lactone acylase *Pseudomonas syringae*, (11) QUIP_PSE14: Acyl-homoserine lactone acylase [*Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (strain 1448)], (12) QUIP_PSEU2: Acyl-homoserine lactone acylase quiP [*Pseudomonas syringae* pv. syringae (strain B728a)], (13) QUIP_PSEF5: Acyl-homoserine lactone acylase quiP [*Pseudomonas fluorescens* (strain Pf-5)], (14) QUIP_PSEPF: Acyl-homoserine lactone acylase quiP [*Pseudomonas fluorescens* (strain Pf0-1)], (15) QUIP_PSEPK: Acyl-homoserine lactone acylase quiP [*Pseudomonas putida* (strain KT2440)], (16) QUIP_PSEAE: Acyl-homoserine lactone acylase quiP [*Pseudomonas aeruginosa*], (17) 1E3A PAC_ECOLX: Penicillin G acylase [*Escherichia coli*].

Tomando como referencia alineamientos múltiples contra otras Penicilín acilasas y homoserín lactonas acilasas (Fig. 4.62), definimos como posible subunidad α la secuencia desde la posición 48 a la 224, y como subunidad beta de la posición que ocupaba la serina 246 hasta el final. Para la amplificación empleamos los oligonucleótidos α PACSPNdeI y α PACEcorevStop para el fragmento amino y β PACNdeI y β PACEcorevStop (Anexo I) para hacer lo propio con el fragmento carboxilo. Ambos fragmentos fueron clonados entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* de los vectores pET22b+ y pET28b+ para expresar las formas nativas y sus versiones fusionadas a una secuencia de 6 histidinas en amino terminal respectivamente (pET22 α PAC, pET22 β PAC, pET28 α PAC y pET28 β PAC).

Una vez obtenidas las construcciones se transformó con ellas la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y se indujo la expresión de los genes utilizando IPTG, como se detalla en Materiales y Métodos. No conseguimos la expresión de la forma soluble de ninguna de las dos subunidades, lo que hizo que tuviéramos que tratar con la forma precipitada de ambas proteínas. La generación de los anticuerpos en conejo a partir de las proteínas separadas en



4. RESULTADOS

geles de SDS-PAGE, corrió a cargo de la empresa -PROALT-, que nos proporcionó el suero inmune.

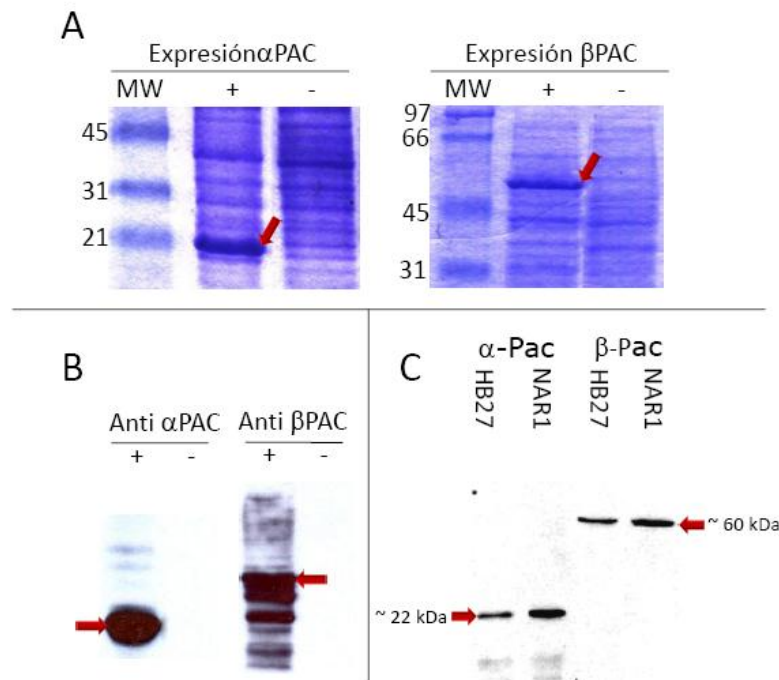


Figura 4. 63 Expresiones PAC en *Thermus* y *coli*. Expresiones de los fragmentos α y β en *E. coli*, observadas mediante tinción con azul Coomassie **(A)** e inmunodetección utilizando los anticuerpos anti α y anti β PAC **(B)**. (+): Cultivo inducido (-): Control negativo, cultivo sin inducir. **(C)**: Inmunodetección en extractos totales de *T. thermophilus* HB27 y Nar1, crecidos en medio rico y condiciones aeróbicas hasta fase estacionaria, utilizando los anticuerpos anti α y anti β PAC.

Para comprobar si los anticuerpos reconocían a la PAC nativa de *T. thermophilus*, utilizamos las cepas de *T. thermophilus* HB27 y NAR1, en la que también se encuentra este gen, y comprobamos que tanto el anticuerpo contra el fragmento amino terminal como el dirigido contra el carboxilo terminal detectaban de manera bastante específica 2 proteínas que probablemente representan las subunidades α y β de la PAC de *T. thermophilus* (Fig. 4. 63). Por lo tanto este experimento nos permitió demostrar, por primera vez, que la PAC de *T. thermophilus* se procesa en dos subunidades al igual que ocurre con otras proteínas homólogas de mesófilos. El tamaño de éstas parecido al esperado: 20 kDa para la subunidad α y de 58'8kDa para la subunidad β .

4.7.2 Localización celular de la penicilín acilasa

Las penicilín acilasas suelen ser enzimas solubles ubicadas en el periplásmo en Gram-negativas o secretadas al medio extracelular en Gram-positivas (Arroyo y cols., 2003; Parmar y cols., 2000). Tomando como punto de partida esto y utilizando programas de predicción de localización subcelular y de predicción de fragmentos transmembrana se puede realizar una estimación teórica de la probable localización de la PAC en *T. thermophilus*. Todos los datos obtenidos de los programas de predicción de segmentos transmembrana y



de predicción de péptidos señal parecen indicar la presencia de un fragmento transmembrana en la zona amino terminal de la proteína que podría coincidir con el posible péptido señal (Fig. 4.64). Un análisis más detallado de esta secuencia muestra semejanzas con péptidos señal exportados vía Tat, si bien es cierto que las dos argininas están separadas por dos residuos aminoácidos; en *E. coli* ocurre algo parecido y aun así su translocación al periplasma emplea este sistema de secreción (Ignatova y cols., 2002). En la penicilín acilasa de *T. thermophilus* no se observa ninguna secuencia de posible corte de ese péptido por la peptidasa señal.

4.7.2.1 Utilización de la sGFP

La proteína sGFP (*superfolded green fluorescent protein*) es una variante de GFP de *Aqueorea victoria* que puede ser utilizada como marcador de localización termoestable en *T. thermophilus* (Cava y cols., 2008; Blas-Galindo, 2007b).

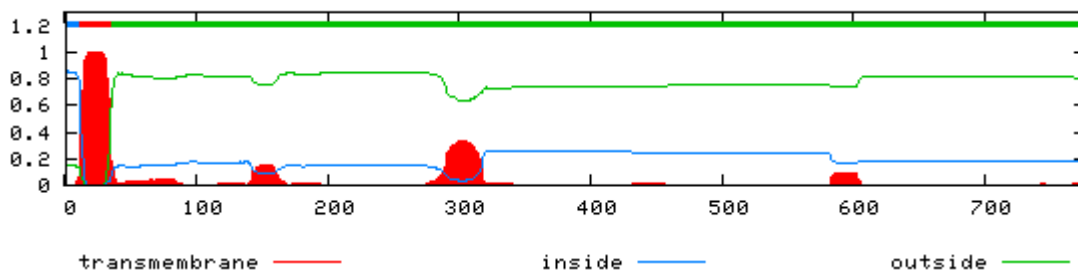
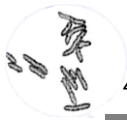


Figura 4. 64 Predicción de regiones transmembrana de la PAC. Se refleja la posible existencia de un péptido señal. Imagen producida por el programa TMMOD desarrollado por Kahsay y colaboradores basándose en modelo "Hidden Markov" (Kahsay y cols., 2005).

Dado que las proteínas que se exportan vía Tat permiten la expresión de proteínas fluorescentes en el periplasma, tratamos de comprobar tal secreción en fusiones a sGFP. Para ello fusionamos tanto el gen *pac* completo como la proteína a la que habíamos quitado el posible péptido señal. Adicionalmente, construimos una fusión de la sGFP con ese supuesto péptido señal.

Las construcciones se realizaron sobre el plásmido pMKPnquosGFP (Fig. 4.65) empleando los fragmentos escogidos amplificados mediante PCR con los oligonucleótidos oSPPACEcoRIrev, oPACNdeI-3, o α PACSPSRBSNdeIdir, oPACEcoRIrev, generando los plásmidos pMK-SPsGFP, pMK-PACsGFP, pMK-SPSsGFP. Para saber cuál es el fragmento de *pac* que correspondería al péptido señal, tomamos como referencia el alineamiento con la proteína de *E. coli* y, basándonos en esto, tomamos como péptido señal los primeros 47 aminoácidos de la PAC de *Thermus*. El fragmento sin el péptido señal comenzaría en la Leucina 48 y se extendería hasta el final de la proteína.



4. RESULTADOS

Como control de expresión de una proteína citoplásmica empleamos una fusión a la glicosidasa TTP0042, que fue amplificada con los oligonucleótidos oTTP0042NdeI y oTTP0042NSEcoRIrev, para generar el plásmido pMK-42sGFP.

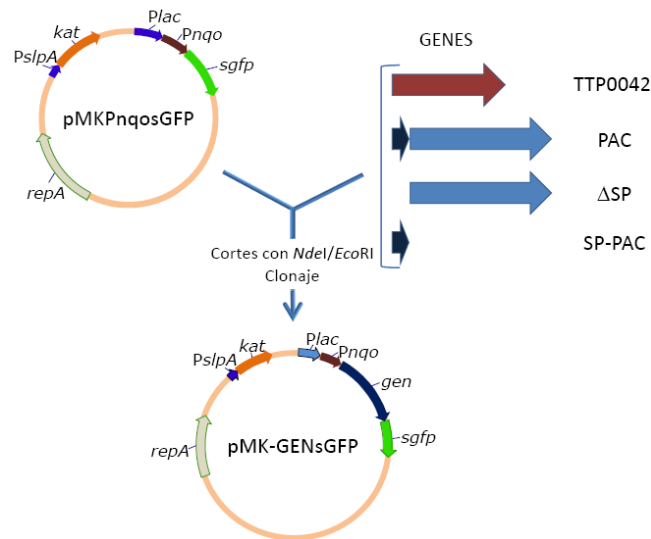


Figura 4. 65 Construcción de plásmidos derivados pMKPnqosGFP para fusión de proteínas a la sGFP. TTP0042: β-glicosidasa. PAC: penicilín acilasa. ΔSP: Penicilín acilasa sin el péptido señal. SP-PAC: Péptido señal de la penicilín acilasa.

Transformamos con estas construcciones varias estirpes de *T. thermophilus* para hacer este ensayo, dado que en algunas de ellas podemos limitar el nivel de expresión desde este promotor. Realizamos ensayos de Western-blot utilizando anticuerpos monoclonales que reconocían a la sGFP para comprobar que se producía la expresión de estas fusiones en las distintas fracciones.

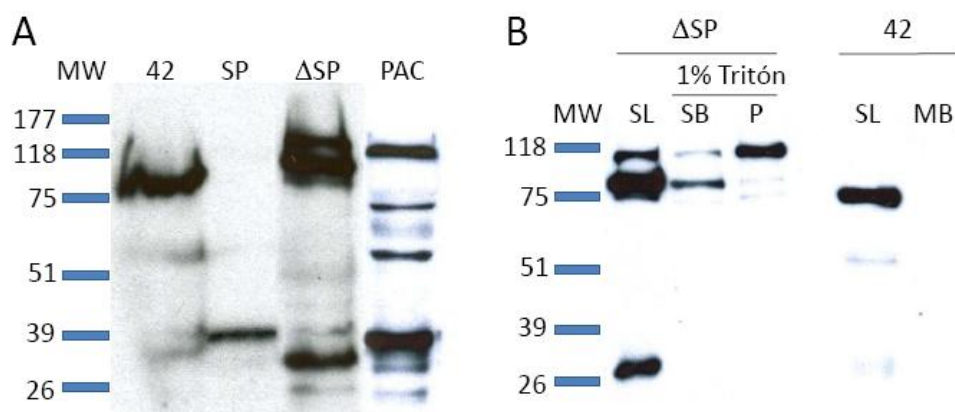
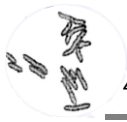


Figura 4. 66 Expresión de las fusiones a sGFP. (A) Western-blot con anticuerpo monoclonal anti GFP de extractos de *T. thermophilus* ΔPAC sobreexpresando las distintas fusiones con la sGFP. 42: fusión con la TTP0042, SP: Fusión con el péptido señal de la PAC, ΔSP: Fusión PAC sin el péptido señal, PAC: Fusión con la PAC. (B) fraccionamiento celular de *T. thermophilus* sobreexpresando fusiones con la sGFP. SL: Fracción de proteínas solubles, MB: Fracción de membrana, SB: Fracción de membrana solubilizada con 1% (p/v) de tritón X-100, P: Fracción de membrana que queda insoluble tras el tratamiento con 1% de Tritón.



Como se observa en la figura 4. 66 las fusiones producidas se expresan en *T. thermophilus*, siendo de mayor nivel la correspondiente a la proteína citoplásmica TTP0042 y la PAC sin el péptido señal (Δ SP). Es interesante señalar la existencia de degradación, que es especialmente relevante en la fusión con PAC, así como una banda muy pronunciada en la Δ SP, de tamaño menor al de la fusión completa. Es interesante destacar que en la fracción particulada (P) no aparece esta banda, sino que toda la marca se concentra a la altura de la fusión, probablemente indicando que se trata de cuerpos de inclusión no accesible a las proteasas e insolubles en tritón X100 (Fig. 4.66 B). El fraccionamiento de las células reveló que esta fusión era esencialmente soluble, al igual que ocurría con la glucosidasa TTP0042. Tanto la fusión a la PAC completa como a su péptido señal quedaban en la fracción particulada (datos no mostrados).

En las imágenes de microscopía de la figura 4.67 se puede observar cómo la fusión con la glicosidasa genera fluorescencia por toda la célula, como corresponde a una expresión citoplásmica. Sin embargo, las fusiones a PAC o a su péptido señal generaron la formación de filamentos. En el caso de la enzima sin su péptido señal muestra una distribución en parches discretos en el centro de las bacterias que conforman el filamento (Fig. 4.67 B). Por su parte, las fusiones a la PAC completa o a su péptido señal (paneles D y C) produjeron mucha menos intensidad de fluorescencia y ésta se encontraba localizada en puntos concretos desplazados hacia los bordes de las bacterias. Las imágenes no difirieron unas de otras cuando se utilizaron distintas cepas del microorganismo.



4. RESULTADOS

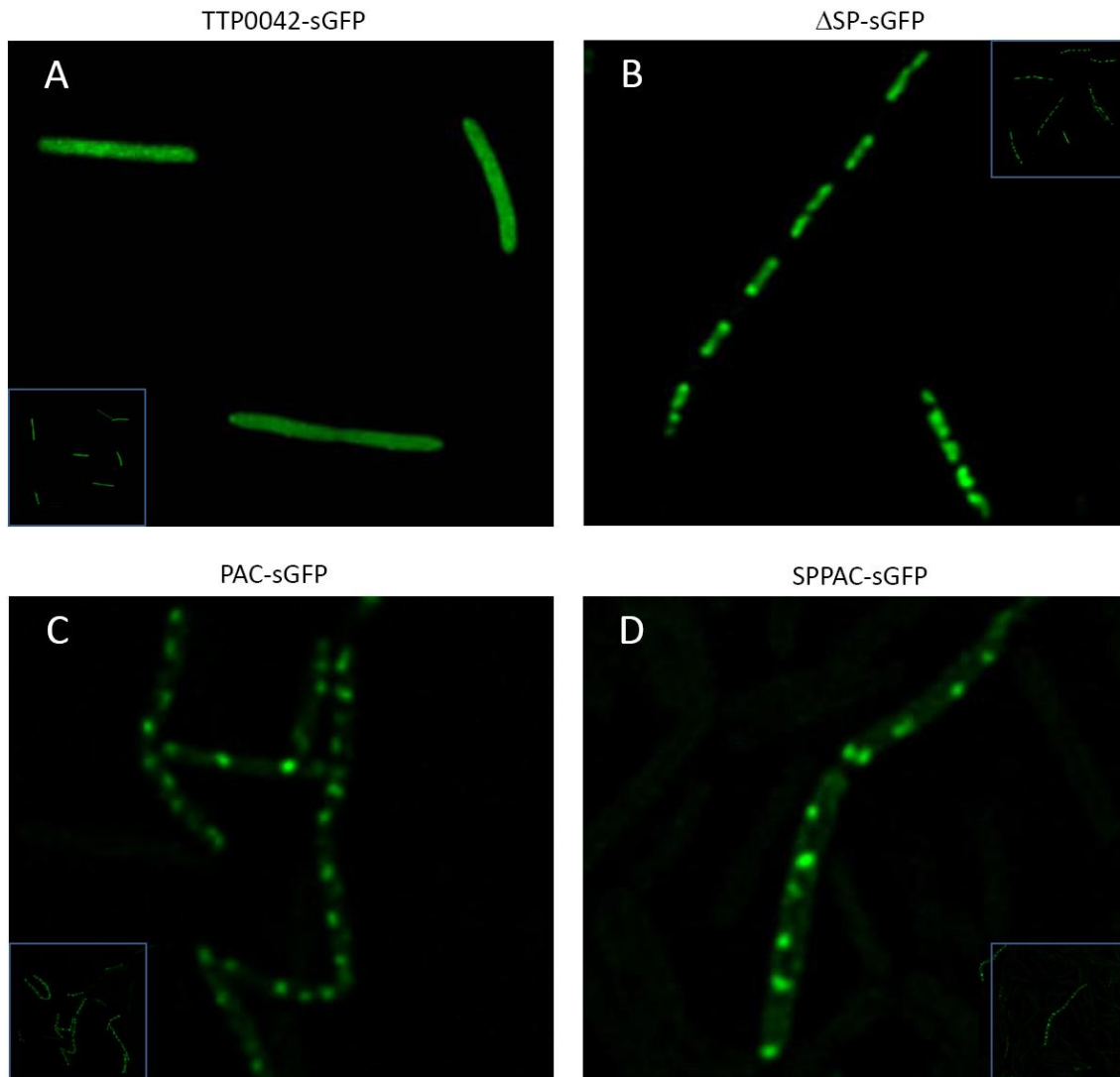


Figura 4. 67 Imágenes de microscopía confocal. Se muestran juntos diferentes campos de imágenes de microscopía confocal de *T. thermophilus* HB27 Δ PAC transformado con las construcciones de las distintas proteínas fusionadas a la sGFP. (A) Construcción TTP0042 unida a sGFP. (B) Construcción PAC sin el péptido señal (Δ SP) unida a sGFP. (C) Construcción PAC unida a sGFP. (D) Construcción péptido señal de la PAC unido a sGFP.

Estos datos sugieren que la presencia del péptido señal concentra la expresión de la proteína sGFP sobre zonas concretas de la célula sin producir formas solubles periplásmicas.

4.7.2.2 Localización de PAC mediante fraccionamiento celular

En paralelo a los ensayos de localización celular mediante la expresión de la fusión de la enzima a sGFP, decidimos estudiar la presencia de la de *Thermus* en las distintas fracciones celulares. Para ello empleamos un mutante de capa S de NAR1 que muestra un espacio periplásmico hipertrofiado (Castán y cols., 2002), generando cuerpos multicelulares que comparten una misma envuelta externa. Las proteínas periplásmicas pueden ser fácilmente extraídas de estos cuerpos multicelulares mediante rotura mecánica de la envuelta externa común.



Como se puede observar en la figura 4. 68, contrariamente a lo que ocurre en *E. coli* y en otras bacterias Gram-negativas, en el caso de *T. thermophilus* HB27 esta enzima permanecía anclada en la membrana, no apareciendo en la fracción soluble correspondiente al citoplasma (CIT) ni al periplasma (PE) donde sí se podía detectar DrpA, una proteína reguladora del sistema de respiración de nitrato. La aparición de esta proteína en la fracción citoplásmica es habitual ya que el método de separación no excluye la contaminación de esta fracción con periplasma procedente de las células que no formen esos cuerpos de inclusión.

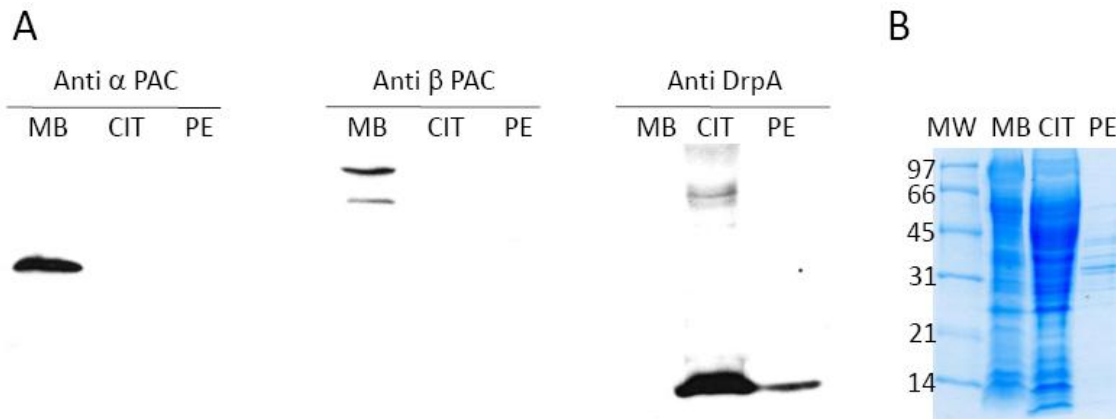


Figura 4. 68 Separación de las distintas fracciones celulares de *T. thermophilus* NAR1. Situación de la penicilina acilasa y DrpA en las fracciones de *Thermus*. MB: Fracción de membrana, CIT: Fracción de proteína citoplásmica, PE: Fracción de proteína periplásmica. (A): Inmunodetección con anticuerpos, (B): Gel teñido con azul Coomassie.

Para tratar de determinar si la PAC estaba asociada a la membrana interna o a la membrana externa empleamos solubilización diferencial con detergentes, un método ampliamente utilizado para este propósito (Thein y cols., 2010; Hobb y cols., 2009; Schnaitman 1971a y b).

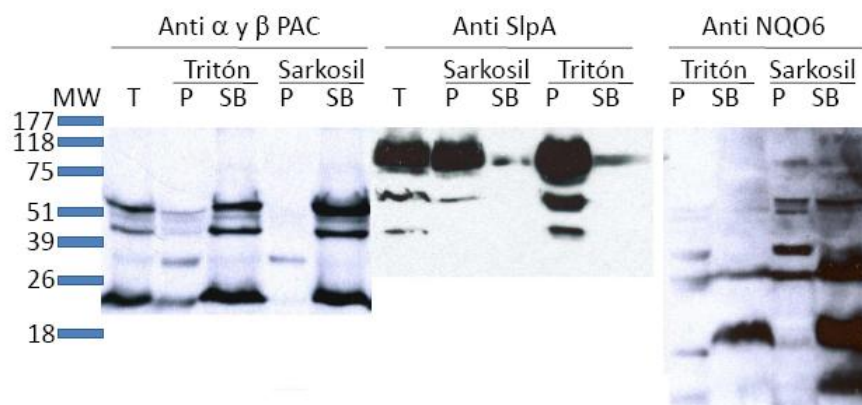
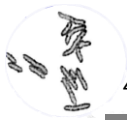


Figura 4. 69 Solubilización de elementos de membrana interna. Western-blot de las membranas de *T. thermophilus* HB27 tratadas con 1% de Tritón o Sarkosil a 37°C durante 30 minutos, utilizando diferentes anticuerpos. T: Extracto total de la bacteria, P: Fracción de proteínas insolubles tras el tratamiento con el detergente, SB: Fracción de proteínas solubles tras el tratamiento con el detergente.



4. RESULTADOS

Como control de contaminación cruzada entre proteínas de ambas membranas utilizamos anticuerpos contra slpA (Proteína de la capa S), y NQO6, proteína de la NADH deshidrogenasa de tipo I (complejo I). Como se muestra en la figura 4.69, al tratar las membranas con Tritón X-100, la penicilín acilasa se solubiliza, al igual que ocurre con la proteína NQO6, mientras que slpA queda en la fracción insoluble. Con sarcosil, un detergente clásicamente empleado para solubilizar proteínas de membrana interna de Gram-negativas, ocurre lo mismo, indicando que la PAC está probablemente asociada a la membrana interna.

4.7.3 Accesibilidad a la tripsina

Los datos anteriores sugieren que la PAC de *T. thermophilus* permanece unida a la membrana interna, pero no indican nada acerca de su topología. Para estudiarla decidimos analizar su accesibilidad a Tripsina en células permeabilizadas con EDTA.

Utilizamos la cepa *T. thermophilus* NAR1 Δ slpA que fue crecida hasta llegar a fase exponencial en aireación o en microaerofilia, dependiendo de los controles que fuéramos a utilizar, y luego se realizó el ensayo del modo que viene descrito en Materiales y Métodos (3.5.10). Dado que la cepa silvestre posee una capa cristalina que limita el acceso a la tripsina inclusive realizando un tratamiento con EDTA, empleamos la cepa NAR1 slpA:kat, como se puede observar en la figura 4.70.

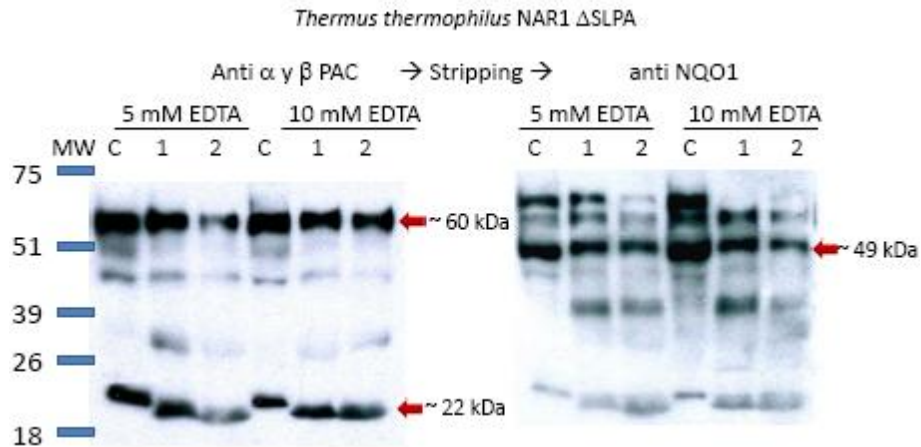


Figura 4. 70 Pruebas de accesibilidad a la Tripsina. Imagen de Inmunodetección de las subunidades α y β PAC de la penicilín acilasa (Izquierda) y NQO1 (48,6 kDa) tras realizar un stripping, en muestras de *T. thermophilus* NAR1 Δ SLPA. C: Son los controles sin tripsina pero tratados con la misma cantidad de EDTA y HCl, 1: tratamiento con 1,2 mg/ml de tripsina, 2: Tratamiento con 5,5 mg/ml de tripsina, ambos durante 5 minutos.

Los ensayos con tripsina muestran que ésta es capaz de penetrar la envoltura de *Thermus* Δ SlpA y cortar la penicilín acilasa en la subunidad α , sin tocar la subunidad β . Los ensayos en paralelo, tras retirar la marca del anticuerpo, se realizaron con un anticuerpo anti Nqo1 (proteína orientada hacia el citoplasma) y mostraron una menor sensibilidad de esta proteína a la degradación. No obstante, alcanzando una mayor concentración de tripsina NQO1 podía ser degradada parcialmente.



Queríamos analizar si ese péptido eliminado de la subunidad α de la penicilín acilasa pertenecía a su región amino o carboxilo. Para ello tratamos las células con EDTA y tripsina y posteriormente analizamos si la proteína se quedaba asociada a la membrana o por el contrario aparecía en la fracción soluble. Nuestra hipótesis de partida era que el corte en la región amino debería provocar la solubilización de la proteína, pues era ésta la región que considerábamos más probablemente implicada en su anclaje a la membrana. Como se puede observar en la figura 4.71, la proteína aún queda anclada en la membrana tras el tratamiento con tripsina, por lo que el fragmento eliminado debe pertenecer a la parte carboxilo terminal de la subunidad.

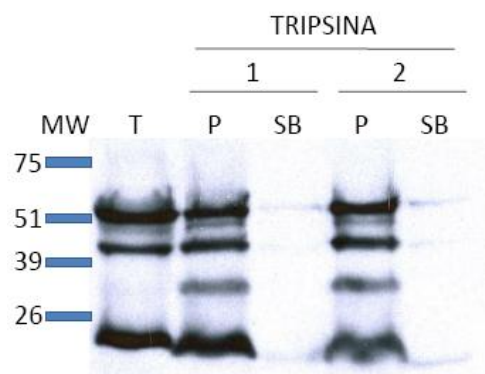
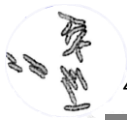


Figura 4. 71 Localización subcelular de las subunidades α y β de la PAC. Las muestras se sometieron a tripsinización previamente a la separación de las fracciones. T: Extractos totales, P: Fracción de membrana, SB: Fracción de proteínas solubles, 1: Ensayo realizado con 1,2 mg/ml de tripsina, 2: Ensayo realizado con 5,5 mg/ml de tripsina.

4.7.4 Expresión de una quimera (PS_{Eco} - PAC_{Th})

Puesto que sospechábamos que el péptido señal de la penicilín acilasa de *T. thermophilus* era el responsable de su anclaje a la membrana al no procesarse, decidimos construir una quimera con el péptido señal de la PGA de *E. coli* y la PAC de *Thermus*. Para ello empleamos "Overlap Extension PCR", con 2 pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el péptido señal de *E. coli* (NdeI-EcoIPACfbis y colaA1a25EcoIPACr) y otro para amplificar la PAC de *Thermus* desde la serina 38 (colaSer33TthPACf y o β PACEcorevSTOP). La secuencia amino terminal de esta pre-pro-proteína quimérica se muestra en la figura 4.72. A partir de esta construcción y del vector de expresión para *Thermus* pMKPnqo, se construyó el plásmido pMKPnqo-HPAC, con el que se transformó *T. thermophilus* HB27 Δ PAC, para analizar la expresión de esta quimera.



4. RESULTADOS

A

ATGAAAAATAGAAATCGTATGATCGTGAAGTGTGTTACTGCTTCCCTGATGTATTATTGGAGCTTACCTG
CACTGGCTTCCCTGCCCAAGGGGAAGGCCGCATCGCCCTGGAGGGGCTTTCGCCCCGGTGGAGGTGGT
CCGGGACGGCAAGGGGGTGGTGCATCCGGGCGGCGACGCTTAAGGACCTCTTCTTCGCCAGGGC

B

MKNRNRMIVNCVTASLMYYWSLPALASLPQEGEGRIALEGLSAPVEVVRDGGKGVVIRAAATLKDLFFAQQ

Fig. 4. 72 Secuencias de nucleótidos (A) y de aminoácidos (B) de la quimera construida con el péptido señal de la penicilín acilasa de *E. coli* (en rojo) y la Penicilín acilasa de *T. thermophilus* sin su péptido señal (negro).

Una vez detectados los clones que expresaban la proteína fusión, separamos las distintas fracciones celulares lo que nos permitió observar que la proteína no sólo se expresaba en forma soluble, sino que se procesaba en dos subunidades, si bien ese procesamiento no siempre se producía correctamente, y parte de proteína sin procesar aparecía en la fracción soluble (Fig. 4.73).

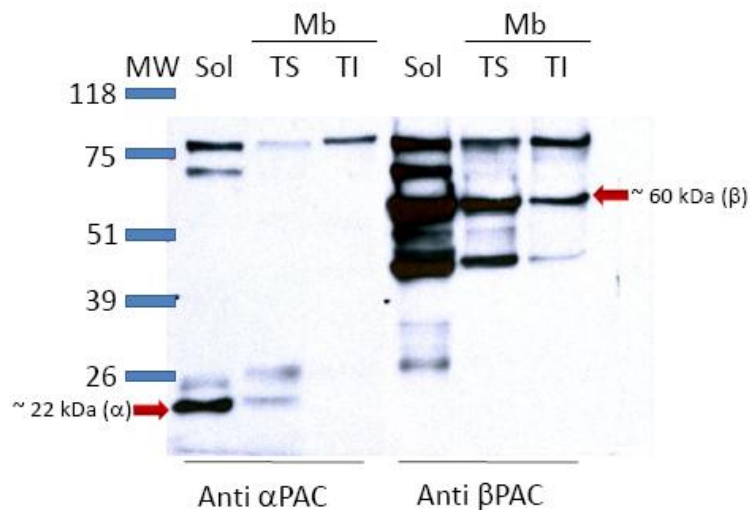


Figura 4. 73 Expresión de la quimera $PS_{Eco}-PACT_{Th}$. Western-blot de la expresión de la penicilín acilasa de *Thermus* con el péptido señal de *E. coli* en *T. thermophilus* ΔPAC desde el plásmido pMK-HPAC, utilizando anticuerpos anti α (izquierda) y anti β (derecha) PAC. Sol: Fracción soluble, TS: Fracción de membrana solubilizada con 1% de Tritón X-100, TI: Fracción de membrana insoluble con 1% de Tritón X-100. Las flechas indican la posición de la banda que se correspondería con las subunidades α y β .

Estos datos sugieren que el péptido señal de la PAC de *E. coli* es reconocido y procesado por el sistema de *T. thermophilus*.

4.7.5 Generación de mutantes de delección amino terminal y complementación al mutante ΔPAC

Los datos anteriores mostraban que la PAC de *T. thermophilus* se procesaba en dos subunidades. En *E. coli*, para que ese procesamiento tenga lugar se requiere que esté



presente el extremo carboxilo terminal de la subunidad β (Bruns y cols., 1985, Sizmann y cols., 1990). Por ese motivo pensamos que quizá en *T. thermophilus*, esta zona también podría ser fundamental para el procesamiento de esta enzima y que un mutante de delección en esta zona daría lugar a un precursor proteico incapaz de autoprocresarse.

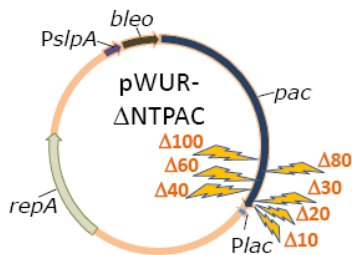


Figura 4. 74 Construcciones de los mutantes de delección Delta 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 carboxilo terminal en pWUR.

Para verlo amplificamos fragmentos del gen *pac* a los que se les deleccionaron regiones de tamaños crecientes de la región carboxilo terminal, utilizando para esto los oligonucleótidos oPACNdeIRBSdirII como directo y los oΔNEcorIrev como reversos (Anexo I), siendo N en este caso el número de aminoácidos a eliminar de la zona carboxilo terminal de la proteína, que fueron 10, 20, 30, 40, 60, 80 ó 100. Posteriormente procedimos a clonar esos fragmentos en el vector pWUR para su expresión de manera constitutiva en *T. thermophilus*, generando los plásmidos pWURΔNPAC (Figura 4.74). Una vez obtenidos los clones, intentamos complementar con ellos, una cepa de *T. thermophilus* HB27 mutante insercional para el gen *pac*, en el que éste había sido interrumpido con un fragmento génico que portaba resistencia a kanamicina. Lamentablemente, al realizar estas construcciones nos encontramos con que la penicilín acilasa parecía haber recobrado su tamaño original, no observándose variaciones de tamaño ni en el caso de haber deleccionado 100 aminoácidos a la subunidad beta de la enzima. Este efecto inesperado lo atribuimos a la recombinación que podría tener lugar entre la copia truncada de la proteína que estábamos introduciendo y uno de los fragmentos que aún quedaban dentro del genoma de *Thermus*. Para sortear este problema decidimos crear un mutante de delección de *T. thermophilus* HB27.

4.7.5.1 Generación de un mutante limpio HB27ΔPAC

Para la obtención de este mutante amplificamos las regiones anteriores y posteriores del gen *pac* (1 kb en cada caso) mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos oUpPACHindIIIdir, oUpPACSalIrev, oDownPACSalIIdir y oDowPACEcoRIrev (Anexo I), y clonamos ambos insertos en el plásmido de pK18, generando el plásmido suicida pK18ΔPAC (Fig. 4.75).

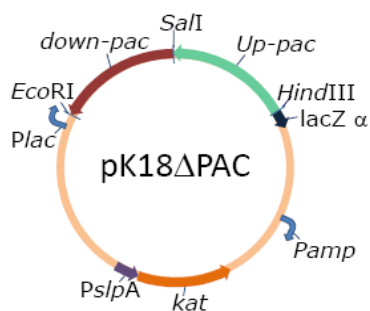
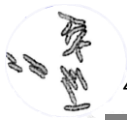


Figura 4. 75 Esquema del plásmido pK18ΔPAC con el detalle de las dianas de restricción más relevantes.



4. RESULTADOS

Este plásmido fue usado para la integración por recombinación homóloga y, posteriormente se analizaron aquellos clones en los que había sido eliminado espontáneamente en la búsqueda de los mutantes de deleción.

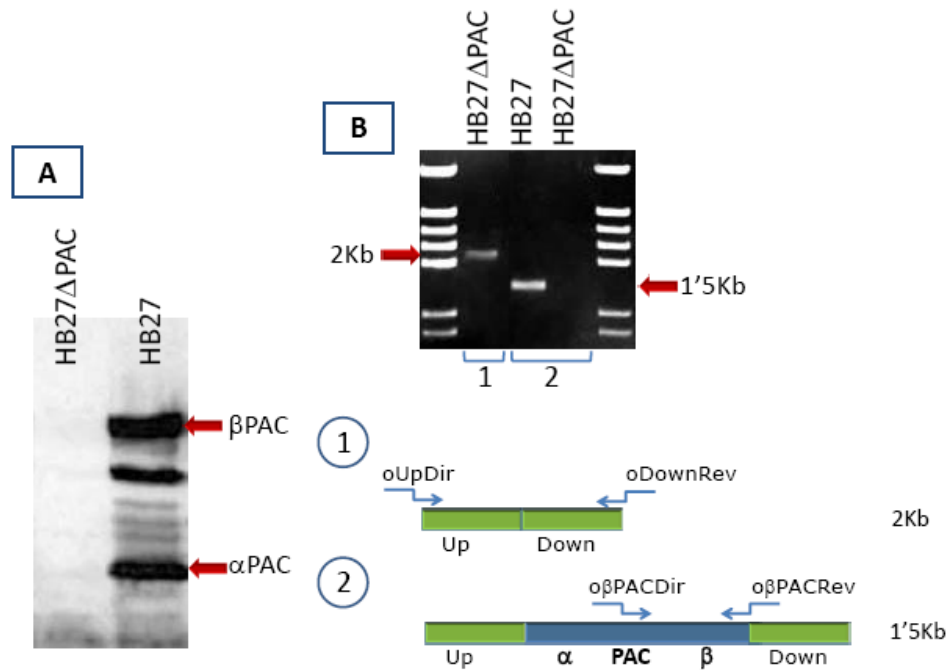


Figura 4. 76 Comprobación de los mutantes de deleción *T. thermophilus* HB27ΔPAC. (A) comprobación mediante Western-blot utilizando los anticuerpos policlonales contra cada una de las subunidades de la enzima. (B) Comprobación mediante PCR, amplificando los fragmentos que se detallan en (1) Cepa mutante y (2) Cepa con fenotipo silvestre.

La comprobación de que realmente habíamos conseguido el mutante se realizó inicialmente mediante Western-blot. Utilizando los anticuerpos generados contra las dos subunidades podíamos observar la desaparición de la proteína en contraste con el control positivo (Fig. 4.76 A). La comprobación también se realizó mediante PCR del DNA cromosómico total de la bacteria. Utilizando oligonucleótidos externos al gen *pac* observaríamos una banda de 2 kb, en lugar de las 4 kb que observaríamos en el caso de un fenotipo silvestre (Fig. 4.76 B Esquema 1), mientras que unos cebadores internos al gen no amplificarán ninguna banda en el mutante y sí en el silvestre (Fig. 4.76 B Esquema 2). Todos estos resultados mostraban que, efectivamente, habíamos conseguido eliminar todo el gen *pac* del cromosoma de *T. thermophilus* HB27.

4.7.5.2 Expresión de los mutantes de deleción carboxilo terminal

Volvimos a intentar la expresión del mutante ΔPAC con los diversos mutantes de deleción carboxilo terminal expresados desde pWUR.

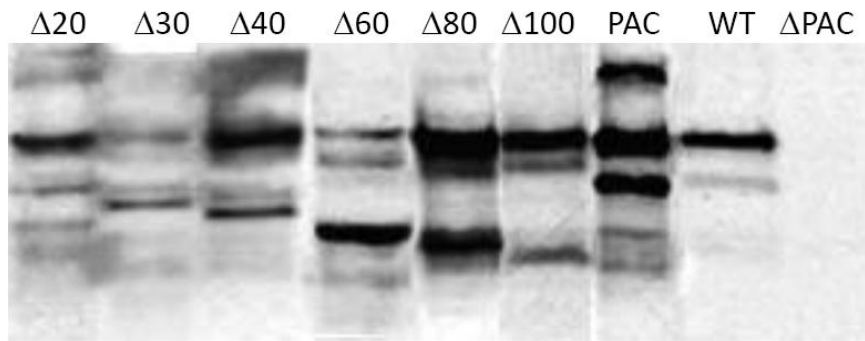


Figura 4. 77 Expresión del los mutantes carboxilo terminal en el mutante Δ PAC. Western-blot con el anticuerpo anti subunidad beta de la PAC, utilizando extractos totales de *T. thermophilus* HB27 o HB27 Δ PAC expresando tanto la PAC completa como los distintos mutantes, clonados en pWUR. Δ Nº indica el número de aminoácidos eliminados del carboxilo terminal de la proteína. C+ corresponde con el extracto de la bacteria silvestre. C- es el extracto del mutante de delección.

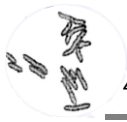
Como se puede observar en los distintos carriles del gel (Fig. 4.77), hay una proteína reconocida por el anticuerpo anti subunidad β de tamaño indistinguible a la subunidad β silvestre que aparece en todos los casos y cuyo origen no podemos concretar. Por debajo de esta banda aparece otra, también detectada por el anticuerpo anti β , que es de tamaño decreciente, relacionándose con la delección empleada. Estos datos no nos permiten concluir de forma clara un efecto de la zona carboxilo terminal de β , pues en todos los casos aparecen fragmentos “procesados” del tamaño esperado, lo que sugiere la acción de proteasas externas independientes de PAC.

4.7.6 Generación de mutantes de homología y ensayos de actividad de la PAC de *T. thermophilus*

El método más sencillo y rápido para la determinación de la actividad penicilín acilasa *in vitro*, es la utilización de un compuesto cromogénico, el ácido 2-nitro-5fenilacetaminobenzoico (NIPAB), que al ser hidrolizado por la penicilina G acilasa libera un compuesto de color amarillo, el ácido 2-nitro-5-aminobenzoico (Zhang y cols., 1986).

En nuestro laboratorio ya se habían realizado ensayos de actividad con esta enzima producida en *E. coli*, no observándose actividad sobre estos sustratos colorimétricos, pero sí cuando se utilizaba penicilina G y se analizaban los resultados mediante HPLC (Moreno, 2004) confirmando que esta enzima era capaz de hidrolizar éste, aunque con muy baja eficiencia. Dada la complejidad del comportamiento de esta enzima pensamos que quizá, sobreexpresandola en su sistema natural, podríamos observar un incremento en su actividad.

Para su sobreexpresión se utilizó el vector pWUR, en el que clonamos tanto la forma silvestre de la enzima, como una versión en la que habíamos eliminado el posible péptido señal de la misma, utilizando α PACSPSNdeI y α PACEcorervStop como oligonucleótidos



4. RESULTADOS

directos para la forma silvestre y sin péptido señal de la proteína, respectivamente, y oPACEcoRIrevSTOP como reverso en ambos casos, generamos los plásmidos pWURPAC y pWUR Δ SP (Fig. 4.78).

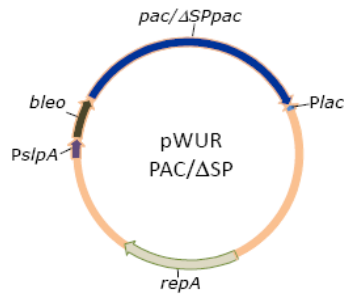


Figura 4. 78 Plásmidos para la sobreexpresión constitutiva de la Penicilín acilasa, tanto silvestre como sin péptido señal, en *T. thermophilus*.

La razón de tratar de clonar la enzima sin el péptido señal era comprobar si podíamos expresar una forma soluble citosólica de la proteína, lo que nos permitiría esquivar los impedimentos que supone para la sobreexpresión de una proteína el tener que utilizar los sistemas de transporte a través de membrana, cuya saturación limita en gran medida la capacidad de expresión. Tampoco podíamos estar seguros de que, aunque consiguiéramos expresar la proteína en el citoplasma esta consiguiera madurar de forma correcta en un compartimento celular diferente al natural.

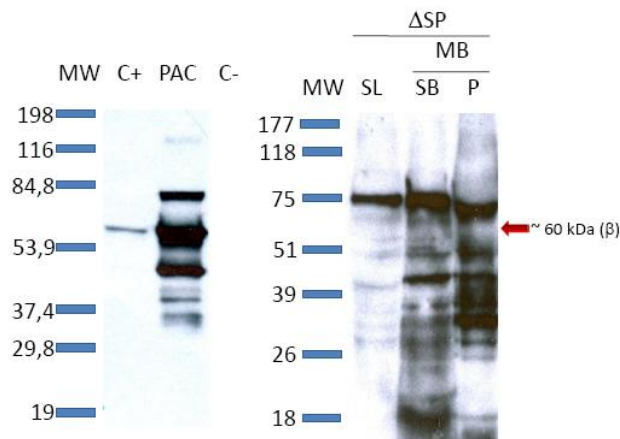


Figura 4. 79 Sobreexpresión de la PAC en *T. thermophilus* Δ PAC. Inmunodetección de la sobreexpresión de la penicilín acilasa tanto en su forma nativa como sin su péptido señal en el mutante Δ PAC, utilizando el anticuerpo anti β . C+: *T. thermophilus* HB27 fenotipo salvaje, C- Mutante HB27 Δ PAC, PAC: Mutantes Δ PAC sobreexpresando la forma nativa de la PAC desde el plásmido pWURPAC, SPS: Sobreexpresión de la PAC sin péptido señal en mutantes Δ PAC. SL: Fracción soluble, MB: Fracción de membrana, SB: Fracción de membrana soluble tras el tratamiento con 1% de tritón, P: Fracción de membrana insoluble tras el tratamiento con 1% de tritón.

Como se puede observar en la figura 4.79, se consiguió una buena expresión de la proteína en su forma nativa, si bien parte de ella aparecía sin procesar. En cuanto a la forma sin péptido señal, al separar las fracciones celulares se comprobó que parte de ésta era expresada como proteína soluble, aunque no parecía estar procesándose correctamente.

Los ensayos no mostraron actividad sobre el NIPAB con los extractos de *T. thermophilus* sobreproductores, a pesar de que en éstos se podía apreciar una cantidad



importante de la misma aparentemente bien procesada. Como control positivo utilizamos la PAC de *E. coli* proporcionada por el laboratorio del Dr. Guisán.

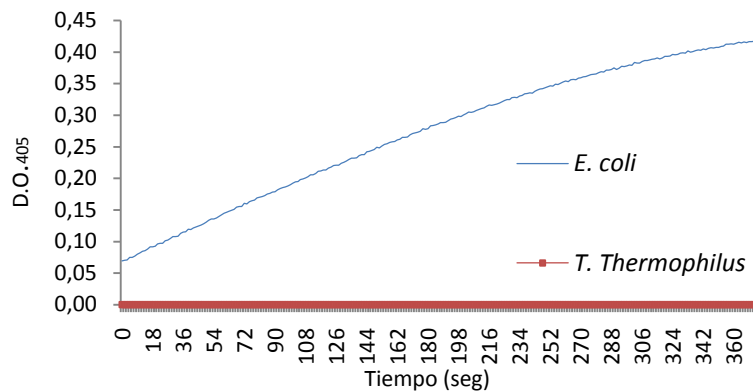


Fig. 4. 80 Medida de la actividad penicilín acilasa del extracto celular completo de *E. coli* y de *T. thermophilus* sobreexpresando la PAC tanto nativa como sin péptido señal, sobre el sustrato colorimétrico NIPAB.

Estos datos mostraban la nula actividad de la PAC de *T. thermophilus* sobre este sustrato, probablemente consecuencia de que éste no sea el sustrato natural de esta enzima. Para tratar de adaptarla a él decidimos seguir una estrategia de diseño racional para modificar el centro activo de modo que pudiera acomodar la penicilina G. Para ello se utilizaron distintos programas de modelado por homología como "Swiss model", "Modbase" y "Yasara", o de "Threading" como Fugue "Phyre", "Raptor" o "Tasser" para, a partir de la estructura de proteínas homólogas, realizar un modelado teórico de la posible estructura del centro activo de la penicilín acilasa de *T. thermophilus*.

Tras analizar las estructuras escogidas, se observó que en el centro activo de la enzima de *E. coli*, el residuo fenilacetilo de la penicilina G encaja dentro de una cavidad plana cuya parte superior está delimitada por los residuos β F24, β F57, α F146 y α M142 y la parte inferior viene delimitada por los carbonos α de los residuos β S67, β T68 y β A69 situados en lámina β (Fig. 4.81). Lo más probable es que sean estos residuos los que determinen la selectividad de la PGA hacia su sustrato. En cuanto a la enzima de *Thermus* la falta de afinidad por la penicilina G se explicaría al desaparecer los residuos aromáticos que empaquetan el fenilacetilo de la penicilina G. Al realizar el modelado, se observó que los residuos β F24 y β F57 de la PAC de *E. coli* se correspondían con L279 e I312 de la PAC de *Thermus* respectivamente. Por ello decidimos hacer las mutaciones L279F e I312F para intentar aumentar la afinidad de la enzima por la penicilina G.



4. RESULTADOS

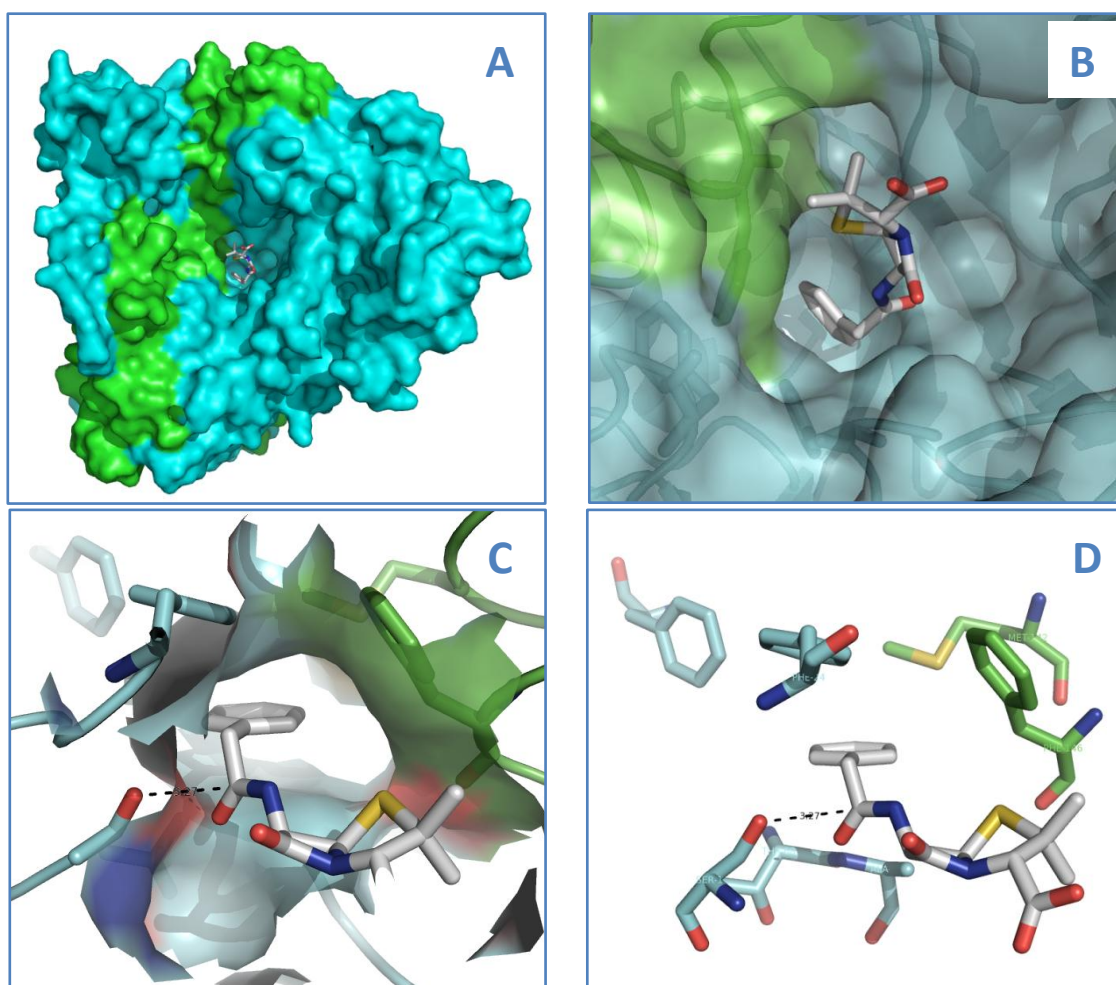


Figura 4. 81 Estructura de la penicilín acilasa de *E. coli* (1GM7). El heterodímero se muestra con su cadena α en verde y su cadena β en azul (A), detalle del encaje del sustrato (B), cavidad determinada por tres residuos de Phe (C) e interacciones entre los residuos del centro activo con penicilina G (D).

Con los oligonucleótidos L279F, L279F_antisense, I312F e I312F_antisense realizamos las mutaciones puntuales sobre el plásmido pWURPAC, utilizando el kit de Quickchange de Stratagene, tal y como viene detallado en Materiales y Métodos. Con esto generamos dos nuevos plásmidos, uno el pWURL279F con la mutación sencilla L279F y el pWUR2MUTPAC que portaba las dos mutaciones.

Transformamos los mutantes HB27 Δ PAC con estos dos plásmidos construidos para sobreexpresar las dos modalidades de enzimas mutantes. Una vez que habíamos comprobado mediante Western-blot que la expresión, así como el procesamiento efectivamente se había producido, repetimos el ensayo de actividad, sin obtener ningún resultado positivo una vez más.

DISCUSIÓN



Los microorganismos y las enzimas que estos portan han sido utilizados durante milenios para la producción de importantes productos para el ser humano, pero sólo algunas décadas atrás se comenzaron a implementar las primeras aplicaciones de la biocatálisis en la industria química. Desde entonces, tanto la comunidad académica como la industria, se han acercado a la biocatálisis como una fuente de investigación con enorme proyección, y la síntesis enzimática de productos específicos se ha convertido en un aspecto fundamental de la biotecnología moderna, que va ganando importancia con el paso del tiempo y la aparición de nuevas enzimas y aplicaciones, desplazando en muchos casos a la síntesis química clásica. Dentro de estos biocatalizadores, las enzimas pertenecientes a organismos extremófilos, especialmente termófilos, están cobrando importancia en las últimas décadas debido a características asociadas a la termoestabilidad, como mayor vida media y resistencia a solventes orgánicos, entre otras, que las convierten en piezas de gran interés para participar en las, a menudo, extremas condiciones que son necesarias para muchos procesos industriales y para las que las enzimas procedentes de organismo mesófilos, no resultan rentables (Hough y Danson, 1999).

Como primer objetivo de este trabajo nos propusimos la búsqueda de posibles enzimas biotecnológicamente relevantes. Se realizó, en colaboración con el laboratorio de la Dra. María José Hernaiz del grupo de biotransformaciones de la Universidad Complutense, un cribado de diferentes cepas de *Thermus*, que nos llevó al descubrimiento en varias de ellas de actividades enzimáticas que podrían ser de gran interés (Tabla 4.1). Una de las más atractivas resultó ser la cepa HB27, no sólo por las actividades detectadas, entre las que destacaron importantes actividades β -fucosidasa y β -glucosidasa, sino también porque su genoma había sido secuenciado (Henne y cols., 2004), lo que facilitaba la tarea de búsqueda de los genes codificantes de las enzimas responsables de esas actividades. Además esta cepa es fácilmente manipulable y se disponía de sistema de expresión homólogo de proteínas en el caso de que fallara el de *E. coli*.

Aunque el cribado de actividades se realizó creciendo la bacteria en medio rico sin utilizar ningún tipo de inductor, anteriormente ya habían sido publicados estudios de inducción de este tipo de actividades sobre la cepa T2 de *Thermus* sp. empleando galactosa, lactosa y melibiosa, para las actividades α y β -galactosidasas (Toyama y cols., 1990b; Ulrich y cols., 1972). También hay publicados reportes de organismos termófilos de otros géneros que pueden utilizar la celobiosa como fuente de carbono para crecer y en los que se ha utilizado para la inducción de diferentes actividades glicosidasas (Kengen y cols., 1993). En nuestros ensayos quedó patente que en *T. thermophilus* HB27 se produce una fuerte inducción de actividad glicolítica empleando celobiosa, en concreto de las actividades β -glucosidasa y β -fucosidasa que aumentaban hasta 6 veces por encima del nivel basal del cultivo crecido con glucosa. Nosotros, debido a dificultades experimentadas en el crecimiento de este organismo en medios mínimos, no hemos conseguido constatar si puede utilizar celobiosa como fuente de carbono para su crecimiento, como ocurre con otras cepas de *Thermus* (Kengen y cols., 1993). Es interesante destacar que en ensayos previos realizados



en el laboratorio se observó crecimiento del organismo en xilano cuando se expresaba una xilanasas de *Streptomyces* cuyo producto principal es la celobiosa (Caro, 2003). Sólo detectamos un leve incremento de la actividad α -glucosidasa al utilizar como sustratos sacarosa y maltosa, indicando que éstas podrían ser enzimas de actividad metabólica endógena.

5. 1 GLICOSIDASAS DE *Thermus thermophilus* HB27

En un principio la tarea de búsqueda se realizó atendiendo a la anotación que los autores de la secuenciación del genoma del organismo habían hecho para cada una de las enzimas catalogadas, y a diversos alineamientos realizados con proteínas homólogas, llegando a escoger 14 candidatas que nos parecían las más interesantes desde el punto de vista biotecnológico, 9 de ellas eran potenciales glicosidasas y 5 esterases o lipasas (Tablas 4.2 y 4.5).

Varias de las enzimas estudiadas no han podido ser expresadas en forma soluble y activa en ninguno de los sistemas empleados. En algunas como la TTC1828 no se ha observado expresión en absoluto ni en *E. coli*, ni en *Thermus*, otras, como las TTC1198, TTC1283 y TTP0221 han sido expresadas en la fracción particulada, de *E. coli*, y la TTC1198 también en la de *Thermus*, pero no hemos podido constatar actividad sobre los sustratos probados. En otros casos, como TTP0220 y TTP0222, aun habiéndose expresado en forma soluble y haber sido purificadas, no se ha detectado más que una actividad muy baja β -glucosidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa de TTP0222.

Al utilizar el sistema de *Thermus* para la expresión de las proteínas no deberíamos tener los problemas que podrían presentarse en un sistema mesófilo, como diferente utilización de codones, necesidad de cofactores o diferencias en la temperatura de biogénesis que pudieran alterar el plegamiento. Además los sistemas utilizados han probado ya su potencial en la expresión de diferentes proteínas activas (Cava y cols., 2008; Moreno y cols., 2005; Moreno y cols., 2003), y el plásmido pMKPnqo expresa la forma nativa de la enzima sin la etiqueta de polihistidinas, por lo que ni tan siquiera la presencia de ésta podría ser un impedimento. Por otro lado tampoco parecía haber ningún tipo de efectos tóxicos para la célula, por lo que nos inclinamos a pensar que quizá, al menos en este sistema, sí que se esté produciendo la expresión, aunque a niveles tan bajos que no permiten ser observados en un extracto total de proteínas teñidas con azul de Coomassie. Probablemente lo que esté ocurriendo es que los sustratos utilizados para tratar de valorar la actividad enzimática de las distintas proteínas no sean los adecuados, y que se deba ampliar la búsqueda de sustratos para dar con el correcto para estas enzimas.

En el caso de TTC1198 puede que el problema resida en haber clonado una forma truncada de la proteína. Al realizar el clonaje se tomó como buena para el diseño de los



oligonucleótidos la anotación del gen en las bases de datos, pero un análisis más detallado del inicio tomado para este gen indicó que éste podría estar 59 aminoácidos antes, según el alineamiento con AmyA de *Bacillus flavocaldarius*, con la que comparte un 99% de identidad y que ha sido expresada en *E. coli* en forma soluble y activa (Kashiwabara y cols., 1999). Sería por lo tanto, la ausencia de este fragmento en la zona amino terminal la que explicaría la ausencia de expresión soluble y, probablemente, la falta de actividad. En apoyo de esta conclusión está el hecho de que no obtuviéramos una expresión de la forma soluble activa de la proteína ni tan siquiera al expresarlas en *Thermus*.

TTC0107

Durante el desarrollo de este trabajo fue publicado un estudio de esta enzima expresada en *E. coli* donde se detallaban sus principales sustratos, siendo el más importante la trealosa, pero también pudiendo hidrolizar otros disacáridos como kojibiosa, sacarosa, nigerosa, turanosa, leucrosa, isomaltosa, palatinosa y maltosa (Alarico y cols., 2008), siendo su probable papel fisiológico la asimilación de éstos azúcares (sobre todo la trealosa) como fuente de carbono y energía para la bacteria.

En nuestro trabajo fue esta la enzima que más actividad específica presentó sobre PNPG (8753 U/mg), cuando fue expresada en *E. coli*. En cuanto a sus propiedades enzimáticas, tuvimos un máximo de actividad de la enzima a los 80° C, que se mantenía, tras una caída inicial, en casi un 50% durante más de 20 horas. En el trabajo de Alarico y colaboradores se describe una actividad máxima a 90°C, con un descenso de actividad a esa temperatura de un 35% en las primeras 2 horas, manteniéndose después durante las siguientes 48 horas, mientras que a 100°C la enzima pierde su actividad en la primera media hora. Las diferencias entre las distintas Temperatura óptima y estabilidades observadas podrían estribar en la cantidad de enzima utilizada que era 45 veces superior a la empleada por nosotros. Alternativamente la presencia de la etiqueta de polihistidinas o inclusive los diferentes protocolos de purificación de la enzima que podrían dar lugar a diferentes grados de oligomerización o de plegamientos incompletos de la enzima, que explicaran esas diferencias.

Los intentos de producción de esta enzima de *T. thermophilus* tanto a partir del pMKE2 como del pMKPnqo arrojaron resultados positivos, observándose una expresión, sobre todo en el caso del último, de la enzima en forma soluble y activa en una proporción mucho mayor que en el caso de *E. coli* en el que la mayor parte de la expresión se correspondía con agregados insolubles (Figs. 4.29 y 4.30), confirmando el sistema de *Thermus* como alternativa para la expresión de termozimas.



TTP0072

La expresión de esta proteína en *E. coli* mostró también que la mayor parte de la proteína producida en este organismo acababa como agregados insolubles, cosa que no ocurría al expresarla en *Thermus*, en las que la mayor parte era proteína citosólica soluble. Se reveló activa con PNPG al expresarla en *E. coli*, con temperatura óptima entre 80-85 °C y bastante estable, con una caída en los primeros minutos del ensayo, cosa atribuible como en el caso anterior a la probable existencia de más de una población de enzimas, con distintas termoestabilidades o grados de oligomerización. En cuanto a su pH óptimo, éste fue de 6, aunque mantiene el 60 % de su actividad entre 4,5 y 7,5. Los estudios de termoestabilidad revelaron, como en el caso anterior

La mutación en esta glicosidasa no parece variar el nivel global de actividad α -glicosidasa medido en la bacteria, por lo que parece que no tiene una gran expresión *in vivo*, al menos en las condiciones probadas.

TTP0042

La enzima TTP0042 presenta fundamentalmente actividades: β -glucosidasa, β -galactosidasa, y β -fucosidasa, con una fuerte inhibición en presencia de tampón Tris-HCl. Esta enzima ya había sido caracterizada con anterioridad (Fourage y cols., 2000; Dion y cols., 1999) mostrando estas mismas actividades, sin embargo en su caso la actividad más baja de las tres era la β -galactosidasa y en nuestro caso ha sido la β -glucosidasa.

La expresión de esta proteína en *E. coli* dio como resultado una gran proporción de proteína mal plegada que aparecía como agregados insolubles, hecho este que no se producía al expresarla en *Thermus* (como se podía apreciar también en la expresión de la fusión con sGFP) o *S. lividans*, donde el ratio de expresión de proteína expresada soluble en el citoplasma era mucho mejor, lo que implica un rendimiento de proteína activa por mililitro de cultivo mayor que en *coli*. Los datos obtenidos demuestran la capacidad de *S. lividans* para expresar enzimas procedentes de *T. thermophilus*, ya sean enzimas secretadas como enzimas citoplásmicas y valida este sistema para futuras expresiones de enzimas de termófilos, siendo un primer ejercicio para probar alternativas para producir estas proteínas en un sistema GRAS (Generally Recognized as Safe-Generalmente aceptado como seguro). La actividad β -glicosidasa en extractos extracelulares de *S. lividans* (fig. 4.30) podría atribuirse a la posible lisis celular que estaría produciéndose durante el crecimiento de la bacteria, lo que daría lugar al vertido al medio de todos los componentes celulares, incluyendo la glicosidasa que se estaba expresando.

La enzima fue anteriormente publicada con el nombre de Tt β -gly (Dion y cols., 1999) que determinaron su temperatura óptima en 88°C, algo superior a los 80°C observados por nosotros, aunque mantiene casi un 100% de actividad entre los 75 y los 85°C. El pH óptimo



calculado fue de 6,5, manteniendo una actividad de más del 50% de su máximo entre pH 4,7 y 8 y quedando completamente inhibida a pH4, similar a lo descrito por Dion y colaboradores. En los experimentos de inactivación térmica, se vio que, conforme a lo publicado, la enzima mantenía el 100% de actividad a 70 y 80°C tras 2 horas, pero que 10 minutos a 90 servían para acabar con el 50% de su actividad. Estos experimentos permitieron además observar un efecto curioso, una dependencia de la estabilidad con respecto a la concentración de la enzima. Cuando se trabajaba a bajas concentraciones, ésta parecía tener una estabilidad mucho menor a altas temperaturas (tesis doctoral Pérez-Sánchez, M. 2009) que cuando se realizaban los ensayos a una mayor concentración de proteína. Este hecho podría explicarse por un fenómeno de agregación, aunque se había determinando que esta enzima era monomérica (Dion y cols., 1999). Las proteínas que forman oligómeros, se deben disociar antes de que la desnaturalización irreversible del monómero ocurra, lo que se encuentra fuertemente inhibido por asociaciones intermoleculares (Robb y Maeder, 1998; Backmann y Schafer, 2001), por lo que, al aumentar la cantidad de proteína en el medio de reacción se propiciarían estas asociaciones proteína-proteína que las protegerían de la desnaturalización aumentando su estabilidad térmica.

Un efecto colateral observado al purificar la proteína de la columna de níquel-agarosa mediante EDTA, utilizado al realizar las primeras purificaciones, fue constatar que esta enzima no se veía activada por cationes divalentes como ocurre con algunas glicosidasas, (Bronnenmeier y Staudenbauer, 1988). La purificación fue repetida en sucesivas ocasiones eluyendo con Imidazol sin observar efectos notables en la actividad de la enzima que no parece verse afectada por la presencia o ausencia de estos cationes.

El mutante realizado en esta enzima, de entre todos los realizados en las glicosidasas, fue el único que perdió la capacidad de inducción, tanto de la actividad β -glucosidasa como la β -fucosidasa cuando se utilizaba la celobiosa, (Fig. 4.36), lo que cuadra con los datos de actividad obtenidos sobre la enzima purificada que mostraban que poseía ambas actividades (Tabla 4.4). Una vez señalada esta enzima como la responsable de la inducción de ambas actividades en respuesta a celobiosa, decidimos estudiar en más detalle su entorno génico. La enzima está situada en un sistema similar al operón *Lac* en *E. coli*, aunque no se ha detectado una reseñable similitud de secuencia entre las proteínas de ambas, salvo en el caso del regulador, y en éste sobre todo en la zona amino terminal, donde se encontraría la región hélice-giro-hélice de unión al DNA. En los mutantes de inserción realizados se observó que, además de la afectación producida por la mutación en la β -glucosidasa que por supuesto conllevaba la pérdida de actividad, el resto también presentaba un fenotipo de carencia de inducción de ambas actividades por celobiosa (Fig. 4.39). Esto podría significar que para que se produzca la inducción sería necesaria la participación de todas las proteínas del agrupamiento, ya que mutando cualquiera de ellas se pierde completamente la actividad. Sin embargo, la metodología utilizada en la construcción de los mutantes podría estar condicionando los resultados ya que, al tratarse de mutantes



5. DISCUSIÓN

polares de inserción, al realizar la mutación del primer gen, podríamos estar comprometiendo la transcripción del resto de proteínas que se encontraran corriente abajo, explicando la falta de inducción en todos los mutantes. Esto implicaría, probablemente, que todos los genes se estuvieran transcribiendo mayoritariamente desde el promotor PIII (Fig. 4.37), ya que un promotor interno potente debería seguir permitiendo la inducción inclusive al interrumpir el primer gen, hecho que no se observa en los ensayos de inducción con mutantes (Fig. 4.41). Alternativamente, y en el caso de que existieran promotores internos significativos, estos datos habría que interpretarlos en base a la pérdida de la funcionalidad de las correspondientes enzimas, como por ejemplo falta de permeabilidad a la celobiosa.

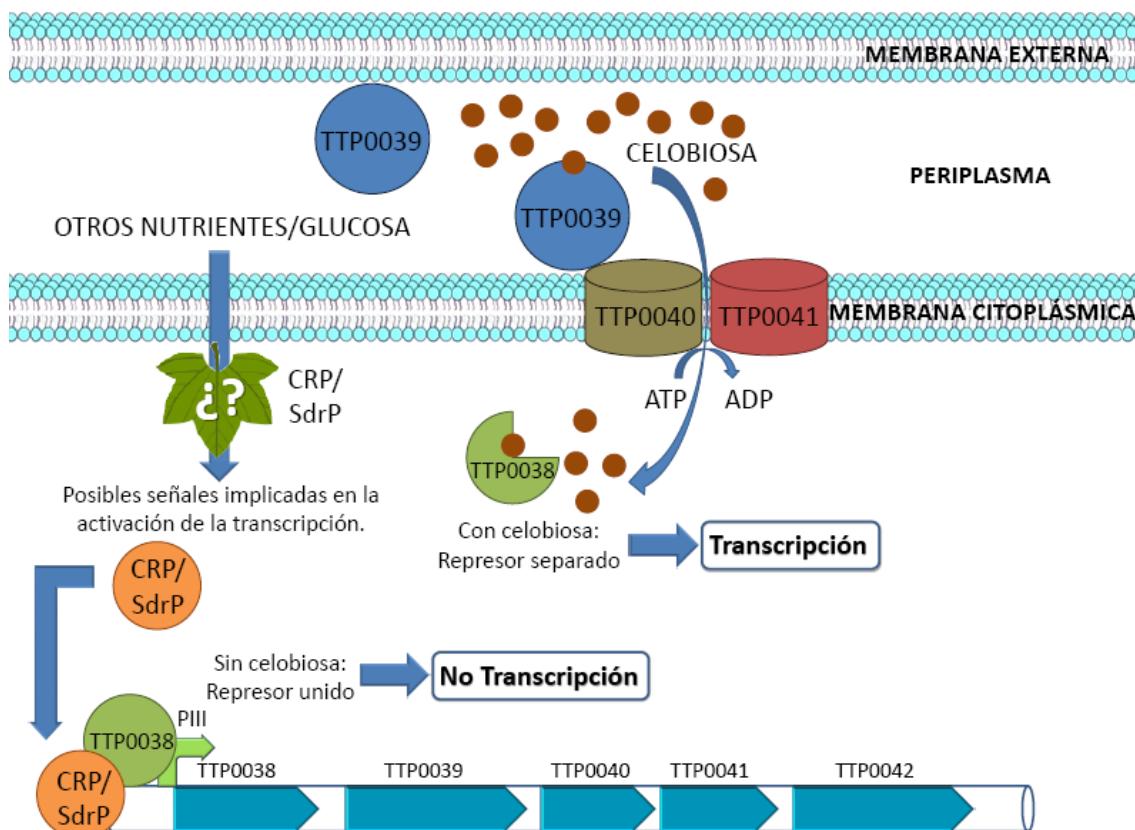


Figura 5. 1 Representación del operón de la β-galactosidasa y su posible regulación.

Los ensayos de promotores indicaron que el principal es el PIII, llegando a una inducción que, aproximadamente, doblaba la conseguida por los otros dos promotores, aunque sin llegar en ningún caso a la observada con la cepa silvestre (Fig. 4.41). Existe la posibilidad de que la actividad observada con los promotores PI y PII, que parece inducirse en menor medida también por celobiosa, sea debida a la acción del promotor *P_{lac}* que se encuentra justo delante de la región de policlonaaje del plásmido utilizado, el pMH184. Este promotor podría encontrarse reprimido por la unión de la enzima TTP0038, que al cambiar su conformación en presencia de celobiosa se desprendería del mismo permitiendo la transcripción, lo que explicaría el efecto observado; similar al que sucedería al tratar de expresar la proteína en *E. coli* desde el sistema pET. Los primeros intentos de expresión fallidos, conjuntamente con la expresión en presencia de celobiosa, podrían explicarse por la



unión de ésta proteína al *P_{lac}* y su desprendimiento con celobiosa que permitiría la transcripción. Cabe destacar también que dicha expresión se consiguió a 37°C y no a 21 (Fig. 4.43). Esta ausencia de expresión, incluso cuando añadíamos celobiosa en el medio, podría explicarse teniendo en cuenta la gran estabilidad de las proteínas termófilas, una enorme rigidez que podría ocasionar que, a esa temperatura tan baja, la celobiosa no pudiera inducir el cambio conformacional necesario para que la enzima se soltara del DNA.

En los ensayos de retardo en gel pudimos observar cómo la proteína era capaz de unirse efectivamente a la región del DNA que nombramos como PIII (Fig. 4.45). Este retardo se hacía más patente al aumentar la cantidad de proteína y disminuía al añadir celobiosa, siendo más apreciable al utilizar el promotor más largo, en el que además se podría observar la aparición de una segunda banda al añadir el azúcar, señal del posible cambio en la conformación de la proteína. Esto parecía corroborar nuestra hipótesis de que esta proteína era capaz de unirse a este promotor y que la celobiosa provocaba un cambio conformacional en la misma que hacía que ésta se soltara, permitiendo la transcripción desde el promotor.

Al sobreexpresar el posible regulador TTP0038 en la cepa silvestre de HB27, observamos que ésta aún tenía la capacidad de inducción, aunque en un nivel mucho menor que en el caso de la cepa silvestre sin transformar, indicando que, quizá, la expresión de esta proteína desde el potente promotor *PsipA* era tal que la celobiosa en el medio no era suficiente para impedir que parte de éste se uniera al promotor, no permitiendo una total activación del sistema (Fig. 4.42). Al expresarlo en el mutante 38:KAT con la TTP0042 controlada por el promotor PIII vimos que parecía perderse la capacidad de regulación, encontrándose en los mismos niveles los cultivos con celobiosa y los cultivos con glucosa.

Durante la realización de estos experimentos nos encontramos con notables dificultades para controlar el sistema de expresión desde los vectores, con gran variabilidad en los resultados. Por un lado es probable que la bacteria prefiera otro tipo de azúcares presentes en el medio, aun en el medio diluido que hemos utilizado, antes que la celobiosa, por lo que el sistema permanecería inhibido hasta mientras estos se agotan del medio. Por otro lado, la celobiosa, probablemente se vaya hidrolizando, inclusive en un mutante de la TTP0042, a causa de la acción de otras glicosidasas de *T. thermophilus*, lo contribuirá a que la señal se vaya apagando en el tiempo. Todo esto contribuirá a que la recogida de las muestras en el momento oportuno sea fundamental a la hora de valorar este sistema, y a la existencia de grandes diferencias en la inducción dependientes del crecimiento. Además, no podemos descartar que, como en el sistema Lac de *E. coli*, haya otras proteínas implicadas que respondan a la presencia de otros azúcares u otras señales.

En este sentido cabe destacar que se han encontrado en el genoma de *T. thermophilus* HB8 4 proteínas de la familia de reguladores CRP/FNR, dos de las cuales, que cuentan con homólogos en la cepa HB27, han sido estudiadas en detalle. La primera es una proteína CRP, cuya homóloga en HB27 es la TTC1072, y que responde a niveles de cAMP



(AMP cíclico), regulando la expresión de varios genes, algunos de función desconocida y otros implicados en reparación del DNA o en un sistema procariota de defensa (proteínas asociadas a CRISPR), en regulación transcripcional, etc. (Shinkai y cols., 2007). La otra proteína estudiada se denominó SdrP (*stationary phase-dependent regulatory protein*), por ser independiente de cAMP pero dependiente de fase de crecimiento, aumentando su transcripción en fase estacionaria. Esta proteína tiene una homóloga en HB27, la TTC0994, y regula genes implicados en el abastecimiento de nutrientes y energía, el control del nivel redox de la bacteria y la poliadenilación del DNA (Agari y cols., 2008). Nuestra hipótesis es que el sistema podría estar regulado de la siguiente manera: en un medio rico, en presencia de glucosa u otros nutrientes capaces de ejercer represión catabólica, la proteína TTP0038 estaría unida al promotor PIII, reprimiendo la expresión del sistema hasta un nivel basal. Al añadir celobiosa al medio será detectada por la proteína TTP0039 y conducida al interior celular por el canal formado por TTP0040 y TTP0041, con gasto de ATP, uniéndose al regulador, que se separaría del DNA vía un cambio conformacional. Para una máxima expresión del promotor parece que se necesitan señales alternativas, de ausencia de otros nutrientes, cosa que podría ocurrir vía CRP o, más probablemente, SdrP. Alguna de éstas u otro elemento intermediario se uniría al promotor y reclutaría la RNA polimerasa. El sistema sería autoregurable ya que él mismo sintetiza su propio inhibidor, lo que haría que, al disminuir la cantidad de celobiosa en el medio, hubiera suficiente regulador libre como para volver a unirse al promotor y detener la expresión.

5. 2 POTENCIALES ESTERASAS Y LIPASAS

Las enzimas que se expresaron solubles se purificaron y se intentaron realizar pruebas de actividad, pero no conseguimos encontrar unas condiciones en las que no precipitaran, probablemente debido a la exposición de su bolsillo hidrofóbico, por lo que estas pruebas se acabaron realizando con extractos totales de *E. coli*. Un problema adicional fue que la labilidad del sustrato utilizado dificultó en gran medida la obtención de resultados viables, sólo consiguiendo observar algo de actividad incrementada sobre los controles en el caso de TTC1341, aunque fue imposible realizar la caracterización de la misma.

Durante la realización de este trabajo se publicó la existencia de dos actividades lipolíticas en *T. thermophilus* HB27 utilizando p-Nitrofenol laurato, una de las cuales, la de menor tamaño con 34 kDa, es una proteína extracelular que se corresponde con la TTC0904 que nosotros hemos expresado (Fuciños, 2007; Fuciños y cols., 2005 a y b) y que ha sido expresada también recientemente en *Saccharomyces cerevisiae* (López-López y cols., 2010). Además, se ha publicado también la existencia de una polihidroxitirato depolimerasa en *T. thermophilus* HB8 que sería homóloga a la TTC1787 y que, a diferencia de nuestros resultados, si que parece pudieron medir actividad hidrolítica sobre PNPB a esas temperaturas (Papaneophytou y cols., 2008).



5. 3 PENICILÍN ACILASA

La sobreexpresión en *E. coli* de las zonas amino y carboxilo terminal de la PAC de *T. thermophilus*, aunque fuera de manera insoluble, nos permitió la obtención de anticuerpos policlonales de conejo. Con éstos demostramos, por primera vez en este organismo, que la PAC de *Thermus* era procesada en dos subunidades de tamaños similares a los esperados para cada una de las subunidades de la proteína predichas por alineamiento de secuencia.

Localización celular de la penicilín acilasa

Todos los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, muestran que la PAC de *Thermus*, a diferencia de la de otros organismos, está anclada en la membrana. Las imágenes obtenidas de microscopía muestran la fluorescencia, cuando se fusiona la PAC completa, en pequeñas puntos concretos en la membrana bacteriana, sin que haya difusión por el periplasma, lo que indicaría que la enzima no se suelta de estos puntos, quedándose anclada en la membrana. Además, pudimos comprobar cómo el péptido señal de ésta, por sí solo, podía dirigir a la sGFP a la membrana, observándose imágenes parecidas a las obtenidas con la enzima completa. Gracias a estos resultados podríamos aventurar que el sistema de transporte que utiliza esta proteína es vía Tat, ya que la proteína sGFP sólo puede madurar en el citoplasma y este sistema es el único que permite la translocación de proteínas plegadas. Si la PAC utilizara el sistema Sec de transporte lo más probable es que no pudiéramos detectar fluorescencia (Thomas y cols., 2001). Al quitar a la PAC el péptido señal podíamos observar la fluorescencia dentro de la célula aunque sin llegar a distribuirse homogéneamente por el periplasma, lo que implicaba que la proteína podía ser expresada de forma soluble, aunque no llegaba a inundar el citoplasma completo de la célula. Estos datos concordaban con los obtenidos con los que obtuvimos del fraccionamiento celular de los mutantes Δ SlpA.

Una vez determinado que, en el caso de *T. thermophilus*, esta enzima parecía encontrarse anclada en la membrana, nos preguntamos si podríamos de algún modo resolver en cuál de las 2 membranas podría encontrarse. El Tritón X-100 y con Sarcosil son ampliamente utilizados para solubilizar proteínas de membrana interna de Gram-negativas (Hobb y cols., 2009; Thein y cols., 2010). En nuestro caso, al tratar un extracto de membranas de *Thermus* con estos detergentes, conseguimos solubilizar la PAC y el control de membrana interna utilizado, NQO6, dejando insoluble el de membrana externa, SlpA (Fig. 4.69), lo que demuestra que la PAC, se encuentra anclada a la membrana interna de la bacteria.

Aún faltaba por determinar la orientación de la proteína en la membrana y para ello decidimos realizar un intento de proteólisis en bacterias tratadas con EDTA. El EDTA produce un aumento en la permeabilidad pasiva de la membrana externa en muchas Gram-negativas, sin producir una lisis celular, (Leive, 1968) al eliminar más del 40% de los



5. DISCUSIÓN

lipopolisacáridos así como de proteínas como OmpA, OmpaF/C y lipoproteínas, proteínas periplásmicas y fosfatidiletanolamina, en parches discretos dentro de ésta y de una manera específica de cepa (Marvin Y cols., 1989), lo que puede permitir la entrada, de manera pasiva, de pequeñas proteínas como, en nuestro caso la tripsina. Para realizar estos experimentos volvimos a utilizar el mutante NAR1 Δ SlpA, ya que la Capa S que rodea *Thermus* podría impedir la entrada de esta proteína. Estos ensayos mostraron que la PAC era accesible a la tripsina tras el tratamiento con EDTA en un mayor grado que el control intracelular utilizado, mostrándonos que probablemente la proteína se encontraba anclada en la membrana interna hacia el espacio periplásmico, expuesta a la acción de la proteasa (Fig. 6.1).

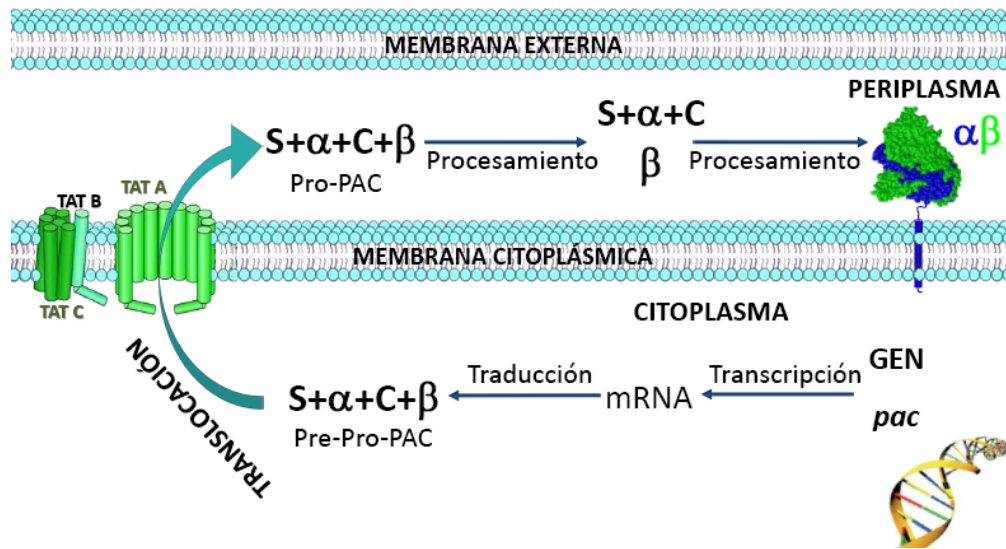


Figura 5. 2 Hipótesis de la posible translocación y procesamiento de la penicilina acilasa de *T. thermophilus* HB27.
S: Péptido señal, α : Subunidad α de la PAC, C: Péptido espaciador, β : Subunidad β de la PAC.

Como la tripsina sólo parecía capaz de cortar un pequeño trozo de la PAC pensamos que quizá éste podría ser de la zona amino terminal se correspondiéndose con el péptido señal no procesado, por lo que el corte podría liberar la encima dejándola soluble. Repetimos el experimento de tripsinización y tras éste realizamos una separación de las fracciones celulares. La figura 4.71 muestra que, si bien el corte se ha producido, la escisión de éste péptido de la subunidad α no solubiliza la proteína, por lo que este corte ha de producirse en la zona carboxilo terminal de la proteína. Ensayos realizados en el laboratorio sobre la proteína sin péptido señal producida en *E. coli*, revelaron que la tripsina elimina un segmento que probablemente defina el espaciador (Fig. 5.3).



LKLPLKR**EEAPSALLRMAPP**RFMEAS**S**NNWVVAGSR

Figura 5. 3 Detalle de la secuencia del posible espaciador de PAC. La flecha señala el lugar de corte de la tripsina que definiría el comienzo del péptido espaciador (Rojo). La serina catalítica que marca el comienzo de la subunidad β (Azul) está en un recuadro.

Como el péptido señal de la PAC de *Thermus* no era procesado, dejando la proteína anclada en la membrana decidimos crear una proteína quimérica con el péptido señal de la de *E. coli* (Fig. 4.72). Tras expresar ésta en el mutante Δ PAC separamos las distintas fracciones de membrana y demostrar que podíamos expresar la proteína soluble en *Thermus* utilizando este péptido señal, aunque parte de la proteína no parecía estar correctamente plegada (Fig. 4.73). Lo que aún no hemos podido demostrar es si este péptido señal es capaz de dirigir la proteína hacia el periplasma procesándose allí, o ésta queda soluble en el citoplasma.

Generación de mutantes de delección amino terminal y complementación al mutante Δ PAC

Una de las zonas más importantes de para el autoprosesamiento descritas en la PAC de *E. coli* es la zona carboxilo terminal de la subunidad β (Choi y cols., 1992), por ello decidimos expresar formas truncadas de la proteína con delecciones de tamaño variable, en el mutante de delección Δ PAC que habíamos construido. El análisis de los experimentos arrojó resultados sorprendentes ya que la proteína parecía seguir procesándose inclusive sin 100 aminoácidos en su zona carboxilo terminal. Es más, los anticuerpos anti β siempre reconocían una banda de igual tamaño que la subunidad β , además de otra que iba disminuyendo de tamaño correspondientemente a las mutaciones expresadas. Estos extraños datos no nos permiten decir con seguridad qué estará ocurriendo en la subunidad β de la PAC, aunque sugieren que el procesamiento podría implicar proteasas externas, en contraposición con el corte autocatalítico de *coli*.

Actividad de la penicilín acilasa de *Thermus thermophilus*

Los ensayos de actividad utilizando la penicilín acilasa, tanto en extractos expresando la proteína silvestre, como la forma sin péptido señal o los mutantes realizados, arrojaron resultados negativos en los ensayos con el sustrato colorimétrico NIPAB. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que esta enzima, expresada en *E. coli*, tenía una actividad, si bien escasa, sobre la penicilina G, liberando fenilacético. Estos resultados demuestran que, como era de esperar, no sólo esta penicilina G no es el sustrato natural de esta enzima, sino que se aleja bastante de lo que debe ser su actividad en la bacteria, ya que, ni tan siquiera el doble mutante realizado para tratar de que esa penicilina



5. DISCUSIÓN

G se acople mejor al centro activo, dieron resultados positivos, lo que implica que el cambio necesario para que acepte este sustrato debe ser mucho más profundo.

La función de esta proteína nos resulta aún desconocida. Las significativas cantidades de ácido fenilacético en el peptidoglicano de *Thermus* y la alta similitud estructural entre el muropéptido pentapeptídico con ácido fenilacético unido a la cadena lateral y una hipotética doble penicilina apuntaban a que quizá esta proteína estuviera implicada en la asimilación de estos residuos al peptidoglicano, pero la constatación de que la mutación en este gen no afectaba a la proporción de ácido fenilacético en el peptidoglicano hizo que desestimara esta hipótesis (Moreno, 2004). Otra opción sería que estuviera implicado, como parece ocurrir en *E. coli*, en la asimilación de compuestos fenilacetilados, pero a diferencia de este microorganismo, en *Thermus* el gen *pac* parece encontrarse aislado, transcribiéndose en un mRNA monocistrónico, sin los genes acompañantes que se encuentran en *coli*. Tampoco la temperatura parece ser un mecanismo de regulación de esta proteína (Datos no mostrados). Una de las hipótesis más plausibles sobre la actividad que tendría esta enzima es que podría estar implicada en mecanismos de Quórum-quenching, por su homología con homoserín lactonas. En trabajos futuros se planea modificar el centro activo de la enzima de una forma más extensa, seleccionando formas activas sobre la penicilina G, expresadas en *E. coli*. También se estudiará su potencial actividad sobre moléculas señalizadores en sistemas sensores de Quórum.

CONCLUSIONES



Del trabajo realizado en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.** Distintas cepas de *Thermus thermophilus* constituyen una fuente relevante de actividades alfa y beta glicolíticas termoestables potencialmente interesantes desde el punto de vista biotecnológico.
- 2.** La cepa *T. thermophilus* HB27 expresa notables niveles de estas actividades, siendo la actividad betaglicosidasa inducible por celobiosa.
- 3.** Se han clonado y expresado en *E. coli* 9 genes anotados como codificantes de posibles glicosidasas y 5 posibles esterases. Dos alfa-glicosidasas y una beta-glicosidasa han sido expresadas en forma activa en alguno de estos sistemas.
- 4.** La ausencia de actividad detectable en los otros genes clonados de posibles glicosidasa muestra la existencia de notables diferencias entre las anotaciones existentes en las bases de datos del genoma de *Thermus thermophilus* y la secuencia y actividad real de estas enzimas.
- 5.** Utilizando *T. thermophilus* y *S. lividans*, se pueden conseguir expresiones de proteínas de organismos termófilos con un rendimiento que puede llegar a superar en eficiencia al obtenido con *E. coli*.
- 6.** La actividad mayoritaria beta-glicosidasa se debe a la enzima anotada como TTC0042, que se expresa desde un operón de degradación de celobiosa inducible por la misma y sometido a represión catabólica por un mecanismo desconocido.
- 7.** La enzima TTP0038 es el regulador transcripcional sensible a celobiosa de dicho operón uniéndose, al menos, al promotor principal del mismo en ausencia de celobiosa.
- 8.** El homólogo de *T. thermophilus* de la penicilina G acilasa se procesa en dos subunidades de de 22 y 60 kDa aproximadamente, localizándose en el periplasma pero anclada a la membrana citoplásmica por un péptido señal que aparentemente no se procesa.
- 9.** Se ha obtenido un modelo de la PAC de *T. thermophilus* sobre el que ha sido posible identificar los residuos del centro activo importantes en la enzima de *E. coli* para aceptar penicilina G. Dos de estos residuos han sido introducidos sin obtener incremento en la actividad enzimática



6. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



- Adams, M. W., (1993). Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100° C. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**: 627-658.
- Adham, S. A., Honrubia, P., Díaz, M., Fernández-Ábalos, J. M., Santamaría, R. I. and Gil, J. A. (2001). Expression of the genes coding for the xylanase Xys1 and the cellulase Cel1 from the straw-decomposing *Streptomyces halstedii* JM8 cloned into the amino-acid producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. *Arch. Microbiol.*, **177**(1): 91-97.
- Agari, Y., Kashihara, A., Yokoyama, S., Kuramitsu, S. and Shinkai, A. (2008). Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.*, **70**(1): 60-75.
- Aires-Barros, M. R., Taipa, M. A. and Cabral, J. M. S. (1994). Isolation and purification of lipases, en Woolley, P. and Petersen, S. B. (eds.). Lipases: their structure, biochemistry and application, Cambridge University Press, Cambridge, 243-270.
- Alarico, S., da Costa, M. S. and Empadinhas, N. (2008). Molecular and physiological role of the trehalose-hydrolyzing alpha-glucosidase from *Thermus thermophilus* HB27. *J. Bacteriol.*, **190**(7): 2298-2305.
- Alkema, W. B., Prins, A. K., de Vries, E., Janssen, D. B. (2002a). Role of α Arg¹⁴⁵ and β Arg²⁶³ in the active site of penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **365**(Pt 1): 303-309.
- Alkema, W. B., Dijkhuis, A. J., De Vries, E. and Janssen, D. B. (2002b). The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity of penicillin acylase. *Eur. J. Biochem.*, **269**(8): 2093-100.
- Alkema, W. B., Henggens, C. M., Kroezinga, E. H., de Vries, E., Floris, R., van der Laan, J. M., Dijkstra, B. W. and Janssen, D. B. (2000). Characterization of the beta-lactam binding site of penicillin acylase of *Escherichia coli* by structural and site-directed mutagenesis studies. *Protein Eng.*, **13**(12): 857-863.
- Álvaro, G., Lafuente, R. F., Rosell, C. M., Blanco, R. M., Garcia-Lopez, J. L. and Guisan, J. M., (1992). Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. New choice as industrial enzyme. *Biotechnol. Lett.*, **14**(4): 285-290.
- Argüelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.*, **174**(4): 217-224.
- Arraztio García, Ana M. (1997). Estudio de la termoestabilización mediante la construcción de proteínas híbridas y técnicas de evolución molecular. Tesis doctoral presentada en el Departamento de biología molecular. Facultad de ciencias. Universidad autónoma de Madrid.
- Arroyo, M., de la Mata, I., Acebal, C., Castellón, M. P. (2003). Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **60**(5): 507-514.
- Atomi, H., Matsumi, R., Imanaka, T. (2004). Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *J. Bacteriol.*, **186**(14): 4829-4833.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.
- Averhoff B. (2009). Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**(3): 611-626.
- Backmann, J. and Schafer, G. (2001). Thermodynamic analysis of hyperthermostable oligomeric proteins. *Methods Enzymol.*, **334**: 328-342.
- Balkwill, D. L., Kieft, T. L., Tsukuda, T., Kostandarithes, H. M., Onstott, T. C., Macnaughton, S., Bownas, J. and Fredrickson, J. K. (2004). Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles*, **8**(1): 37-44.
- Basso, A., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L. and Linda, P. (2001). Selectivity of penicillin G acylase towards phenylacetic acid derivatives in amide bond synthesis in toluene. *J. Mol. Catal. B.*, **16**(2): 73-80.
- Bauer, K., Kaufmann, W., Offe, H. A. (1960). Enzymatische synthese von α -phenoxypropionyl-6-aminopenicillansäure. *Naturwiss.*, **47**: 469.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Bech, A. M. (1992). Enzymes for the acceleration of cheese-ripening, en IDF Bull. 269 -Fermentation-produced enzymes and accelerated ripening in cheesemaking, Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium, 24-28.
- Beeby, M., O'Connor, B. D., Ryttersgaard, C., Boutz, D. R., Perry, L. J. and Yeates, T. O. (2005). The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. *PLoS Biol.* **3**(9): e309.
- Beisson F, Arondel V, Verger R. (2000). Assaying Arabidopsis lipase activity. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**(6): 773-775.
- Béki, E., Nagy, I., Vanderleyden, J., Jager, S., Kiss, L., Fulop, L., Hornok, L. and Kukolya, J. (2003). Cloning and heterologous expression of a beta-D-mannosidase (EC 3.2.1.25)-encoding gene from *Thermobifida fusca* TM51. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(4): 1944-1952.
- Benaroudj, N., Lee, D. H., Goldberg, A. L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **276**(26): 24261-24267.
- Benkovic, S. J. and Hammes-Schiffer, S. (2003). A perspective on enzyme catalysis. *Science*, **301**(5637): 1196-1202.
- Berger, R., Hoffmann, M. and Keller, U. (1998). Molecular analysis of a gene encoding a cell-bound esterase from *Streptomyces chrysomallus*. *J. Bacteriol.*, **180**(23): 6396-6399.
- Bergeron, L. M., Gomez, L., Whitehead, T. A. and Clark, D. S. (2009). Self-renaturing enzymes: design of an enzyme-chaperone chimera as a new approach to enzyme stabilization. *Biotechnol. Bioeng.*, **102**(5): 1316-1322.
- Bibb, M. J. Ward, J. M. and Hopwood D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, **274**(5669): 398-400.
- Binnie, C., Cossar, J. D. and Stewart, D. I. (1997). Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends. Biotechnol.*, **15**(8): 315-320.
- Blas-Galindo, E. (2007b). Desarrollo de nuevas herramientas y protocolos de selección de proteínas termoestables en *Thermus thermophilus*. Tesis doctoral U. A. M.
- Blas-Galindo, E., Cava, F., Lopez-Vinas, E., Mendieta, J. and Berenguer, J. (2007a). Use of a dominant *rpsL* allele conferring streptomycin dependence for positive and negative selection in *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(16): 5138-5145.
- Bokhove, M., Nadal Jimenez, P., Quax, W. J. and Dijkstra, B. W. (2010). The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**(2): 686-691.
- Borges, N., Ramos, A., Raven, N. D., Sharp, R. J., Santos, H. (2002). Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*, **6**(3): 209-216.
- Boston, P. (1999). The search for extremophiles on earth and beyond. what is extreme here may be just business-as-usual elsewhere. <http://www.astrobiology.com/adastra/extremophiles.html>.
- Bradoo, S., Saxena, R. K. and Gupta, R. (1999). Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**(1): 87-91.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G. (1990). A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, **343**(6260): 767-770.
- Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R. & Murzin, A. G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, **378**(6555): 416-419.
- Brochier-Armanet, C. and Forterre, P. (2007). Widespread distribution of archaeal reverse gyrase in thermophilic bacteria suggests a complex history of vertical inheritance and lateral gene transfers. *Archaea*, **2**(2): 83-93.
- Brock, T. D. (1985). Life at high temperatures. *Science*, **230**(4722): 132-138.



- Brock, T. D. and Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. N., a non sporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, **98**(1): 289-297.
- Brock, T. D. (1978a). Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. *Springer*.
- Brock, T. D. (1978b). The genus *Thermus*. In Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Starr, M.P. (ed). *New York Heidelberg Berlin: Springer-Verlag*, pp. 72-91.
- Bronnenmeier, K. and Staudenbauer, W. L. (1988) Purification and properties of an extracellular β -glucosidase from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**(4-5): 380-386.
- Brouns, S. J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A. P., de Vos, W. M. and van der Oost, J. (2005). Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *J. Biol. Chem.*, **280**(12): 11422-11431.
- Brüggemann, H. and Chen, C. (2006). Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. *J. Biotechnol.*, **124**(4): 654-661.
- Brune, A. K. and Gotz, F. (1992). Degradation of lipids by bacterial lipases, en G, W. (ed.). Microbial degradation of natural products, VCH, Weinheim, 243-266.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E. M. and Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90**(2): 155-186.
- Bruggink, A., Roos, E. C. and de Vroom, E. (1998). Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Org. Proc. Res. Dev.*, **2**(2): 128-133.
- Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Brüning, H.J., Maywald, F., Collins, J. and Mayer, H. (1985). Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: a periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.*, **3**(1): 36-44.
- Cambillau C. and Claverie J. M. (2000). Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J. Biol. Chem.*, **275**(42): 32383-32386.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic. Acids. Res.*, **37**: 233-238.
- Caro, E. (2003). Expresión y selección de proteínas de bacterias mesofilas en *thermus thermophilus*. Tesis doctoral U. A. M.
- Castán, P., Zafra, O., Moreno, R., de Pedro, M.A., Vallés, C., Cava, F., Caro, E., Schwarz, H., Berenguer, J. (2002). The periplasmic space in *Thermus thermophilus*: evidence from a regulation-defective S-layer mutant overexpressing an alkaline phosphatase. *Extremophiles.*, **6**(3): 225-232.
- Castán, P. (2004). Desarrollo de cepas de interés biotecnológico mediante la manipulación de los genes *recA* y *slpA* de *Thermus thermophilus*. Tesis doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid
- Cava, F., Hidalgo, A. and Berenguer, J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles.*, **13**(2): 213-231.
- Cava, F., de Pedro, M. A., Blas-Galindo, E., Waldo, G. S., Westblade, L. F. and Berenguer, J. (2008). 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., Laptenko, O., Borukhov, S., Chahlaifi, Z., Blas-Galindo, E., Gomez-Puertas, P. and Berenguer, J. (2007). Control of the respiratory metabolism of *Thermus thermophilus* by the nitrate respiration conjugative element NCE. *Mol. Microbiol.*, **64**(3): 630-646.
- Chahinian, H. and Sarda, L. (2009). Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein Pept. Lett.*, **16**(10):1149-1161.
- Chakravarty S. and Varadarajan R. (2002). Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry.* **41**(25): 8152-8161.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Chandel, A. K., Venkateswar R. L., Narasu, M. L. and Sinfh, O. M. (2008). The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.*, **42**(3): 199-207.
- Chang, C., Park, B. C., Lee, D. S., Suh, S.W. (1999). Crystal structures of thermostable xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible structural determinants of thermostability. *J. Mol. Biol.*, **288**(4): 623-634.
- Chen, C. W., Ou-Yang, C. C. and Yeh, C. W., (2003). Synthesis of galactooligosaccharides and transgalactosylation modeling in reverse micelles. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**(4): 497-507.
- Chivian, D., Brodie, E. L., Alm, E. J., Culley, D. E., Dehal, P. S., DeSantis, T. Z., Gihring, T. M., Lapidus, A., Lin, L. H., Lowry, S. R., Moser, D. P., Richardson, P. M., Southam, G., Wanger, G., Pratt, L. M., Andersen, G. L., Hazen, T. C., Brockman, F. J., Arkin, A. P. and Onstott, T. C. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science*, **322**(5899):275-278.
- Choi, K. S., Kim, J. A. and Kang, H. S. (1992). Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *J. Bacteriol.*, **174**(19): 6270-6276.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B. and Bork, P. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, **311**(5765): 1283-1287.
- Claridge, C. A., Gourevich, A. and Lein, J. (1960). Bacterial penicillin amidase. *Nature*, **187**: 237-238.
- Cole, M. (1969a). Deacylation of acylamino compounds other than penicillins by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **115**(4): 741-745.
- Cole, M. (1969b). Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxypenicillins by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **115**(4): 757-764.
- Cole, M. (1969c). Penicillins and other acylamino compounds synthesized by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **115**(4): 747-756.
- Cole, M. (1969d). Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **115**(4): 733-739.
- Cole, M., Savidge, T., Vanderhaeghe, H. (1975) Penicillin acylase (assay). *Methods Enzymol.*, **43**:698-705.
- Coolbear, T., Daniel, R. M., and Morgan, H. W. (1992). The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **45**: 57-98.
- Cowan, D. A. (2004). The upper temperature of life--where do we draw the line? *Trends Microbiol.*, **12**(2): 58-60.
- Cristina Vallés Rapp, Pablo Castán García y José Berenguer Carlos (2002). Microorganismos Termófilos y sus Aplicaciones. *Obra Social y cultural de Caja Segovia*.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A. (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.*, **10**(6): 673-676.
- da Costa, M. S., Rainey, N. F. and Rainey, F. A. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. G.M. Garrity. Vol. I, New York: Springer.
- da Costa, M. S., Santos, H., and Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **61**:117-153.
- Dai, M., Zhu, K., Yang, Y., Wang, E., Xie, Y., Zhao, G. and Jiang, W. (2001). Expression of penicillin G acylase from the cloned pac gene of *Escherichia coli* ATCC 11105. Effects of pacR and temperature. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 1298-1303.
- Daines, A. M., Maltman, B. A. and Flitsch, S. L. (2004). Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**(2): 106-113.
- Daniel, R. M. and Cowan, D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**(2): 250-264.



- Daniel R. M. and Danson M. J. (1995). Did primitive microorganisms use non-heme iron proteins in place of NAD/P? *J. Mol. Evol.*, **40**: 559–563.
- Daniel R. M., Cowan D. A., Morgan H. W. and Curran M. P. (1982). A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. *Biochem. J.*, **207**(3): 641–644.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**(9): 853–859.
- De Grado, M., Lasa, I. and Berenguer, J. (1998). Characterization of a plasmid origin for the extreme thermophile *Thermus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.*, **165**(1): 51–57.
- De Grado, M., Castán, P. and Berenguer, J. (1999). A high-Transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid*, **42**: 241–245.
- Dehouck, Y., Folch, B. and Rooman, M. (2008). Revisiting the correlation between proteins' thermoresistance and organisms' thermophilicity. *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**(4):275–278.
- de Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J. and Villa, T. G. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. *Protein. Pept. Lett.*, **13**(7):645–651.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas F. and Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**(2): 144–151.
- Dharmsthiti, S. and Kuhasuntisuk, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* Ip602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 75–80.
- Díaz, M., Esteban, A., Fernández-Abalos, J. M. and Santamaría, R. I. (2005). The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*, 151(Pt 8):2583–2592.
- Díaz, M., Adham, S. A., Ramón, D., Gil, J. A. and Santamaría, R. I. (2004). *Streptomyces lividans* and *Brevibacterium lactofermentum* as heterologous hosts for the production of X22 xylanase from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**(4): 401–406.
- Díaz, E., A. Ferrández, M. A. Prieto, and J. L. García. (2001). Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**: 523–569.
- Díaz M, Ferreras E, Moreno R, Yepes A, Berenguer J, Santamaría R. (2008). High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**(6):1001–1008.
- Didziapetris, R., Drabnig, B., Schellenberger, V., Jakubke, H. D. and Svedas V. (1991). Penicillin acylase-catalyzed protection and deprotection of amino groups as a promising approach in enzymatic peptide synthesis. *FEBS Lett.*, **287**(1–2): 31–33.
- Dion, M., Fourage, L., Hallet, J. N. and Colas, B. (1999). Cloning and expression of a β -glycosidase gene from *T. thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconj. J.*, **16**(1): 27–37.
- Dodson, G. and Wlodawer A., (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.*, **23**(9): 347–352.
- Domínguez, A., Sanromán, A., Fuciños, P., Rúa, M. L., Pastrana, L., and Longo, M. A. (2004). Quantification of intra- and extra-cellular thermophilic lipase/esterase production by *Thermus* sp. *Biotechnol. Lett.*, **26**: 705–708.
- Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, C. P., Dodson, E. J., Dodson, G. and Moody, P. C. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature*, Jan 19; **373**(6511): 264–268.
- Efremov, R. G., Baradaran, R., Sazanov, L. A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature*, **465**(7297): 441–5.
- Eggert, T., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R. and Jaeger, K-E. (2000). A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 6459–6469.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Elander, R. P. (2003). Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**: 385–392.
- Ewis, H. E., Abdelal, A. T. and Lu, C. D. (2004). Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*. *Gene*, **329**: 187–195.
- Faria, T. Q., Mingote, A., Siopa, F., Ventura, R., Maycock, C., and Santos, H. (2008). Design of new enzyme stabilizers inspired by glycosides of hyperthermophilic microorganisms. *Carbohydr. Res.*, **343**(18): 3025–33.
- Fernández-Herrero, L. A., Olabarría, G. and Berenguer, J. (1997). Surface proteins and a novel transcription factor regulate the expression of the S-layer gene in *Thermus thermophilus* HB8. *Mol. Microbiol.*, **24**(1):61–72.
- Fernández-Herrero, L. A., Badet-Denisot, M. A., Badet, B. and Berenguer, J. (1995a). 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-Herrero, L. A., Olabarría, G., Castón, J. R., Lasa, I. and Berenguer, J. (1995b). Horizontal transference of S-layer genes within *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, **177**(19): 5460–5466.
- Ferrero, M. A., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Fernández-Ververde, M. and Luengo, J.M. (1991). In vitro synthesis of new penicillins containing keto acids as side chains. *Antimicrob Agents Chemother.*, **35**: 1931–1932.
- Friedrich, A., Prust, C., Hartsch, T., Henne, A. and Averhoff, B. (2002). Molecular analyses of the natural transformation machinery and identification of pilus structures in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* strain HB27. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 745–755.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. Ñ. and Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie.*, **82**: 1033–1041.
- Forterre, P. (1996). A hot topic: The origin of hyperthermophiles. *Cell*, **85**: 789–792.
- Fourage, L., Dion, M. and Colas, B. (2000). Kinetic study of a thermostable beta-glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconj. J.*, **17**(6): 377–383.
- Fuciños, P., Abadín, C. M., Sanromán, A., Longo, M. A., Pastrana, L. and Rúa, M. L. (2005b). Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: partial purification and preliminary biochemical characterisation. *J. Biotechnol.*, **117**: 233–241.
- Fuciños, P., Domínguez, A., Sanromán, M. A., Longo, M. A., Rúa, M. L., Pastrana, L. (2005a). Production of thermostable lipolytic activity by *thermus* species. *Biotechnol. Prog.*, **21**(4):1198–1205.
- Fuciños, P. (2007). Un estudio integrado das lipasas de *Thermus thermophilus* HB27: condicións de produción, localización celular, purificación e caracterización. Tesis doctoral. Universidad de Vigo.
- Gabor, E. M., de Vries, E. J. and Janssen D. B. (2005). A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme Microb. Technol.*, **36**: 182–190.
- Galtier, N. and Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. *J. Mol. Evol.*, **44**: 632–636.
- Gang, D. M., and K. Shaikh. (1976). Regulation of penicillin acylase in *Escherichia coli* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta.*, **425**: 110–114.
- Galán, B., García, J. L., and Prieto, M. A. (2004). The PaaX Repressor, a Link between Penicillin G Acylase and the Phenylacetyl-Coenzyme A Catabolon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **186**(7): 2215–2220.
- Geueke, B. and Hummel, W. (2003). Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein. Expr. Purif.*, **28**(2): 303–309.
- Ghanem, E. H., Al-Sayeed, H. A. and Saleh, K. M. (2000). An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**: 459–464.



- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. and Davidson, W. S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.*, **79**: 119-157.
- Gihring, T. M. and Banfield, J. F. (2001). Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**: 335-340.
- Gill, I. and Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, Part 2: Biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, **15**(11): 470-478.
- Giordano, R. C., Ribeiro, M. P. and Giordano, R. L. (2006). Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. *Biotechnol. Adv.*, **24**(1):27-41.
- Glozi A, Paoli G., De Rosa M. and Gambacorta A. (1983). Effect of isoprenoid cyclization on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **735**: 234-242.
- Gololobov, M. Yu., Voyushina, T. L., Stepanov, V. M., Adlercreutz, P. (1992). Organic solvent changes the chymotrypsin specificity with respect to nucleophiles. *FEBS Lett.*, **307**(3): 309-312.
- Gomes, J., Gomes, I., Terler, K., Gubala, N., Ditzelmuller, G. and Steiner, W. (2000). Optimisation of culture medium and conditions for α -l-arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **27**: 414-422.
- Gomes, J. and Steiner, W. (1998). Production of a high activity of an extremely thermostable β -mannanase by the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Biotechnol. Lett.*, **20**: 729-733.
- Gomes, I., Gomes, J. and Steiner, W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresour. Technol.*, **90**: 207-214.
- González, B., Vasquez, C., Bull, P. and Vicuña R. (1984). Electron microscopy mapping of *Escherichia coli* RNA polymerase-binding sites on plasmids from thermophilic bacteria. *DNA*, **3**(3): 251-257.
- Gotsche, S., Dahl, M. K. (1995). Purification and characterization of the phospho-alpha(1,1)glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.*, **177**(10):2721-2726.
- Grunwald, P. (2009). Structure, function and application of enzymes, en Biocatalysis, Biochemical Fundamentals and applications, Imperial college press, 293-336.
- Guan, C., Cui, T., Rao, V., Liao, W., Benner, J., Lin, C-L., Comb, D. (1996). Activation of glycosylasparaginase: Formation of active N-terminal threonine by intramolecular autoproteolysis. *J. Biol. Chem.*, **271**: 1732-1737.
- Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K. M., dela Tour, C. B. and P. Forterre. (1997). Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **94**: 10.606-10.611.
- Guncheva, M., Ivanov, I., Galunsky, B., Stambolieva, N. and Kaneti, J. (2004). Kinetic studies and molecular modelling attribute a crucial role in the specificity and stereoselectivity of penicillin acylase to the pair ArgA145-ArgB263. *Eur. J. Biochem.*, **271**(11): 2272-2279.
- Gupta, R. S. (2000). The natural evolutionary relationship among prokaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.*, **26**(2): 111-131.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**: 763-781.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour. Technol.*, **89**(1): 17-34.
- Hanahan, D. (1983). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In DNA cloning: a practical approach. D. M. Glover. Oxford, IRL Press. Glover, D.M. (ed). Oxford: IRL Press, p. 109-135.
- Hari Krishna, S. and Karanth, N. (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catal. Rev. Sci. Eng.*, **44**: 499-591.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**: 235-251.
- Heim, R., Prasher, D. C. and Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(26): 12501-12504.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G. and Fritz, H. J. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.*, **22**(5): 547-553.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**: 637-644.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, **316**(2): 695-696.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, **280**(2): 309-316.
- Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R. J., Murshudov, G. N., Dodson, G. G. and Wilson, K.W. (2000). Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the active site cleft. *J. Mol. Biol.*, **302**: 887-898.
- Hidaka, Y., Hasegawa, M., Nakahara, T. and Hoshino T. (1994). The entire population of *Thermus thermophilus* cells is always competent at any growth phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**(7): 1338-1339.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Moreno, R., Zafra, O., Cava, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M. and Berenguer, J. (2004). *Thermus thermophilus* as a cell factory for the production of a thermophilic Mn-dependent catalase which fails to be synthesized in an active form in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(7): 3839-3844.
- Hishinuma, F., Tanaka, T. and Sakaguchi, K., (1978). Isolation of extrachromosomal deoxyribonucleic acids from extremely thermophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **104**: 193-199.
- Hobb, R. I., Fields, J. A., Burns, C. M. and Thompson, S. A. (2009). Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, **155**(3): 979-988.
- Hopwood, D. A. and Wright, H. M. (1978). Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.*, **162**: 307-317.
- Hough, D. W. and Danson, M. J. (1999). Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**(1): 39-46.
- Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2002). Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(8): 3925-3931.
- Huang, H. T., English, A. T., Seto, G. M. Shull, B. A. and Sobin, B. A. (1960). Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillin. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 3790-3791.
- Huber, R., H. Huber, and K. Stetter. (2000). Towards the ecology of hyperthermophiles: Biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 615-623.
- Hudson, J., Morgan, H. and Daniel, R. (1989). Numerical classification of *Thermus* isolates from globally distributed hot springs. *System. Appl. Microbiol.*, **11**: 250-256.
- Hurst, L. D. and Merchant, A. R. (2001). High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes. *Proc. Biol. Sci.*, **268**: 493-497.
- Ignatova, Z., Wischnewski, F., Notbohm, H. and Kasche, V. (2005). Pro-sequence and Ca²⁺-binding: implications for folding and maturation of Ntn-hydrolase penicillin amidase from *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, **348**: 999-1014.
- Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A. and Kasche, V. (2002). Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**(1): 146-149.



- Ignatova, Z., Stoeva, S., Galunsky, B., Hörnle, C., Nurk, A., Piotraschke, E., Volter, W. and Kasche, V. (1998). Proteolytic processing of penicillin amidase from *Alcaligenes faecalis* cloned in *E. coli* yields several active forms. *Biotechnol. Lett.*, **20**: 977-982.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**(1): 23-28.
- Ishida, M., Yoshida, M. and Oshima, T. (1997). Highly efficient production of enzymes of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*: a practical method to overexpress GC rich genes in *Escherichia coli*. *Extremophiles*, **1**(3): 157-162.
- Itoh, Y. H., Sugai, A., Uda, I. and Itoh T. (2001). The evolution of lipids. *Adv. Space. Res.*, **28**(4): 719-24.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. and Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**: 29-63.
- Jaeger, K. E. and Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **16**: 396-403.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Ann. Rev. Microbiol.*, **53**: 315-351.
- Jaeger, K. E. and Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**: 390-397.
- Jaenicke, R., Schurig, H., Beaucamp, N. and Ostendorp, R. (1996). Structure and stability of hyperstable proteins: glycolytic enzymes from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Adv. Protein. Chem.*, **48**: 181-269.
- Jenney, F. E. Jr. and Adams, M. W. (2008). The impact of extremophiles on structural genomics (and vice versa). *Extremophiles*, **12**: 39-50.
- Kahsay, R. Y., Gao, G. and Liao L. (2005). An improved hidden Markov model for Transmembrane protein detection and topology prediction and its applications to complete genomes. *Bioinformatics*, **21**(9):1853-1858.
- Kampmann, M. and Stock, D. (2004). Reverse gyrase has heat-protective DNA chaperone activity independent of supercoiling. *Nucleic. Acids. Res.*, **32**: 3537-3545.
- Kasche, V., Ignatova, Z., Märkl, H., late, W., Punckt, N., Schmidt, D., Wiegandt, K., and Ernst, B. (2005). Ca²⁺ is a cofactor required for membrane transport an maturation and is a yield-determining factor in high cell density penicillin amidase production. *Biotechnol. Prog.*, **21**, 432-438.
- Kasche, V., Galunsky, B. and Ignatova, Z. (2003). Fragments of pro-peptide activate mature penicillin amidase of *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 4721-4728.
- Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S. and Voelter, W. (1999). Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1433**(1-2): 76-86.
- Kashefi, K. and Lovley, D. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, **301**(5635): 934.
- Kashiwabara, S., Azuma, S., Tsuduki, M. and Suzuki, Y. (2000). The primary structure of the subunit in *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 molecular weight 540,000 homohexameric alpha-glucosidase II belonging to the glycosyl hydrolase family 31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(7): 1379-1393.
- Kashiwabara, S., Ogawa, S., Miyoshi, N., Oda, M. and Suzuki, Y. (1999). Three domains comprised in thermostable molecular weight 54,000 pullulanase of type I from *Bacillus flavocaldarius* KP1228. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(10):1736-1748.
- Kashiwabara, S., Matsuki, Y., Kishimoto, T. and Suzuki, Y. (1998). Clustered proline residues around the active-site cleft in thermostable oligo-1,6-glucosidase of *Bacillus flavocaldarius* KP1228. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(6): 1093-1102.
- Kates, M. (1992). En: The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology (Danson, M. J., Hough, D. W. and Lunt, G. G., Eds.) pp. 51-72, Portland Press, London and Chapel Hill.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Katz, E., Thompson, C. J. and Hopwood, D. A. (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**(9):2703-2714.
- Kaufmann, W. (1964). The possible implication of a bacterial enzyme in the biochemical mode of action of penicillins on gram negative bacteria. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **14**: 458-462.
- Kaufmann, W. and Bauer, K. (1964). Variety of substrates for a bacterial benzyl penicillin-splitting enzyme. *Nature*, **203**: 520.
- Kayser, K. J. and Kilbane, J. J. II. (2001). New host-vector system for *Thermus* spp. based on the malate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.*, **183**(5): 1792-1795.
- Kazlauskas, R. J. and Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with lipases, en Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A. and Stadler, P. J. W. (eds.). *Biotechnology*, tomo 8a, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kengan S. W. M., de Bok F. A. M., van Loo N. D., Dijkema C., Stams A. J. M. and de Vos W. M. (1994). Evidence for the operation of a novel Emden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 17537-17541.
- Kengen, S. W., Luesink, E. J., Stams, A. J. and Zehnder, A. J. (1993). Purification and characterization of an extremely thermostable beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.*, **213**(1):305-312.
- Ketudat Cairns, J. R. and Esen, A. (2010). β -Glucosidases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **67**(20): 3389-3405.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. *John Innes Centre*, Norwich.
- Kieft, T. L., Fredrickson, J. K., Onstott, T. C., Gorby, Y. A., Kostandarithes, H. M., Bailey, T. J., Kennedy, D. W., Li, S. W., Plymale, A. E., Spadoni, C. M. and Gray, M. S. (1999). Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(3): 1214-1221.
- Kikuchi, A. and Asai, K. (1984). Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature*, **309**: 677-681.
- Kim, Y. W., Chen, H. M. and Withers, S. G. (2005). Enzymatic transglycosylation of xylose using a glycosynthase. *Carbohydr. Res.*, **340**(18): 2735-2741.
- Kim, C. H., Nashiru, O. and Ko, J. H. (1996). Purification and biochemical characterization of pullulanase type I from *Thermus caldophilus* gk-24. *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**: 147-152.
- Kim, H. K., Park, S. Y. and Oh, T.K. (1997). Purification and partial characterization of thermostable carboxyl esterase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 37-42.
- Kim, M. H., Kim, H. K., Lee, J. K., Park, S. Y. and Oh, T. K. (2000). Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium-dependent thermostability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**: 280-286.
- Kim, S. and Kim, Y. (2001). Active site residues of cephalosporin acylase are critical not only for enzymatic catalysis but also for post-translational modification. *J. Biol. Chem.*, **276**(51): 48376-48381.
- Kirk, N. and Cowan, D. (1995). Optimising the recovery of recombinant thermostable proteins expressed in mesophilic hosts. *J. Biotechnol.*, **42**(2): 177-184.
- Klaus, D. (1998). An enzyme process for the physical refining of seed oils. *Chem. Eng. Technol.*, **21**: 278-281.
- Kobayashi, H., Kuwae, A., Maseda, H., Nakamura, A. and Hoshino, T. (2005). Isolation of a low-molecular-weight, multicopy plasmid, pNHK101, from *Thermus* sp. TK10 and its use as an expression vector for *T. thermophilus* HB27. *Plasmid*, **54**(1): 70-79.
- Kohda, J., Kawanishi, H., Suehara, K., Nakano, Y. and Yano, T. (2006). Stabilization of free and immobilized enzymes using hyperthermophilic chaperonin. *J. Biosci. Bioeng.*, **101**(2): 131-136.
- Kowalak, J. A., Dalluge, J. J., Mc Closkey, J. A., and Stetter, K. O. (1994). The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles. *Biochemistry*, **33**(25): 7869-7876.



- Koyama, Y., Arikawa, Y. and Furukawa, K. (1990a). A plasmid vector for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **72**: 97-102.
- Koyama, Y., Okamoto, S. and Furukawa, K. (1990b). Cloning of α - and β -galactosidase genes from an extreme thermophile, *Thermus* Strain T2, and their expression in *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(7): 2251-2254.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. and Furukawa, K. (1986). Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *J. Bacteriol.*, **166**: 338-340.
- Kren, V. and Martínková, L. (2001). Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Curr. Med. Chem.*, **8**(11):1303-1328.
- Kutzbach, C. and Ravenbush, E. (1974). Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem.*, **355**: 45-53.
- Laemmli, U. and Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4.I; DNA packaging events. *J. Mol. Biol.*, **80**: 575-599.
- Lagarde, D., Nguyen, H.K., Ravot, G., Wahler, D., Reymond, J.L., Hills, G., Veit, T. and Lefevre, F. (2002). High-throughput screening of thermostable esterases for industrial bioconversions. *Organic Process Res. Develop.* **6**: 441-445.
- Laine, R. A. (1994). A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology*, **4**(6): 759-767.
- Lamosa, P. Gonçalves, L. G., Rodrigues, M. V., Martins, L. O., Ranven, N. D. and Santos, H. (2006). Occurrence of 1-glycerol-1-myo-inositol phosphate in hyperthermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(9): 6169-6173.
- Lasa, I., de Grado, M., de Pedro, M. A. and Berenguer, J. (1992). Development of *Thermus-Escherichia* shuttle vectors and their use for expression of the *Clostridium thermocellum* celA gene in *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, **174**: 6424-6431.
- Leive L. (1968). Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylenediaminetetraacetate. *J. Biol. Chem.*, **243**(9): 2373-2380.
- Lennox, E. X. (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, **1**(2): 190-206.
- Leuschner, C. and Antranikian, G. (1995). Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganism. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**: 95-114.
- Li, W. F., Zhou, X. X. and Lu, P. (2005). Structural features of thermozyms. *Biotechnol. Adv.*, **23**: 271-281.
- Liao, H., McKenzie, T., and Hageman, R. (1986). Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(3): 576-580.
- Lieph, R., Veloso, F. A. and Holmes D. S. (2006). Thermophiles like hot T. *Trends Microbiol.*, **14**(10): 423-426.
- Lindsay, C. D. and Pain, R. H. (1991). Refolding and assembly of penicillin acylase, an enzyme composed of two polypeptide chains that result from proteolytic activation. *Biochemistry*, **30**(37):9034-9040.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**(6422): 709-715.
- López-García, P. and Forterre, P. (2000). DNA topology and the thermal stress response, a tales from mesophiles and hyperthermophiles. *Bioessays*, **22**: 738-746.
- López-López, O., Fuciños, P., Pastrana, L., Rúa, M. L., Cerdán, M. E. and González-Siso, M. I. (2010). Heterologous expression of an esterase from *Thermus thermophilus* HB27 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, **145**(3):226-232.



7. BIBLIOGRAFÍA

- López, R., Fernandez-Mayoralas, A., Martinlomas, M. and Guisan, J. M. (1991). Enzymatic beta-galactosidation of beta-xylano pyranosides. *Biotechnol. Lett.*, **13**(10):705-710.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F. and Lafuente, J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids*, **93**: 143-148.
- Lucente, G., Romeo, A. and Rossi, D. (1964). Use of *Escherichia coli* ATCC 9637 for the asymmetric hydrolysis of amino acid derivatives. *Experientia*, **21**: 317-318.
- MacElroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, **6**: 74-75.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker (2003). Brock Biology of Microorganisms, 10th Edition, Prentice Hall, Pearson Education, Inc., 1019 pp.
- Maehara, T., Hoshino, T., Nakamura, A. (2007). Characterization of three putative Lon proteases of *Thermus thermophilus* HB27 and use of their defective mutants as hosts for production of heterologous proteins. *Extremophiles*, **12**(2): 285-96.
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B. and Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic. Acids Res.*, **30**(2): 482-496.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**: 208-218.
- Martin, C. A., Hoven, A. D. and Cook, A. M. (2008). Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **27**(8): 635-642.
- Marvin, H. J., ter Beest, M. B. and Witholt, B. (1989). Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J. Bacteriol.*, **171**(10): 5262-5267.
- Mather, M. W. and Fee, J. A. (1992). Development of plasmid cloning vectors for *Thermus thermophilus* HB8: expression of a heterologous, plasmid-borne kanamycin nucleotidyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(1): 421-425.
- Matsumura, M., Signor, G. and Matthews, B. W. (1989). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, **342**: 291- 293.
- McVey, C. E., Walsh, M. A., Dodson, G. G., Wilson, K. S. and Brannigan, J.A. (2001). Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.*, **313**(1): 139-50.
- Merino, E., Balbás, P., Recillas, F., Becerril, B., Valle, F. and Bolivar, F. (1992). Carbon regulation and the role in nature of the *Escherichia coli* penicillin acylase (pac) gene. *Mol. Microbiol.*, **6**(15): 2175-2182.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**: 165-199.
- Miroux, B. and Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, **260**(3): 289-298.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B. and Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**(1): 71-81.
- Moller, C. and van Heerden, E. (2006). Isolation of a soluble and membrane-associated Fe (III) reductase from the thermophile *Thermus scotoductus* (SA-01). *FEMS Microbiol. Lett.*, **265**: 237-243.
- Moracci, M. Trincone, A. and Rossi, M. (2001a). Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **11**(4-6): 155-163.
- Moracci, M., Trincone, A., Cobucci-Ponzano, B., Perugino, G., Ciaramella, M. and Rossi, M. (2001b) Enzymatic synthesis of oligosaccharides by two glycosyl hydrolases of *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, **5**(3): 145-152.



- Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A. and Berenguer, J. (2005) High-level overproduction of His-tagged Tth DNA polymerase in *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 591–593.
- Moreno, R. (2004). Clonaje de enzimas termoestables de interés biotecnológico y desarrollo de herramientas para su expresión en *Thermus thermophilus*. Tesis doctoral U. A. M.
- Moreno, R., Zafra, O., Cava, F. and Berenguer, J. (2003). Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid*, **49**: 2-8.
- Morillas, M., McVey, C. E., Brannigan, J. A., Ladurner, A. G., Forney, L. J. and Virden, R. (2003). Mutations of penicillin acylase residue B71 extend substrate specificity by decreasing steric constraints for substrate binding. *Biochem. J.*, **371**(Pt 1):143-150.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H. and Hoshino, T. (2005). 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.
- Napoli, A., A. Valenti, V., Salerno, M., Nadal, F., Garnier, M., Rossi and Ciaramella, M. (2004). Reverse gyrase recruitment to DNA after UV light irradiation in *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33192-33198.
- Nashiru, O., Ko, S.-H., Lee, S. Y. and Lee, D. S. (2001). Novel alpha-Glucosidase from an extremophile, *Thermus caldophilus*, GK24: Purification, Gene cloning and Expression in *E. coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**: 347-354.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**(6): 711-29.
- Nthangeni, M. B., Patterton, H., van Tonder, A., Vergeer, W. P. and Litthauer, D. (2001). Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**: 705-712.
- Oh, S. J., Kim, Y. C., Park, Y. W., Min, S. Y., Kim, I. S. and Kang, H. S. (1987). Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*. **56**(1):87-97.
- Ohashi, H., Katsuta, Y., Nagashima, M., Kamei, T. and Yano, M. (1989). Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin G acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(6):1351-1356.
- Okanishi, M. Suzuki, K. and Umezawa, H. (1974). Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural conditions and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**: 389-400.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. and Goldman, A. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.*, **5**: 197–211.
- Omelchenko, M. V., Wolf, Y. I., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Daly, M. J., Koonin, E. V. and Makarova, K. S. (2005). Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to thermophily and radiation resistance. *BMC Evol. Biol.*, **5**: 57-79.
- Onionen, C. and Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci.*, **9**(12): 2329-2337.
- Oshima T. (2007). Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids.*, **33**(2):367-672.
- Oshima, M. and Osawa, Y. (1983). Outer and inner membrane preparations of extreme thermophile and their physico-chemical properties. *J. Biochem.*, **93**(1): 225-234.
- Oshima, T. and Imahori, K. (1974). Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a non-sporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 102-112.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Paiardini, A., Sali, R., Bossa, F. and Pascarella, S. (2008). "Hot cores" in proteins: comparative analysis of the apolar contact area in structures from hyper/thermophilic and mesophilic organisms. *BMC Struct. Biol.*, **8**: 14.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. and Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**: 119-131.
- Panke, S. Held, M., and Wubbolts, M. (2004). Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**: 272-279.
- Papaneophytou, C. P, Pantazaki A. A. and Kyriakidis, D. A. (2009). An extracellular polyhydroxybutyrate depolymerase in *Thermus thermophilus* HB8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**(4): 659-668.
- Park, H-S., Kayser, K. J., Kwak, J. H. and Kilbane, J. J. 2nd. (2004). Heterologous gene expression in *Thermus thermophilus*: beta-galactosidase, dibenzothiophene monooxygenase, PNB carboxy esterase, 2-aminobiphenyl-2, 3-diol dioxygenase, and chloramphenicol acetyl transferase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31**: 189-197.
- Park, Y. J., Choi, S. Y. and Lee, H. B., (2006). A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1; purification, characterization, and expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**(5): 820-828.
- Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S. S. and Kennedy, J. F. (2000). Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). *Biotechnol. Adv.*, **18**(4): 289-301.
- Pédelaçq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, **24**(1): 79-88.
- Peräkylä, M. and Kollman, P.A. (1997). A simulation of the catalytic mechanism of aspartylglucosaminidase using ab initio quantum mechanics and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**: 1189-1196.
- Peräkylä, M. and Rouvinen, J. (1996). Ab initio quantum mechanical model calculations on the catalytic mechanism of aspartylglucosaminidase (AGA): A serine protease-like mechanism with an N-terminal threonine and substrate assisted catalysis. *Chem. Eur. J.*, **2**: 1548-1551.
- Pereira, S. L., Grayling, R. A., Luyrz, R. and Reeve, J. N. (1997). Archaeal nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12633-12637.
- Pérez-Sánchez, M. (2009). Síntesis enzimática de disacáridos: estudio del efecto del aceptor y de la presencia de disolventes verdes. Tesis doctoral. U.C.M.
- Pozidis, C., Lammertyn, E., Politou, A. S., Anne, J., Tsiftoglou, A. S., Sianidis, G. and Economou, A. (2001). Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**: 611-619.
- Prieto, M. A., Díaz, E. and García, J. L. (1996). Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster. *J. Bacteriol.*, **178**(1): 111-20.
- Quintela, J. C., Pittenauer, E., Allmaier, G., Arán, V. and de Pedro, M. A. (1995). Structure of peptidoglycan from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.*, **177**: 4947-4962.
- Ramírez-Arcos, S., Fernández-Herrero, L. A. and Berenguer, J. (1998). A thermophilic nitrate reductase is responsible for the strain specific anaerobic growth of *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim. Biophys. Acta*, **1396**: 215-227.
- Ramos, A., Raven, N., Sharp, R. J., Bartolucci, S., Rossi, M., Cannio, R., Lebbink, J., Van Der Oost, J., De Vos, W. M. and Santos, H. (1997). Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 4020-4025.
- Rao, A. and García, J. L., (1999). New insights into the regulation of the *pac* gene from *Escherichia coli* W ATCC 11105. *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**: 7-14.
- Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H. and Imanaka, T. (2001). Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain kb700a. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4064-4069.



- Rathi, P., Saxena, R. K. and Gupta, R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.*, **37**: 187-192.
- Ray, P. H., White, D. C. and Brock, T. D. (1971). Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*, **108**(1): 227-35.
- Reuter, S., Nygaard, A. R. and Zimmermann, W. (1999). β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *S. solfataricus*, *A. oryzae* and *E. coli*. *Enzyme. Microb. Technol.*, **25**(6): 509-516.
- Rocchietti, S., San Vicente, A., Pregolato, M., Tagliani, A., Guisan, J. M., Fernández-Lafuente, R. and Terrini, M. (2002). Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin acylase. *Enz. Microb. Technol.*, **31**: 88-93.
- Roche, D., Prasad, K. and Repic, O. (1999). Enantioselective acylation of β -amino esters using penicillin G acylase in organic solvents. *Tetrahedron Lett.*, **40**: 3665-3668.
- Rolinson, G. N., Batchelor, F. T., Butterworth, D., Camero-Wood, J., Cole, M., Eustace, G. C., M. V., H., M., T. and Chain, T. B. (1960). Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis. *Nature*, **187**: 236-237.
- Robb, F. T. and Maeder, D. L. (1998). Novel evolutionary histories and adaptive features of proteins from hyperthermophiles. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**(3): 288-291.
- Robinson-Rechavi, M., Alibés, A., and Godzik, A. (2006). Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.*, **356**(2): 547-557.
- Rosenau, F. and Jaeger, K. E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie.*, **82**: 1-10.
- Rosenberg, A. H., Lada, B. N., Chui, D., Lin, S.-W., Dunn, J. J. and Studier, W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, **56**: 125-135.
- Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature.*, **409**(6823): 1092-101.
- Rozzell, J. D. (1999). Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**: 2253-2261.
- Rúa, M. L., Atomi, C., Schmidt-Dannert, C. and Schmid, R. D. (1998). High-level expression of thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**: 405-410.
- Ruiz-Arribas, A., Fernández-Ábalos, J. M., Sánchez, P., Garda, A. L. and Santamaría, R. I. (1995). Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2414-2419.
- Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M and Ranjbar, B. (2006). Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophys. Chem.*, **119**(3): 256-270.
- Salis, A., Monduzzi, M. and Solinas, V. (2007). Use of lipases for the production of biodiesel. En: *Industrial enzymes Structure, Function and Applications*. J. Polaina and A. P. MacCabe (Eds.) XII, 642 p. Chapter 19: 317-339.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangeetha, R., I. Arulpani and A. Geetha (2011). Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. *Res. J. Microbiol.*, **6**: 1-24.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(12): 5463-5467.
- Santos, H., Lamosa, P., Faria, T. Q., Tiago M. Pais, T. M., de la Paz, M. L. and Serrano, L. (2008). Compatible solutes of (hyper)thermophiles and their role in protein stabilization. En *Thermophiles: Biology*



7. BIBLIOGRAFÍA

and technology at high temperatures. CRC Press (ed) Frank Robb, Garabed Antranikian, Dennis Grogan and Arnold Driessen. Ch. 2.

Santos H, da Costa MS. (2002). Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.*, **4**(9):501-509.

Savidge, T. A., Cole, M. (1975). Penicillin acylase (bacterial). *Methods Enzymol.*, **43**:705-721.

Sazanov, L. A. and Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*, **311**: 1430-1436.

Schlieben, N. H., Niefind, K. and Schomburg, D. (2004). Expression, purification, and aggregation studies of his-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus*. *Protein Expr. Purif.*, **34**: 103-110.

Schiraldi, C., Marulli, F., Di Lernia, I., Martino, A. and De Rosa, M. (1999). A microfiltration bioreactor to achieve high cell density in *Sulfolobus solfataricus* fermentation. *Extremophiles*, **3**: 199-204.

Schiraldi, C. and De Rosa, M. (2002). The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.*, **20**: 515-521.

Schmidt-Dannert, C., Rúa, M. L., Atomi, H. and Schmid, R. D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**(1-2): 105-114.

Schnaitman, C. A. (1971a). Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.*, **108**(1): 545-552.

Schnaitman, C. A. (1971b). Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **108**(1): 553-563.

Schoemaker, H. E., Mink, D. and Wubbolts, M. G. (2003). Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. *Science*, **299**(5613): 1694-1697.

Schwartzman, D. W. and Lineweaver, C. H. (2004). The hyperthermophilic origin of life revisited. *Biochem. Soc. Trans.*, **32**(2): 168-71.

Schwarzenlander, C. and Averhoff, B. (2006). Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.*, **273**(18): 4210-4218.

Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzym. Microb. Technol.*, **25**: 471-482.

Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V. T., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R. and Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science.*, **313**: 1935-1942.

Severinov, K. (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**:118-125.

Shinkai, A., Kira, S., Nakagawa, N., Kashihara, A., Kuramitsu, S. and Yokoyama, S. (2007). Transcription activation mediated by a cyclic AMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.*, **189**(10):3891-901.

Shirazi, S. H., Rehman, S. R. and Rehman, M. M. (1998). Short communication: production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**: 595-597.

Sianidis, G., Pozidis, C., Becker, F., Vrancken, K., Sjoeholm, C., Karamanou, S., Takamiya-Wik, M., van Mellaert, L., Schaefer, T., Anné, J. and Economou, A. (2006). Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.*, **121**(4):498-507.

Siebers, B., and Hensel, R. (1993). Glucose catabolism of the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**: 1-8.

Sizmann D., Keilmann, C. and Bock, A. (1990). Primary structure requirements for the maturation in vivo of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Eur. J. Biochem.*, **192**: 143-151.



- Snell, F. D., and Snell, C. T. (1949). Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand, New York.
- Spence D. W and Ramsden, M. (2007). Penicillin acylases. En: Industrial enzymes Structure, Function and Applications. J. Polaina and A. P. MacCabe (Eds.) XII, 642 p. Chapter 33: 583-597.
- Stetter, K. O. (1998). Hyperthermophiles: Isolation classification and properties. In *Extremophiles: Microbial life in extreme environments* (Horikoshi L and Grant W.D., eds) pp. 1-24, Wiley-Liss.
- Stojcevic, N., I. Moric, J. Begovic, S. Radoja, and M. Konstantinovic. (2001). DNA architecture and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* penicillin amidase (*pac*) gene. *Biomol. Eng.*, **17**: 113-117.
- Sudhakaran, V. K. and Borkar, P. S. (1985a). Microbial transformation of β -lactam antibiotics: enzymes from bacteria, sources and study - a summary. *Hind. Antibiot. Bull.*, **27**: 63-119.
- Sudhakaran, V. K. and Borkar, P. S. (1985b). Phenoxymethyl penicillin acylase: sources and study--a sum up. *Hindustan. Antibiot. Bull.*, **27**(1-4): 44-62.
- Suzuki, Y., Hatagaki, K. and Oda, H. (1991). A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**(6): 707-714.
- Takayama, G., Kosuge, T., Sunamura, S., Matsui, I., Ishikawa, K., Nakamura, A., and Hoshino, T. (2004). Use of a *Thermus thermophilus* host-vector system for expression of genes from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *J. Jpn. Soc. Extremophiles*, **3**: 18-27.
- Takesawa, Y., Cowan, D., Bonnerjea, J. and Hoare, M. (1990). Heat-induced precipitation of cell homogenates: An investigation of the recovery of thermostable proteins. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**: 184-189.
- Tamakoshi, M., Yaoi, T., Oshima, T. and Yamagishi, A. (1999). An efficient gene replacement and deletion system for an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **173**: 431-437.
- Tamakoshi, M., Uchida, M., Tanabe, K., Fukuyama, S., Yamagishi, A. and Oshima T. (1997). A new *Thermus-Escherichia coli* shuttle integration vector system. *J. Bacteriol.*, **179**(15):4811-4814.
- Tekaia, F., Yeramian, E., Dujon, B. (2002). Amino acid composition of genomes, lifestyles of organisms, and evolutionary trends: a global picture with correspondence analysis. *Gene*, **297**(1-2): 51-60.
- Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E. and Oshima, T. (2005). Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. J.*, **388**(2): 427-433.
- Teshima, T., Kohda, J., Kondo, A., Yohda, M., Tamura, A., and Fukuda, H. (2000). Affinity purification of fusion chaperonin cpn60-(His)₆ from thermophilic bacteria *Bacillus* strain MS and its use in facilitating protein refolding and preventing heat denaturation. *Biotechnol. Prog.*, **16**: 442-446.
- Thein, M., Sauer, G., Paramasivam, N., Grin, I. and Linke, D. (2010). Efficient Subfractionation of Gram-Negative Bacteria for Proteomics Studies. *J. Proteome. Res.*, **9**(12): 6135-6147.
- Thompson, C. J., Kieser, T., Ward, J. M. and Hopwood, D. A. (1982). Physical analysis of antibiotic-resistant genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. *Gene*, **20**: 51-62.
- Thompson, C. J., Ward, J. M. and Hopwood, D. A. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature*, **286**: 525-527.
- Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. and Robinson, C. (2001). Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **39**(1): 47-53.
- Thompson, M. J. and Eisenberg, D. (1999). Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.*, **290**(2): 595-604.
- Tolner B., Poolman B. and Konings W. N. (1998). Adaptation of micro-organisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A**: 423-428.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Torres, R., Ramón, F., de la Mata, I., Castellón, M. P. and Acebal, C. (1999). Enhanced production of penicillin V acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 81-84.
- Torres-Guzmán, R., de la Mata, I., Torres-Bacete, J., Arroyo, M., Castellón, M. P. and Acebal, C. (2002). Substrate specificity of penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**: 593-597.
- Trincon, A. and Giordano, A. (2006). Glycosyl Hydrolases and Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharides. *Curr. Org. Chem.*, **10**(10): 1163-1193.
- Tusnády, G. E., Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.*, **283**(2): 489-506.
- Ulrich, J. T., McFeters, G. A. and Temple, K. L. (1972). Induction and characterization of, β -galactosidase in an extreme thermophile. *J. Bacteriol.*, **110**: 691-698.
- Valle, F., Gosset, G., Tenorio, B., Oliver, G., and Bolivar, F. (1986). Characterisation of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase gene. *Gene*, **50**: 119-122.
- Valle, F., Balbas, P., Merino, E. and Bolivar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends. Biochem. Sci.*, **16**:36-40.
- Van de Castele M., Legrain C., Desmarez L., Chen P. G., Pierard A. and Glansdorf N. (1997). Molecular physiology of carbamylation under extreme conditions – What can we learn from extreme thermophilic microorganisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118**: 463-473.
- Van de Castele M., Demarez M., Legrain C., Glansdorff N. and Pierard A. (1990). Pathways of arginine biosynthesis in extremely thermophilic archaeo- and eubacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1177-1183.
- Van de Sandt, E. J. A. X. and E. De Vroom. (2000). Innovation in cephalosporin and penicillin production: Painting the antibiotics industry green. *Chimica oggi*, **18**: 72-75.
- Van Langen, L. M., Van Rantwijk, F., Svedas, V. K. and Sheldon, R. A. (2000). Penicillin acylase catalysed peptide synthesis: a chemoenzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione. *Tetrahedron Asym.*, **11**: 1077-1083.
- van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2004). Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. *Tetrahedron*, **60**: 501 – 519.
- van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R. and Driessen, A. J. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**: 437-454.
- Vásquez, C., Villanueva, J. and Vicuña, R. (1983). Plasmid curing in *Thermus thermophilus* and *Thermus flavus*. *FEBS Lett.*, **158**: 339-342.
- Verger, R., (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. *Tibtech.*, **15**: 32-38.
- Verhaert, R. D. M., Riemans, A. M., Laa, J., Duin, J. and Quax, W. J. (1997). Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3412-3418.
- Vieille, C. and Ziekus, G. J. (1996). Thermozyms: Identifying molecular determinants of proteins structural and functional stability. *Trends Biotechnol.*, **14**: 183-190.
- Vieira, J. and Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*, **19**: 259-268.
- Vulfson, E. N. (1994). Industrial applications of lipases. In: Woolley, P., Petersen, S.B. (Eds.), *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*. University Press, Cambridge, pp. 271-288.
- Wegman, M. A., van Langen, L. M., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (2002). A two-step, one-pot enzymatic synthesis of cephalixin from D-phenylglycine nitrile. *Biotechnol. Bioeng.*, **79**(3):356-61.
- Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. and Woese, C. R. (1989). The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *Syst. Appl. Microbiol.*, **11**: 128-134.



- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**: 221-271.
- Wymer, N. and Toone, E. J. (2000). Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**(1): 110-119.
- Xu, Q., Buckley, D., Guan, C. and Guo, H-C. (1999). Structural insights into the mechanism of intramolecular proteolysis. *Cell*, **98**: 651-661.
- Yamagishi, A., Tanimoto, T., Suzuki, T. and Oshima T. (1996). Pyrimidine biosynthesis genes (*pyrE* and *pyrF*) of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(6): 2191-2194.
- Yokoyama, A., Shizuri, Y., Hoshino, T. and Sandmann, G., (1996). Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Arch. Microbiol.*, **165**: 342-345.
- Yu, M. X., Slater, M. R. and Ackermann, H. W. (2006). Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages. *Arch. Virol.*, **151**(4): 663-679.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*, **292**: 883-896.
- Zaks, A. (2001). Industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**: 130-136.
- Zhang, J., Liu, J., Zhou, J., Ren, Y., Dai, X. and Xiang, H. (2003). Thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*: High-level expression, purification and characterization. *Biotechnol. Lett.*, **25**: 1463-1467.
- Zhu, Y., Wang, L., Du, Y., Wang, S., Yu, T. and Hong, B. (2011). Heterologous expression of human interleukin-6 in *Streptomyces lividans* TK24 using novel secretory expression vectors. *Biotechnol. Lett.*, **33**(2):253-261.



7. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO I



La siguiente tabla muestra los oligonucleótidos utilizados durante la realización de este trabajo. La secuencia diana para una enzima de restricción, caso de llevarla, se encuentra subrayada y en negrita.

Tabla 1 Oligonucleótidos diseñados para la realización de este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→ 3')	USO/DIANA DE RESTRICCIÓN
oProm42XbaI Frwd38	AAAA <u>TCTAGA</u> CCATCACCGCACGG	Directo para la amplificación de la región anterior a TTP0038. <i>NdeI</i> .
oProm42NdeI Rev38	AAAA <u>CATATG</u> CTGTTGAAAGCGCTTGC	Reverso para la amplificación de la región anterior a TTP0038. <i>NdeI</i> .
o38NdeI dir2	AAAA <u>CATATGA</u> CCAAGGCTCGCCC	Directo para la amplificación de TTP0038. <i>NdeI</i> .
o38HindIII revNS	AAAA <u>AAGCTT</u> GGCTCTCACCTCCC	Reverso para la amplificación de TTP0038, sin señal de parada de la traducción. <i>HindIII</i> .
o38EcoRI rev	AAAA <u>GAATTC</u> TCAGGCTCTCACCTC	Reverso para la amplificación de TTP0038. <i>EcoRI</i> .
oMUT38EcoRI dir	AAAA <u>GAATTC</u> CTGGCCAGGGCCTG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0038. <i>EcoRI</i> .
oMUT38HindIII rev	AAAA <u>AAGCTT</u> ACGAGGGAGACGTCTC	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0038. <i>HindIII</i> .
oMUT39EcoRI dir	AAAA <u>GAATTC</u> CCTGGAGCCGGTGG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0039. <i>EcoRI</i> .
oMUT39HindIII rev	AAAA <u>AAGCTT</u> GCCTCGGGGCTTCC	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0039. <i>HindIII</i> .
oMUT40EcoRI dir	AAAA <u>GAATTC</u> CGGGGAGATCCTCCT	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0040. <i>EcoRI</i> .
oMUT40HindIII rev	AAAA <u>AAGCTT</u> GCCGAACATCATGTAG	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0040. <i>HindIII</i> .
oMUT41EcoRI dir	AAAA <u>GAATTC</u> GGGGCAACTACCTGG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0041. <i>EcoRI</i> .
oMUT41HindIII rev	AAAA <u>AAGCTT</u> GGAACGGTGGCCGTG	Reverso para la realización del mutante de inserción en 41 <i>HindIII</i> .
oProm42XbaI Frwd-II	AAAA <u>TCTAGA</u> CGCCGCCAACGACCA	Directo para la amplificación de la región anterior a TTP0039. <i>XbaI</i> .
oProm42NdeI Rev-II	AAAA <u>CATATG</u> GGGAACCTCCTTTTCGC	Reverso para la amplificación de la región anterior a TTP0039. <i>NdeI</i> .
oProm42XbaI Frwd-I	AAAA <u>TCTAGA</u> GAGCTCCTCAAGTACC	Directo para la amplificación de la región anterior a TTP0040. <i>XbaI</i> .
oProm42NdeI Rev-I	AAAA <u>CATATG</u> GGGGAAGAAAAGGGG	Reverso para la amplificación de la región

8. ANEXO I

		anterior a TTP0040. <i>NdeI</i> .
oTTP0042NdeI	AAA <u>CATATG</u> ACCGAGAACGCCGA	Directo para la amplificación de TTP0042. <i>NdeI</i> .
oTTP0042HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> AGGTCTGGGCCCGC	Reverso para la amplificación de TTP0042. <i>HindIII</i> .
oTTP0042NSEcoRIrev	AAAA <u>GAATTC</u> GGTCTGGGCCCGCG	Reverso para fusión de la proteína TTP0042 a sGFP. <i>EcoRI</i> .
oMUT42EcoRIdir	AAAA <u>GAATTC</u> AAGGGCCTCGCCTTCT	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0042. <i>EcoRI</i> .
oMUT42HindIIIrev	AAAA <u>AAGCTT</u> CCCGTTTTCCGTGACG	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0042. <i>HindIII</i> .
oTTP0072NdeI	AAAA <u>CATATG</u> AGGCTGAACCTAGGA	Directo para la amplificación de TTP0072. <i>NdeI</i> .
oTTP0072HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> ATAGAAGGGGGGCA	Reverso para la amplificación de TTP0072. <i>HindIII</i> .
oMUT72EcoRIdir	AAAA <u>GAATTC</u> TAGACCTGGGGCCAG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0072. <i>EcoRI</i> .
oMUT72HindIIIrev	AAAA <u>AAGCTT</u> GGGGTCCGAAGCCAA	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0072. <i>HindIII</i> .
oTTP0220NdeI	AAAA <u>CATATG</u> CGGCTGGACCCCA	Directo para la amplificación de TTP0220. <i>NdeI</i> .
oTTP0220HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> CTACTCCGCGAGAAGC	Reverso para la amplificación de TTP0220. <i>HindIII</i> .
oMUT220EcoRIdir	AAAA <u>GAATTC</u> TGGGGGAGCCCGGGG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0220. <i>EcoRI</i> .
oMUT220HindIIIrev	AAAA <u>AAGCTT</u> TTGTCCACGAGGAGGCG	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0220. <i>HindIII</i> .
oTTP0221NdeI	AG <u>CATATG</u> GCTGTTCCGGAAAAG	Directo para la amplificación de TTP0221. <i>NdeI</i> .
oTTP0221HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> TCATCCTCCACCTCCA	Reverso para la amplificación de TTP0221. <i>HindIII</i> .
oTTP0222NdeI	AAAA <u>CATATG</u> AGGGTGGAGAAGGC	Directo para la amplificación de TTP0222. <i>NdeI</i> .
oTTP0222HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> CACCAGCCACCTC	Reverso para la amplificación de TTP0222. <i>HindIII</i> .
oMUT222EcoRIdir	AAAA <u>GAATTC</u> CGGGGGTGGCGGCTTTG	Directo para la realización del mutante de inserción en TTP0222. <i>EcoRI</i> .
oMUT222HindIIIrev	AAAA <u>AAGCTT</u> CCACCACCTTCCCTTGG	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTP0222. <i>HindIII</i> .
oTTC0552NdeI	AAAA <u>CATATG</u> GAGAGCGTCACCCG	Directo para la amplificación de TTC0552.



		<i>Ndel</i> .
oTTC0552HindIII	AAAA <u>AAGCTT</u> CTACTTTAAGTTTAGCAC	Reverso para la amplificación de TTC0552. <i>HindIII</i> .
oTTC0107Ndel	AAAA <u>CATATG</u> TGGTGGAAGAGGCG	Directo para la amplificación de TTC0107. <i>Ndel</i> .
oTTC0107HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> CTAGTCTAGCCGACC	Reverso para la amplificación de TTC0107. <i>HindIII</i> .
oMUT107EcoRI dir	AAAA <u>GAATTC</u> GACTGGTACATCTGGA	Directo para la realización del mutante de inserción en TTC0107. <i>EcoRI</i> .
oMUT107HindIII rev	AAAA <u>AAGCTT</u> GGGGGTCCGCTCGGG	Reverso para la realización del mutante de inserción en TTC0107. <i>HindIII</i> .
oTTC0904Ndel	AAAA <u>CATATG</u> AAGCGGCTTATCGCGCT	Directo para la amplificación de TTC0904. <i>Ndel</i> .
oTTC0904HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> CAAGCCGCACCCG	Reverso para la amplificación de TTC0904. <i>HindIII</i> .
oTTC1198Ndel	AAAA <u>CATATG</u> GACCTGGGGGTGGA	Directo para la amplificación de TTC1198. <i>Ndel</i> .
oTTC1198HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> AGGCCTCCCGCCACA	Reverso para la amplificación de TTC1198. <i>HindIII</i> .
oTTC1283Ndel	AAAA <u>CATATG</u> AACCACCAGACCTGGA	Directo para la amplificación de TTC1283. <i>Ndel</i> .
oTTC1283HindIII	AA <u>AAGCTT</u> CACTCCGAGGGCTCAAAG	Reverso para la amplificación de TTC1283. <i>HindIII</i> .
oTTC1341Ndel	AAAA <u>CATATG</u> CACCTTCTCCTCT	Directo para la amplificación de TTC1341. <i>Ndel</i> .
oTTC1341HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> ATTGCAAGTAGTTATCAC	Reverso para la amplificación de TTC1341. <i>HindIII</i> .
oTTC1494Ndel	AAAA <u>CATATG</u> GAAGGATTTCCGGTTAGG	Directo para la amplificación de TTC1494. <i>Ndel</i> .
oTTC1494HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> CTAAAGGGGCCGCC	Reverso para la amplificación de TTC1494. <i>HindIII</i> .
oTTC1787Ndel	AAAA <u>CATATG</u> CTCCAGCGCGCCC	Directo para la amplificación de TTC1787. <i>Ndel</i> .
oTTC1787HindIII	AAA <u>AAGCTT</u> AGAGTAGCCCAAGGACC	Reverso para la amplificación de TTC1787. <i>HindIII</i> .
oTTC1828Ndel	AAAA <u>CATATG</u> AGGGCGTGGCTCT	Directo para la amplificación de TTC1828. <i>Ndel</i> .
oTTC1828HindIII	AA <u>AAGCTT</u> CTAAGGCCAGGCCACG	Reverso para la amplificación de TTC1828. <i>HindIII</i> .
oTTP0039Frwd	ATGATTAAGAAAGCGCTTCAAG	Para comprobación del mutante de

8. ANEXO I

		inserción de TTP0039.
oTTP0040Frwd	ATGAGGACCTTCTGGCG	Comprobación del mutante de inserción de TTP0040.
oTTP0041Frwd	ATGCGTGAGGAACGATGG	Comprobación del mutante de inserción de TTP0041.
oαPACSPSNdel	CGC CATATG CTGGAGGGGCTTTCC	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> sin el péptido señal. <i>Ndel</i> .
oαPACEcorervStop	AAAG GAATTC TTAGGTGGGGGCGTCT	Reverso para amplificar el fragmento a del gen <i>pac</i> . <i>EcoRI</i> .
oαPACNdel2	AAAA CATATG AAGCGCTTCTTGCGG	Directo para la amplificación del gen <i>pac</i> . <i>Ndel</i> .
oβPACNdel	AAAA CATATG AGCAACAACCTGGGTGGTG	Directo para amplificar la región β del gen <i>pac</i> . <i>Ndel</i> .
oβPACEcorevSTOP	AAAG GAATTC TTAAGGCGAAGGAAGGGG	Reverso en la región β del gen <i>pac</i> . <i>EcoRI</i> .
oPACXbaIRBSdir	GAGGT TCTAGA GGAGGTATGGTATGCT	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> con su RBS. <i>XbaI</i> .
oPACXbaISPSRBSdir	AAAA TCTAGA GGAGGCGCATCATGCTGGAGGGGCTTTCCG	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> con su RBS y sin péptido señal. <i>XbaI</i> .
oPACEcoRIrevSTOP	AAAA GAATTC TTAAGGCGAAGGAAGGG	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> . <i>EcoRI</i> .
oPACEcoRIrev	GAGG GAATTC AGGCGAAGGAAGGGGCT	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> sin señal de parada de la transcripción. <i>EcoRI</i> .
oPACNdel-3	AAAA CATATG CTTTTTCCAACCATGA	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> desde el primer ATG. <i>Ndel</i> .
oPACNdelIRBSdirII	AAAA CATATG TAAGGAGGTATGGTATGC	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> con un terminador de la traducción para fusiones con la sGFP. <i>Ndel</i> .
oSPPACEcoRIrev	AAAA GAATTC CAGGGCGATGCGGCCT	Reverso para amplificar el péptido señal de la <i>pac</i> . <i>EcoRI</i> .
oΔ10EcoRIrev	AAAA GAATTC TTACCTCCCAAAGGAGCC	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 10 aa delecionados. <i>EcoRI</i> .
oΔ20EcoRIrev	AAAA GAATTC TTAGAGATAATCGCCGCGCT	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 20 aa delecionados. <i>EcoRI</i> .
oΔ30EcoRIrev	AAAA GAATTC TTAGAGGTCCGCGTAGTGG	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 30 aa delecionados. <i>EcoRI</i> .
oΔ40EcoRIrev	AAAA GAATTC TTAGCCCGACTGGCCATA	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 40 aa delecionados. <i>EcoRI</i> .
oΔ60EcoRIrev	AAAA GAATTC TTACTGGCGGTAGCTCGGC	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 60 aa delecionados. <i>EcoRI</i> .
oΔ80EcoRIrev	AAAA GAATTC TTACACCGTGTACCGGTCC	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 80



		aa deletados. <i>EcoRI</i> .
oΔ100 <i>EcoRI</i> rev	AAAA GAATTC TTAGTGGGTGAGGACGGCG	Reverso para amplificar el gen <i>pac</i> con 100 aa deletados. <i>EcoRI</i> .
oUpPAC <i>HindIII</i> dir	AAAA AAGCTT GGTGGAGAGGACCAGGG	Directo para amplificar la región anterior al gen <i>pac</i> . <i>HindIII</i> .
oUpPACS <i>Sall</i> rev	AAAA GTCGAC CATACCATACCTCCCATG	Reverso para amplificar la región anterior al gen <i>pac</i> . <i>Sall</i> .
oDownPACS <i>Sall</i> dir	AAAA GTCGAC CTATGGGCCAGTCGGG	Directo para amplificar la región posterior al gen <i>pac</i> . <i>Sall</i> .
oDownPAC <i>EcoRI</i> rev	AAAA GAATTC GGGGAGGGTTATCCGGT	Reverso para amplificar la región posterior al gen <i>pac</i> . <i>EcoRI</i> .
L279F	AACGACCCCACTTCGCCCTCCAGG	Para la generación de la mutación L279F en el gen <i>pac</i> .
L279F_antisense	CCTGGAGGGCGAAGTGGGGTCTGTT	Para la generación de la mutación L279F en el gen <i>pac</i> .
I312F	CCGGCGTCGTCTTCGGGCGGAAC	Para la generación de la mutación I312F en el gen <i>pac</i> .
I312F_antisense	GTTCCGCCCGAAGACGACGCCGG	Para la generación de la mutación I312F en el gen <i>pac</i> .
oUpPAC200	ACCAAAACCCCGCGCGG	Para la secuenciación del gen <i>pac</i> .
βSec	AAAGGGAGGTGGGGGAGG	Para la secuenciación del gen <i>pac</i> .
<i>NdeI</i> - <i>EcoI</i> PACfbis	CGACGCCATATGAAAAATAGAAATCGTATGATC	Directo para la amplificación del péptido señal de <i>pac</i> de <i>E. coli</i> . <i>NdeI</i>
colaAla25 <i>EcoI</i> PACr	GGCAGGGAAGCCAGTGCAGGTAAG	Reverso para la amplificación del péptido señal de <i>pac</i> de <i>E. coli</i> .
colaSer33TthPACf	TGCACTGGCTTCCCTGCCCAAG	Directo para amplificar el gen <i>pac</i> de <i>T. thermophilus</i> sin péptido señal y fusionarlo con el de <i>E. coli</i> .
oPIII <i>HindIII</i> dir	AAAA AAGCTT TACTAGAGGAGGGCGT	Directo para el clonaje de <i>PceI</i> . <i>HindIII</i> .
oPIII <i>XbaI</i> rev	AAAA TCTAGA CTTTGCCCGGAGT	Reverso para el clonaje de <i>PceI</i> . <i>XbaI</i> .
oPIIIFrw	CAGATCCCGGGCGCGA	Directo para la amplificación de <i>PceI</i> .
oPIIIFrw2	CCTAAAGGGGTGGGCGCC	Directo para la amplificación de <i>PceI</i> .
oPIIIDY-782Rev	CTTTGCCCGGAGTATAGCATC	Reverso marcado con un fluoróforo para amplificar <i>PceI</i> añadiendo el fluoróforo en 3'.
M13Directo	GTAAAACGACGGCCAGT	Directo utilizado para la secuenciación de clonajes realizados en vectores pUC y derivados y para comprobación de mutantes de inserción.

8. ANEXO I

M13Reverso	AACAGCTATGACCATG	Reverso utilizado para la secuenciación de clonajes realizados en vectores pUC y derivados.
T7Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Utilizado para la secuenciación de clonajes realizados en vectores pET22b(+) y pET28b(+) y derivados.

ANEXO II

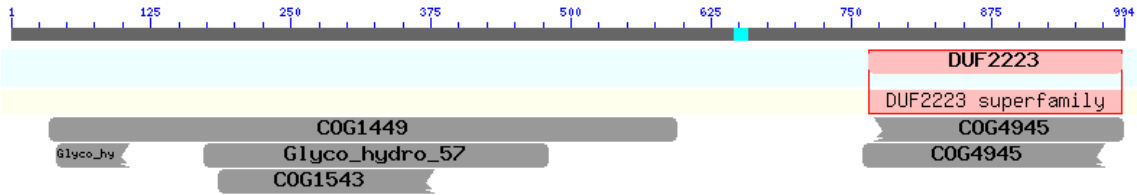


9. ANEXO II

```
TTC1198      GHlafARGP----HLAVVNAsPpFRQDFpLHGvFpRgGRAVDLLSgEVCTpQgGRLCGP 403
AmyA         GHlafARGP----YLVVVNAsPpFRQDFpLHGvFpRgGRAVDLLSgEVCTpQgGRLCGP 462
AmyA2        GHlafARSHGTESVVAVNAAPEpWRAQIpLHGvFpRgGRAVDLVSGREGRCVGGYLEGG 470
Np16503      NYLIYKKTdGDEtVLVIINrSDQ--KADIPIp-LDARGTWLVNLLtGERFAAEAtLCTs 574
.:* : :      :. :* : . : : :* : . .*  *:*:*.* . *
```



```
TTC1198      VLPPFSLALWREA-- 416
AmyA         VLPPFSLALWREA-- 475
AmyA2        GLEPFSLAVWRVQG- 484
Np16503      -LPPYGFVLYAIERW 588
* * : : : : :
```

TTC1828: Amilopululanasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TaqDRAFT_3658: Glicósido hidrolasa de la familia 57 [*Thermus aquaticus* Y51MC23]

Tmel_0803: glycoside hydrolase family protein [*Thermosipho melanesiensis* BI429]

PF1934: Amilopululanasa [*Pyrococcus furiosus* DSM 3638]

TTC1828	-----	
TaqDRAFT_3658	-----	
Tmel_0803	MKKVVFILLIFSIFSFSSVFNENGEVIFTFKKALDAKVVYLAGTFNNWSPNSLAMEKEGN	60
PF1934	-----	
TTC1828	-----	
TaqDRAFT_3658	-----	
Tmel_0803	VWKISLKLEPGTYQYKYVIEGTNWKEDPEAPGYVDDGFGGKNGIFTLAKKDGELIILKSE	120
PF1934	-----	
TTC1828	-----	
TaqDRAFT_3658	-----	
Tmel_0803	TKKSESSYEKNEKFDKGMFIDEEGYVIRFEYKGYVVTIAGNFNNWNAEDTECYEIDD	180
PF1934	-----	
TTC1828	-----MRAWLWKPQEPEYGGDTVKKRFWAAVFLLA-----	31
TaqDRAFT_3658	-----MGKWLP-----ALALTG-----	13
Tmel_0803	GIWEAVLELEEGDYQYKFVVGKDWVTDPNALAFVDDGFGGKNGFFQVFKVNGKLTIGLK	240
PF1934	-----MSRKLSLLLVFLIFGSMGLGANNIVKAE-----	27
TTC1828	--TGLAQPLKVAILWHQHQPYPENPLTGQYEGPWVRMHGVNDYPWMAEVLLEFPEVKVSF	89
TaqDRAFT_3658	--LALAQPLKVIVLWHQHQPYPENPVTEGQYEGPWVRMHGTNSYPWMAEVLKEFPEIKVTF	71
Tmel_0803	EESTKAKPLNVAI IWHHHQPLYKIPGEEQFMMPVWRTHGVNDYPYMDLVKYLKTKGVTF	300
PF1934	----EPKPLNVI IVWHQHQPYYDVPVQGIYTRFPWVRLHAANNYWKMAHYLTFEPDIHVTI	83
	:***: * :***:*** * * : **** *..* * ** : : *::	
TTC1828	DYTSTLLKQIQDYLSGKAKDAYWRVSEKPA--SALTPEERAFVVER-----	133
TaqDRAFT_3658	DYTSTLLKQIEDYLSGKAKDAYWRVSEKPL--GQLSQEERAFIVER-----	115
Tmel_0803	NLVPSLLLQIEDYLKG-QLDEYQRLSLN----ENLTQEKQFLINH-----	341
PF1934	DLSGSLIAQLADYMNG-AKDIYQI ISEKIANGEPLTYDEKWFMQLQAPGGFFDHTIPWNGE	142
	: *: * : **:. * * * : * * : ** : *::	
TTC1828	-----FFDINPRFVAESPRYQELQAKR---NRGEAFTDQDLTDLRVLWN	174
TaqDRAFT_3658	-----FFDINPRFVEKSPRYKELQAKK---IRGETFADQDLQDLRVLWN	156
Tmel_0803	-----FFDINPQFVNAHERYKELMEKK---VSGEEFTDQDLDLKVCWN	382
PF1934	PVTDENGNPIRDFWDRYTELKDKMLAAKQKYANLPLEEQKVAVTNEFTEQDYIDLAVLFN	202
	: : : : : : : * : * : : * : ** ** * : *	
TTC1828	LLWINRDYIAKDPRLRALREKD--RGFSQEDLNIVLKKHLELMATILPLHR---TLWERG	229
TaqDRAFT_3658	LYWINVDYIERDPGLKALYRKD--RGFTQEDLAYVLKKHLELMATILPLHR---ELWERG	211
Tmel_0803	LYWINIEYINQDERLKSLSLTSK---KHYTEKDLIYVLDYHKKLLSEIVEKYK---TLWDND	436
PF1934	LAWIDYNYIISTPELKALYDKVDEGGYTREDLKTVLYHQMWLLNNTFKEHEKINLLLGNG	262
	* ** : ** * : ** * : : ** ** * : * : . . * .	
TTC1828	QIDLLTTPYYHPILPILLDREAIRESNPTLALPKEPIAWPEDARWQVRSYGKAYFRELFG-	288
TaqDRAFT_3658	QIDLITTPYYHPILPILIDKEAIRESNPALALPKEPIAWPEDARWQVRAGRDYFQKLFG-	270
Tmel_0803	KVELITTPFYHPILPILVD-----MGWKDDAVIQIKEGLSYFEKIFG-	478
PF1934	NVEVTVPYAHPIGPILND-----FGWSEDFDAHVKKAHELYKHYLGG	305
	: : : . . * : ** ** * : . * : * : : . : : * :	
TTC1828	--REPLGMWPPGALSQKAAELYAEEGIRFLVTDEAVLGKSGLPVNPLT-LTRPYHVEKD	345

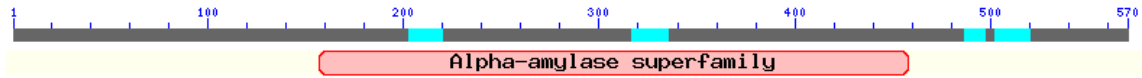


TTC1828 -----
TaqDRAFT_3658 -----
Tme1_0803 -----
PF1934 ETPTQTETQTPETETRTETKTPETTTTTPTETKETPTQTTTTQPARETQGGICGGLIV 1102

TTC1828 -----
TaqDRAFT_3658 -----
Tme1_0803 -----
PF1934 LLAALGVLRRRS 1114



9. ANEXO II



TTC1283: Maltodextrin glucosidasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TaqDRAFT_3693: Región catalítica de α -amilasa [*Thermus aquaticus* Y51MC23]

TSC_c23400: Maltodextrina glucosidasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

Mrub_1114: Subunidad catalítica de α -amilasa [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

Mesil_1167: Región catalítica de α -amilasa [*Meiothermus silvanus* DSM 9946]

```

TTC1283          -MNHHDLE--HADPPFPELGEVEVLFLETEAREGVLLYERDQKPKMPAWERGLKARV 57
TaqDRAFT_3693   -MNYHDLE--HLSPPFPRLGEEVAIFLETEAQEGLLLYEKDGVEVLQKPMARVPGGLKAQV 57
TSC_c23400      MAHYHDLE--HIHPPLPELGEVTLTYLETEAEGLLLYEKDGVEIHKKPEMPEAKGGLRVRV 58
Mrub_1114       MRHYHDWEFPCVDPDKPELGEQETLRLRTPARAGFLILERYGEVERRPMKAVPGGLEIRL 60
Mesil_1167      -MHYHDWEFPCVSPMTPELGAEVTLRVRTSAKAGVLLLERFGEVERRPLQAVPDGLEITL 59
                ::* *      * *.* * : : . * * . *.* : * : * : : * :      * * . :

```

```

TTC1283          PVHASPFRYCFRLPQG--YLGSHGLERTLPRYDRFFHLLAKPLPPEWALGAVFYQIFPDR 115
TaqDRAFT_3693   TVAQSPFRYLFRLEPEG--YWGSHGLEKALPRYDRFFHLLAHPLPPEWALGTVFYQIFPDR 115
TSC_c23400      PVHVSFPRYCFLLPEG--FLGSHGLEKTLPRYDRFFHLLAGSLPWWALGTVYQIFPDR 116
Mrub_1114       PLHTSPLRYCFRLTEEKAYLAADGLQGMPRYDKFFHLLAQPTVPDVAWGAFFYQIFPDR 120
Mesil_1167      PMHASPIRYCFRLPEEKVYLTSGGPSSTMPRYDRFFHLLSAPVPEWAVGAVFYQIFPDR 119
                . :  * : * * * * * . : : : * . . : * * * : * * * : * : * * * * *

```

```

TTC1283          FRQGRPELAPKEGAWLYGGRPIRKKAWHEPPGEDG----REFYGGDLFGVLEALPYLEAL 172
TaqDRAFT_3693   FRQGPKDLAPQDGAWLYGKPIRKKAWHEPPGPDGS---REFYGGDLFGLEALPYLQDL 172
TSC_c23400      FRQGRKELAPKDGWLLMGRPIRKKAWNEPPGPEGA---WEFYGGDLWGILEALPYLEAL 173
Mrub_1114       FRNGNPHNDPQSGEWVYMGRIPIVKEWDEPVSYGPEGPIQHYGGDLEGLEKLDYLEAL 180
Mesil_1167      FKNGDPSNDPKDGEWIYMQKIVKKAWDDPVDLKIG--PLQHYGGDLEGIQALQALQEL 177
                * : * *      * : * * : * * * * . . . . : * * * * * * : : * * * : *

```

```

TTC1283          GVEALYLTPIFQSPSSHRYDTEHYRVDPHLGGEEALRALYEALARGMKLILDGVFNHV 232
TaqDRAFT_3693   GVETLYLTPIFQSPSSHRYDTEYLRVDPHLGGEEALKALYQALEARGMKLVLDGVFNHI 232
TSC_c23400      GVEALYLTPIFQSPSSHRYDTEYLRVDPHLGGEEALRALYQALEARGMKLVLDGVFNHV 233
Mrub_1114       GIEALYLNPIIPSGSNHRYDASDYHNVDPHLGGNPAFEKLVLEALHQRGMKLVLDGVFNHI 240
Mesil_1167      GIEALYLTPIIPSRSNHRYDGLDYLNVDPYLGNEAFDRLVADLHAHLKIVLDGVFNHI 237
                * : * * * * * : * * * * * * * . * * * * * * : * : * * * . : * * * * * :

```

```

TTC1283          GATHPWFQKALKDPSSPERGMFTFFPDGYSYASFWGVKHPKLDYASALTQERFVFGKEAP 292
TaqDRAFT_3693   GATHPWFQRAL-DPMSPERAMFTFFPDGTYASFWGVRQMPKLDYASPLTQERFVFGKRAP 291
TSC_c23400      GATHPWFQALKDPSPERSMFTFFPDGYSYATFWGVKSMPKLDYASPLTQERFVHGPRAP 293
Mrub_1114       GNTHPDFQKALQDPTSPEAQFTFYADGSYAAFYGVKTLPKLDYANPLTVERWIDGYHAP 300
Mesil_1167      GDAHPDFQKALHDPDSPEASQFTFHADGSYASFMGVKTLPKLDYASPLAVERWLDGYHAP 297
                * : * * * * * * * * * * . * * * * * * * * * : * * * * * . : * * * * *

```

```

TTC1283          VRYWMRL-AHGWRDLVAHSIGEGGTNRKNARWLRALARAAKEEREDALVFGELSYDVTPT 351
TaqDRAFT_3693   IRHWMRL-CHGWRDLVAHAIGEGGTNRKNARWLRALARAAKEEREDAFVFGELSYDVTPT 350
TSC_c23400      IRYWMRL-AHGFRDLVAHSIGEGGTNRKNARWLRALARAAKEERPEAVVFGELSYDAIPT 352
Mrub_1114       VRHWIRKGDGWRDLVAHQMGEGGTDRRNEILRLIKHNSMEENPEALVFGELFFDFTLPT 360
Mesil_1167      VRHWLRKGDGWRDLVAHQIGEGGTDRHNLRLIHRNSREENPEAFVFGELFFDSTNH 357
                : * : * * . . : * * * * * : * * * * * * * . * * : : * * . : * * * * * : * :

```

```

TTC1283          LRAHTLDGAMHYAGFAHPVMEWLSGRDLHGPNVALEAEELWRALFDHYAALPLQLRHAMY 411
TaqDRAFT_3693   LRAHTLDGAMHYAGFAHPVMAWLSGRDVHGLPAPLGAHEVWQVLHDHYAALPLQLRHTMY 410
TSC_c23400      LRAHTLDGAMHYAGFAHPVMEWLSGRDVHGRPVHLDAQETWRVLDHYQALPVQLRHSMY 412
Mrub_1114       LRAHTLDGSMHYAGFANPVMWLSGKNVYGVWVAVSSQAAWDTLWDHYTALPLQLRQSMY 420
Mesil_1167      LRAHTLDGSMHYHGFAANLLEWLSGRNIYGEVEVVSASEAWQLTLDHYAALPLQIRQTM 417
                * * * * * * * * * * : : * * * * * : * : : * . * * * * * * * * * * : *

```

```

TTC1283          TLLSSHDIPRALWRLRGDKERFKTAYALLFAFPGPSAVYYGDEVGLSQPNPYEVWRGDPY 471
TaqDRAFT_3693   TLLSSHDIPRALWRLRGDKERFKLAYALLFAFPGPSAIYYGDEIGLSQPNPYEVWAGDPY 470
TSC_c23400      TLLSSHDIPRALWRLKEDVERFKLAYALLFAFPGPSAIYYGDEVGLSQPNPYAKWQGDY 472
Mrub_1114       TLISSHDIPRALWRLSGDVQRFKLALGLLFTFPAGPLYYGDEIGLDQANPYHDWNGDPM 480
Mesil_1167      TLLDSHDVPRAFWRRLRGDVELYKMALGILLTFPGAPGLYYGNEIALNQSNNPYEVWNGDPM 477
                * * : * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * *

```

```

TTC1283          CRAPFPWDEALWDKDLLAFLRRLILLKKTHPALRLGGLLPLKAPPVLAFFFFRRHRGKEVW 531

```



```

TaqDRAFT_3693      CRAPFPWDEAAWDRNLLRFFKRLVHLKTHPVLRRQGGLLPLEAPEGVLAFRRRWRGKEVL 530
TSC_c23400         CRAPFPWEESAWNLEVLTLIRRLVKLRTHPALRLGGLLPLEAGKGVLAFRRRYQGQEIW 532
Mrub_1114          CRGTFPWDERRWNHEVLAWVKTLIRLKKSPALRRGGLLPLQVTEQCCLAFRRMYQGEEVW 540
Mesil_1167         CRGSFPWDESKWNREVLWTRRLIHLRKNTPALRRGGLLPLQAPTGAIAIKRVYQGQEVW 537
                   **..***:*  * : :*  : * : * : . * . ** ***** : .  : * : *  : * : * :

TTC1283            AFFAKEEVRLSLPRGVDLLSGREVAGEVEARYLLFEPSE- 570
TaqDRAFT_3693     AYFAKEGARLRVPQGVDLLTGQEVAGEVEARYLLLEPVS- 569
TSC_c23400        AFFAPEGARLTLPPIGLIAEKEVAGEVETSFLLFQPV-- 570
Mrub_1114         VYAALEPLEVVLPRVENLLTGQTQTGRVRLSGLGVFRLQ 580
Mesil_1167        VYAAPFPVRLELPPSQNLLSGEKMGGRAVVHGLGVFQIT- 576
                   . : *      . : :*  : * : .  * . .  * .

```



9. ANEXO II



(1) Sitio de unión de azúcar de la familia 2 de las glicosil hidrolasas.

(2) Dominio barril TIM de la familia 2 de las glicosil hidrolasas.

TTP0220: β-galactosidasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TSC_c19250: β-galactosidasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

Trad_0718: proteína de unión a azúcares de la familia 2 de glucosidasas [*Truepera radiovictrix* DSM 17093]

Dgeo_2104: Familia de proteínas glicósido hidrolasas [*Deinococcus geothermalis* DSM 11300]

```

TTP0220      -----MRLDPNHPRPTLQRPGWRSLEGHWFDFALSEAEA---PGGVRFD 40
TSC_c19250   -----MKLDPNHPRPTLQRPGWKSLEGPWNFSLNEAED---PKKVRFD 40
Trad_0718    MDDTPAVPPEPHREAPAGVVDAAYPRLRRAAWRSLDGPWRLAFGD-AR--TPEAVVWT 57
Dgeo_2104    -----MHDEHYPRPQLRRAHWRDLGGRWAFAYDDGARWQTPDEVHFD 42
              * :*** *:* . :.* * * * : : . : * * * :

```

```

TTP0220      RKILVFPFPEAPGSGVGEA-WVGVAVYRKVLRAK----PRPGRR-LFLRFGAVDYRAEVF 94
TSC_c19250   RTIRVFPFPEAPGSGVGEA-WVQVAVYRKVLRIK----PRPSLR-LFLRFGAVDYRAEVF 94
Trad_0718    HEITVFPFPEASAASGIGDGFHPVVWYERFPTVP----PTWAGRRVLLHFGAVDYAATVW 113
Dgeo_2104    REIIVFPFPEASAASGVDPASHPVVWYGTRELVTEDEPRPRGERLLHFGAVDYRARVW 102
              : * * * * * : . : * * * : * . * * : : * * * * * * * * :

```

```

TTP0220      VNGVRVLEHEGGHTPFGLDLTPFLER----PVEVLVRAEDDPLDPEAPRGKQ-ALGEPGG 149
TSC_c19250   LNGARVLEHEGGHTPFGLELTSFLER----PLEVLVRAEDDPSDPEKPRGKQ-ALGEPGG 149
Trad_0718    VNGHLVATHEGGHTPFWADITDALRGEPEGAEQRTVRAEDDPLDHLKPRGKQDWLKEPHA 173
Dgeo_2104    VNGQLVAEHEGGHTPFASADVT-ALAG--GPELRIVVRAEDDPHDLAQPRGKQDWKEQPHS 159
              : ** * * * * * * * : : * * * * * * * * * * * * * * : : * .

```

```

TTP0220      IFYPRTTGIWQPVWLEWVPESHIAALRLTPDLKALGFHLEVQ-----AHGEGEAVEVALF 204
TSC_c19250   IFYPRTTGIWQPVWLEWVPESHIAALRLRPDLEALGFHLEVQ-----AVGEGDAVEVALF 204
Trad_0718    IWYRPTTGIWQSVWLEPVGEARVSGLRVTPDVAHFSLLEVSCALPSASGAEPGIAPGGE 233
Dgeo_2104    IWYRPTTGIWQPVWLESVSQTYLHELRLWTPDLREELRLQVR-----LNGAPP-----HP 209
              * : * * * * * * * * * * * * : : * * * * : : * : * * *

```

```

TTP0220      PGVRGEAPLGEAPWLEARFPLLGERASGFLG-----LPAKGSPEGLLWRPETPVLFPL 257
TSC_c19250   PGVRGEV-LREKPWLEARFPLVGLLARGFLG-----LPLKEEVGAILWRPENPVLFPL 256
Trad_0718    LTLEFTLRGEEVLARDTAALSARGAHTVRRTLHLDDPGIDDARAHLLWSPESPPTLLEL 293
Dgeo_2104    LQLRVRLSLRGRPLAQQTVALSQRQGSVLP----LNHTPLNPERQDLLWSPRHPNLIDA 265
              : . . . . * . . . . : . . . . : * * * . * * * :

```

```

TTP0220      RLRLLSG-RRVLDEVYSYGGRLREVAQKGVFLNNGEYPFRLVLDQGLWPEGHLAPPPLA 316
TSC_c19250   RLRLLSG-RRVLDEVYSYGGRLREVSARQGVFFLNREYPFRLVLDQGLWPEGHLAPPGLE 315
Trad_0718    DVVLRRE-GEVLDRVASYTALRSVEVRGGHFFLNGRPYFLRLALDQGYWDDTLLAAPSPE 352
Dgeo_2104    EVALLSGAVVDEVRSYAGMRSVEVQGGFRLLNGHPYLRVLAQNYWPESHLPATPSPE 325
              : * * * * * * * * * * * * : : * * * * * * * * * * * * :

```

```

TTP0220      ALRRDAALAKALGFNGVRKHQKVEDPRYLHLADRLGLLVFAEMPSFFRFSPKAARRYLAE 376
TSC_c19250   ALRQDILLAKALGFNGVRKHQKLEDPRYLHLADRLGLLVFAEMPSFFRFSPKAARRYLAE 375
Trad_0718    ALRKDVELAKAMGFNGVRKHQKLEDPRYLFWADRLGLLVWTELPAYAFSPQTAARLTRE 412
Dgeo_2104    ALRREAELVKALGFNGVRIHQKIEDPRFLYWCRLGLLVWGEAANAYRFTDESCERLTRE 385
              * * * : * * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * :

```

```

TTP0220      LAEALERDRNHPSLVAWILFNEGWGLTPWR--AETLAFQGAFLARALDPTRLLVDNDG 434
TSC_c19250   LVAALERDRNHPSVAVVWVFNESWGLWPWG--PEARSFLQGVFFLARSLDPTRLLVDNDG 433
Trad_0718    WLEAIARDYNHPCVAVVWVFNESWGVDPDLPLVAAQRHLVLAALYHLAKSLDPHRPVVNDG 472
Dgeo_2104    WLEALRRDYSHPICVAVVWVFNESWGVNLERDPAQRAFVKGLYHLTRALDPTRPVVANDG 445
              * : * * * * * * * * * * * * : . . . : * * * * * * * * * *

```

```

TTP0220      FEHGFWDLLTVHDYAP-PEVLARRYGEG-----LPEAPMGRPLALAGLPPG-----V 481
TSC_c19250   FEHGSFWDLYTVHDYAP-PEVLARRYRQKP-----FPLTPMGRPLSWEALPEG-----V 481
Trad_0718    WEH-VVTDLLTIHDYSRDPETLARRYGTRAAQESSVHVRPAGREVVLTGFEEAVNVREA 531
Dgeo_2104    WQH-VAGDILGIHDYALEGAVLRERYGTPEAIERTFAHVQPHFRNLLTAGHTRG-----EE 500

```



```

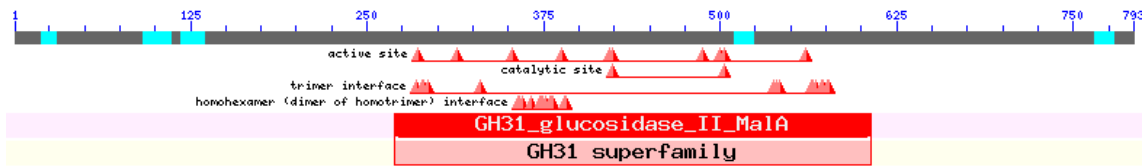
::*      * : :***: . * **          * * : . .
TTP0220      RPFLSEFGGLRLKGP--GPGWGYREAE GEEAFLREALRYLETACGSR-LSGFCYTQLYDT 538
TSC_c19250   RPFLSEFGGVRLKGS--TPGWGYREVEGEEAFLQEVLRYLEVACESL-LSGFCYTQLYDT 538
Trad_0718    PIVLSEFGGVRYAPPQAGQGWDQVESEEEALLARYRALIAAASEAG-LAGFCYTQFADT 590
Dgeo_2104    AVMLTEFGGLSIRPGEGERWWGYGTVGTPEAFLEKYGDLVGAVLDCESLAGFCYTQLTDT 560
             .*:****:          *** . **:*. : .. . *:*****: **

TTP0220      FQEENGLLDFWRRPKVPPERVR-----AFLEGC 566
TSC_c19250   FQEENGLLDFWRRPKVPPERVR-----AFLEGC 566
Trad_0718    FQEENGLLYSDRRPKLPLEAL-----YEAT 615
Dgeo_2104    EQETNGLLTASRQPKFDLAAARAINTRPSRAVPGDVLNEIHQAAQEDRRRLAGSQEPP 620
             ** ***** *:*. *

TTP0220      EARLLAE 574
TSC_c19250   EARRVLWE 574
Trad_0718    AQRH--- 620
Dgeo_2104    VQPQHS- 627
             :
    
```



9. ANEXO II



TTP0221: α -glucosidasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TSC_c19240: α -glucosidasa 2 [*Thermus scotoductus* SA-01]

PCC7424_1902: α -glucosidasa [*Cyanotheca* sp. PCC 7424]

alr5331: α -glucosidasa [*Nostoc* sp. PCC 7120]

AGL2_BACTQ: α -glucosidasa [*Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071]

```

TTP0221      MAVPGKGLGKKLWSAAEMAALLGPGILLLAVRYARERDRWTPRDPLPPWQGVGRVQGLEA 60
TSC_c19240   MGAPRKGLLKKLWNAVETVALLGPGVLLLAIQYARKRDRWEKAPFLPWQGVGKPLGLKA 60
PCC7424_1902 MDLYKQAVLR--FRYVRLKRFLGS--LFYSWQRDRLEKRYRPNPPEPTQKPEKCLQAES 56
alr5331      MDILNKTLN--LRTIKLRRFFGS--LLYPLQRDWLERQFLKPTLEAVEETGEVYKAEA 56
AGL2_BACTQ   -----MLEDTSFAIQPEQDDKTQETHRIDIGNMHTF5H 33
              : . . . . .

TTP0221      IPGGVVRVFAEAELEAVFLGEDLLRLTWSP-GEALPPYALAE--EASPLEPERLRGPDGV 117
TSC_c19240   IPGGVVRVFQEVELEAVFLGEDLLRLTWFP-GEAVPPYALAEAGEASPFEPERQ--EGG 116
PCC7424_1902 TERGGYFKFEGAELEIRFLTPDFVQIDWKP-GKIPIAYGIAC--KDWPTVETTFEQGENQ 113
alr5331      TKSGGQFNQHFEELEICFLSADLVRVWKP-GILPIAYGISR--NAWPEVETTFQETEK 113
AGL2_BACTQ   TEHVFSFHCDTGIVKIRFYREDIVRIAFNPFGETSLSTSVAVVKEPEKVDASVHETEEV 93
              ..  : : * * : : : : * * . . : : :

TTP0221      LLLRTRRLALALGEEG-LEVRDGEGRLLRQEAYPER-----AGRAWRHRVRLAPGER 168
TSC_c19240   RLLRTPHALAVVEEG-LTFWDGAGRLLRQEAYPER-----SGRAWRHRVHLAPEER 167
PCC7424_1902 WSVSSNTLQILVSQEGSLTFKTLQDLGQLIREEYPPQR-----KGEEWLHQAKLQPC 165
alr5331      WTISSSQLKVIVNVVDGSLKFQNSLRLLTLEELPPQRQTKLSHLGKEEAWIHQAKLRPE 173
AGL2_BACTQ   TLTSAKQTVVLQKRPFRVRIYDNHGRLLVAEGKKGMAFT-----YQGEVCCFKMMDEAD 148
              : : : . : * : : :

TTP0221      VGLGERAYPLDRRGA-----FRLWNRDPGGSYGPGEDPLYLSVPVWLSLLPQGGY 220
TSC_c19240   VFGLGERAYALDRGGV-----FRFWNQDPGGSYGPGEDPLYLSVPLWLSQKLEGGY 219
PCC7424_1902 IYGLGERAAPLNLRATPKSEKEARSYRMWNYDMGGKYGPGADPLYLCIPVYLGHSGG 225
alr5331      IYGLGERAAPLNLRATCG-NEEETRYRMWNYDAGGIYGTGTDPYLYCIPVYLGHEEG 232
AGL2_BACTQ   FYGFGEKTGFLDKRGET-----MTMWNNTDVIYAPHNPETDPLYQSHFYFMTVRNG 200
              . * : : : : * : * : : * * . . . . * * * * . * : : . .

TTP0221      LAFYENPAEGFADLRGEEAWVGF--LGGAFRYYLIPG-PLAALSRYVRLTGLPMPPRW 277
TSC_c19240   LAFYENPADGFADLRGEEALVGF--LGTFRYYLIPG-PLAALARYVRLTGLPPLPRW 276
PCC7424_1902 LIFYENTYSGNFSFK-EEARAQF--DGGALRYylaIG-SIKQVVERYTQLTGCPVLP 281
alr5331      LIFYENSFPANFSFS-NLARAQF--EGMLRYYSAG-SLPQLLERYTELTRPPLPRW 288
AGL2_BACTQ   GIFFDNTYKTTDFDQTATDEYCFSAEGGAIDYVVFAGPTPKDVLEQYTDLTGRMPLPK 260
              * : : * . : : * * : * * . * . : : * * * * * : * : *

TTP0221      ALGFHYARWGLRTRREEVEERVAGFLERGLPLRAVHLDIDYMRGYRVFTVDEGRYP 337
TSC_c19240   ALGFHYARWGLRTRKEVEVEVGLKRDPLKAVHLDIDYMRGYRVFTVDEKRFPLDGM 336
PCC7424_1902 AFGYHQSRRWGFETEVEVRQVAGFITHNLPLSAIHLDIDCLDDFRAFTIDPDRFPK 341
alr5331      TFGYHQSRRWGYEREAALREVVKGFETYNI PVSALHLDIDVLDNFRAFTIDPDRFP 348
AGL2_BACTQ   ALGYHQSRRYSYETEVEVREIAQTFIEKDIPLDVIYLDIHYMNGYRVFTFDRNRF 320
              : : * * : * : . . . : : . * : : * : : * * * : : * * * * * :

TTP0221      VRGFQEKGVRTLILDPGVKAEKGFPPYEGLREGLFCRLPSGVEVVRGVPVWPLA 397
TSC_c19240   VRTFRERGVHTVLILDPGKIGKGFSPYEEGLREGVFCRLPTGEVFLGVPVWPLA 396
PCC7424_1902 TQELKDKGVRLIIINPGVKPHRDNKLFEEGITQEIFCKTQDNKLI FAPVWPGMCA 401
alr5331      AAELAAGKIRLITINPGVRSRKNKLFEEGRAQDVFCCLPNKGPAPASVWAGLSA 408
AGL2_BACTQ   IADLKQKGI RIVVPIVDPGVKEDPEYVIYQEGIRHDYFCKYIEGNVYFGEVWPG 380
              : : * : : : * : : * : : : : * * . * * : : . * * * . * * *

TTP0221      TDPKARAWWGEKLGKGFLEMVAGLWLDMNEPALFAAWGEPTLP-ASARHALEGQGG 456
TSC_c19240   TDPGGRAWWGERLKGFLDMGVSGFVWLDMNEPALFAAWGEPTFP-RSVRHALEGQGG 455
PCC7424_1902 TDPLARHWWSRQYELLDLGFGAGFVWDMNEPGVFTLWGDSTLPPHATQHAMEGRG 461
alr5331      TNPQARHWWSRQYELLDLGITGFVWDMNEPGVFLWGDPSLPPHATQHSMEGRGG 468
AGL2_BACTQ   TNKKVRKWWGEKHFYTDLGIIEGIWDMNEP---SVFNETKTMVVKVIHDNDGDP 437
              * : * * * : : : : * : * * * * * : : . . . . * : * *

```




TTP0221	AHNLYGLLMARASWEGFRKHAPERRPFLLRTRSGHAGVQRYAWAWTGDVESTWEGLRRTTLR	516
TSC_c19240	AHNLYGFLMARASFEGFREHAPLRRPFLLRTRAGFAGVQRYAWAWTGDVESTWEGLSTTLR	515
PCC7424_1902	AHNIYGLLQARAGYEALRDYQVNHRRPFIVSRAGWAGLQRYAWTWTGDI DSTWEALGQTIP	521
alr5331	AHNFYGLLQAEAGYQALCEYQPQRPFIVSRSGWAGLQRYAWTWTGDIITSWEGLRQTIP	528
AGL2_BACTQ	LHNVYGFMMGEATYKGMKLLNGKRPFLLTRAGFSGIQRYYAAVWTGDNRSFWEHLQMSLP	497
	.*: . . * : : . . : ***: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
TTP0221	ALLGLSLSGVYFVGSIDIGGFSGNPSPELYLRWFQMAALTPFFRLHAARWTKRREPWRFG	576
TSC_c19240	ALLGLSLSGVYFVGSIDIGGFSGNPSPELYVVRWFQAAFTPFRLHSARWTRRREPWRFG	575
PCC7424_1902	TVLNMGLSGIPYSGPDIGGFKGDPSELYLRWFQACFLPFCRTHSANNVKPRTPWSYGE	581
alr5331	TVLNLGLSGIAYSIGSDIGGFKGHPSAELYLRWFQVSCFMPFCRTHSANNKPRTPWSFGE	588
AGL2_BACTQ	MCMNLGLSGVAFCGPDVGGFAHNTNGELLTRWMQVGAFTPYFRNHCAIGFRRQEPWAFGE	557
	: . . . * * : : * . * : * * . . . * * * * : : * * * * : : * * : * *	
TTP0221	EVLEGVRRAMALRESLLPYLYTLAHRASREGKPLLRPLFLEGG-----PYTEEAFLG	631
TSC_c19240	EVLEGVRWAMELRERLLPYLYTLAYRASREGLPLLRPLFLQGGQ-PDGADLEEAFLG	634
PCC7424_1902	PILSIARDFLQLRYRLIPYFYTLAWAETQTGDPVVRPLFVLDVDDQRLWVDEDAFLV	641
alr5331	PTLGIVRQFLQLRYRLMPYFYTLAWESTQTGHPLVRPLFWADQDNPHLWDIDDAFL	648
AGL2_BACTQ	KYERIIKKYIRLRYQWLPHLYTLFAEAHETGAPVMRPLFFEYPPDENTYNLYDEF	617
	: : * * : * : * * * : . . * * : * : * * * : : * * : * *	
TTP0221	LLVAPVLEEGARAKEVPLPKGGWYPWGEDRALQGPTWARLPAPLDRIPLLVRAGTVL	691
TSC_c19240	ILVAPVLEEGARAKEVPLPKGGWYPWEEDGVLEGPARVRLPAPLKRIPLLVRAGSIL	694
PCC7424_1902	LMVCPVKEGMRSRSVPLPKGRWYHFWDVDRVIENCPEVELDAPLTGIPLLVRAGN	701
alr5331	LLVAAIAEAGATSRTIILPKGNWYNFVNDELLEGEKQVKLKAPLEQIPILVKAGS	708
AGL2_BACTQ	VLIAPIMTPSTTRRVAYFPKGNWVDYWTGEVLEGGQYHLISADLETLPFIKQGS	677
	: : : : . . : : * * * * : . . : : . . : * * * : * : * : * : *	
TTP0221	EEG-----GLALHLYPGAEG-AEGRLYWDEGE-----GPYRLDRFRLPAEGGF	738
TSC_c19240	EEG-----GLALHLYPGEAG-AEGHLYWDEGDG-----GPYRLDRFRLPAEGG	741
PCC7424_1902	TDQ-----ELTLHIYPPVEGTCEENLYSDEGDG-----GDWRIDRFCLKRDQ	749
alr5331	ENN-----QLILHLYPSAFLTSQQQVYSDEGDG-----GESRCDREYFLTHNQ	756
AGL2_BACTQ	DVKRSTEMPDEHRTVHIYKANGGKATYVLYDDDGQTFSEYKGDYLRMYIEVEYGEN	737
	: * : * . : * * : * : * : * : : : . . : *	
TTP0221	LWQKGELPWPWARVRLRFLGKRLRAHVEG-EAHAEEGGVLLPPFFREALLEVEG----	793
TSC_c19240	LWEGEGEYPWPWEGVSIRLWERRLWGARVEG-KVYPSQGGVFLPPFFREALLEVEG----	796
PCC7424_1902	TRLEQGEFNFYPSKIELCLHGMKLQQVWIDGEEIKNFSEKQLICSPFQKIRLVGD	806
alr5331	IWKQQGDYVFPYTSVQLYLHGFEPPQVWVDGDEVVNQG-RCLDLEIFEQVRWQGM	815
AGL2_BACTQ	VTKSEGTYQPSWKL SFAIHHAETEQT KVTIDG-----NEQNAIFDPHQRI	787
	: * . : . . : * * : * * . . .	
TTP0221	---	
TSC_c19240	---	
PCC7424_1902	---	
alr5331	YFN 818	
AGL2_BACTQ	---	



```

TTP0222      QARLLEFAVHAYRRAK GK-VVGYFQFMFVEPWEGITWAVLDVERVPKKGFFALKEASSPV 555
AM1_2814     QSQLIQFAAEAYRRQRYQPVSSI FQFMFVEDWPSMNWGI VDYWRQPKPGHEALKWAYQPV 649
Mfla_0006    QARLIQFAVENYRRQRYAPVSAVFQFMFVENWPSINWGI VDYWRQPKAGYEALRVAYQPV 633
Entcl_2579   QAEVVQMAAESYRRQRYQPVAALFQFMFSETWPSINWAVVDYRRI PPKGYFALQKAYQPV 632
              *:::~*.. *** : * . ***** * * ..*::~* * ** *. **: * .**

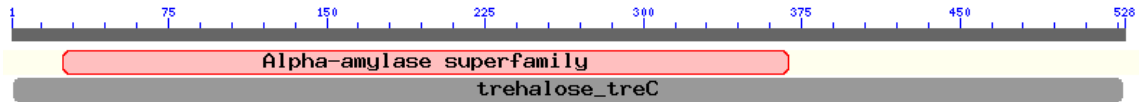
TTP0222      LLSLVPYLERVEVGAPPLQEAWLVSDLRPLSLRVRLRLEGPATLLLHEEEIALDAGEVR 615
AM1_2814     LPSIAWPQLTWTLGETVELELWAINDLWKDY-----PEAIFTYALRQNQRLKSGQSR 702
Mfla_0006    LPSLEWKQDEYEAGASPRIGLWAINDTWSGF-----EHASYTVTLYREGKPLDMLKLP 686
Entcl_2579   LPSIEPITLTWHPGERGRIGLWAINDRWLN Y-----PDARLSWFVLQGGRELARGSLT 685
              * * : * * * : . * . . . : : . * .

TTP0222      RFFSLGELWESPLEVQARFLPLREALARIPPGAYRLVGEAWEGERLWSRHVLSVEYLEPI 675
AM1_2814     ----INLAADSSQPVDKIFFQPQNLGSYTVTATLKDR LGTVLGENQFVFDVIDRGDQTNE 758
Mfla_0006    ----LEMLPDSGYKLRDYALPVLEKGYEIKAEITGQDGKSMGRNQYRFSVK----- 734
Entcl_2579   ----LDLPADSGHKVTEALALVPPTAQ TLLLVTTELQDHAGNTLGKNSRYFSVTAK----- 735
              : * : : : * .. *

TTP0222      LPLEVAW 682
AM1_2814     STS---- 761
Mfla_0006    -----
Entcl_2579   -----
    
```



9. ANEXO II



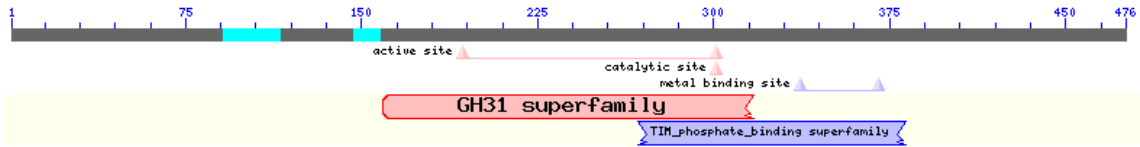
TTC0107: α -glucosidasa/glicosil hidrolasa [*Thermus thermophilus* HB27]

Tcald: α -glucosidasa [*Thermus caldophilus*]

bflav: oligo-1,6-glucosidasa [*Bacillus flavocaldarius*]

BSU07810: Fosfo- α (1,1)glucosidasa (TreA) [*Bacillus subtilis* 168]

TTC0107	-----MWWKEAVIYQVYPRSFQDTNGDGVGDLEGVRRRLPYLKSLGVDALWLSPFYKSP	54
Tcald	-----MSWWQRAVIYQVYPRSFQDTNGDGVGDLEGIRRRRLPYFKSLGVDAFWLSPFYKSP	55
Flav	-----MSWWQRAVIYQVYPRSFQDTNGDGVGDLEGIRRRRLPYLKSLGVDALWLSPFYKSP	55
BSU07810	MKTEQTPWKKAVVYQIYPKSFNDTNGVGDNLNGIIEKLDYLKTLQVDVWLWLPYIDSP	60
	*:	
TTC0107	MKDFGYDVADYCDVDPVFGTLQDFDRLLLEEAHALGLKVLVDLVPNHTSSEHPWFLESRAS	114
Tcald	MKDFGYDVADYCDVDPVFGTLQDFDRLLLEEAHALGLKVLVDLVPNHTSSEHPWFLESRAS	115
Flav	MKDFGYDVADYCDVDPVFGTLQDFDRLLLEEAHALGLKVLVDLVPNHTSSEHPWFLESRAS	115
BSU07810	QHDNGYDIRDYYSIYPEYGTMEDFERLVSEAHKRDLKVVMDLVVNHTSTEHKWFREAISS	120
	:* ***: ** .: * :*:	
TTC0107	RNSPKRDWYIWKDPAPDGGPPNNWQSFVGGPAWTLDEATGQYYLHQFLPEQPDNLWRNPE	174
Tcald	RNSPKRDWYVWKDPAPDGGPPNNWQSFVGGPAWTLDEATGQYYLHLFLPEQPDNLWLNPE	175
Flav	RNSPKRDWYIWKDPAPDGGPPNNWQSFVGGPAWTLDEATGQYYLHLFLPEQPDNLWRNPE	175
BSU07810	IDSPYRDFYIWKKPQENGSVPTNWSKFGGSAWELDEASGQYYLHLFDVTDADLNWENEE	180
	:** ***::*:	
TTC0107	VREAIYEVMRFWLRRGVDGFRVDVLWLLAEDLLFRDEPGNPDWRPGMWRDRGRHLHIFTED	234
Tcald	VREAIKEVMRFWLRGVDGFRVDVLWLLGKDPFRDEPGSPLWRPGLPDRARHEHLYTED	235
Flav	VREAIKEVMRFWLRGVDGFRVDVLWLLGKDPFRDEPGSPLWRPGLPDRARHEHLYTED	235
BSU07810	VRKHVYDMMHFWEKIDGFRDLVINLISKDQRFPAEEG-DGRSFYTDGPRVHEFLHEM	239
	**:	
TTC0107	QPETYAY-----VREMR-QVLDEFSEPGRERVMVGEIYLPYPQLVRYQAG---CHLFPN	285
Tcald	QPETYAY-----VREMR-QVLDEFSEPGRERVMVGEIYLPPLRVLRYAAG---CHLFPN	286
Flav	QPETYAY-----VREMR-QVLDEFSEPGRERVMVGEIYLPPLRVLRYAAG---CHLFPN	286
BSU07810	NEKVFSHYDSMTVGEMSSTTVDHCIRYTNPDNKLDMTFSFHHLKVDYPNGEKWALAPFD	299
	:*:	
TTC0107	FHLIFRGLPDWRPENLARIVEEYESLLTRWDWPNWVLGNHDQPRLASRLGE-----AQA	339
Tcald	FSLVTEGLSDWRPENLARIVETYEGLLTRWDWPNWVLGNHDQPRLASRLGE-----PQA	340
Flav	FSLVTEGLSDWRPENLARIVETYEGLLSRWDWPNWVLGNHDQPRLASRLGE-----PQA	340
BSU07810	FLKLKEILSDWQT-----GMHAGGGWNAFWCNHDQPRVVSRYGDDGAYRVKSA	348
	* : . * .**:* . : : . * . *****:*:* * : . *	
TTC0107	RVAAMLFLTTRGTPTWYYGDEIGMKNGEIP-----PEKVQDPAALRQK---DRLGEHN	389
Tcald	RVAAMLFLTTRGTPTWYYGDELALPNGLIP-----PEKVQDPAALRQR---DREPTAY	390
Flav	RVAAMLFLTTRGTPTWYYGDELALPNGLIP-----PEKVQDPAALRQR---DREPTAY	390
BSU07810	KMLATAIHMMQGTPYIYQGEELGMTNPKFTDISSYRDVESLNMVYHAFKEKGMADQDITAI	408
	::* * .: :*** * *:*:*:* * . . * : : * : : * : : * : : * :	
TTC0107	LPP-GRDPERTPMQWDDTPFAGFSTVEPWLFPVNPDKYKTRNVAAQEQDPRSMHLVRLIA	448
Tcald	HTL-GRDPERTPMPWDASPYGGFSTVEPWLPLNPDYKTRNVAAQEKDPRSMHLVKRLIA	449
Flav	HTL-GRDPERTPMPWDASPYGGFSTVEPWLPLNPDYRTRNVAVQEQDPRSMHLVRLIA	449
BSU07810	LQAKSRDNRTPVQWQDATENGFFTGTGPWIPVAGNYREINAEALRDQNSVFYHYQKLIQ	468
	.** .***: ** : .*** * **:* : * : * . . : * .*: : : : **	
TTC0107	LRKDPDLLYGAYRTYRAREG--VYAYLRG---EGWLVALNLTEKEKALELPR-----G	496
Tcald	LRKDPGLLYGAYRTYRAREG--VYAYLRG---EGWLVALNLTEKEKALELPR-----G	497
Flav	LRKDPDLLYGAYRTYRAREG--VYAYLRG---EGWLVALNLTEKEKALELPR-----G	497
BSU07810	IRKMYDIVTEGTYEIIAKDDPNI FAYLRHGSNEKLLVINNFYGTAAFTLPDSLAPDEWK	528
	:** .: : . * : : . :*:* * * * * : . * * : *	
TTC0107	GRVVLSTHLDREERVGERLFLRPDEGVAVRLD---	528
Tcald	GRVVLSTHLDREERVGERLFLRPDEGVAVRLD---	529
Flav	GRVVLSTHLDREERVGERLFLRPDEGVAVRLD---	529
BSU07810	AEVLLTNDREAREG--LQNMTLRPYESIVYRLTKPC	561
	..*:*:*.. ** : : : * * * * . : . *	



TTP0072: α -galactosidasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TSC_c19210: α -galactosidasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

Mrub_2812: Glicosido hidrolasa del clan GH-D [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

SlivT: α -galactosidasa SCF8502 [*Streptomyces lividans* TK24]

```

TTP0072          --MRLNLGG-----AEVFLRAEG-LEEAPGGVRLWGREVRFPPFPAKGFRRHGQWSWS 51
TSC_c19210      --MRLEFSDPLRESRLEVPVLAEA-LGPVPGYLLRGREVRVFAPFASKRFRCRHGWQWSWS 57
Mrub_2812       ----MQIQG-----YEFISISAGR-LEETLGGYLLSGKTVQIGHPPFGRITLYFKKHGQWSWS 49
SlivT           MAQLVELGG----RTLAVELAGDAPRAVEGGLLLPPGRTAVLHGLGDALFYRHGHNSWS 56
                ::: . . . . . ** * . : : : : **: ***

TTP0072          LAAWVDPAQAPTPLLPEARRPQADDPFLEAGAWWGSVGVGALRGPDRALLLGDLDLGA- 110
TSC_c19210      LTTWVDLNFPPKPLFPEARRPQADDPFLEASEWWSGLGALGEGPDGKVVLLLGDLDLGA- 116
Mrub_2812       EAGWVSLKESPKPILPPERRPQCDDPAYALSPVHGSSGLGGLEGHDRMLFLLGALRPGA- 108
SlivT           PCGWRRLESEAPLRIESAERRLTADDTVWDDPARHHSSAVAALGEGPDGRVLLLGDLDLGA- 116
                * . * : . ** **. . . * . . . * ** : * : **** ..

TTP0072          RVLGREDLLLGRYAGEGGAWFLAHGPEEEVFAAYAQLLPRRLSGR----PPRVWCSWYSF 166
TSC_c19210      RVLGREDLLLGRYAEEEGEWFLGYGEPTEVFAAYGRLLPRRLSKG----PPRLWCSWYSF 172
Mrub_2812       RIEADR-LSLKGSSDHETQWFLAYGEQQVVLARYTELLANTLGIRGQPPAPRVWCSWYSY 167
SlivT           RLTAADRDTLTGWCERDGPWFALGSEEEVFAAYARHLGDRLGRSDKR-AGNVWCSWYAY 175
                *: . . . . . ***. * **: * * . * * . . : : *****:

TTP0072          YTRIGEDLLLRVLDEVAAFSEFVFQIDDGWQRALGDWEPNDRFPRGMAFLAERIRERGLR 226
TSC_c19210      YNRIHEALLLEVLVEVAGLPFEVFQIDDGWQRALGDWEPNERFPRGMAFLAERIREKGF 232
Mrub_2812       YSDISESKMLQTI AALQGLPFEVFQIDDGWQQNMGDWEPNHKFPSPGMSAIALRAQSQGLT 227
SlivT           YESITEEQLTKDVTALRGLPFDVQVDDGWERAVGDWEANDKFPSPGMRALADRIDAGL 235
                * * * : . : : . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

TTP0072          PGLWFAPFLVTADSPFLQMRPDWVLRDGEGRPVVAGFNWGRPLYALDAGNEEVVEWAADL 286
TSC_c19210      AGLWLAFFLVTPDSPLVRAHPWILRDGEGRPI PAGFNWPKPLYALDSGNEEVLDHVAGL 292
Mrub_2812       PGLWLAFFIARSSNLKFEHPDWFLRDEQGEVLVLAGTNWGG-YYALDVTLPVQDQDLQRL 286
SlivT           PGLWIAFFIVLPGSRTARQRPPELLLRDGRGEPVVAGHNWGVGYWTLDTLPLAAQEHRET 295
                .***:***:.. . * : : * : .*** . * . : * * * : : * * . :

TTP0072          VR-KALAWGYDYKLKDFLYAAALPG-----AEGEARYRRAMARLREAAG-EAYLLFCGAP 339
TSC_c19210      VR-KVRAWGYDYKLKDFLYAAALPG-----AEGEVYRKAMERIREEAG-EAYLLFCGAP 345
Mrub_2812       IQ-KVRGWGYRYLKLDFLFAALPGQRHSGASREEAYREALRLIREAAGDDVYILACGAP 345
SlivT           IRRVVREWGFTYKLKDFVAGAVPGRFADVGREEAYRTGLSIVREAAGPDAVLLGSGAP 355
                : : . ** : ***** : * : * * . * * * . : : * * * : : * * : * *

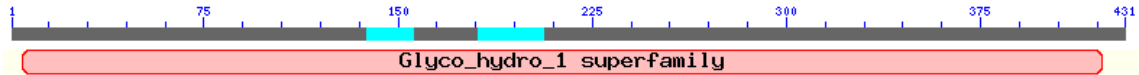
TTP0072          VLASLGLADGLRVGPDVAPYWDNEERSFWLADPTGPGRLNALRSTLHRLWLMENVHVDPD 399
TSC_c19210      ILASLGLADGLRVGPDVAPYWDNEDRSFWLQDPTGPGRLNALRSTLHRLWLRNVQVDFD 405
Mrub_2812       ILASLGLVDGLRIGPDVAPYWDNEDRRVYLHPTGPAAYNALRSTLHRLWLKPLVHTDPD 405
SlivT           LLPSLGLVDAIRSGPDVAPMWEHYAT----QDPSDALARNVNTVHRLWQSPLEVDPD 411
                : * . * * * . * : * * * * * * : : * * : * * : * * : * * : * *

TTP0072          VVYFRTRFNLLSPEEMRLQEALAHFTGFKATSDPPSWLLPEEKGRLEAFLAREVPVRLG 459
TSC_c19210      VAFFRSRFSLLSLEEMRLQEAMGEITGFKATSDPPSWLSPEERERLWAFLSRDKEVKPLG 465
Mrub_2812       VAYFRTRYNLLTPAQRVVLDLALVAGFKATSDPPEWLDGDEREGLKEWLEASPSILQTG 465
SlivT           VVYFRSRLNLLTEQQQLLRDLADVCGFRAVSDPPGWLLPEELKAMEAYLTGRPEVRLG 471
                * . : * * * * * : : : . : . . * * : * * * * * * * * : * : : * : *

TTP0072          PYRFRVGEEDVYAPLL----- 476
TSC_c19210      PYRFRVGEEDVYAPLL----- 482
Mrub_2812       PYTFKIGEREVDVDFSSWLEI----- 484
SlivT           RYRFALDGREVDVGAAPVAGDEQRYPLA 499
                * * : . . : * : . :
    
```



9. ANEXO II



TTP0042: β -glucosidasa [*Thermus thermophilus* HB27]

SSMG_06549: β -galactosidasa [*Streptomyces* sp. AA4]

Micau_5688: β -galactosidasa [*Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029]

Mrub_0288: β -galactosidasa [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

```

TTP0042      --MTE-----NAEKFLWGVATSAYQIEGATQEDGRGPSIWDAFAQRPGAIRDGSTGE  50
SSMG_06549  MTMSAQPIPDVLAFFDAFVWGAATAAFQVEGSTTADGREASVWDTFAARPGAVAGGDTGD  60
Micau_5688  --MSN-----VRFPEGFVWVGATAAYQIEGAAREDDGRGPSIWDTFSSRTPGAVFQGHGTGD  52
Mrub_0288   MKRSD-----FPANFIWGTATSAYQIEGAVSEDDGRGPSIWDTFSSHTPGKTKGGDHGD  52
           :           .  *:* **:*:*:*:*:.  *** .:*:*:*:  **  *  *  :

TTP0042      PACDHYRRYEEDIALMQSLGVRAYRFSVAWPRIPEGRGRINPKGLAFYDRLVDRLLASG  110
SSMG_06549  PAADHYRRYADDVALMRSGLTAYRFSLSWPRILPHGK--PEPRGLDFYDRLVDRLLAAG  118
Micau_5688  VACDHYHRYAEDVALMADLGLRAYRFSVSWPRVDPDGTGPVEPRGLDFYDRLTDALLDAG  112
Mrub_0288   VACDHYHRYPEDIALMKELGVNAYRFSVAWPRIPEGRGRVNPRLDFYNRLVDALLEQG  112
           *.*:*:*:*  :*:*:*  .**:*  *****:****:  *.  :*:*  **:*:*  *  *  *

TTP0042      ITPFLTLYHWDLPLALEERGGWRSRETAFAFAYAEAVARALADRVFFATLNEPWCSAF  170
SSMG_06549  IQPWATLYHWDLPQSLDRGGWTARDTAYRFAEYAEETIARLGDVRSWSTLNEPWCAAM  178
Micau_5688  LDPIVTLYHWDLPQALEDRGGWTVRETAEHFAEYALAVHGRLGDRVRTWTTLNEPWCSAY  172
Mrub_0288   ITPWATLYHWDLPQSLDQGGWPSRETAYAFAYADLVTRHLGDRVKHWITLNEPWCSAY  172
           :  *  *****  :*:*:*  *:*  *****  :  *.*  :  *****:

TTP0042      LGHWTGEHAPGLRNLEAALRAAHLLLGHLGLAVEALR-AAGARRVGIVLNFAPAYGEDPE  229
SSMG_06549  LGYSGVHAPGRTSPEGAVAAAHLLLGHLGLAMDVLR-QHTSTPSGITLNLNLY---PVVD  234
Micau_5688  LGYSGVHAPGRRDAGDAFRAVHLLLGHLGLAARALR-AAGAETLGITLNLADVQPADAG  231
Mrub_0288   LGYHAGIHAPGQQNFKHSIWASHLLLAHGLAVPVIRRNVTGARVGITLNLSPGYPASPD  232
           **:*  *  *****  .  :.  *  *****.*  .:*  .  **.*:  .

TTP0042      -AVDVADR-----YHNRFFLDPIKGGYPESPFRDPPVP---ILSRDLELVARPLDFL  279
SSMG_06549  SPEDADAVRRIDGLQNRLFLDPLLSGGYPADLREDLARFGFDTVVRDGDEAVVGKPIDWL  294
Micau_5688  SAADAEAVRLVDGLHNRIFLDPLTGGGYPADVLAHVSRIVAPDFVRDGDEKLIAPLDLL  291
Mrub_0288   -PADVAAARRFDGFGQNRWYLDPLYGLGYPADMLALYGEAPS---VQGDLLITIAAPTDFL  288
           .  *  .  :*:*  :*:*:  .  ***  .  :  .  *  :.  *  *  *

TTP0042      GVNYYPVVRVAPG-----TGTLPVRYLP-PEGPATAMGWEVYPEGLHLLKR  325
SSMG_06549  GVNYRGRYVAGSARPGSTPAGREWPG-ADQVHFVDPDPAAPRTASGWEVVRPGLTESLLQ  353
Micau_5688  GLNYIAPTYVAGRADG---TGGAAYPGTAGAVEFLP-PAGPLTEMGWSIEPAGLARLLER  347
Mrub_0288   GINYYSRAVVRNSD-----LEPYRFQYVR-VGEEHTDMDWEVYPEGLYDLLIR  335
           *:*  *  *  .  .:  :  *  .*:  *  *  *  :

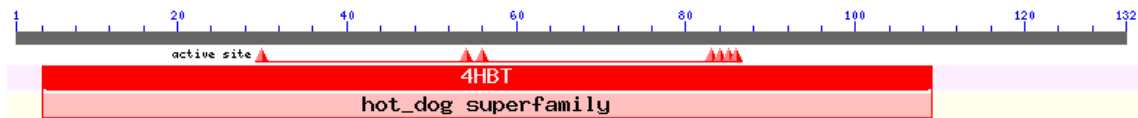
TTP0042      LGREV-PWPLYVTENGAAYPDLWTGE-AVVEDPERVAYLEAHVEAALRAREEGVDLRGYF  383
SSMG_06549  VHRDYPPVPLYVTENGAAYDPDIRD--GEVSDDDRIFAFLDAHLRAAHDALAHGVDLRGYF  411
Micau_5688  VAADYPGLPLMITENGAAFPDTDLDEQGGVADADRVAYLDGHLRAAHEIARGVDLRGYL  407
Mrub_0288   LGREYRPKAIYITENGAAYPDAVADD-GGIHDLERVRYFQRHLALCLEALQHGAPLKGYF  394
           :  :  .:  :*:*:*:*  .  .  :  *  *  :  :  *  .  *  .*.  *:*:

TTP0042      VWSLMDNFWEAFGYTRRFGLYVDFPSQRRIPKRSALWYRERIARAQT--  431
SSMG_06549  YWSLLDNFEWAEGYAKRFGLVHVDYRTQRRTPKRSARWYAEVIARNALP-  460
Micau_5688  VWSVLDNFWEAEGYRKRFGIVHVDYLTQRRTPKRSARWYQEVIA RNGL--  455
Mrub_0288   AWSLLDNFEWAEGYAKRFGLVYVDFPSQRRRIKASGYWFRDFLREAVASS  444
           **:*  *****  **  :*:*:  :*:*:  :*:*  *  *  .  *  :  :  .

```



ALINEAMIENTO DE POSIBLES ESTERASAS/LIPASAS



TTC0552: Esterasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TSC_c09420: Esterasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

TaqDRAFT_3404: Proteína de la superfamilia de las tioesterasas [*Thermus aquaticus* Y51MC23]

Mrub_1579: Proteína de la superfamilia de las tioesterasas [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

Mesil_2221: Proteína de la superfamilia de las tioesterasas [*Meiothermus silvanus* DSM 9946]

Ethha_0574: Proteína de la superfamilia de las tioesterasas [*Ethanoligenens harbinense* YUAN-3]

```

TTC0552      MESVTRIKVRYAETDQMGVVHHSVYAVYLEAARVDFLERAGLPYHRVEARGVFFPVVELG 60
TSC_c09420   MESETRIKVRYAETDQMGVVHHSVYAVYLEAARVEFLEKAGLPYHRVEARGVFFPVVELG 60
TaqDRAFT_3404 MESRTLKIVRYAETDQMGVVHHSVYAVYLEAARVEFLESAGLPYHLVEARGVYFPVVELG 60
Mrub_1579    MKVRLPITVRYAETDAMGVVHSSYVIWLEAARVEWLNQIGLPYTQIEAQGLAFVVEIG 60
Mesil_2221   MRIRHPITVRYAETDAMGVVHSSYVPWLEAARVEWLERIGQYPPEIERRGIAYPVVELG 60
Ethha_0574   MITETKLIVRYAETDQMGIVHHAVYPIWFEEARTDFLKQAGMSYSKMEADGLLLPLAEMH 60
              *      : ***** **::**:: *  ::****::*: * . *  : *  *  : . : * :

TTC0552      LTFRAPARFGEEVEVTRRLAELSSRALLFRYRVEREGV--LLAEGFTRHLCQ-VGERAAR 117
TSC_c09420   LTFRAPARFGEEVLVTRRLAHLSSRDLLFRYRVEREGT--LLAEGFTRHLCQ-VGEKAGR 117
TaqDRAFT_3404 FTFRSPARFGVEVTRRLAEVSSRALLFRYRVLREEA--LLAEGFTRHLCQ-VGGRAAR 117
Mrub_1579    LTYRSPARFGDTVEVETWLSEATSRTLQYRYRVWKGQT--LLAEGFTRHLCQDTRGKAVR 118
Mesil_2221   LTYRSPARFGDKVEVEVWLAEVTARTVRYQYRIWRGEQ--LLAEGFTRHLVSDSSGKAVR 118
Ethha_0574   CRFKASAHYEDEIVVKTEIKKMTYAKVVFEYKVVYREADRLLVEGGTVHACTDRSLKPIN 120
              :::.*::: : : *.. : . : : :.::: : : **.* * * * : . .

TTC0552      IPEDIYRALSVLNLK---- 132
TSC_c09420   IPEDLYQALSVLHLG---- 132
TaqDRAFT_3404 IPEDILKALRVLHLG---- 132
Mrub_1579    IPAAVAEP LHRH--LLSD-- 134
Mesil_2221   MPTDLLSKLSEYRELSS-- 135
Ethha_0574   VAKSFPELYQAIYTLSTKE 139
              :. .

```



9. ANEXO II



TTC0904: Esterasa [*Thermus thermophilus* HB27]

TaqDRAFT_3608: Esterasa [*Thermus aquaticus* Y51MC23]

TSC_c07960: Esterasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

Mrub_2145: Pectinacetilesterasa [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

```
TTC0904      -MKRLIALVLLFALALAQQGLEAFWKAVEVPGGVCADGSPYRFYVSPGDPKVVVDFQGGG 59
TaqDRAFT_3608 -MKRLIALVVALALALAQQGLEAFWKAVEVPGGVCSDGSPYRFYVSPGDPKKVVLDFQGGG 59
TSC_c07960    -MRRFLALLLLLGLALAQQGLEAVWKAVEVPGGVCSDGSPYRFYVSPGDPKKVVLDFQGGG 59
Mrub_2145     MQRWLTALVVVIGFALAQAPAGWQEIRPGGAAVCSDGSPWRFYVAPGAADKVI VNFQGGG 60
              : : **:: :.:****. . : . .**::****:****:* . **:::****

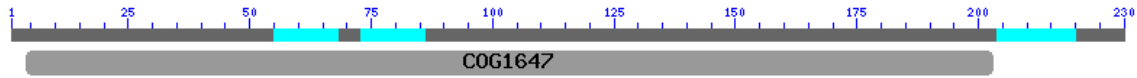
TTC0904      ACWDQATCGPESRTYRKRVDVQELLYLAQGIYNRMSVANPFFGWTHVFPYCTGDLHVGRA 119
TaqDRAFT_3608 ACWDAATCGPQSQTYRKRVDVQELLLAQGIYNRMSVANPFFGWTHVFPYCTGDLHVGRA 119
TSC_c07960    ACWNAATCGPQSQTYRKRVDVQELLLAQGIYNRLSVANPFYGWTHVFPYCTGDLHVGRA 119
Mrub_2145     ACWDAATCNPQSRLYTTRLQLQDLQAGQGI FNRNNPENFRDWTHTVFPYCTADLHWGNN 120
              ***: **.*:*: * .:***:* . *** .*****.*** *.

TTC0904      TVDYGGFVHHQGARNAQAALYVFRNHTNPERVFTGCSAGAYGAVLWADKILATYKNA 179
TaqDRAFT_3608 TVDYGGFVHHQGARNAQAALYVFRNHAQAERVFTGCSAGAYGAVLWADKVLATYKNA 179
TSC_c07960    TVDYGGFVHHQGARNAQAALYVFRNHTDPEKVFVTGCSAGAYGAVFWADKVLSTYKNA 179
Mrub_2145     TARYGDLTIQHKGAVNARQAVLWVFNINPNPQNILVTGCSAGGYGSI MWAPYFMRRYPNA 180
              *. **.:**:* ** * ::**. * ..:***.***.***:*** .: * **

TTC0904      QIAVCGDAGVGVVTEDFP--GFTAWNPR--LP-ELPGLS-SPPKVSEIYRALAQAYPKAV 233
TaqDRAFT_3608 QVAVCGDAGVGVATPDFP--GYARWNPR--FP-ELPGLS-ARPSVSEIYLALSRAYPKAV 233
TSC_c07960    KVAVCGDAGVGVTRDFP--GFTVWNSR--LP-EVPGLS-QNPEVAEIYMALAKAFPQAR 233
Mrub_2145     QVTQLGDAALGVAPASFFPVASRAWGIQSALPGWIGGLEPAQLGSNDLYQIFARAYPNRS 240
              ::: **.:** .*. . * . * . : * : ** . : ** : **::**.*

TTC0904      LAQYTTLLDGTQIIFYALMKKEAAPSEATAREWAVAAERAVGFPASEA-NYTYLAPGSQ 292
TaqDRAFT_3608 LAQYTTLLDGTQIFFYGLMKGERTPSEATAREWATEAQKAVLTPAQAE-NYTFYLAPGSQ 292
TSC_c07960    IAQYTTLLDGTQIFFYGLMKGERTPSEATAREWAEAGAMRAVLAPAQAE-NYTFYLAPGGQ 292
Mrub_2145     FAQYSTLADEVQIFFYSLIVGQPRPTPEIAQQWVQGALANLASIKQAAPNFYSYLAPGTQ 300
              :***:** * .**:**. : : * : **.* * : . * : ***** *

TTC0904      HCILPRPELYTLKVGESVFLDWLRALAEGRTPPRVRP-- 329
TaqDRAFT_3608 HCILPRPELYTLKVEASFLDWLKALEKVA PRVRP-- 329
TSC_c07960    HCILPRPELYTLKVGESVFLDWLRALAEKAPPRVRP-- 329
Mrub_2145     HCIIGRPEFYSTRVGDVRFVDWLSRLVSNRPGDVAPPR 339
              ***: **:**. :***. **:** *... . * *
```

- TTC1341:** Carboxilesterasa [*Thermus thermophilus* HB27]
- TSC_c23750: Carboxilesterasa [*Thermus scotoductus* SA-01]
- Mesil_0878: α/β hidrolasa [*Meiothermus silvanus* DSM 9946]
- TaqDRAFT_3985: carboxylesterase [*Thermus aquaticus* Y51MC23]
- Mrub_2760: Esterasa/lipasa [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

```

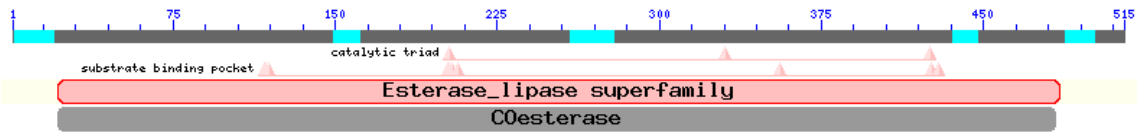
TTC1341      -MHL...LHGFTSHPVLT...LGLPLPERLKEAGWEVRQPALPGHGTRPEDLLKVRFDWLLAAE 59
TSC_c23750   -MNL...LHGFTSHPVLT...LGLPQVLR...AGFQVSQPALPGHGTRPEDLLKVRWQDWLETAR 59
TaqDRAFT_3985 -MNL...LHGFTSHP...LTLG...LPGVLR...AGFAVSQPALPGHGTRPEDLLGVRWQDWLSAAR 59
Mesil_0878    MSPV...LHGLSSH...PVLTVG...LPEVLRQAGYQIAQPTLPGHGTRPEDLKGVRWQDWYRVAL 60
Mrub_2760     MSNV...VLHGFTSHP...TLTMG...LPETL...RKAGFTVAQPTLPGHGTRPEDLRGVRWLDWLQTAR 60
              :*.***:.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*
              :*.***:.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*

TTC1341      EAYLELPEPRGVVGLSMGGLLA...AAHLAARHPTKALVALAPAFALKNPLAPLAPYLHWLIPR 119
TSC_c23750   AFYRELPEPRGVVGLSMGALLSAH...LAETPTQALVALAPAMALKHPLAPLAPLLAWLIPR 119
TaqDRAFT_3985 EAYAALPEPRGVVGLSMGALLA...HLAVEMPTQALVALAPALALRSPLAPLAPLLAWFIPR 119
Mesil_0878    EAYRSLPSPKAVVGLSMGGLLA...AKIAAEEAPQALVAMVPALGFVNKTAYLAPYLSWAIPR 120
Mrub_2760     EAYQALPEPRAVVGLSMGGLLAG...WLAEEHKTAALVALAPALGFKNRLAYLAPLLHHVKPW 120
              * **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*

TTC1341      FPGPPSIEDPELKRKNPNYPYFPTRAVLELLALMRKTPEVLPQVKARALVVEAGKDRVVK 179
TSC_c23750   FPGPDSIQDPELKKQNPYPYFPTRALLQLLALMRRTPEVLPKVKANALVIEAGQDKVVD 179
TaqDRAFT_3985 FPGPDSIRDPELKKANPNYPYFPTRSVLELLALMRKTPEVLP...RVRAPALVVEAGR...QVVK 179
Mesil_0878    AKGTASVRDAERKAKSPNYPWMPTEA...VAELVKLQREVDPLLPKVKAPALVLQARH...DSTIP 180
Mrub_2760     AHSTDPAAEEARRRARS...PNYPNFPTVALVQLIALQRRVPELLPRVRAPALVLEAAH...DHTVP 180
              .. . . . . : .*** **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*

TTC1341      --GVDRYFALLGSPRKDYLVFPESGHDLLLD...RDREAVARAVRDWLLASDNYLQ 230
TSC_c23750   PAGVRGYHALLGSSRKEYLVFPESGHDLLLD...QDREAVAVRDWLIANS...THLH 232
TaqDRAFT_3985 --GVR...RYE...LLGSAKKDYLVFPESGHDLLLD...RDRERVAQAVRDWLIANS...NHLR 230
Mesil_0878    EASVRRYYQRLGSAHKQYKVY-DSEH...DLLDSEADKVAADIR...DWLQGILPV-- 230
Mrub_2760     EAAVRRYFALIGGPHKGYRVY-QSQH...DMLDPLAQQISDDIAAWLKEKLV--- 229
              .* *. :*...* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*
    
```

 Pentapéptido conservado GXSXG.



TTC1787: Carboxilesterasa [*Thermus thermophilus* HB27]
TSC_c01340: Carboxilesterasa [*Thermus scotoductus* SA-01]
estA1: Carboxilesterasa tipo B [*Bacillus* sp. BP-7]
1C7I_A: Cadena A de Esterasa Pnb [*Bacillus subtilis*]

```

TTC1787      -----MLQRALPFLALLGLALAQAQFVWETPLGRAQGRLEGGAIIFYGLPYAAEAEER---- 50
TSC_c01340   MRPSTFLRPGAVALTTLGLALAQGIIVQTPGLPALGQIEKGAIIFYGLPYAQANR---- 56
estA1        -----MSESVVKTQYGTVKGISKNGVQVTKGIPYAKPPVQQLR 38
1C7I_A       -----MTHQIVTTQYGVKVGKTTENGVHKWKGIPYAKPPVQQWR 38
              * * * . * : * . : *:***:.

TTC1787      FRAPKPLKAWPPGVGQEA--VACQPAPGITAWFGGPIPPEREDCLVLNVHLPQAVPPPPGG 108
TSC_c01340   FEAPRPVAAWPSGVGKER--VACPQTLGTPARLGGYLPPQREECVNVNLFPLELPPPEG 114
estA1        FKAPDPPAAWEGVLDATAYGVPVCPQPPDLLSYSYPELPRQSEDCLYVNVFAP--DTPGKN 96
1C7I_A       FKAPPEPPEVWEDVLDATVYGPVCPQPSDLLSLSYKELPRQSEDCLYVNVFAP--DTPSQN 96
              *.** * .* :. .***. . : : * : ** : ** : * . * .

TTC1787      FPMVYLHGGAFVTSAAAAEPIYRGHRLSEE-GVVVVPNYRLGPLGFLALPALAEEDPRA 167
TSC_c01340   FPMVYLHGGGFTSGSAAEPIYEGHRLAQE-GVVVSVDYRLGPLGFLALPALAKEDRKA 173
estA1        RPVMVWIHGGTFYLGAGSEPLYDGSNLAAGQGDVIVVTLNRYLGPFGFLHLSSIDEAYS-- 154
1C7I_A       LPVMVWIHGGAFYLGAGSEPLYDGSKLAAGQGEVIVVTLNRYLGPFGFMHLSSFDEAYS-- 154
              *****:*** * *.:**:* * .*: : *:* : *****:*** * .: :

TTC1787      VGNYGLLDVLEALRFVVDYIRYFGGDPKNVTLFGESAGGMLVCTLLATPEARGLFQKAIV 227
TSC_c01340   VGNYGLLDVEALRFVQRYIRYFGGNPQNVTLFGESAGGMLVCTLLATPEAQGLFHRAIL 233
estA1        -DNLGLLDQTAALKWVKDNI SAFGGDPENVTVFGESAGGMSIAALLAMPAAKGLFQKAIL 213
1C7I_A       -DNLGLLDQAAALKWVRENI SAFGGDPDNVTVFGESAGGMSIAALLAMPAAKGLFQKAIM 213
              . * **** * :.:* : * * :*.***:***** * :.:* * * :*:*:***:

TTC1787      QSGGCGYVRPLKEDLALGEAWAKARGCDPKDLACLALPLERLLP-EEPGLEAMGRFLSN 286
TSC_c01340   QSGGCHQVHPLEKDFPFGERWARNLGCSPEDLACLRHPLSRLFPSQEP--KAPPDITSS 291
estA1        ESG-SSRTMTEEKAASTAHAFRLRILGIDGHLDRLHTVSAEDLLK-----AADQLRKTE 266
1C7I_A       ESG-ASRTMTEQAASTAAAFQVLGINESQLDRLHTVAAEDLLK-----AADQLRIAE 266
              **: * . . . : : . . : : * . . * * : : . . * : * : . :

TTC1787      PSLFRTGPFKPHLSFLLPQDPREALREGKAAGIPLIAGANAEEVAFPSLQALLGPGDWE 346
TSC_c01340   ALGFNPSPFKPHLG-ALLPDSPLQALGQKARGIPLLVGANLEELTFPGLAWLLGPGTWE 350
estA1        NENIFQLFFQPALDPKTLPAEPEQAI AEGAADGIPLLIGTNRDE-----GYLFFTPDSE 320
1C7I_A       KENIFQLFFQPALDPKTLPEEPEKSI AEGAASGIPLLIGTNRDE-----GYFFFTPDSD 320
              : * : * . * * . * : : : * * * * : * : : * : : . . :

TTC1787      EAERRLLESGLSREKAQALLAHYRKGVPDPKRAWGEVQTDLTLLCPSLKAARLQAPHAPT 406
TSC_c01340   EFSGRLLAAQGIIPKEREALTKAYQKRFSDPRKAWGEVQTDLQLLCPSLKAARLQAFPAPT 410
estA1        VHSQETIDEALEYLLGQPLAKKAADLYPRSLESQIHIMTDLLFWRPAVACASAQSRYPAPV 380
1C7I_A       VYSQETLDAALEYLLGKPLAEKVADLYPRSLESQIHIMVTDLLFWRPAVAFASAQSHYAPV 380
              . . : : : * . . . . : : * * : * : : * * : . * .

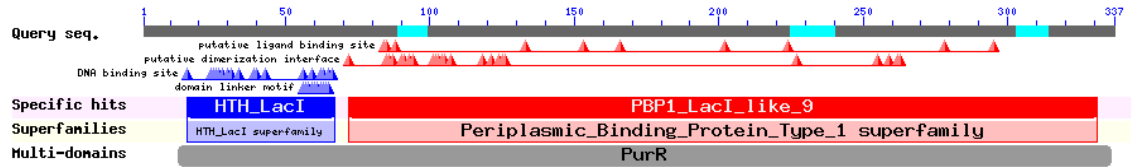
TTC1787      YAYLFTFRAPGWEGLGAFHGLELAPLFGNLLERPFPLPLFLRQEAQEAEYLGKKMRRYWT 466
TSC_c01340   YAYLFTFRVPGWEGLGAFHGLELAPLFGNFEEMPFLPLFLSAEAREKAEALGKRMRRYVW 470
estA1        WMYRFDWHPDKPPYNKAFHALELFPVFGNLNG---LKRNVQADITDEVKQLSHTIQSAWL 437
1C7I_A       WMYRFDWHPEKPPYNKAFHTLELFPVFGNLDE---LERMAKAEITDEVKQLSHTIQSAWT 437
              : * * : : * * * * . : * * : * : : : : * : : : *

TTC1787      SFAKDGEK-GWPRWPLYREG--HLLRLDVPLGLLPDLYEERCGALEVLGGLL 515
TSC_c01340   SFAREGEP-RGWPRWPTYEEG--YLLRLDEPPGLLPDSYEERCGALEALGGLL 519
estA1        AFAKTGNPSCEDVQWPAYTEDKRETLILNSELSTIEHDPDGEKRRKLLHS--- 486
1C7I_A       TFAKTGNPSTEAVNWPAYHEESRETIVLDSEITIENDPESEKRRKQLFPPSKGE 489
              : * : * * . * * * : * : : * * : *
    
```

Pentapéptido conservado GX SXG.



9. ANEXO II



TTP0038: Proteína A del control del catabolito [*Thermus thermophilus* HB27]

HMPREF9536_04593: Proteína periplásmica de unión y dominio de unión de azúcares de la familia LacI [*Escherichia coli* MS 84-1]

ECIAI1_2947: Regulador transcripcional GalR [*Escherichia coli* IAI1]

ECDG_01996: Regulador transcripcional de la familia LacI [*Escherichia coli* B185]

EC55989_2401: Regulador transcripcional GalS [*Escherichia coli* 55989]

SeW_A2526: Regulador transcripcional GalS [*Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Weltevreden str. HI_N05-537]

BpOF4_06355: Regulador transcripcional de la familia LacI [*Bacillus pseudofirmus* OF4]

```

TTP0038      MTKARP TIAEVARRAGVSPATVSRVLNGTARV SPEKVR AVLQAVEELGYAPSPLAQGLAT 60
HMPREF9536  ----MATIKDVARLAGVSVATVSRVINNSPKASEASRLAVHNAME SLSYHPNANARALAQ 56
ECIAI1_2947 ----MATIKDVARLAGVSVATVSRVINNSPKASEASRLAVHSAMESLSYHPNANARALAQ 56
ECDG_01996  ---MNMTIR DVARQAGVSVATVSRVLN NSTLVSADTREA VMKAVSELDYRPNANAQALAT 58
EC55989_2401 ----MTIR DVARQAGVSVATVSRVLN NSTLVSADTREA VMKAVSELDYRPNANAQALAT 56
SeW_A2526   ----MTIR DVARQAGVSVATVSRVLN NSALVSPDTRDA VMQAVTLLGYRPNANAQALAT 56
BpOF4_06355 ----MTIR EVAKMAGVSVATVSRVINNGKVKVQATEEKVREI IKELNYVPSAIAVSLNN 56
          ** :*: ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

TTP0038      GRSYAVGILLSDFASPFPGPIEALTLELEATPYRPIAVPGHWSLVRELEALEFLKAHRV 120
HMPREF9536  QTTETVGLIVGDVSDPFFGAMVKA VEQVAYHTSNFLLIGNGYHNEQKERQAIEQLIRHRC 116
ECIAI1_2947 QTTETVGLIVGDVSDPFFGAMVKA VEQVAYHTSNFLLIGNGYHNEQKERQAIEQLIRHRC 116
ECDG_01996  QVSDTIGVVVMDVSDAFFGALVKAVDLVAQQHQKYV LIGNSYHEAEKERHAIEVLIRQRC 118
EC55989_2401 QVSDTIGVVVMDVSDAFFGALVKAVDLVAQQHQKYV LIGNSYHEAEKERHAIEVLIRQRC 116
SeW_A2526   QVSDTIGVVVMDVSDAFFGALVKAVDLVAQQHQKYV LIGNSYHEAEKERHAIEVLIRQRC 116
BpOF4_06355 KKSKTIGLMLPDI TNPFPAELAKGVVEEVAKENGYTVILCNTNGDLQSEL DHLQVLEQKYV 116
          : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : :

```

```

TTP0038      EALVLLGTALDGEALGELG---IPVLA FQRVEGPKAWSLCLDNQQAAYEATRYLIDRGH 177
HMPREF9536  AALVVHAKMIPDADLASLMKQMPGMVLINRILPGFENRCIALDDRYGAWLATRHLIQQGH 176
ECIAI1_2947 AALVVHAKMIPDADLASLMKQMPGMVLINRILPGFENRCIALDDRYGAWLATRHLIQQGH 176
ECDG_01996  NALIVHSKALS DDELAQFMDNIPGMVLINRVVQGYAHRVCVCLDNLSGARMATRMLLNNGH 178
EC55989_2401 NALIVHSKALS DDELAQFMDNIPGMVLINRVVQGYAHRVCVCLDNLSGARMATRMLLNNGH 176
SeW_A2526   NALIVHSKALT DRELSDFMDQIPGMVLINRIVPGYAHRVCVCLDNVSGARMATRMLLNNGH 176
BpOF4_06355 DGIILSHTLSYSDVEHIA---TPIVSI DRTLEG-NFPSVTSNNFQGA VMVAVRHLLKGC 172
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

TTP0038      TRIVHISSHRGGMDVRDRLLGYRKAMREAG---LEARV VYGDLEEEGGYRAAAEFRRYP 234
HMPREF9536  TRIGYLCNHSISDAEDRLQGYDALAESGIAANDRLVTFGE PDESQAMTELLGRGR 236
ECIAI1_2947 TRIGYLCNHSISDAEDRLQGYDALAESGIAANDRLVTFGE PDESQAMTELLGRGR 236
ECDG_01996  QRIGYLSSSHGIEDDAMRKAGWMSALKEQDIIPPESWIGTGT PDMPGGEAAMVELLGRNL 238
EC55989_2401 QRIGYLSSSHGIEDDAMRKAGWMSALKEQDIIPPESWIGTGT PDMPGGEAAMVELLGRNL 236
SeW_A2526   QRIGYLASSHHIEDDAMRREGWLHALQEQGIAAESWIGTGT PDMQGESAMVELLGRNL 236
BpOF4_06355 KKIAHISG PQSIRTARLR LQGYLEVVDLDWY-TEALVADGDY EIKSGYEATRLLQMN 231
          : * : : : : : * * : : : : : : : * : : * : * :

```

```

TTP0038      DTAIFAANDQTAFGARLYLYEQGLRVPEDVSLVGFDDIALSAYQIPPLTTVRQPIQDIG 294
HMPREF9536  NFTA VACYNDSMAAGAMGVLDNDNGIDVPEGISLIGFDDVLSRYVRPRLTTVRYPIVTMA 296
ECIAI1_2947 NFTA VACYNDSMAAGAMGVLDNDNGIDVPEGISLIGFDDVLSRYVRPRLTTVRYPIVTMA 296
ECDG_01996  QLTAVFAYNDNMAAGALTALKDNNGIAIPLHLSIIGFDDIPIARYTDPQLTTVRYPIASMA 298
EC55989_2401 QLTAVFAYNDNMAAGALTALKDNNGIAIPLHLSIIGFDDIPIARYTDPQLTTVRYPIASMA 296
SeW_A2526   QLTAVFAYNDNMAAGALTALKDNNGIAIPLHLSVIGFDDIPIARYTDPQLTTVRYPIASMA 296
BpOF4_06355 DIDGIFAGNDLMAVGCLKAIHSLGLHVPRDISVIGFDGINFSKITIPELSTISQPIYDMG 291
          : : : * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

```

TTP0038      IALGRALRAVLAGEVPT--LPRLELRLVERASVREVRA----- 330
HMPREF9536  TQAAELALALADNRPLPEITNVFSPTLVRRHSVSTPSLEASHHATSD--- 343
ECIAI1_2947 TQAAELALALADNRPLPEITNVFSPTLVRRHSVSTPSLEASHHATSD--- 343

```



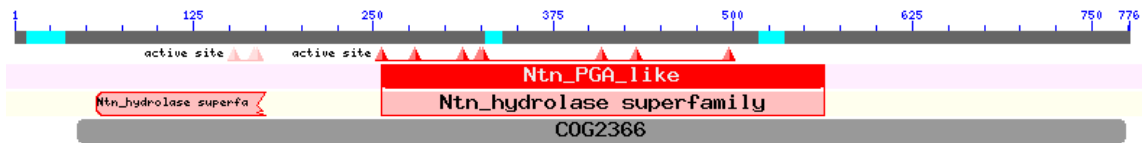
ECDG_01996	KLATELALQGAAGNIDPRASHCFMPTLVRRHSVATRQNAAAITNSTNQAM	348
EC55989_2401	KLATELALQGAAGNIDPRASHCFMPTLVRRHSVATRQNAATITNSTNQAM	346
SeW_A2526	KLATELALQGAAGTLDITATHCFMPTLVRRHSVAWRQNAVLTN-----	340
BpOF4_06355	LLATNTLLKAMEGQCYEQMVYELDVQLIERDSTK-----	325

. . . : * : . * *

- Región H-T-H (Hélice-Giro-Hélice) de unión al DNA.



9. ANEXO II



TTC1972: PAC [*Thermus thermophilus* HB27]

TaqDRAFT_4937: Peptidasa S45 penicilín amidasa [*Thermus aquaticus* Y51MC23]

TSC_c04470: Penicilín acilasa [*Thermus scotoductus* SA-01]

Mesil_0788: Peptidasa S45 penicilín amidasa [*Meiothermus silvanus* DSM 9946]

Mrub_2155: Peptidasa S45 penicilín amidasa [*Meiothermus ruber* DSM 1279]

Rxyl_2001: Penicilín amidasa [*Rubrobacter xylanophilus* DSM 9941]

Caur_3748: Peptidasa S45 penicilín amidasa [*Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl]

Dgeo_0269: Penicilín amidasa [*Deinococcus geothermali*s DSM 11300]

PLES_34311: Penicilín acilasa [*Pseudomonas aeruginosa* LESB58]

QUIP_PSESM : Acil-homoserín lactona acilasa [*Pseudomonas syringae*]

```

TTC1972          MLFPTMKRFLRGLVWLLGFLFLALLLGFSGYLYLR---ASLPQEGGRIALEG-LSAPVE 56
TaqDRAFT_4937   -----MKRFLRAMAWLLALGLLLVLALLSGYLYLR---SSLPQEEGRALKG-LSAPVE 51
TSC_c04470      -----MKRLLRVFAWLLGLALAVLGVVLAAYVTLR---ASLPQVEGRMVKLG-LSAPVE 51
Mesil_0788      -----MRRFLRGLGRFLGILLGLLVVAGVGVFFWLRG--ATLAQHdGRLALGG-LSAPVE 52
Mrub_2155       -----MRLRLRLLGRLLLVVGLALVAVGGWFWLRA--ATIPQHSGRALKG-LSAPVE 51
Rxyl_2001       -----MHRGLRWAGFAAAALVALLAAASCGYLYLRL--STSPQTNGTLELEG-LRRPAE 52
Caur_3748       -----MRLQRRFIGWIALLVVVVVLGGSGGYLWLSR---SLPQISGDIRVRG-ISGPVT 51
Dgeo_0269       -----MRRLLVR-VGRGVLWVLLLVLLLALGAVVWLKE--TSRPQVSGTLTLPG-LAGPVS 51
PLES_34311      -----MSKNARYAWRLSLGGLLLGLLACAVYLLA--VPLGFKYGEIQVGHGLEHEGR 50
QUIP_PSESM      ----MASPALRHFLPRFGAAAAAASFSLAGCQLGGGDPETVLPASGTFPLKG-LAQNVS 55
:               :               .               * : : :

```

```

TTC1972          VVRDGKGVVIRIRA-ATLKDFFAQGFVHAQERLWQMEFQRRVGGQRLSEILGEATLPQDR 115
TaqDRAFT_4937   VVRDGKGVVIRIRA-ATLRDLFFAQGFVHAQERLWQMEFQRRVGGQRLSEVLGEATLPQDR 110
TSC_c04470      VGRDARGVVIRIRA-QTLKDLFFAQGFVHAQERLWQMEFQRRVGGQRLSEVLGEATRAQDR 110
Mesil_0788      VLREPRGVVHIKA-ENTHDMFFALGVVHAQERLWQMEFQRRVGGQRLSEVLGKATLEQDK 111
Mrub_2155       MSRTAEGVLHIKA-QTDEDAFFALGVHAQDRLWQMEFQRRVGGQRLSEVIGKATLEQDR 110
Rxyl_2001       VVREPSGVVHIRA-ADEHDLFFALGVHAQDRLWQMEFQRRVGGQRLSEVLGRAALEQDR 111
Caur_3748       IVRDRDGVVAHITG-TTDADAVFGLGFVHAQERLWQMEVQRRIGHARLSEIFGATTLPQDK 110
Dgeo_0269       VTRDAWGVPHIRAQASDEDAMFALGFVHAQDRAWQMDQRRVAGQRLAEVLEGEALPQDR 111
PLES_34311      IAWDAAGVPHIRA-QSLKDGYYFLGYSHARDRLWQMEFARRYAGGTLSEVFGAKTLPMDR 109
QUIP_PSESM      VRRNNMGMPLES-STYHDALFTLGYVHAGDRIGQMLGMRLLAQGRLESEVAGADALEVDR 114
:               * : * . * * * ** : * * * . . * : * : * :

```

```

TTC1972          FLRTWGFYRAARAAYGKLYPEEKEAVDAYAAGVNAFLASGA-PLPPEFRLLGFR-PEPWT 173
TaqDRAFT_4937   FLRTWGFYRAAEAAERLYPEEKEAVDAYAAGVNAFLASGA-PLPPEFTLLGFR-PEPWT 168
TSC_c04470      FLRTWGFYQAAKSAYERLYPEEKEAVDAYVAGVNAFLQSGA-PLPPEFRLLGFR-PEPWT 168
Mesil_0788      FLRTWGFYRSAERAYQGISPQAKAAVDAYVAGVNAYLATNP-PLPLEFRLLGFR-PEPWK 169
Mrub_2155       FLRIWGFYKAAEQAYGSLSPSAKAVVDAYVAGINAYLATNP-PLPLEFRLLGFR-PEPWK 168
Rxyl_2001       FLRTWGFYRAARSAYRSLGPEGRAAVDAYVAGVNAYLRTDP-GLPLEFRLLGYE-PEPWR 169
Caur_3748       FLRTLGVARAARSALERLDSSETLAWLEAYAAGVNAFLATNP-VLPPEFLILGVQ-PEPQW 168
Dgeo_0269       FLRTWGFYRAAQSAIPALSEQARRMVRAYTAGVNAGFAQG--RLAPEFRILGYT-PEPWT 168
PLES_34311      FARTLGFRTAEGIYANLDAPTRVLLQRYSDGINAYLELAPAALPLEFSLVRHERPGPWG 169
QUIP_PSESM      LMRSVNLKRNASDLYNAASPRLKRFFDYYARGVNAYLFRYRDKLPADVARAGYT-PEYWK 173
:               * .. : * . * * : * : * : * : * :

```



TTC1972 GPDVLVWAKMMSYDLSGNWEEELKRHRLLARGVSPKRLELEKPPYPEDAPTIVLRAEDLKL 233
 TaqDRAFT_4937 GPDVLVWAKMMSFDLSGNWEEELLRHRLLARGVSPERLLELPPYPEDAPTIIRSEDRL 228
 TSC_c04470 GPDVLVWAKMMSFDLSGNWEEELLRHRLLARGISQERLLELPPYPEDASTILQGEDLEL 228
 Mesil_0788 SADVMVWAKMMAYDLSGNWRESELQRYAWAAQGMSPERMAQLRPPYPEDAPTIVLQSEDLKL 229
 Mrub_2155 PADVLVWAKMMSYDLSGNWRSELQRLQWAAKGMTPARMAQLKPPYPADAPTIVLQAEIDLQL 228
 Rxyl_2001 PADVLVWAKMMSFDLSANYESELERYRLRARGLEPPRIAEMLPPYPEDGPVILPEGGGAS 229
 Caur_3748 PIDSLVWAKMMAWDLGGNWSNELMRATLIAK-IGPEDAAFLMPPYTADGPLIMP--AAGV 225
 Dgeo_0269 DVDSIAWSKLMAYDLGNADDEILGTQVVRRLGEAKLNEVLPPYPQAPTILSREELGL 227
 PLES_34311 PVDLSLHLLYSWTLNLANLGMQLQRLALAEH-LDLARINEVFAPYGERPPATRDYASLY 228
 QUIP_PSESM PEDSALIFSLNFSLSVNLQEEELS-ALVLAQKVGADKLAWLLPTYPDEELPFAEADKLKG 232
 * : : * . * : : : : : * . . :

TTC1972 PLKRE-----EAPSALLRMAPP-----FMEASNNWVAVGSRRTETGKPF 272
 TaqDRAFT_4937 PLGRE-----EAPAALLQMAP-----FLEASNNWVAVGSRRTTTGKPF 267
 TSC_c04470 PLKRE-----EAPAALLRMAPP-----FLEASNNWVAVGSRRTVTGKPF 267
 Mesil_0788 PPPAPGES-----QPARTLLALAHSLPNNLVLAGDDKARASNNWVIVSGSRRTTTGKPL 281
 Mrub_2155 PPPARPDG-----ESARSLLSLARLPQALHLPGEMLMARASNNWVIGPARTVSGKPL 280
 Rxyl_2001 PQAER-----QAEALLRLRRSLP-----VSLEASNNWVVSGRRTESGAPL 269
 Caur_3748 VSPATAADTPHTPLKPETTRRMLDLAQELQFLNRIG--DQLAGSNNWVIGGSRRTASGKPL 283
 Dgeo_0269 QOQAPHHRRVATVLPAAATLRLAQLEAARALGLER--LPGKGSNDWVIAGSRRTASGKPI 285
 PLES_34311 RSLRG-----TPDAGKLLSLQPGSN-----VEGIGSNNWVVSASRSATGKPL 270
 QUIP_PSESM LNLSNQVTG-----LSDLNRIALQLSDLN-----MLGVAASNNWAIAPQRSRSRGKSL 279
 : * . . * . . * : : * . . :

TTC1972 LANDPHLALQAPSLWFLMALEAPGLRAIGATLPLGPGVVIIGNRERIAWGVTVNGADVDEL 332
 TaqDRAFT_4937 LADDPHLRLQAPSLWFLMALEAPGYRAIGASLPGVPGVIGRNDRIAWGVTVNGADVQDL 327
 TSC_c04470 LANDPHLRLGAPSLWFLMALEAPGYRVIIGASLPGVPGVIGRNDRIAWGVTVNGADVQDL 327
 Mesil_0788 LANDPHLGLGVPSVWFLVDLEAPGYRAIGSSFPGLPAVVIIGNRDRIGGVTTVNGADVQDL 341
 Mrub_2155 LANDPHLGLGAPSVWYLVHIEAPTYKAISSFPGLPAVVIIGNRERIGWGVTTVNGADVQDL 340
 Rxyl_2001 LANDPHLGLGVPLWYLAHLKSPTLEAVGATLPGVPGVVIIGNRNDIAWGVTVNGADVQDL 329
 Caur_3748 LVNDPHLANRIPS IWYLAHIQGSTINVIIGATFPGLPVVVIIGNRERIAWGVTVNGADVQDL 343
 Dgeo_0269 LADDPHLALSSPMLWYLDVQGPRLRAIGATIPGLPGVIGRNDRVAWGVTVNPNVDQDL 345
 PLES_34311 LANDPHLRLTNPAAFYLASLKIPLGSLTGANFAGAPLFIIGNRERIAWGVTVNGADVQDL 330
 QUIP_PSESM LASDMQLPAGLNSAWSFVQIRAPKYQVSGASIAGLPLVLSGFNGKLAWSMSNVKGDNDQDL 339
 * . . * : * : : . . * : : . * * : * * : * : * :

TTC1972 YLLEEVEGR---GYRYKGRVVPYGVREEVIRVKGGREEVLVKRETVYGPVITDALE---- 385
 TaqDRAFT_4937 YLLEEAGG---GYRYKQVRPYRVREERIRVKGGREEVFKVRETVYGPVITDALQ---- 379
 TSC_c04470 YLLEDVGGK---GYRYRGQVLPYRVREERIPVKGGKEEVLVRETVYGPVITDALE---- 380
 Mesil_0788 YILDQVSG---GYRYQGGIEPFQTRTETIKVKGQPDVTRITVRESRYGPVIVSDVVK--- 393
 Mrub_2155 YIMEEVAG---GYRYKGRVEPWRTREVIKVKGEVDVTLQVRESRYGPVINDVVK--- 392
 Rxyl_2001 YVLEEARDGR---GYRYRGEVPRYRVREERIEVGDGEDVTLRVRETVYGPVIVSGVVD--- 383
 Caur_3748 YIERIDARN---YAEYNGRREPVTLISEVITVKDSEPVTLTVRITRHGPVIVSDVLE--- 396
 Dgeo_0269 YIEPDGAK-----LTARTEVIKVKGQPDVHVTVRESEHGPIISDVGA--- 387
 PLES_34311 YLERVDFQDP---RRYLTDPDGYRPFTRERITVRDGETVSVLEVRTRHGPFVIVSDYEPARL 389
 QUIP_PSESM FLEKIKREGNRVSYMADGKWVPAASHQETFLVKGGSPIRETVYETRHGALLNASATP--- 396
 : : * : * . * : : * . . . :

TTC1972 ---DPPKTPMALRWVSLDEEDHILMAFLGVNRAGNWEFFKALLPYSAPSQNPFVYADVEG 442
 TaqDRAFT_4937 ---DPPKTPMALRWVSLDPEDHILMAFLGVNRARDWASFVAALRDYSAPSQNPFVYADVEG 436
 TSC_c04470 ---NPPQVPMALRWVSLDEEDHILMAYLGINRAQNWQEFVAALSHYSAPSQNPFVYADADG 437
 Mesil_0788 ---SAGSKPLALRWALDPEDKTIEAFLGLAEAKNWAEFKAALSHYNAPSQNPFVYADVDG 450
 Mrub_2155 ---NPGARPLSLRWTSLDPTDRTIEAFLGIARARNWEEFKAAALALYNAPSQNPFVYADVDG 449
 Rxyl_2001 ---APGARPLALRWTSLEPEDRTIEAFLGVNRAGGWEFFNEALRLYKAPSQNPFVYADEEG 440
 Caur_3748 ---DVDEP-LAFRWALDPEDTTLRGIINLNRARNWQEFVAALSDYKAPMQSFVYADVEG 452
 Dgeo_0269 ---GAVGPRVALKWTALQPGDITLAEFLGLNYARNWPDFVAALKRYVAPSQNPFVYADVDG 444
 PLES_34311 PQAQRDLVIALAWTGLDRHDKTFPSLLAINRAEGWEQFLDAAADFVPPQNMVYADVEG 449
 QUIP_PSESM ---PGNGLSLALQVPDFK-DDKSLDAFFDLSRAPNVEKAFDTSREIRAITLNMVFADAS- 451
 : : : . * : : : * . . : . . : * : * . :

TTC1972 NIGYIAPGKFPVRKE--GHTGMVPVPG-NGEWDWLGYRRPEEWPQAFNPARGYLVTANHK 499
 TaqDRAFT_4937 HIGYIAPGKFPPIRKA--GHTGMVPVPG-NGDWDWLGYRRPEEWPQVLDPPRGYIVTANHK 493
 TSC_c04470 NIGYIAPGKFPPIRKE--GHTGMVPVPG-NGEWDWQGYRKPEWPKVLPNPKEGFLVTANNK 494
 Mesil_0788 NIAYMAPGKFPPIRKP--GHSGLMPVPG-DGNWDWQGYLPQEEWPPQVYNPKEGFIVTANNK 507
 Mrub_2155 NIGYMAPARFPIRRP--GHSGLMPVPG-DGNWDWQGYLPQDQWPPQVYNPKEGFIVTANNK 506
 Rxyl_2001 NIGYVAPGKFPVRRE--GHSGLAPVPG-DGRWDWEGSVPFESWPRALNPREGFVVTANNK 497
 Caur_3748 NIGFYAPGLVPIRR--NGDGSVPVPGWTDYEWIGVYVFAELPHIYNPPQDYIVTANNQ 509
 Dgeo_0269 NIGYYAPGRVPIRR--GWDGSLPVPG-DGQHEWSGFIPFAQLPHTFNPADGLVVTANNK 500
 PLES_34311 NIGYVSAGRVPRLRGADDDLHGLAPSGWESRYDWVGYVPESAKPRSLNPREGFIVTANQR 509
 QUIP_PSESM NIGWQVTGRFPNRRE--GQGLLSPGWGDKYDWDGFADSMMLHPYDQDPRQGWLAAAANQR 508
 : * . : . . * * * * . : * * * * : * . : : * : * . :

TTC1972 VTPKGFPPYALT--YDWAEPYRAERIEELLAKE-KLSLEDMKAIQQDQKSLLYRDFRPVL 556



9. ANEXO II

TaqDRAFT_4937	VTPEGFPYALT--YDWAEPYRARRIEELILGKE-KLSLEDIKAIQQDQSRLLYRDFHPVL	550
TSC_c04470	VTPQGFPYALT--YDWAEPYRARRIEELLLAKE-RLALEDMKAIQQDQKTLFRDFRFPVL	551
Mesil_0788	VTAPGYPHITIS--LEWEEPYRARIQMIKAKD-KLSPEDMIAMQKDLKSLLYDAFKPVL	564
Mrub_2155	VTAPNYPHITIS--LEWEEPYRARIQMIKAKD-KLSPEDMIAMQKDLKSLLYDAFKPVL	563
Rxyl_2001	AVPDSYPYRIS--LEWAEPYRARIIRRMILSAG-RLGVKDMVRIQQDRRSLLFEDFRPVL	554
Caur_3748	VVGDDYPYLLG--TSWAAPYRARRIEELIEQKS-ALTVADMRTMLGDVVSLHARELLPIL	566
Dgeo_0269	VVPEGYPFNLGNIRNWAEPYRARIETALLTQKPRELTVDDVKKVQLDVTVSLVWRDLKPFVL	560
PLES_34311	IVPPDNADFDFG--HDWVLPYRYDRIREWLGPGQRTLEDLSLELQNDFFSSVMASLLPKML	567
QUIP_PSESM	TIPKGYGMQLS--NSWGYPERAERIAELANSJK--QDLRSTVAMQYDQTTTFAAKLKTIF	564
	. : . * * * * . : : : . :	
TTC1972	ELLTPLS-----EGARAWRDRLLAWDGTMAPGSEALVFALWY-TELTRLP	601
TaqDRAFT_4937	QGLTPLS-----ERARAWRERLLAWDGTMAPGSEALVFALWY-TELTRLP	595
TSC_c04470	ELLNPLS-----ERAKAVRERLLAWDGTMDKSSEALVFALWY-TELTRLP	596
Mesil_0788	ETLTPLS-----EAAGEWKAKLLAWDGVARPEQQEPEVFEAWY-TELTRLP	609
Mrub_2155	ELLNPLS-----ENARQWKARLLAWDGMRAEQVEPTVFQAWY-TELTRLP	608
Rxyl_2001	EDLGPLG-----PRARQWRERLLRWGDGDARPGSREAALFEAWY-TELTRLP	599
Caur_3748	REVTPNG-----PREAAALELLRSWDGTMAPGSDAAAQVFGYYHALLEAVF	612
Dgeo_0269	LATRPDG-----DLSRQALEQLRGWNGDERIDVVPPTIFEAWL-AELQOMA	605
PLES_34311	EQVSDPE-----LRASEAFALLQGWNHQAADLAAPLIAGYVWVRAFTRELL	613
QUIP_PSESM	QAPGMSKPLKQALDALPEADRNNAREAFTRMAFDGKLSATSADAALYELFLQESAKQIF	624
	* : : : :	
TTC1972	QREVGEAYWD-----EPRYLLKALKEGDKNCD--QPETEYRESCLDYAALALER	648
TaqDRAFT_4937	EKEVGEAYWD-----EPRYLLRAMREGDKNCD--QPETEYKETCLDYAALALER	642
TSC_c04470	KREVGEAYWD-----EPRYLLRAMREGDPCND--QPNTYRESCLDFAALALER	643
Mesil_0788	KKEVGEAYWD-----EPRYLLSALKSNDPCND--QPNTYRESCLDFAALALER	656
Mrub_2155	SQEVGEAYWD-----QPRYLLAAMRQGDPAQC--TPDT---QTCLEFAALALDK	652
Rxyl_2001	AREVGRRYWD-----EPRYLLRAMRRGDRSCR--PSGG--RGDCLEFAARALER	644
Caur_3748	ADELGEFFSETYRHRD---FAAMALRRVLEGRQEWCDNVNTIATTEDCATILATAFSK	669
Dgeo_0269	QDELGD-----GTR---LSSLAVLNQLRANGQLCRNERDETSRQDQAGEMQASLKR	654
PLES_34311	QPRIGTQLLASG--WNQ---RNYDGLRLILDGQADLR---FWCGQEQGCDLKLNSLR	665
QUIP_PSESM	LDELGPETSPAQALVANASSYSYSPQADHLLGRDSDPYWDDVKTQKEDKPAIARSALAA	684
	. : : : :	
TTC1972	ALDRKE-----ALGARAWGEVHRARFPHA-VLTHT-PLKRLSDREVAFGDORYTVNVGP	700
TaqDRAFT_4937	ALERKE-----ALKARAWGEVHRAGFAHA-VLSHT-PLKRLSDRALPFGDORYTVNVGP	694
TSC_c04470	ALDRKE-----ALRVRSWQVHRATFPHA-VLTHT-PLKRFTDRRVFPGDORYTVNVGP	695
Mesil_0788	ALKRLG-----EPVPR-WGLDLHQATFKHP-VLTNVAPLRRFVDRVPHGGDORYTVNRGA	708
Mrub_2155	ALDRFG-----NNPPR-WGEVHRATFPHA-I LTNVPLNRLSDRAVPHGGDORYTLNRAS	704
Rxyl_2001	ALERLG-----EEVPE-WGAHRAVFEHP-VLSRT-PLARFAGREVAAGGDAYTVNVGP	695
Caur_3748	GLAAMATAQGEEDPTRWRWRVHQAVFPHN-PFSQVQALRGIFERRVPTGGDSFTVNFAP	728
Dgeo_0269	AVDRLAARLGP-NPAGWTYGVHTVASNHR-AFGGVKALGWLFNHSTPTNGGTNTVNVAR	712
PLES_34311	ALDELRAAHG-SAPSGWKWGEAHAALAEHV-PFHKT-PLRALFDLKNKGGDNFVNVVGR	722
QUIP_PSESM	AVTRGDSLLG-SDHKAWQWGLHRDNWTSANPLARQLGGGEPNRSASAGGDHDTLNVS	743
	. : . : * : : : : : . * . : : *	
TTC1972	FDP----ETLAMGHGPSYRQIVDLSDMEGSLFVHPMGQSGHFLSRHYADLLPLWQRGDYL	756
TaqDRAFT_4937	FDP----RTLMDHGPSYRQIVDLADMEASLFVHPMGQAGHLLSPHYADLLPLWARGDYL	750
TSC_c04470	FDP----ETLLMSHGPSYRQIVDLAHEASLFVHPMGQGTGHFLAPGYDGLLPLWAGGEYL	751
Mesil_0788	YDP----ANFHMTVGSSYRQILDVDFSLERSLYIHPMGQSGSPLSGDFANLLPLWQRGEYL	764
Mrub_2155	YDP----STFRMTVGSSYRQILDVDFADLERSLYIHPMGQSGALLSGGYDNLAKWAGGQYL	760
Rxyl_2001	YDP----ASFRMDSGPSYRQIVDLSPEGRSLYVHPMGQSGSPLSGHFDLGLWSSGGYQL	751
Caur_3748	MRLN---EGYLQYNAPSRYRQIIDFADLAESRFIHTTGQSGNVLSNRYSDYLALWQQTGDI	785
Dgeo_0269	PDP----DTLRQTQGPSYRQIIDLSDLNRSIYVGTGQSGNPFQGDHVSQQRLWAAAGEYL	768
PLES_34311	FDYSDPANPFNTRIAATLRMVIDLADFNDNSRYALSTRNSGLPFDG-ATDLNELWARGAYI	781
QUIP_PSESM	FEWG---KGF DARVAPSLRMIVDFSLVEPMTGMINTGQSGNPASPYANSIEFPWQKQYM	800
	. : : * : : * : : * : : * : : *	
TTC1972	PMRFGAP-LG-----RTLLEPLPSP----- 776	
TaqDRAFT_4937	PMGFAG--EG-----RTILLEPGR----- 767	
TSC_c04470	PMAFSPLGWE-----KVLLEPGR----- 770	
Mesil_0788	AMKTQDYPVQ-----SRQRLEPLR----- 783	
Mrub_2155	PMRMGETSFR-----TRQTLPLR----- 779	
Rxyl_2001	RMRTAGYEAD-----DALTLRPAR----- 770	
Caur_3748	PMRFSGTIDG-----ERLVLPDR----- 804	
Dgeo_0269	PMSTDAQDWGR---TTTLTLPQR----- 789	
PLES_34311	RIADDPDAT---DRQLVLRPSASSSGEPRE 809	
QUIP_PSESM	SIPLQQQNYEKGYKQRLTLTPGK----- 824	
	: * *	

