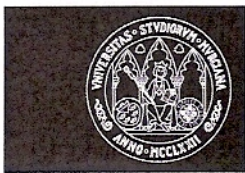


UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Estudio de la Lisina-Épsilon-Oxidasa LodA Sintetizada por *Marinomonas mediterranea*.
Papel de la Flavoproteína LodB en la Generación del Cofactor Quinónico de LodA mediante Modificación Post-Traduccional.

D^a. M^a Dolores Chacón Verdú
2015



D. José Tudela Serrano, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** * de Biología Molecular y Biotecnología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Estudio de la lisina-épsilon-oxidasa LodA sintetizada por *Marinomonas mediterranea*. Papel de la flavoproteína LodB en la generación del cofactor quinónico de LodA mediante modificación post-traducciona", realizada por D^a María Dolores Chacón Verdú, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Antonio Sánchez Amat, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 30 de Abril de 2015, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 30 de Abril de 2015



Doctorando: D^a. María Dolores Chacón Verdú



**UNIVERSIDAD DE
MURCIA**

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Antonio Sánchez Amat, Catedrático de Universidad del Área de Microbiología en el Departamento de Genética y Microbiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA LISINA-ÉPSILON-OXIDASA LodA SINTETIZADA POR *Marinomonás mediterranea*. PAPEL DE LA FLAVOPROTEÍNA LodB EN LA GENERACIÓN DEL COFACTOR QUINÓNICO DE LodA MEDIANTE MODIFICACIÓN POST-TRADUCCIONAL", realizada por D^a. María Dolores Chacón Verdú, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de Abril de 2015

El trabajo realizado en la presente memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Chacón-Verdú, M. D.; Gómez, D.; Solano, F.; Lucas-Elío, P. and Sánchez-Amat, A. (2014). *lodB* is required for the recombinant synthesis of the quinoprotein L-lysine-epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(7):2981-2989. doi: 10.1007/s00253-013-5168-3.

Chacón-Verdú, M. D.; Campillo-Brocal, J. C.; Lucas-Elío, P.; Davidson, V. L. and Sánchez-Amat, A. (2015). Characterization of recombinant biosynthetic precursors of the cysteine tryptophylquinone cofactors of L-lysine-epsilon-oxidase and glycine oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *BBA-Proteins and Proteomics*. pii: S1570-9639(14):00334-3. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.018.

Campillo-Brocal, J. C; Chacón-Verdú, M. D.; Lucas-Elío, P. and Sánchez-Amat, A. (2015). Distribution in microbial genomes of genes similar to *lodA* and *goxA* which encode a novel family of quinoproteins with amino acid oxidase activity. *BMC Genomics* 16(231). doi:10.1186/s12864-015-1455-y.

Además ha sido expuesto en los siguientes Congresos Nacionales e Internacionales:

- Gordon Research Conference on Protein Cofactors, Radicals & Quinones (2012) Mount Holyoke College, South Hadley, MA (EEUU).
- OxiZymes 2012. Marsella (Francia).
- VII Congreso de la Federación Española de Biotecnólogos (BAC2013). Sevilla (España).
- XIV International Symposium and VII European Conference on Marine Natural Products (MaNaPro) (2013). La Toja (España).
- I Congreso Internacional Campus Mare Nostrum de Jóvenes Investigadores en el Mediterráneo (2013). Murcia (España).
- III Jornadas de inicio a la investigación de estudiantes de la Facultad de Biología (2013). Murcia (España).
- OxiZymes 2014. Viena (Austria).
- The Fourth International Conference on Cofactors (ICC-04) (2014). Parma (Italia).

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de algún modo han participado en este proyecto.

Un agradecimiento especial quiero dedicarle a mi director de tesis **Dr. Antonio Sánchez Amat** que sin conocerme depositó su confianza en mí y me dio la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación. Muchísimas gracias de corazón.

A la **Dra. Patricia Elío Lucas**, que me cedió los mutantes de LodA y que siempre estuvo dispuesta a ayudarme en lo que necesitara.

A los **Drs. Antonio Romero** y **Fco. Javier Medrano** del CIB-CSIC (Madrid) por su colaboración en la obtención de la estructura recombinante de LodA. Y a este último, gracias por cederme el plásmido pETMBP28.

Al **Dr. Alejandro Torrecillas** del Servicio de Biología Molecular del SAI de la Universidad de Murcia, por su valioso aporte en esta memoria en las diferentes técnicas de espectrometría de masas.

A mis compañeros de departamento, **Jonatan** y **Carmen**, vuestra presencia, conversaciones y compañía han hecho el pasillo y el laboratorio más agradable todos estos años. Gracias también a **Rafa**, **Sandra** y **Aída** con los que en algún momento de este camino compartí laboratorio.

A mis “amig@s de la universidad”, **Ángel**, **Chules**, **Juan**, **Mar**, **Tere**, **Pepe**... Gracias por las horas compartidas dentro y fuera de la facultad, porque este camino ha sido más llevadero a vuestro lado. Mucho ánimo a los que os queda ya poco para completar también este viaje. A aquellas personas que también llevo muy dentro en el corazón, y que siempre han tenido para mí una palabra de ánimo durante este tiempo, en especial a **Rosario** y **Consue**. La vida sólo tiene sentido cuando se comparte con personas maravillosas y os aseguro que para mí vosotr@s lo sois.

A mis **padres** los cuales se merecen una mención más que especial, porque muchos de los logros de mi vida los he podido realizar gracias a ellos, sobretodo este. Os dedico este trabajo porque es el resultado del valor de la perseverancia que me habéis inculcado cada momento de mi vida. Gracias porque yo soy el fruto del enorme esfuerzo que habéis hecho a lo largo de vuestra vida.

A mi hermana **Cristina**, porque tu llegada a mi mundo supuso sentar las bases de la responsabilidad en mi vida para intentar ser un buen ejemplo para ti, no se si lo he logrado pero como consecuencia de ello he llegado hasta aquí, por eso este trabajo es también parte de ti.

Al resto de mi **familia**, y en especial a mis **abuelos**. Probablemente no entenderéis nada de lo que pone aquí, pero se que estáis orgullosos de vuestra nieta mayor, y con eso me sobra, por eso este éxito también es vuestro.

A **Cayetano**, porque has sobrepasado todas las expectativas que deposité en tu persona, porque sin necesidad de pedirte nada, lo das todo; porque espero que sigas apoyándome incondicionalmente aunque no estés de acuerdo con mis decisiones, porque una parte de este triunfo también te pertenece.

Y a aquellas personas que tal vez lean estas líneas y se sientan injustamente olvidadas, les pido de corazón que me perdonen, ya que es inevitable dejarse a alguien en el tintero.

Por último, y en un alarde de narcisismo intencionado, me dedico esta tesis a mi misma porque después de todos estos años he conseguido culminar mi sueño.

*A mis padres y a mi hermana,
Para ti, Caye,*

“Los sueños parecen al principio imposibles, luego improbables,
y luego, cuando nos comprometemos, se vuelven inevitables”

Mahatma Gandhi

ABREVIATURAS

AADH: amina aromática deshidrogenasa	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
AMP: adenosin monofosfato	IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
Amp: ampicilina	IS: secuencia de inserción
AP: presión atmosférica	JGI: Joint Genome Institute (USA)
ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo	Kb: kilobases de DNA o 1000 pb
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	kDa: kilodalton
BSA: albúmina de suero bovino	Km: kanamicina
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo	LAO: L-aminoácido oxidasa
CIB: Centro de Investigaciones Biológicas	LOD: actividad lisina oxidasa
Cm: cloranfenicol	LodA: lisina-épsilon-oxidasa
COG: Clusters of Orthologous Groups	LTQ: lisina tirosilquinona
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas	m/v: relación masa/volumen
CTQ: cisteína triptofilquinona	m/z: relación masa/carga
DAO: D-aminoácido oxidasa	MADH: metilamina deshidrogenasa
DBM: motivo de unión a dinucleótidos	MALDI: ionización por desorción láser asistida por una matriz
DMSO: dimetil sulfóxido	mau: operón de utilización de metilamina
DNA: ácido desoxirribonucleico	MBP: proteína de unión a maltosa
DO: dopa oxidasa	MCO: multicobreo oxidasa
DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm	MCS: sitio de clonación múltiple
DOE: Department of Energy (USA)	ML: Máxima verosimilitud (Maximum likelihood)
Dopa: 3,4-dihidroxifenilalanina	MLodA: LodA multimérica
DTT: ditioneitol	MM: masa molecular
EC: Comisión de Enzimas	mob: región de movilización por conjugación del plásmido RP4.
EDTA: etilen diamino tetracetato (sal disódica)	MP: Máxima parsimonia (Maximum parsimony)
ESI: ionización por electrospray	MS/MS: espectrometría de masas en tándem
FAD: flavín dinucleótido	MS: espectrometría de masas
FMN: flavín mononucleótido	NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
Gm: gentamicina	NBT: azul de nitrotetrazolio
GoxA: glicina oxidasa	
Ha: hemaglutinina	

Ni-NTA agarosa: agarosa con níquel unido a nitrilotriacetato

NJ: Vecino más cercano (Neighbor-joining)

ori: origen de replicación

P: promotor

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases en una secuencia de DNA.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Base

pH: concentración de protones

PHB: poli- β -hidroxibutirato

Poli-His: etiqueta de poli-histidinas

ppm: partes por millón

PPO: actividad polifenol oxidasa

Ppo: enzima polifenol oxidasa

PQQ: pirroloquinolin quinona

QHNDH: quinohemoproteína deshidrogenasa

reb: genes que codifican los cuerpos R

Rif: rifampicina

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

SAM: S-adenosil metionina

SDS: dodecil sulfato sódico

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TFA: ácido trifluoroacético

TH: actividad tirosina hidroxilasa

tnp: gen que codifica una transposasa

TOF: analizador de tiempo de vuelo

TPQ: topaquinona

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TTQ: triptófano triptofilquinona

URF: unidades relativas de fluorescencia

UV: ultravioleta

V: voltio

Δ : deleción (en la descripción de genotipos)

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICES	V
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Marinomonas mediterranea</i>	3
I.1.1. El género <i>Marinomonas</i>	3
I.1.2. La bacteria marina <i>M. mediterranea</i>	4
I.1.2.1. Características generales	4
I.1.3. Polifenol oxidasas en <i>M. mediterranea</i>	6
I.1.4. L-aminoácido oxidasas (LAOs)	8
I.1.4.1. LodA, L-lisina-épsilon-oxidasa de <i>M. mediterranea</i>	11
I.1.4.2. GoxA, glicina oxidasa de <i>M. mediterranea</i>	14
I.1.4.3. Proteínas similares a LodA en otros organismos	15
I.2. COFACTORES ENZIMÁTICOS.....	17
I.2.1 Flavinas	17
I.2.1.1. Estructura de las flavinas	17
I.2.1.2. Propiedades de las flavinas.....	19
I.2.1.3. Clasificación de las flavoproteínas.....	21
I.2.1.4. Motivos estructurales conservados en flavoproteínas.	22
I.2.2. Cofactores quinónicos	24
I.2.2.1. Pirroloquinolin quinona (PQQ)	25
I.2.2.2. Cofactores quinónicos derivados de tirosina: TPQ y LTQ.....	26
I.2.2.3. Cofactores quinónicos derivados de triptófano	27
I.2.2.3.1. Triptófano triptofilquinona (TTQ)	27
I.2.2.3.2. Cisteína triptofilquinona (CTQ)	30
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
III.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	39
III.1.1. Cepas de <i>M. mediterranea</i>	39
III.1.2. Cepas de <i>E. coli</i>	40
III.1.3. Plásmidos	41
III.2. MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES	42
III.2.1. Medios para <i>M. mediterranea</i>	42
III.2.2. Medios para <i>E. coli</i>	43
III.2.3. Tampones utilizados	44
III.2.3.1. Tampones para electroforesis de ADN	44
III.2.3.2. Tampones para geles de poliacrilamida SDS-PAGE	45
III.2.3.3. Tampones para Western Blot	45
III.2.3.4. Tampones para purificación de proteínas	46

III.2.3.4.1. Tampones para purificación en resina Ni-NTA agarosa.	46
III.2.3.4.2. Tampones para purificación en resina de amilosa. ...	47
III.2.3.5. Otros tampones utilizados.	47
III.3. CULTIVO DE CEPAS MICROBIANAS.	48
III.4. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES CELULARES EN <i>M. mediterranea</i> .	49
III.4.1. Fracción extracelular.	49
III.4.2. Fracción intracelular.	49
III.5. PRECIPITACIÓN ETANÓLICA DE LodA.	49
III.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.	50
III.7. MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS.	50
III.7.1. Medida de actividad aminoácido oxidasa.	50
III.7.2. Medidas de fluorescencia: flavinas y proteínas.	51
III.8. ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE ACRILAMIDA.	52
III.8.1. SDS-PAGE.	52
III.8.2. Tinción de proteínas con azul de Coomassie.	53
III.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.	53
III.9.1. Transferencia de proteínas a membranas.	53
III.9.2. Revelado de la membrana.	54
III.10. MANIPULACIÓN DE ADN.	55
III.10.1. Aislamiento de ADN.	55
III.10.2. Tratamiento enzimático del ADN.	55
III.10.3. Amplificación de ADN por PCR.	56
III.10.4. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos.	58
III.10.5. Secuenciación del ADN.	58
III.10.6. Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.	58
III.10.6.1. Preparación de células electrocompetentes.	58
III.10.6.2. Transformación de <i>E. coli</i> .	59
III.10.7. Herramientas bioinformáticas utilizadas.	59
III.10.8. Análisis bioinformático de secuencias.	60
III.11. EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS EN <i>E. coli</i> .	61
III.11.1. Crecimiento e inducción de la expresión.	61
III.11.2. Aislamiento de fracciones celulares en sistema recombinante.	61
III.12. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	62
III.12.1. Matriz de afinidad de níquel.	63
III.12.2. Matriz de amilosa.	63
III.13. DIÁLISIS.	64
III.14. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).	64
III.14.1. Determinación de peso molecular por HPLC-ESI-TOF.	64
III.14.2. Digestión de proteínas para análisis por MS.	65
III.14.3. Análisis por HPLC-MS/MS.	66

III.14.4. Análisis ionización por láser asistida por matriz (MALDI) presión atmosférica (AP).	67
III.15. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.	68
III.15.1. Clonación de genes en plásmidos de la serie pET.	68
III.15.2. Creación de fusiones a MBP usando el plásmido pETMBP28.	70
III.15.3. Clonación de los genes <i>HislodA</i> , <i>HislodACT</i> , <i>lodACT</i> y <i>lodACT2</i> en el vector pBLODAII.....	71
III.16. CONJUGACIÓN Y MOVILIZACIÓN DE TRANSPOSONES A <i>M. mediterranea</i>	75
III.17. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LodA POR PCR.	76
IV. RESULTADOS	79
IV.1 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LodA y LodB FUSIONADAS A ETIQUETAS DE POLIHISTIDINAS.	81
IV.1.1. Fusión de LodA y LodB a etiquetas de poli-His y detección por Western Blot.....	81
IV.1.2. Efecto de la temperatura en la expresión de LodA y LodB.	83
IV.2. EFECTO DE LodB SOBRE LA EXPRESIÓN DE LodA.....	84
IV.2.1. Expresión recombinante de LodA en presencia y ausencia de LodB.	84
IV.2.2. Aislamiento de diferentes formas moleculares de LodA.	85
IV.2.2.1. Purificación de LodA activa y soluble.	85
IV.2.2.2. Purificación de PreLodA.....	85
IV.2.2.3. Aislamiento de LodA a partir de los cuerpos de inclusión.	86
IV.2.3. Caracterización de las diferentes formas moleculares de LodA.	86
IV.2.3.1. Análisis de las diferentes formas moleculares de LodA mediante HPLC-ESI MS TOF.....	86
IV.2.3.2. Caracterización de LodA activa.....	87
IV.2.3.2.1 Estructura cristalina de LodA.	87
IV.2.3.2.2. Análisis de LodA activa por espectrometría de masas (MS).	89
IV.2.3.3. Análisis de la forma precursora de LodA (PreLodA) por espectrometría de masas (MS).	92
IV.2.3.4. Análisis de LodA obtenida de los cuerpos de inclusión por espectrometría de masas (MS)	96
IV.3. ANÁLISIS DE RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LodA.....	97
IV.3.1. Residuos en el entorno del centro activo.....	97
IV.3.2. Residuos en el canal de entrada al centro activo.....	101
IV.3.3. Análisis del extremo C-terminal de LodA.	102
IV.3.3.1. Sistema recombinante.....	103
IV.3.3.2. Sistema nativo.	107
IV.3.4. Análisis de secuencia de proteínas similares a LodA.	110
IV.4. ANÁLISIS DE LodB.....	114

IV.4.1. Análisis bioinformático de LodB.....	114
IV.4.1.1. Análisis de secuencia de LodB.....	114
IV.4.1.2. Detección de genes similares a <i>lodB</i> en genomas con genes de la familia <i>lodA</i>	116
IV.4.2. Caracterización de LodB.....	119
IV.4.2.1. Generación de LodB fusionado a una etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP) y purificación.....	119
IV.4.2.2. Intentos de detección del cofactor en MBPLodB.....	122
IV.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS DEL OPERÓN <i>lod</i> Y <i>gox</i>	125
IV.5.1. Análisis de la forma precursora (PreGoxA) por espectrometría de masas (MS).....	125
IV.5.2. Especificidad de interacción de las flavoproteínas con las quinoproteínas asociadas.....	129
V. DISCUSIÓN	131
V.1. ANÁLISIS DE LodA.....	134
V.1.1. Análisis de residuos mutados en LodA.....	135
V.1.2. Análisis del extremo C-terminal de LodA.....	136
V.2. SÍNTESIS DEL COFACTOR.....	138
V.3. ESTUDIO DE OTROS OPERONES SIMILARES A <i>lod</i> Y <i>gox</i>	140
V.4. MODELO DE FORMACIÓN DEL COFACTOR CTQ EN LodA.....	142
VI. CONCLUSIONES	145
VII. BIBLIOGRAFÍA	149
VIII. APÉNDICES	173

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. INTRODUCCIÓN.

Figura I. 1. Características generales de <i>M. mediterranea</i>	5
Figura I. 2. Micrografías electrónicas de <i>M. mediterranea</i>	6
Figura I. 3. Reacción catalizada por las L-aminoácido oxidasas (LAOs).....	8
Figura I. 4. Actividad antimicrobiana de LodA (marinocina)	12
Figura I. 5. Esquema de la reacción catalizada por la L-lisina-épsilon-oxidasa (EC 1.4.3.20).....	12
Figura I. 6. Estructura del operón <i>lod</i>	13
Figura I. 7. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de biopelículas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R (A) y del mutante SB1 afectado en la actividad lisina oxidasa (B).....	14
Figura I. 8. Reacción catalizada por la glicina oxidasa de <i>M. mediterranea</i>	14
Figura I. 9. Relación filogenética de proteínas similares a LodA	16
Figura I. 10. Estructura química de la riboflavina, flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD).....	18
Figura I. 11. Ciclo catalítico típico de flavoproteínas.....	19
Figura I. 12. Espectro UV-visible del FMN en su forma oxidada y reducida.	19
Figura I. 13. Propiedades de las flavinas.	22
Figura I. 15. Estructura química de los cofactores quinónicos conocido	24
Figura I. 16. Biosíntesis del cofactor PQQ.....	25
Figura I. 17. Reacción catalizada por MADH.....	28
Figura I. 18. Biosíntesis del cofactor TTQ.	29
Figura I. 20. Estructura del operón <i>qhp</i>	31
Figura I. 21. Mecanismo propuesto para la formación de QHNDH.....	32

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Figura III. 1. Esquema del proceso de purificación de proteínas fusionadas a una etiqueta por gravedad mediante columna de cromatografía.....	62
Figura III. 2. Esquemas de los plásmidos creados usando vectores de la serie pET	68
Figura III. 3. Esquemas de los plásmidos creados usando el vector pET15.....	69
Figura III. 4. Esquemas de los plásmidos conteniendo genes del operón <i>lodAB</i> creados a partir de los plásmidos previamente construidos en pET11	70
Figura III. 5. Esquema de plásmidos con proteínas fusionadas a MBP para aumentar la solubilidad de la proteína fusionada	71
Figura III. 6. Esquema de las fusiones traduccionales de <i>lodA</i> con la etiqueta de poli-His en N-terminal.....	73

Figura III. 7. Esquema de los plásmidos para conjugación contruidos con deleciones en C-terminal.....	74
Figura III. 8. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida por solapamiento.....	76
Tabla III. 1. Cepas de <i>M. mediterranea</i> utilizadas en este trabajo.....	39
Tabla III. 2. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.....	40
Tabla III. 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	41
Tabla III. 4. Longitudes de onda utilizadas para las medidas de fluorescencia de proteínas y flavinas.....	52
Tabla III. 5. Cebadores utilizados en esta memoria.....	57

IV. RESULTADOS.

Figura IV. 1. Detección por Western Blot de LodA (flecha roja) y LodB (flecha amarilla) fusionadas a una etiqueta de poli-His.....	82
Figura IV. 2. Expresión recombinante de LodA y LodB a diferentes temperaturas.....	83
Figura IV. 3. Expresión recombinante de LodA en <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) con los plásmidos pETLODA15 [HisLodA] o pETLODAB15 [HisLodA + LodB]	84
Figura IV. 4. Purificación de LodA activa en resina Ni-NTA	85
Figura IV. 5. Purificación de PreLodA en resina Ni-NTA.....	86
Figura IV. 6. Estructura de LodA	88
Figura IV. 7. Sitio activo de LodA	89
Figura IV. 8. LodA recombinante activa digerida con tripsina y analizada por HPLC-MS/MS.....	90
Figura IV. 9. Análisis de PreLodA recombinante por MALDI-TOF tras digestión con tripsina.....	94
Figura IV. 10. Espectro del péptido <u>W(581)PPQSPW</u> obtenido por digestión con pepsina de PreLodA recombinante y su análisis por ESI-MS/MS	95
Figura IV. 11. Superposición de residuos en el entorno del centro activo de LodA con otras proteínas con cofactores derivados del Trp.....	98
Figura IV. 12. Expresión heteróloga de HisLodA y de algunos mutantes en <i>E. coli</i> Rosetta (DE3).....	99
Figura IV. 13. Secuencia aminoacídica de LodA.....	102
Figura IV. 14. Expresión recombinante de LodA en presencia de LodB fusionada a MBP.....	103
Figura IV. 15. Expresión recombinante de HisLodA y la versión mutante HisLodACT.....	105
Figura IV. 16. Expresión recombinante de HisLodA y la versión mutante HisLodACT2.....	106
Figura IV. 17. Actividad lisina oxidasa en cepas de <i>M. mediterranea</i> con diferentes versiones de LodA modificadas en los extremos N o C-terminal.....	108

Figura IV. 18. Actividad lisina oxidasa en sobrenadantes de cultivos de <i>M. mediterranea</i> LDA/B (WT) y LDACT2/B medio MNGL.....	109
Figura IV. 19. Actividad lisina oxidasa en extractos celulares de <i>M. mediterranea</i> LDA/B y LDACT2/B.	111
Figura IV. 21. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA del grupo IA....	111
Figura IV. 22. Análisis de secuencia de LodB.....	115
Figura IV. 23. Organización de los genes similares a <i>lodA</i> (A, marcados en rojo) y los genes similares a <i>lodB</i> (B, marcados en amarillo) en los diferentes genomas seleccionados.	116
Figura IV. 24. Análisis de la secuencia de proteínas similares a LodB.....	118
Figura IV. 25. Expresión recombinante de LodA en cultivos de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) conteniendo LodB fusionado a una etiqueta de MBP.....	120
Figura IV. 26. Purificación de LodA en presencia o ausencia de MBPLodB en columnas de amilosa.....	121
Figura IV. 27. Purificación de MBPLodB a partir de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pETMBPLODB28 en resina de amilosa.....	122
Figura IV. 28. Espectro de absorción de MBPLodB purificada.	123
Figura IV. 29. Medida de fluorescencia de muestras de MBPLodB purificadas con una concentración de 0,3 μ M.....	124
Figura IV. 30. Expresión heteróloga de GoxA en <i>E. coli</i> CD03 con los plásmidos pETGOXA15 [GoxA] o pETGOXAB15 [GoxA + GoxB].	126
Figura IV. 31. Especificidad de la interacción de LodA con LodB.	129
Figura IV. 32. Especificidad de la interacción de GoxA con GoxB..	130
Tabla IV. 1. Péptidos de LodA recombinante activa detectados por digestión con tripsina y análisis por HPLC MS/MS.....	90
Tabla IV. 2. Péptidos de LodA recombinante activa detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF.....	91
Tabla IV. 3. Péptidos de PreLodA detectados tras digestión con tripsina y su análisis por MS/MS.....	92
Tabla IV. 4. Péptidos de PreLodA detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF.....	93
Tabla IV. 5. Péptidos de LodA extraída de los cuerpos de inclusión detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF.....	96
Tabla IV. 6. Péptidos que contienen los residuos del cofactor CTQ detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis con MALDI-TOF de diferentes formas moleculares de LodA recombinante.....	100
Tabla IV. 7. Péptidos de PreGoxA recombinante detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis por MALDI-TOF.	127

Tabla IV. 8. Péptidos de GoxA obtenida de los cuerpos de inclusión de cultivos inducidos con pETGOXA15 detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis por MALDI-TOF.	128
--	-----

V. DISCUSION

Figura V. 1. Modelo de formación del cofactor CTQ en LodA de <i>M. mediterranea</i>	142
---	-----

VIII. APÉNDICES

A. 1. Alineamiento de los residuos conservados 511-584 de LodA con zonas similares de las 21 proteínas presentes en el grupo IA.	175
A. 2. Alineamiento de las proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de <i>Rhodopirelulla</i> sp. SWK7, en la zona de LodA C448	176
A. 3. Alineamiento de las proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de <i>Rhodopirelulla</i> sp. SWK7, en la zona de LodA E101.	177
A. 4. Alineamiento de proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de <i>Rhodopirelulla</i> sp. SWK7, en la zona de LodA Y211.	178
A. 5. Alineamiento del extremo C-terminal de proteínas similares a LodA que están englobadas en el grupo IA, excepto la de <i>Rhodopirelulla</i> sp. SWK7.	179
A. 6. Genes que codifican flavoproteínas hipotéticas similares a <i>lodB</i> detectados en los genomas que contienen genes similares a <i>lodA</i>	180

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Marinomonas mediterranea*.

I.1.1. El género *Marinomonas*.

El género *Marinomonas* engloba un grupo de bacterias marinas Gram-negativas que pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*, familia *Oceanospirillales* con un contenido en G+C del 41 al 50 mol% y que poseen un metabolismo estrictamente aerobio. En relación a su morfología, pueden ser tanto espirilos como bacilos, rectos o curvos, y poseen flagelación polar en uno o los dos extremos de la célula. Además, todos los miembros de este género requieren Na^+ para poder crecer, lo que está en concordancia con su hábitat, y no acumulan poli- β -hidroxibutirato (PHB) (Sanchez-Amat *et al.*, 2005).

Desde la descripción inicial del género *Marinomonas* (van Landschoot and de Ley, 1983), el número de especies pertenecientes a este género ha aumentado, sobre todo durante los últimos años, debido al incremento de estudios sobre microorganismos de origen marino. El elevado número de especies descritas ha hecho necesaria una modificación de la descripción del género para poder englobar las nuevas cepas aisladas (Espinosa *et al.*, 2010).

Hasta el momento, el género *Marinomonas* comprende 23 especies, principalmente aisladas de aguas marinas localizadas en zonas geográficas y ambientes muy variados: océano Pacífico (Baumann *et al.*, 1972; van Landschoot and de Ley, 1983), mar Negro (Ivanova *et al.*, 2005), mar Mediterráneo (Solano and Sanchez-Amat, 1999; Macian *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2010; Lucas-Elio *et al.*, 2010), mar de Japón (Yoon *et al.*, 2005), mar Amarillo (Jung *et al.*, 2012) y en regiones con ambientes con bajas temperaturas y regiones subantárticas (Romanenko *et al.*, 2003; Prabakaran *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Se han aislado también cepas a partir de sedimentos y arenas (Chang *et al.*, 2008; Romanenko *et al.*, 2009). Asimismo, existen cepas de *Marinomonas* asociadas a organismos superiores, tales como ostras (Macian *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2006) y corales (Chimetto *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2014).

En diversos estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que la planta marina *Posidonia oceanica*, de gran importancia en los ecosistemas del mar Mediterráneo, posee una microbiota asociada que contiene una gran cantidad de cepas pertenecientes al género *Marinomonas* (Espinosa, 2007). En este sentido, nuestro grupo ha descrito siete nuevas especies asociadas a esta planta: *M. pollencensis*, *M. balearica* (Espinosa *et al.*, 2010), *M. alcarazii*, *M. aquiplantarum*, *M. foliarum*, *M. posidonica* y *M. rhizomae* (Lucas-Elio *et al.*, 2010), y ha detectado que *M. mediterranea*, previamente descrita (Solano *et al.*, 1997; Solano and Sanchez-Amat, 1999), pertenece también a esta microflora (Espinosa *et al.*, 2010).

Como resultado de una colaboración entre nuestro grupo de investigación y el “Joint Genome Institute” del Departamento de Energía de Estados Unidos, se han obtenido y publicado las secuencias de los genomas de *M. mediterranea* (GenBank CP002583) (Lucas-Elio *et al.*, 2012b) y *M. posidonica* (GenBank CP002771) (Lucas-Elio *et al.*, 2012a). Recientemente, también se ha secuenciado el genoma de *M. ushuaiensis* DSM15871 (GenBank JAMB00000000). Además de las cepas clasificadas a nivel de especie, hay otras cuatro cepas pertenecientes al género *Marinomonas*, cuyos genomas completos han sido secuenciados y están disponibles. Una de ellas, *Marinomonas* sp. MWYL1 (GenBank CP000749) ha sido estudiada por su papel en la generación del gas sulfuro de dimetilo (DMS) (Todd *et al.*, 2007). Este gas, cuando se libera a la atmósfera se puede oxidar a compuestos que actúan dispersando la radiación solar y como núcleos condensadores de nubes lo que puede afectar a los procesos de cambio climático. Las otras tres cepas secuenciadas son *Marinomonas* sp. MED121 (GenBank AANE01000000) que es una cepa aislada del noroeste del mar Mediterráneo; *Marinomonas* sp. GOBB3-320 (GenBank AF321017), aislada del norte del mar Báltico y *Marinomonas* sp. D104 (GenBank AYOZ0100001) que se aisló del océano Ártico en un enriquecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Dong *et al.*, 2014). Esta última cepa ha sido clasificada posteriormente a nivel de especie recibiendo el nombre de *M. profundimaris* (Bai *et al.*, 2014).

Dentro de las distintas especies del género *Marinomonas* destacaremos a *M. mediterranea* por ser la bacteria objeto de estudio en este trabajo. A continuación se hará una descripción más detallada de sus principales características y propiedades.

I.1.2. La bacteria marina *M. mediterranea*.

I.1.2.1. Características generales.

Nuestro grupo de investigación aisló *Marinomonas mediterranea* MMB-1 (ATCC 700492^T y CECT 4803^T) a partir de muestras de agua marina de las costas murcianas del mar Mediterráneo (Solano *et al.*, 1997). En estudios posteriores se ha detectado que esta especie forma parte de la microbiota de la planta marina *P. oceanica*, de donde se aisló la cepa IVIA-Po186 (Espinosa *et al.*, 2010). *M. mediterranea* es capaz de sintetizar melaninas cuando se cultiva en medios conteniendo L-tirosina. Debido a la producción de este pigmento, tanto las colonias como el medio circundante se observan de color oscuro (Solano *et al.*, 1997) (**figura I.1A**).

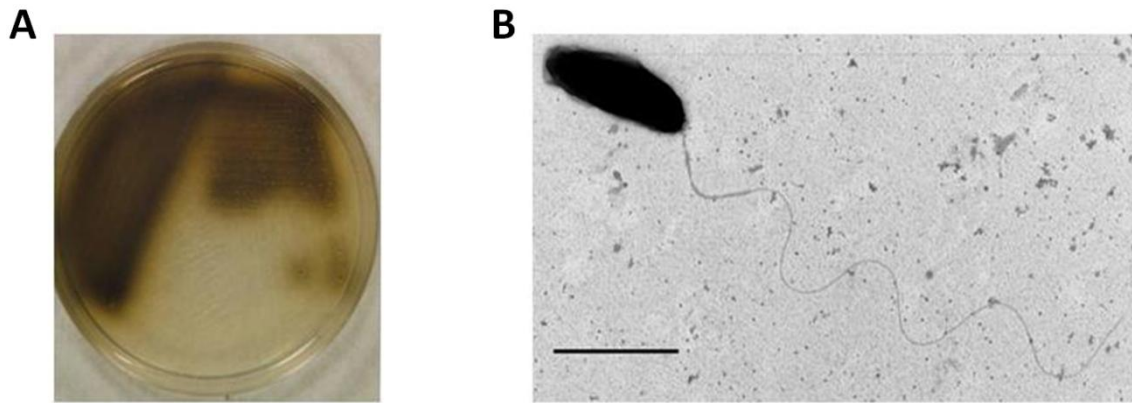


Figura I. 1. Características generales de *M. mediterranea*. (A) Cultivo de *M. mediterranea* en una placa de medio rico MMC incubado durante 4 días a 25°C. Se puede observar la pigmentación debida a la producción de melaninas. (B) Micrografía electrónica de *M. mediterranea* IVIA-Po186 realizada mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico (Barra = 1μm).

M. mediterranea es un bacilo recto Gram-negativo y su movilidad se debe a la presencia de un solo flagelo polar no envainado (**fig. I.1B**). Además, es una bacteria estrictamente aerobia, catalasa positiva y citocromo-c-oxidasa negativa. Presenta un metabolismo quimioheterótrofo y es capaz de utilizar diversos compuestos como fuente de carbono y energía (Solano and Sanchez-Amat, 1999).

Atendiendo al requerimiento de factores orgánicos de crecimiento, *M. mediterranea* es prototrófica lo que significa que es capaz de crecer en medios minerales usando una única fuente de carbono y energía. Se ha comprobado que tiene un mejor crecimiento cuando se usan fuentes orgánicas de nitrógeno como glutamato o extracto de levadura. Al igual que ocurre con otras bacterias marinas, necesita Na^+ para crecer, lo que está en concordancia con su hábitat natural (Solano *et al.*, 1997).

Por otra parte, *M. mediterranea* es gelatinasa y lipasa positiva, pero no produce las enzimas amilasa y agarasa. Es capaz de reducir nitratos a nitritos, pero no es una bacteria desnitrificante. No acumula PHB, ni siquiera en cultivos con fuente de nitrógeno como factor limitante del crecimiento, y es capaz de crecer a temperaturas comprendidas entre 8 y 30°C (Solano *et al.*, 1997).

Una última característica reseñable de *M. mediterranea* es que es la primera bacteria marina en la que se ha descrito la síntesis de unas estructuras citoplasmáticas denominadas cuerpos R (Hernandez-Romero *et al.*, 2003). Este tipo de estructuras sintetizadas por algunas cepas bacterianas fueron descritas por primera vez en bacterias endosimbióticas obligadas de paramecios (Pond *et al.*, 1989). Los cuerpos R de *M. mediterranea* muestran una ultraestructura de capas enrolladas con una zona central granular (Sanchez-Amat, 2006) (**fig. I.2.**).

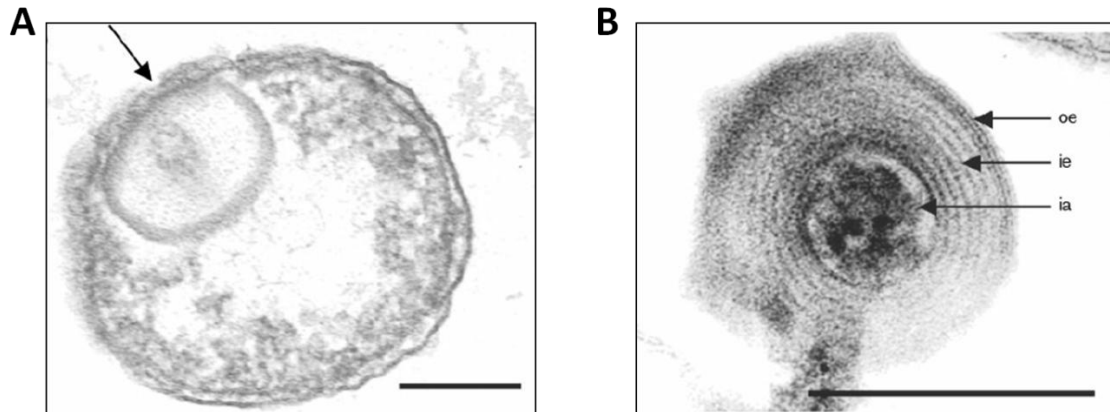


Figura I. 2. Micrografías electrónicas de *M. mediterranea*. (A) Sección ultrafina de *M. mediterranea*. La flecha indica la estructura citoplasmática denominada cuerpo R en la parte superior. (B) Sección transversal de un cuerpo R. oe: envoltura externa; ie: envoltura interna; ia: área interna. Barra = 0,2 μm (Hernandez-Romero *et al.*, 2003).

Los cuerpos R están codificados por los genes *reb* (*rebA*, *rebB* y *rebC*) (Heruth *et al.*, 1994). Recientemente se ha observado que estos genes están ampliamente distribuidos en proteobacterias y se ha propuesto que pueden participar en interacciones de estos organismos con eucariotas. *M. mediterranea* es una de las bacterias con mayor contenido en su genoma de genes *reb* que se encuentran en dos loci diferentes (Raymann *et al.*, 2013).

M. mediterranea sintetiza diversas oxidasas de interés biotecnológico que se describen en los apartados siguientes y que se pueden dividir en dos grandes grupos: polifenol oxidasas y aminoácido oxidasas.

I.1.3. Polifenol oxidasas en *M. mediterranea*.

Hay dos grandes grupos de polifenol oxidasas (PPOs): lacasas y tirosinasas. Las lacasas son cuproproteínas azules que pertenecen al grupo de las multicobre oxidasas (MCO). Estas enzimas (EC 1.10.3.2) tienen baja especificidad de sustrato, oxidan orto y para difenoles y pueden oxidar también aminofenoles, además de otros compuestos. Su mecanismo enzimático implica cuatro transferencias monoelectrónicas sucesivas con la reducción de oxígeno a agua (Thurston, 1994).

A diferencia de las lacasas, las tirosinasas son cuproproteínas no azules, ya que poseen en su centro activo una pareja de iones cobre tipo II unidos a seis residuos de histidina y no poseen CuI, que es el que confiere la pigmentación azul a las lacasas. Las tirosinasas (EC 1.14.18.1), oxidan monofenoles por lo que también se las denomina como cresolasas, monofenol monooxigenasas o tirosina hidroxilasa (TH), y también muestran actividad catecol oxidasa (EC 1.10.3.1). Esta última actividad permite oxidar

el difenol L-dopa por lo que también es denominada dopa oxidasa (DO) (Garcia-Borron and Solano, 2002).

La primera bacteria donde se describió la síntesis de dos cuproenzimas con actividad polifenol oxidasa (PPO) fue *M. mediterranea*. La primera PPO, denominada PpoA, es una MCO con actividad lacasa que se encuentra asociada a membrana (Fernandez *et al.*, 1999). PpoA muestra también actividad TH y DO, por lo que es capaz de oxidar un amplio rango de fenoles aromáticos, incluyendo no solo los característicos de lacasas sino también aquellos característicos para tirosinasas, como L-tirosina, por lo que se la ha denominado también lacasa multipotente (Sanchez-Amat and Solano, 1997; Sanchez-Amat *et al.*, 2001).

La secuencia de PpoA revela la presencia de cuatro centros de unión a cobre típicos de MCOs. Además, en su extremo N-terminal presenta otros dos motivos de unión a cobre ricos en histidinas. La expresión recombinante de diversos fragmentos de PpoA en *Escherichia coli* ha permitido demostrar que la capacidad PPO de la enzima reside en toda la molécula, y que los dos motivos de unión a cobre en el extremo N-terminal son necesarios tanto para la actividad tirosinasa como para la actividad lacasa de esta enzima (Sanchez-Amat *et al.*, 2001).

La función biológica de PpoA es desconocida de momento. Se ha demostrado que en *M. mediterranea* no participa en la melanogénesis, ya que mutantes en esta enzima siguen siendo pigmentados (Solano *et al.*, 2000). A diferencia de otras MCOs bacterianas no parece estar implicada en la resistencia a cobre, puesto que no se induce en presencia de este ión (Fernandez *et al.*, 1999). Una posibilidad es que participe en la resistencia a compuestos fenólicos, función que se ha observado en el caso de las PPOs de *Ralstonia solanacearum* (Hernandez-Romero *et al.*, 2005). No obstante, PpoA podría cumplir otras funciones relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios o transferencias electrónicas (Fernandez *et al.*, 1999). La versatilidad enzimática de las MCOs se pone de manifiesto en el hecho de que una proteína con 33% de identidad a PpoA, sintetizada por la gammaproteobacteria *Lysobacter* sp. T-15 tiene actividad urato oxidasa (Tamaki *et al.*, 2010).

La tirosinasa de *M. mediterranea* también llamada PpoB1, es una tirosinasa fuertemente activada 'in vitro' por SDS a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (Solano *et al.*, 1997), de la misma manera que la tirosinasa de algunas plantas y anfibios (Wittenberg and Triplett, 1985; Moore and Flurkey, 1990). Esta enzima presenta las actividades cresolasa y catecolasa típicas de las tirosinasas, pero no actividad lacasa (Solano *et al.*, 1997; Lopez-Serrano *et al.*, 2002).

La tirosinasa PpoB1 está codificada por el gen *ppoB1* que se encuentra localizado en un operón junto al gen *ppoB2* (Lopez-Serrano *et al.*, 2004). Este último gen codifica una chaperona que participa en la transferencia de cobre a PpoA (Lopez-Serrano *et al.*, 2007). En los mutantes que carecen de *ppoB1* se observa como único cambio fenotípico reseñable que son amelanogénicos, lo que indica que PpoB1 es la enzima de *M. mediterranea* implicada en síntesis de melaninas (Lopez-Serrano *et al.*, 2004; Lopez-Serrano, 2005).

I.1.4. L-aminoácido oxidasas (LAOs).

Las L-aminoácido oxidasas (EC. 1.4.3.2) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que generalmente poseen un cofactor de tipo flavínico, y catalizan la desaminación oxidativa de L-aminoácidos, vía iminoácido, generando el cetoácido correspondiente y liberando amonio y peróxido de hidrógeno (Macheroux *et al.*, 2001; Pollegioni *et al.*, 2013) (**fig. I.3**). La liberación de peróxido de hidrógeno en la reacción es responsable del efecto antimicrobiano descrito para algunas de estas enzimas (Ehara *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011b).

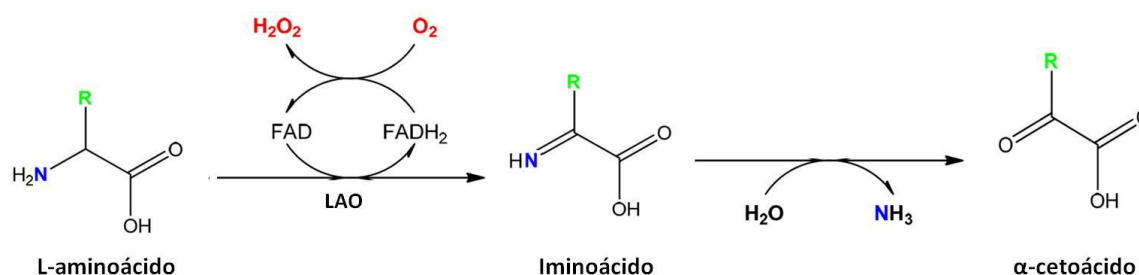


Figura I. 3. Reacción catalizada por las L-aminoácido oxidasas (LAOs).

La mayoría de LAOs presentan en su extremo N-terminal el dominio de unión a FAD característico de oxidorreductasas que unen dinucleótidos (Dym and Eisenberg, 2001). Estas enzimas poseen una estructura dimérica en la que cada subunidad une, de forma no covalente, una molécula del cofactor FAD (Guo *et al.*, 2012), aunque también se han descrito LAOs de estructura monomérica (Yang *et al.*, 2012). Las LAOs muestran una masa molecular entre 50 y 300 kDa, y un punto isoeléctrico entre pH 4.0 y 9.4 (Hossain *et al.*, 2014).

Las LAOs mejor estudiadas son las que se sintetizan formando parte del veneno de serpientes. Estas LAOs oxidan preferentemente aminoácidos hidrofóbicos (Du and Clemetson, 2002). Sin embargo, hasta el momento estas enzimas no han podido ser expresadas en un sistema de expresión recombinante con buen rendimiento (Pollegioni *et al.*, 2013). Además de en serpientes, también se han encontrado LAOs en moluscos marinos como el caracol gigante *Achatina fulica* (Ehara *et al.*, 2002) y la

liebre de mar *Aplysia californica* (Yang *et al.*, 2005); en peces como *Myoxocephalus polyacanthocephalus* y *Sebastes schlegeli* (Endo *et al.*, 2008; Nagashima *et al.*, 2009) y en insectos (Ahn *et al.*, 2000).

En el caso de las LAOs microbianas, algunas muestran un amplio rango de sustratos como es el caso de las producidas por *Bacillus carotarum* 2Pfa (Brearley *et al.*, 1994), *Rhodococcus opacus* DSM 43250 (Geueke and Hummel, 2002), *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1 (Isobe and Nagasawa, 2007) y *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Gomez *et al.*, 2008). En microorganismos también se han descrito diversas LAOs que muestran un cierto grado de especificidad para un aminoácido. Este sería el caso de la glicina oxidasa de *Bacillus subtilis* (Nishiya and Imanaka, 1998), la L-glutamato oxidasa de *Streptomyces endus* y *Streptomyces* sp. X-119-6 (Bohmer *et al.*, 1989; Arima *et al.*, 2009), la L-lisina oxidasa de *Trichoderma viride* Y244-2 (Kusakabe *et al.*, 1980; James *et al.*, 1996; Lukasheva and Berezov, 2002) y la L-triptófano oxidasa de *Chromobacterium violaceum* que parece intervenir en la síntesis del pigmento violaceína (Genet *et al.*, 1995).

Se han descrito diversas LAOs sintetizadas por hongos. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* sintetiza una LAO específica para L-tirosina (Singh *et al.*, 2009) y *Aspergillus carbonarius* AIU 205 una LAO que cataliza la desaminación del 4-aminobutanamida (Sugawara *et al.*, 2014). *Trichoderma harzianum* ETS 323 es un hongo utilizado como agente de biocontrol que produce una LAO extracelular que muestra actividad antimicrobiana debido a la permeabilización de membranas y a la producción de especies ROS (Yang *et al.*, 2011a). En algunos hongos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* la actividad LAO está regulada en relación con el catabolismo de aminoácidos (Sikora and Marzluf, 1982; Calderon *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 2005). Recientemente se ha expresado de forma recombinante en *E. coli* BL21 (DE3) una LAO de amplio espectro sintetizada por *Hebeloma cylindrosporum* (HeLAO), cuyo sustrato preferido es el L-glutamato (Nuutinen *et al.*, 2012).

Las LAOs producidas por bacterias pueden localizarse intracelularmente como en el caso de las producidas por *Pseudomonas putida* y *E. coli* (Bossi *et al.*, 2002; Leese *et al.*, 2012), asociadas a membrana como las sintetizadas por *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris* (Takahashi *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2011) o extracelularmente como en *Cellulomonas cellulans* AM8, *Streptomyces* sp. X-119-6 y *Rhodococcus opacus* (Braun *et al.*, 1992; Geueke and Hummel, 2003; Arima *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011b). En general, las LAOs procariotas secretadas como las LAOs producidas por *Rhodococcus opacus* y *Streptomyces* sp. X-119-6 se sintetizan como proenzimas con un péptido señal que posteriormente sufre proteólisis lo que activa la enzima (Geueke and Hummel, 2003; Arima *et al.*, 2009). Se piensa que esta activación proteolítica se produce tras la secreción para evita el consumo de aminoácidos y la producción de

H₂O₂ en el citoplasma que puede ser tóxica para la célula (Pollegioni *et al.*, 2013). La primera LAO procariota expresada de forma recombinante fue la LAO de amplio espectro de *Rhodococcus opacus* utilizando como huésped *Streptomyces lividans* (Geueke and Hummel, 2003).

Se han propuesto diversas funciones fisiológicas para las LAOs microbianas. Algunas de estas enzimas se inducen cuando es necesario utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno, como ocurre en *Pseudomonas* sp. AIU 813 (Isobe *et al.*, 2012). En las LAOs de membrana producidas por las enterobacterias de los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* se ha mostrado que los α -cetoácidos generados al oxidar los L-aminoácidos, pueden actuar como sideróforos formando complejos con hierro (Drechsel *et al.*, 1993; Massad *et al.*, 1995). En las bacterias marinas *M. mediterranea* y *Pseudoalteromonas tunicata*, se ha mostrado que las LAOs producidas participan en la diferenciación de biopelículas (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). La LAO sintetizada por *Streptococcus oligofermentans* parece participar en la competencia microbiana debido a la producción de peróxido de hidrógeno, que podría tener un efecto citotóxico para poblaciones microbianas competidoras (Tong *et al.*, 2008). Sin embargo, posteriormente se ha propuesto que en el microorganismo productor la LAO cumple un papel protector frente al estrés oxidativo, ya que parecen reducir las especies ROS *in vivo* (Zhou *et al.*, 2012). Esta LAO ha sido recientemente reclasificada como una aminoacetona oxidasa (Molla *et al.*, 2014).

Las LAOs tienen un gran interés biotecnológico en muchos campos diferentes. En el campo biomédico son atractivas por su gran cantidad de efectos biológicos, estudiados particularmente en las enzimas de serpientes (Guo *et al.*, 2012; Izidoro *et al.*, 2014). Entre sus propiedades se encuentran efectos citotóxicos por inducción de la apoptosis (Ande *et al.*, 2008), aunque los mecanismos por los que estas LAOs inducen la apoptosis todavía no se conocen de manera exacta (Costa *et al.*, 2014). Otros efectos son antiviral, antimicrobiano y antiparasitario (Fernandez-Gomez *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2013) e inducción de la agregación plaquetaria (More *et al.*, 2010). Una L-lisina oxidasa del hongo *Trichoderma* se han ensayado *in vivo* frente al cáncer colorrectal con buenos resultados (Treshalina *et al.*, 2000; Pokrovsky *et al.*, 2013).

La alta especificidad que muestran algunas de estas LAOs ha permitido el desarrollo de biosensores utilizando LAOs bacterianas. Un ejemplo sería el uso de la L-lisina oxidasa de *M. mediterranea* para la determinación de L-lisina en plasma (Matsuda and Asano, 2010). También se han desarrollado biosensores en la industria alimentaria para la determinación de la calidad nutricional de los productos en cuanto a su contenido en aminoácidos. Por ejemplo, la L-lisina en alimentos se puede detectar utilizando una LAO secretada a través de la piel por el pez de roca *Sebastes schlegeli* (Endo *et al.*,

2008). Recientemente se ha descrito el uso de una LAO purificada de riñón de cabra para determinar los niveles de L-aminoácidos en zumos de frutas y bebidas alcohólicas (Lata and Pundir, 2013).

Las LAOs también pueden ser usada en biotransformaciones, por ejemplo en la separación de enantiómeros de mezcla racémicas de D- y L-aminoácidos (Qi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). Otra aplicación es la producción industrial de α -cetoglutarato a partir de L-glutámico (Liu *et al.*, 2013) e incluso en la generación de precursores de antibióticos β -lactámicos (Isobe *et al.*, 2008). Además, las LAOs se pueden utilizar en agricultura como agentes de biocontrol (Hossain *et al.*, 2014).

Nuestro grupo de investigación ha descrito en *M. mediterranea* las que hasta el momento son las dos únicas LAOs que no son flavoproteínas: LodA, una L-lisina- ϵ -oxidasa (Gomez *et al.*, 2010) y GoxA una glicina oxidasa detectada de forma paralela al desarrollo de este trabajo (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). Ambas enzimas contienen un cofactor de tipo quinónico, en lugar de flavínico. Estas dos enzimas serán descritas en los apartados siguientes.

I.1.4.1. LodA, L-lisina- ϵ -oxidasa de *M. mediterranea*.

La enzima con actividad L-lisina- ϵ -oxidasa fue descrita por primera vez en los sobrenadantes de la bacteria marina *M. mediterranea* como una proteína con actividad antimicrobiana a la que inicialmente se denominó marinocina (Lucas-Elio *et al.*, 2005). Esta proteína presenta acción bactericida de amplio espectro, incluyendo microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* sp., que presentan alta resistencia a antibióticos clásicos (Lucas-Elio *et al.*, 2005). Estudios posteriores indicaron que la actividad microbiana de la marinocina era debido a la generación de peróxido de hidrógeno que ocurre al oxidar el aminoácido L-lisina (Lucas-Elio *et al.*, 2006) (**fig. I.4**).

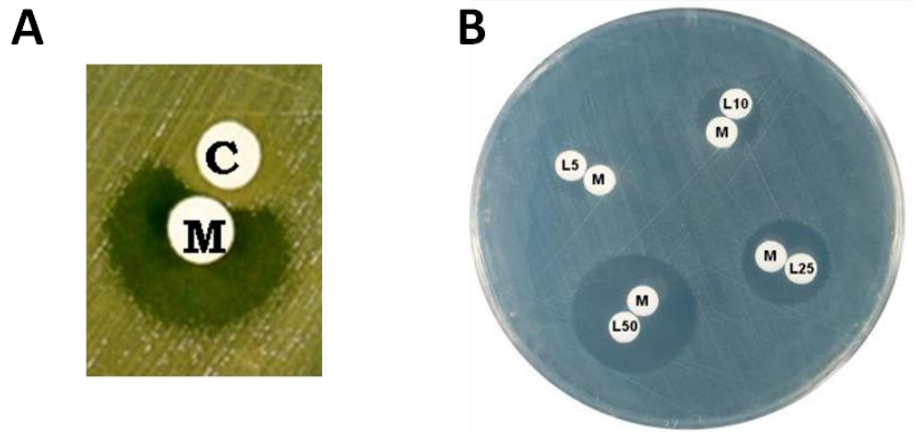


Figura I. 4. Actividad antimicrobiana de LodA (marinocina). (A) Efecto antimicrobiano de la marinocina (M) sobre *E. coli* K-12 en medio complejo. Se observa que esta actividad es inhibida en presencia de 0,2 mg de catalasa (C). (B) Efecto positivo de la presencia de L-lisina (L: discos cargados con 20 μ l de las concentraciones milimolares crecientes indicadas) en la actividad inhibitoria frente a *E. coli* UM202 en medio M9 (Lucas-Elio *et al.*, 2006).

LodA es altamente específica para L-lisina catalizando su desaminación oxidativa en posición épsilon en presencia de oxígeno, generando ácido 6-semialdehído-2-aminoadípico, amonio y peróxido de hidrógeno, responsable de la acción antimicrobiana (Gomez *et al.*, 2006). Dependiendo de las condiciones, el ácido-6-semialdehído-2-aminoadípico puede ciclarse a piperidina-6-carboxilato u oxidarse a ácido-2-aminoadípico (**fig. I.5**).

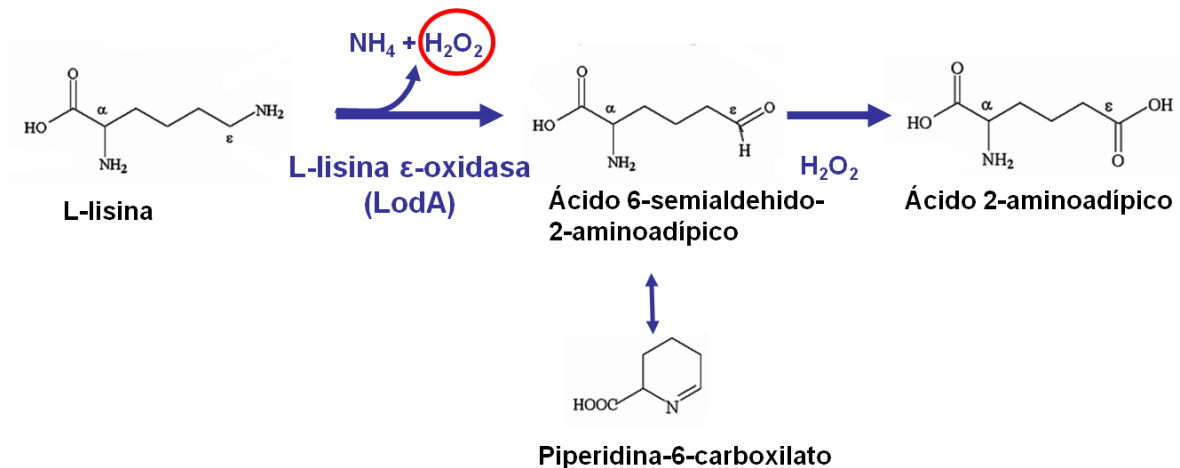


Figura I. 5. Esquema de la reacción catalizada por la L-lisina-épsilon-oxidasa (EC 1.4.3.20).

Esta actividad L-lisina-épsilon-oxidasa no había sido descrita con anterioridad por lo que recibió un nuevo número por la comisión de enzimas (EC 1.4.3.20). Las LAOs clásicas (EC 1.4.3.2) oxidan los aminoácidos en posición alfa. Otra diferencia importante con las LAOs es que la L-lisina-épsilon-oxidasa de *M. mediterranea* no

posee un cofactor de tipo flavínico. Datos previos de nuestro grupo de investigación indicaban que poseía un cofactor quinónico (Gomez *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2010).

LodA está codificada por el gen *lodA* que forma parte del operón *lod*. Además del gen *lodA*, en este operón se encuentra un segundo gen, *lodB*, que codifica una flavoproteína de función desconocida que es requerida para la síntesis de LodA activa (Gomez *et al.*, 2010) (**fig. I.6**).

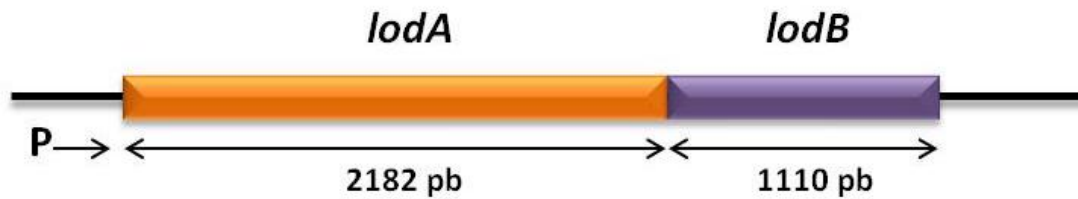


Figura I. 6. Estructura del operón *lod*. El gen *lodA* codifica la proteína LodA que posee actividad L-lisina-épsilon-oxidasa. El gen *lodB* codifica una hipotética flavoproteína, LodB, de función desconocida.

En relación a la localización celular, se ha observado que LodA es una proteína extracelular que presenta gran resistencia a diversos factores ambientales, como elevadas temperaturas, y enzimas proteolíticas como la proteinasa K. Además es precipitable con etanol, lo que sugiere que posee una estructura muy estable (Lucas-Elio *et al.*, 2005). Por su parte, LodB se detecta en los extractos celulares (Gomez *et al.*, 2010).

Se han detectado genes similares a *lodA* y *lodB* en el genoma de diversos grupos microbianos y en los casos analizados se disponen organizados en un operón (Lucas-Elio *et al.*, 2006). En el caso de la proteína AlpP de *P. tunicata* se ha demostrado que también posee actividad lisina oxidasa (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Desde el punto de vista fisiológico, en algunos de los microorganismos que sintetizan proteínas similares a LodA se ha propuesto que juegan un papel determinante en procesos de desarrollo de biopelículas microbianas. A medida que las biopelículas van desarrollándose, la acción autolítica del peróxido de hidrógeno generado por la actividad L-lisina oxidasa causa la muerte de una fracción de la población de células en el centro de las microcolonias (Mai-Prochnow *et al.*, 2008) (**fig. I.7**). Este fenómeno facilita la liberación al medio circundante de las células microbianas supervivientes que muestran variabilidad fenotípica lo que facilita su capacidad de colonizar nuevos ambientes (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). La formación de biopelículas podría jugar un papel importante en el ciclo de vida de *M. mediterranea* al crecer sobre la superficie de la planta marina *P. oceanica* (Espinosa *et al.*, 2010). Además, el elevado peso molecular de LodA permitiría su retención en la matriz polimérica de la biopelícula, lo que compensaría el efecto de dilución del agua, tal como se ha descrito para otras proteínas extracelulares de gran tamaño (Burchard and Sorongon, 1998).

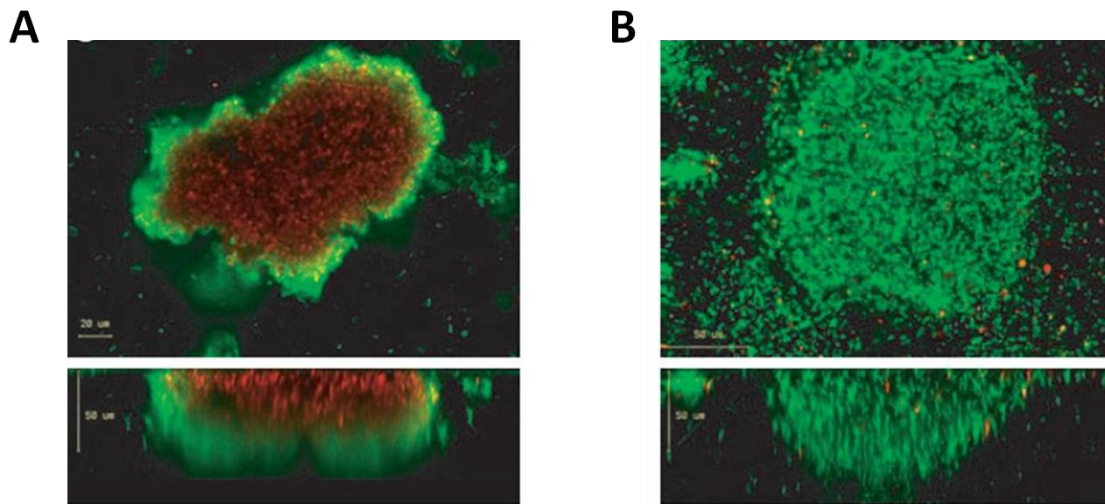


Figura I. 7. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de biopelículas de *M. mediterranea* MMB-1R (A) y del mutante SB1 afectado en la actividad lisina oxidasa (B). Se observa que la muerte celular ocurre durante el desarrollo de la biopelícula en la cepa MMB-1R pero no en el mutante SB1. Las biopelículas han sido obtenidas mediante incubación durante 72 horas en medio MN y teñidas posteriormente con el kit de viabilidad celular BacLight LIVE/DEAD (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

I.1.4.2. GoxA, glicina oxidasa de *M. mediterranea*.

La secuenciación del genoma de *M. mediterranea* en colaboración con el Departement of Energy (DOE), Joint Genome Institute (JGI) (USA) permitió la detección de dos operones adicionales similares al operón *lod* (Lucas-Elio *et al.*, 2012b). De forma paralela a este trabajo, en otra línea de investigación del grupo se estudiaron los nuevos operones detectados para intentar determinar que tipo de actividad codificaban. En este sentido, el mutante LD que tenía deletado el operón *lod* carecía de actividad lisina oxidasa (Gomez *et al.*, 2010). Estudios recientes han revelado que uno de estos operones codifica una nueva quinoproteína con actividad glicina oxidasa, que se ha denominado GoxA (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). GoxA cataliza la desaminación oxidativa de la glicina generando glioxilato, amonio y peróxido de hidrógeno (fig. I.8).

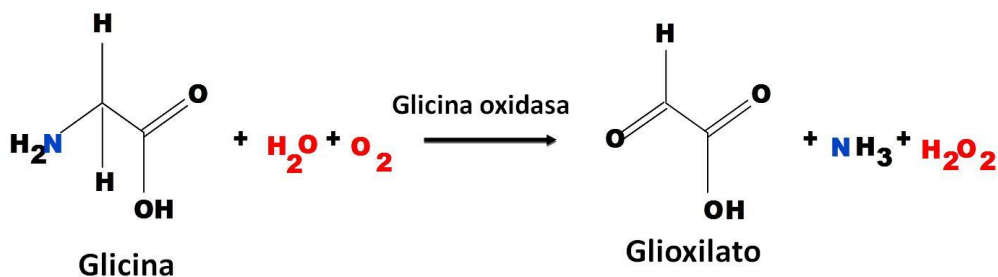


Figura I. 8. Reacción catalizada por la glicina oxidasa de *M. mediterranea*.

GoxA muestra propiedades diferentes a las de otras glicinas oxidasa que tienen cofactor flavínico y que han sido previamente descritas en los géneros *Bacillus* y *Geobacillus* (Nishiya and Imanaka, 1998; Martínez-Martínez *et al.*, 2008). Por ejemplo, GoxA es mucho más específica para el aminoácido glicina que las otras enzimas (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). Se ha propuesto que GoxA es una quinoproteína en base a su sensibilidad a inhibidores de cofactores quinónicos (Campillo-Brocal *et al.*, 2013).

La actividad glicina oxidasa de *M. mediterranea* se encuentra codificada por el gen *goxA* que forma parte del operón *gox*. Al igual que en el caso del operón *lod*, en *gox* se encuentra un segundo gen denominado *goxB*, que codifica una flavoproteína similar a LodB (Campillo-Brocal *et al.*, 2013).

I.1.4.3. Proteínas similares a LodA en otros organismos.

Estudios recientes de nuestro grupo han revelado la presencia de genes similares a LodA en numerosos genomas microbianos (Campillo-Brocal *et al.*, 2015). El análisis filogenético de estas proteínas similares a LodA ha permitido subdividir las en grupos con similitud estadísticamente relevante de acuerdo a los métodos del “Vecino más cercano” (NJ) y de “Máxima verosimilitud” (ML) (Campillo-Brocal *et al.*, 2015) (**fig. IV. 9**).

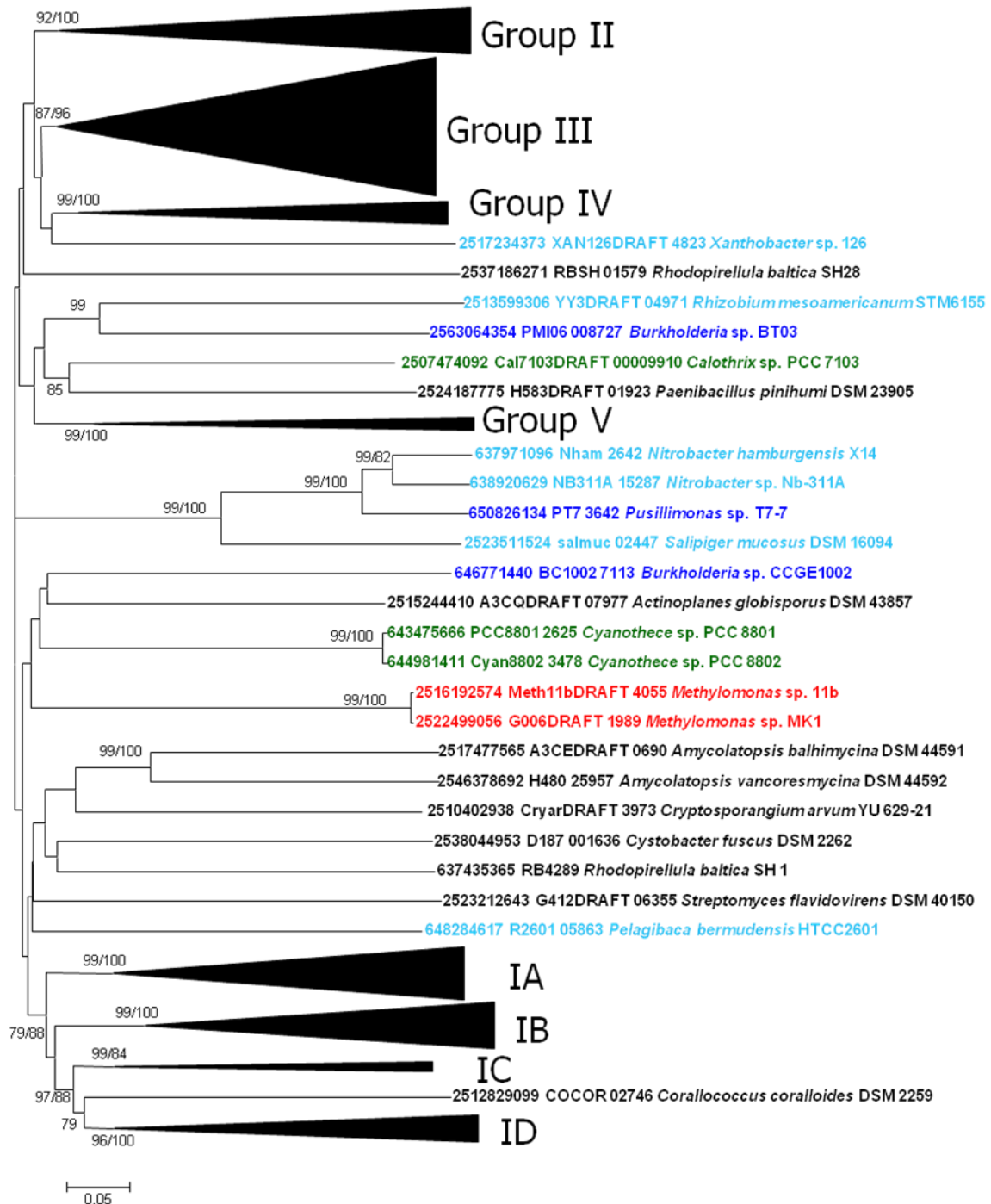


Figura I. 9. Relación filogenética de proteínas similares a LodA. El árbol fue construido usando el método del “Vecino más cercano” (NJ) con el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2013). La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican aquellos que muestran los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70% (bootstrap > 70%) para los árboles construidos por el método NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, las alfavproteobacterias en azul claro, las betaproteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde (Campillo-Brocal *et al.*, 2015).

GoxA se incluye en el grupo II del árbol anterior, mientras que LodA está en el grupo IA. El tercer gen similar a *lod* detectado en *M. mediterranea* se incluye en grupo III. La actividad enzimática de esta proteína se desconoce, aunque por similitud con LodA y

GoxA se puede pensar que codifica una oxidasa de aminoácidos o compuestos similares.

I.2. COFACTORES ENZIMÁTICOS.

Muchas enzimas se sintetizan inicialmente en forma inactiva (apoproteína) por lo que necesitan de un cofactor para obtener la holoenzima activa que es capaz de desarrollar la actividad enzimática. Estos cofactores pueden ser de naturaleza muy variada: un metal (por ejemplo, cobre o hierro), un compuesto orgánico (por ejemplo, flavina) o compuestos organometálicos (por ejemplo, el grupo hemo) (Davidson, 2007). Estos cofactores externos pueden ser disociables, o estar unidos covalentemente a la enzima. Sin embargo, algunas enzimas han desarrollado un método alternativo para introducir un nuevo grupo catalítico funcional en su centro activo, descartando así la necesidad de un cofactor exógeno. Este tipo de enzimas utilizan cofactores derivados de proteínas, los cuales son centros catalíticos o redox que se forman por modificación post-traducciona l en uno o más residuos aminoacídicos de la proteína (Davidson, 2007). Los cofactores derivados de proteínas son modificaciones químicas irreversibles entre las que se incluyen oxigenación de residuos aromáticos, ciclación de péptidos, deshidratación de la cadena lateral, unión covalente de residuos aminoacídicos o procesamiento proteolítico interno (Davidson and Wilmot, 2013). A continuación se comentaran los cofactores de tipo flavínico y los cofactores quinónicos que son uno de los tipos de cofactores generados por modificación post-traducciona l de proteínas, por ser los más relevantes para este trabajo.

I.2.1 Flavinas.

I.2.1.1. Estructura de las flavinas.

Las flavinas son compuestos heterocíclicos que tienen en común un anillo de isoaloxacina, que les otorga propiedades redox, el resto de la cadena tiene función estructural. Sufren procesos de oxido-reducción, pudiendo transferir electrones y/o protones, lo que les proporciona una gran versatilidad. Su nombre proviene del latín flavus (amarillo), ya que su forma oxidada es amarilla. Las flavinas presentes en la naturaleza son derivadas del 7,8-dimetil-isoaloxacina, y entre las más importantes están la riboflavina o vitamina B2, el flavín mononucleótido (FMN) y el flavín adenín dinucleótido (FAD). Todas ellas se producen por sustituciones en el nitrógeno de la posición 10 del anillo de isoaloxacina (**fig. I.10**).

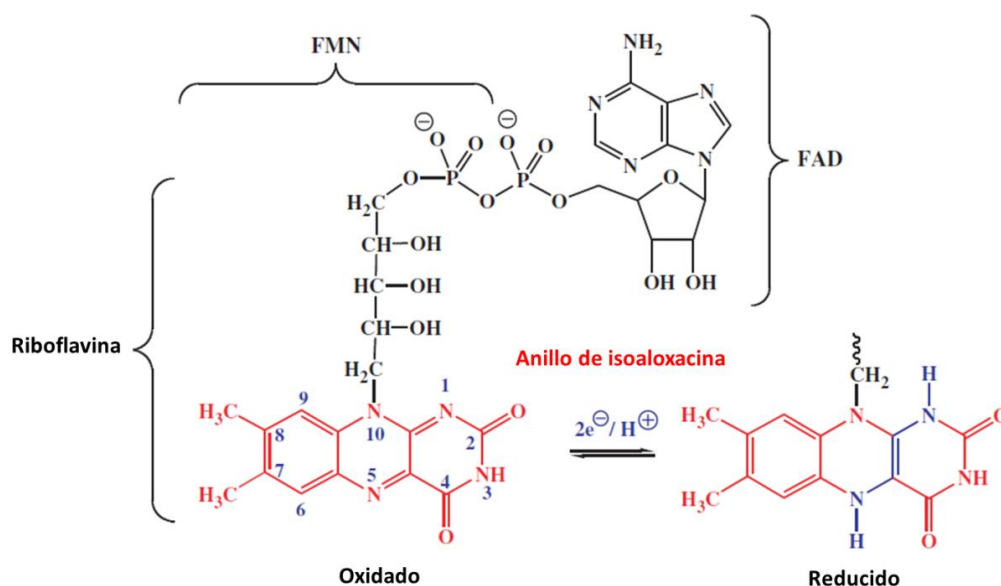


Figura I. 10. Estructura química de la riboflavina, flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD). Se muestra el anillo de isoaloxacina en su estado oxidado (rojo) y en su estado reducido por dos electrones (azul). El esquema numerado para el anillo de isoaloxacina se indica en la estructura oxidada de la izquierda. (Macheroux *et al.*, 2011).

En el caso de la riboflavina, en el N₁₀ de dicho anillo se encuentra una cadena lateral de ribitol. Si se fosforila el grupo 5'-OH de la cadena lateral de ribitol de la riboflavina se obtiene FMN. Si a este FMN se le une un AMP se obtiene FAD (**fig. I.10**). Aunque ambos cofactores están ampliamente distribuidos en la naturaleza, el FAD se presenta más a menudo como cofactor que el FMN (Macheroux *et al.*, 2011). En el anillo de isoaloxacina se producen además ganancias o pérdidas de electrones en los nitrógenos de las posiciones 1 y 5 lo que da lugar a la formación de las formas oxidadas y reducidas de estos compuestos.

En el ciclo catalítico de las flavoproteínas se pueden distinguir dos semireacciones: una primera semireacción de reducción, donde un sustrato orgánico es oxidado por la transferencia de electrones a la flavina que da como resultado la flavina totalmente reducida (hidroquinona) y el producto oxidado (Fraaije and Mattevi, 2000). La segunda semireacción de oxidación consiste en la regeneración del cofactor lo que permite volver a iniciar el ciclo. En este proceso se utiliza un aceptor de electrones. En el caso de que sea oxígeno, se produce peróxido de hidrógeno (Weber and Schleicher, 2014) (**fig. I.11**).

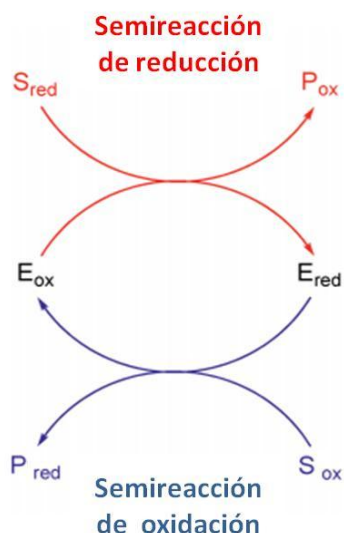


Figura I. 11. Ciclo catalítico típico de flavoproteínas. S: sustrato; P: producto; E: enzima; red: reducido, ox: oxidado.

I.2.1.2. Propiedades de las flavinas.

El anillo de isoaloxacina proporciona a la flavina unas propiedades redox características basadas en sus diferentes estados de reducción. Debido a la distinta distribución electrónica en el anillo de isoaloxacina el espectro de absorción es diferente para los distintos estados de reducción. El espectro de las flavinas oxidadas presenta dos máximos de absorción a longitudes de onda en torno a 370 y 450 nm. Por otra parte, la flavina en su forma reducida por dos electrones, o hidroquinona, pierde los dos picos de absorbancia del espectro UV visible lo que causa el blanqueamiento del cromóforo (**fig. I.12**).

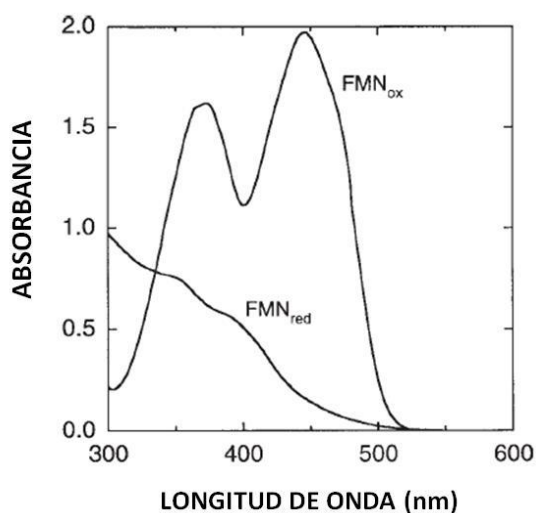


Figura I. 12. Espectro UV-visible del FMN en su forma oxidada y reducida. La reducción de la flavina a su estado reducido por dos electrones provoca la pérdida de los picos de absorbancia típicos de flavinas. (Chapman and Reid, 1999).

La flavinas pueden adquirir los electrones de forma secuencial. En la figura **I.13A** se representan los tres estados redox diferentes en los que se puede encontrar el anillo de isoaloxacina de la molécula de flavina: la forma totalmente oxidada o quinona, la forma reducida por un único electrón o semiquinona y la forma reducida por dos electrones o hidroquinona (Müller, 1991). Estos diferentes estados redox provocan importantes cambios en la estructura electrónica de la flavina que determinará distintos espectros de absorción (**fig. I.13B**).

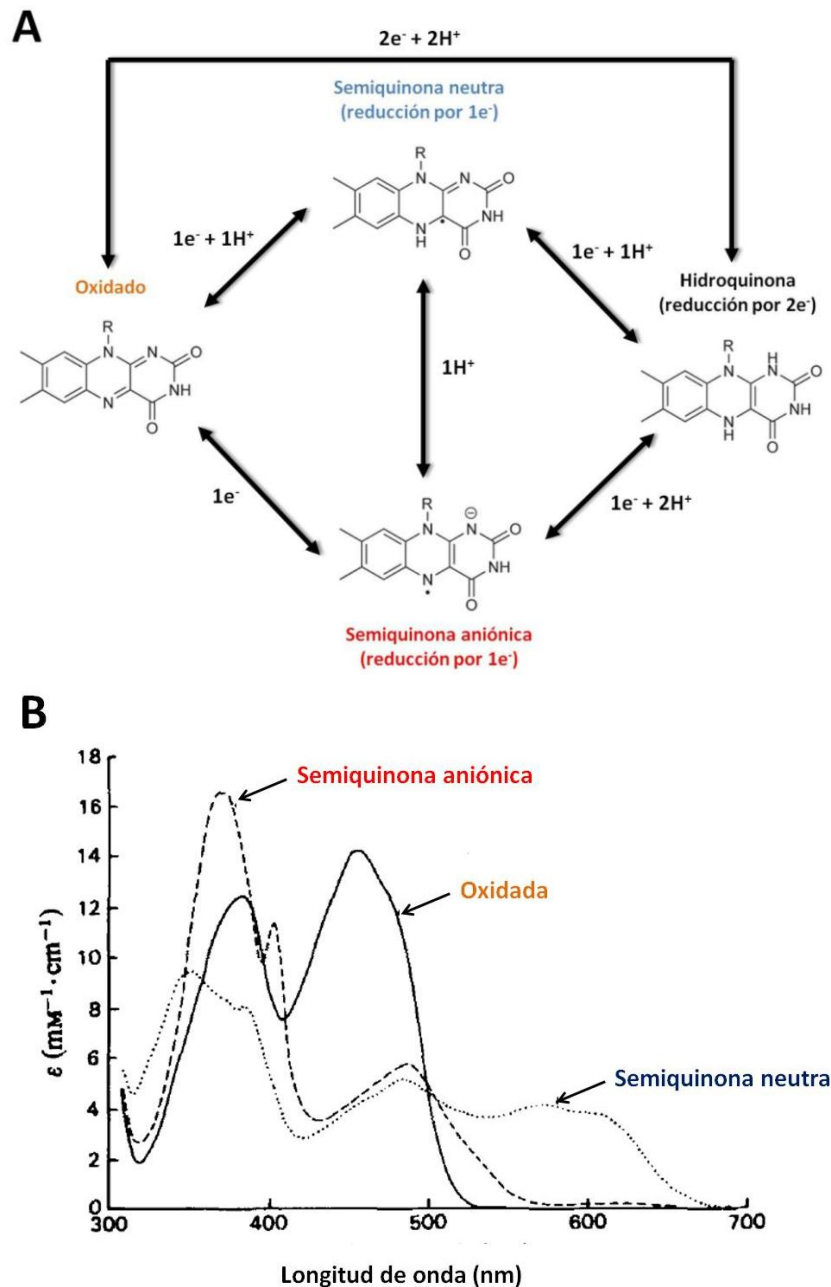


Figura I. 13. Propiedades de las flavinas. (A) Esquema de los diferentes estados redox que puede presentar el anillo de isoaloxacina en flavoproteínas. (B) Espectro de absorción UV-visible de los radicales semiquinona y de la forma oxidada de las flavoproteínas ilustrado con la glucosa oxidasa (Massey and Hemmerich, 1980).

En el caso de la semiquinona cuando está protonada, se la llama también semiquinona azul o neutra. La forma desprotonada se conoce también como semiquinona roja o aniónica. Estas dos especies radicales se distinguen perfectamente por sus propiedades espectrales. La semiquinona neutra tiene un espectro de absorción característico en torno a 580-620 nm mientras que la semiquinona roja posee un pico característico en la región de 380 nm presentando un pico adicional a 400 nm (Massey and Hemmerich, 1980) (**fig. I.13**). La observación de la absorbancia de las flavinas en el rango de espectro UV-visible proporciona una serie ventajas a la hora de caracterizar las flavoproteínas. Por ejemplo, los cambios observados en el espectro pueden proporcionar información sobre mecanismo de reacción enzimática y el entorno proteico (Chapman and Reid, 1999).

Las flavinas y los aminoácidos aromáticos (especialmente el grupo indol del triptófano) son los principales grupos fluorescentes presentes en proteínas. El estudio de la fluorescencia de las flavinas es una herramienta muy útil en el estudio de las flavoproteínas ya que permite por ejemplo, obtener información sobre la unión de la proteína y la flavina. Mientras que las flavinas reducidas tienen una fluorescencia muy baja, en su estado oxidado presentan alta fluorescencia y un máximo de emisión a 525 nm. Generalmente, el espectro de excitación de las flavoproteínas suele ser idéntico al espectro de absorción UV-visible de dicha flavina (Chapman and Reid, 1999).

Aunque la mayoría de las flavoproteínas tienen unida la flavina de forma no covalente, también hay flavoproteínas que la unen de forma covalente. La unión covalente de la flavina a la proteína es un proceso autocatalítico y post-traducciona, que aumenta el potencial redox y parece ser necesaria para mantener la estabilidad de la proteína (Heuts *et al.*, 2009). No obstante, estudios de mutagénesis han demostrado que la unión covalente no es imprescindible para la actividad (Hiro *et al.*, 1996). El tipo de unión se puede determinar mediante espectrometría de masas (Halada *et al.*, 2003).

I.2.1.3. Clasificación de las flavoproteínas.

Las flavoproteínas constituyen un grupo amplio de proteínas con diversas actividades enzimáticas. Más del 90% de ellas son oxidorreductasas, incluyendo monooxigenasas, hidroxilasas, oxidasas, etc. De las restantes, aproximadamente el 4,3% son transferasas y el resto incluye liasas, isomerasas y ligasas. El 75% de ellas tienen FAD como cofactor y en la mayoría de éstas (50%) el principal motivo de unión es el llamado motivo de Rossmann. El 25% de las flavoproteínas utilizan FMN generalmente unido mediante otros motivos como son el barril TIM o flavodoxina (Macheroux *et al.*, 2011).

Las flavoproteínas también se pueden clasificar atendiendo a los motivos conservados que presentan. Un ejemplo de este tipo de clasificación fue propuesta por Dym y Eisenberg (2001), en la que proponen los siguientes grupos: (1) grupo glutathion reductasa (GR): que se subdivide en dos grupos: GR1 y GR2; (2) grupo de la ferredoxina reductasa (FR); (3) grupo de la p-cresol metilhidroxilasa (PCMH) y (4) grupo de la piruvato oxidasa (PO) (Dym and Eisenberg, 2001).

Recientemente también se ha propuesto una clasificación para las flavoproteínas de tipo oxidasa que se basa en la homología de secuencia y los datos estructurales disponibles hasta el momento. Este tipo de flavoenzimas se agrupan en siete familias: (1) familia glucosa-metanol-colina oxidorreductasa (GMC), (2) familia vainilil alcohol oxidasa (VAO), (3) familia aminoácido oxidasa (AO), (4) familia sulfidril oxidasa, (5) familia Acil-CoA oxidasa (ACO), (6) familia 2-hidroxiácido oxidasa (HAO) y (7) flavoproteínas oxidasas únicas (Dijkman *et al.*, 2013).

I.2.1.4. Motivos estructurales conservados en flavoproteínas.

En las proteínas que utilizan nucleótidos como cofactores se han descrito motivos estructurales conservados que participan en la unión del cofactor a la apoproteína. En flavoproteínas, el motivo conservado mejor estudiado es el motivo de Rossmann que fue descubierto en deshidrogenasas dependientes de NADH por Michael Rossmann en 1974 (Rossmann *et al.*, 1974). Este motivo posee una estructura secundaria simétrica básica que consiste en dos hojas compuestas por láminas β paralelas que tienen intercaladas entre ellas hélices α ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$ y $\beta_4\alpha_4\beta_5\alpha_5\beta_6$). Las dos hojas están conectadas entre sí por la hélice α_3 entre las láminas β_3 y β_4 (Rossmann *et al.*, 1974) (fig I.14).

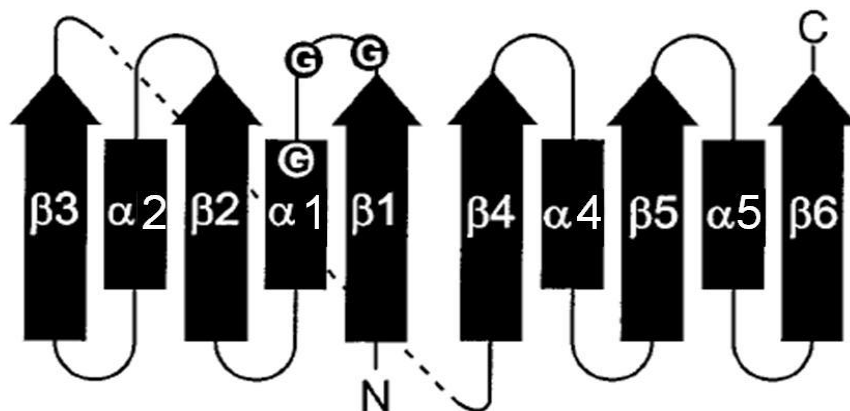


Figura I. 14. Topología típica del motivo de Rossmann. Las flechas corresponden a las láminas β y los rectángulos a las hélices α . Los círculos representan los residuos de glicina conservados del motivo de unión a dinucleótidos (DBM) (Bottoms *et al.*, 2002).

Tipicamente este motivo de Rossmann está localizado en el extremo N-terminal, y posee una secuencia consenso de unión a fosfato conocida como motivo de unión a dinucleótidos (DBM, por sus siglas en inglés “Dinucleotide binding motif”). La mayoría presenta la secuencia consenso **xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)₈ hxhE(D)** (donde x es cualquier residuo y h es un residuo hidrofóbico) (Vallon, 2000). La hoja β₁ llega hasta la primera G. La tercera G forma parte de la hélice α₁, mientras que los 5 últimos residuos incluyendo el residuo ácido forma parte de la hoja β₂ (Dym and Eisenberg, 2001; Bottoms *et al.*, 2002). La importancia de estos residuos conservados de glicina es bien conocida, la primera glicina permite el giro de la cadena principal de proteína que es importante para la posición de la segunda glicina la cual permite un contacto de la cadena principal de la proteína con el pirofosfato del cofactor debido a que este aminoácido carece de cadena lateral (Wierenga *et al.*, 1986). Por último, la tercera glicina permite un empaquetamiento cercano de la hélice α₁ con la primera hoja β, contacto favorecido por los aminoácidos hidrofóbicos que siguen a esta glicina (Wierenga *et al.*, 1986). En la cuarta hoja β a veces se puede encontrar la secuencia **oohhhATG** (donde o es un residuo con carga), denominada motivo ATG que es importante para la interacción con dinucleótidos (Vallon, 2000).

Se han encontrado diferentes variaciones de esta estructura básica del motivo de Rossmann describiéndose en otras proteínas que contienen como cofactor otros nucleótidos tales como FMN, FAD o NADP (Dym and Eisenberg, 2001). De hecho, este motivo es el más abundantemente distribuido en enzimas (Toth-Petroczy and Tawfik, 2014).

Además del motivo de Rossmann, en flavoproteínas se pueden encontrar otros motivos conservados que participan en la unión del cofactor. Por ejemplo, el motivo GD, identificado por primera vez en la rubredoxina reductasa (Eggink *et al.*, 1990). Este motivo presenta la secuencia consenso **T(S)(X)₅F(Y)hhGD** (Eggink *et al.*, 1990) y se encuentra presente en las flavoproteínas incluidas en el grupo GR₂ de la clasificación realizada por Dym y Eisenberg (2001). Otro motivo descrito es el motivo DG que se localiza detrás del motivo GD, y que presenta la secuencia consenso **chhssDGxcSxhR** (donde c es un residuo con carga y s es un residuo pequeño) (Eppink *et al.*, 1997; Vallon, 2000). El motivo DG se ha descrito como altamente específico para flavoproteínas hidroxilasas que son capaces de unir tanto FAD como NAD(P)H (Eppink *et al.*, 1997). En la NADH oxidasa NoxE producida por *Lactococcus lactis* se han identificado dos secuencias conservadas (**D(x)₆GxxP** y **LAXxAxxxG**) que parecen participar en la unión a FAD (Dym and Eisenberg, 2001; Tachon *et al.*, 2011).

En flavoproteínas que poseen dos dominios de unión a nucleótidos se puede encontrar el motivo estructural GG (**RxGGxx(S/T)**) que aparece tras el primer DBM, además de los motivos GD y ATG que siguen al segundo DBM (Vallon, 2000). Al realizar alineamientos de secuencias entre flavoproteínas con dos DBM se observan los motivos estructurales conservados siguiendo un orden general: DBM_(FAD)-(GG)-ATG_(FAD)-DBM_{(NAD(P)H)}-ATG_{(NAD(P)H)}-GxxP-GD (Vallon, 2000; Ojha *et al.*, 2007). No obstante, hay que tener en cuenta que no todas las flavoproteínas poseen todos los motivos conservados aquí descritos.

I.2.2. Cofactores quinónicos.

Las quinoproteínas son enzimas redox que poseen quinonas en su centro activo. Estas quinonas se han generado por modificaciones post-traduccionales en uno o más residuos proteicos (Davidson, 2011). Los cofactores quinónicos conocidos son el cofactor dissociable PQQ, y los cofactores derivados de tirosina (TTQ y LTQ) (Mure, 2004) y de triptófano (TTQ y CTQ) (Davidson, 2005) (**fig. I.15**).

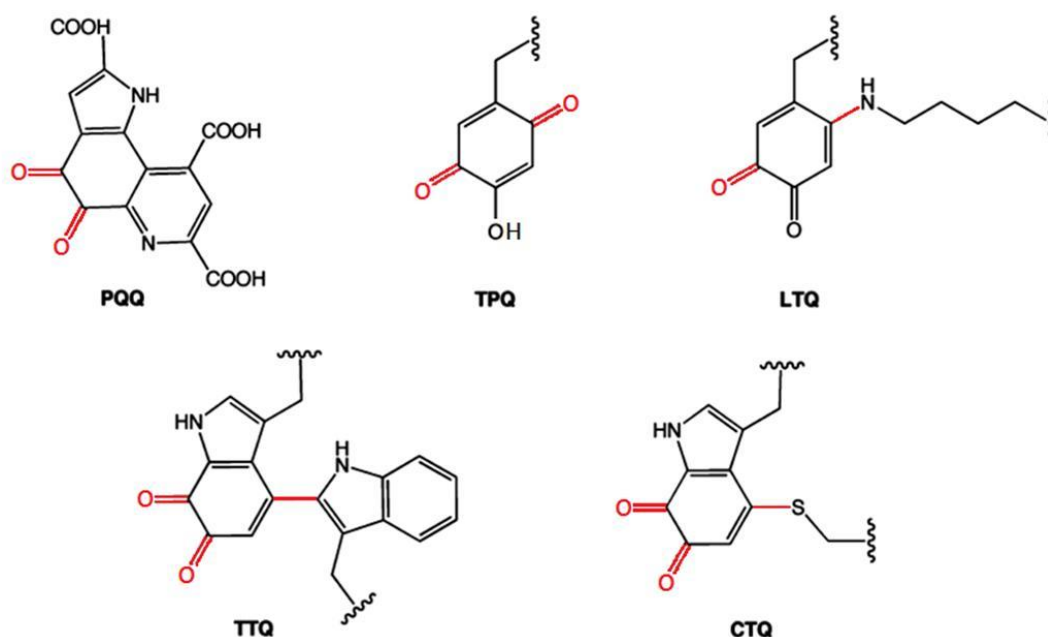


Figura I. 15. Estructura química de los cofactores quinónicos conocidos. PQQ: pirroloquinolin quinona. Cofactores derivados de tirosina: topaquinona (TPQ) y lisina tirosilquinona (LTQ). Cofactores derivados de triptófano: triptófano triptofilquinona (TTQ) y cisteína triptofilquinona (CTQ) (Klinman and Bonnot, 2014).

I.2.2.1. Pirroloquinolin quinona (PQQ).

El cofactor quinónico pirroloquinolin quinona (PQQ) (**fig. I.15**) es un cofactor dissociable que fue descrito por primera vez en la enzima metanol deshidrogenasa sintetizada por bacterias metilótrofas (Salisbury *et al.*, 1979). También es el cofactor de algunas glucosa deshidrogenasas (Duine and Frank, 1979). Es un cofactor que se presenta típicamente en bacterias Gram negativas como *Acinetobacter calcoaceticus* (Olsthoorn and Duine, 1996), *Gluconobacter oxydans* (Holscher *et al.*, 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Meulenberg *et al.*, 1992), *Methylobacterium extorquens* (Toyama *et al.*, 1997) y *Enterobacterium intermedium* (Kim *et al.*, 2003). La presencia de PQQ en eucariotas ha sido objeto de controversia. Recientemente se ha descrito su presencia en hongos (Matsumura *et al.*, 2014). La síntesis de PQQ ha sido obtenida recombinantemente clonando el operón completo de *G. oxydans* en *E. coli* (Yang *et al.*, 2010).

Los genes que participan en la síntesis de PQQ se encuentran organizados en un operón (*pqqABCDEF/G*) y presentan un número variable de genes, por ejemplo *A. calcoaceticus* tiene 4 genes y en el caso de *G. oxydans* el operón presenta 7 (Misra *et al.*, 2012). La biosíntesis de PQQ comienza con la generación de un péptido precursor denominado PqqA de unos 24 aminoácidos que contiene L-tirosina y L-glutámico (Goosen *et al.*, 1992). El gen *pqqE* codifica una enzima dependiente de S-adenosil metionina (SAM) que parece ser la primera enzima que participa en la biosíntesis de PQQ catalizando la formación del enlace C-C entre los aminoácidos L-tirosina y L-glutámico (Yukl and Wilmot, 2012). PqqE podría orientar su sitio activo mediante la interacción con PqqD (Wecksler *et al.*, 2009). Por su parte, el gen *pqqF* parece codificar una proteasa que participaría en la escisión del intermediario tirosina-glutámico del péptido precursor PqqA (Yukl and Wilmot, 2012). PqqC es una oxidasa que participa en la última etapa de la ruta de biosíntesis de PQQ catalizando cuatro pasos de oxidación, en tres de ellos se utiliza el oxígeno como aceptor de electrones y en uno se utiliza el H₂O₂ producido en los pasos previos generando H₂O (Bonnot *et al.*, 2013) (**fig. I.16**).

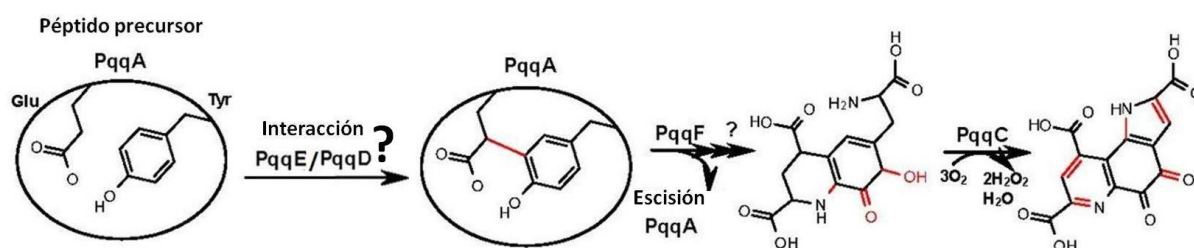


Figura I. 16. Biosíntesis del cofactor PQQ. Las modificaciones post-traduccionales que ocurren en cada paso son mostradas en rojo (Yukl and Wilmot, 2012).

En cuanto a aplicaciones biotecnológicas, algunas enzimas dependientes de PQQ, como la glucosa deshidrogenasa se puede usar como biosensores (Stredansky *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado que la producción de ácido glucónico mediado por la glucosa deshidrogenasa que contiene PQQ, solubiliza el fosfato en el suelo favoreciendo el crecimiento y el desarrollo de las cosechas, incrementando también la productividad (Wagh *et al.*, 2014). En cuanto a posibles aplicaciones farmacéuticas, PQQ puede actuar como anti-neurodegenerativo (Kim *et al.*, 2010a; Kim *et al.*, 2010b) y neuroprotector (Wang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Es también capaz de inducir la apoptosis en células cancerígenas (Min *et al.*, 2014) y además se ha visto que podría participar en la modulación de la respuesta frente al estrés oxidativo en bacterias y mamíferos (Misra *et al.*, 2012).

I.2.2.2. Cofactores quinónicos derivados de tirosina: TPQ y LTQ.

Se conocen dos cofactores quinónicos derivados de tirosina: topaquinona (TPQ) (Janes *et al.*, 1990) y lisina tirosilquinona (LTQ) (Wang *et al.*, 1996) (**fig. I.15**). Estos cofactores son no disociables ya que se generan por modificación de residuos de la propia proteína. Están presentes en amino oxidasas que contienen cobre y que oxidan un amplio rango de sustratos participando en diversas actividades biológicas (Mure, 2004; Davidson, 2011).

Las enzimas que contienen TPQ como cofactor están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Mure, 2004). En microorganismos juegan un papel nutricional ya que permiten el uso de aminas primarias como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento. En plantas participan en la biosíntesis de hormonas y de la pared celular (Cona *et al.*, 2006). En animales se han descrito funciones fisiológicas muy variadas para las enzimas con TPQ entre las que se encuentran la regulación de la homeostasis de la glucosa, la adhesión de linfocitos y la maduración de adipocitos (Yu *et al.*, 2003; Stolen *et al.*, 2004; Airene *et al.*, 2005).

El cofactor TPQ se genera por una modificación post-traducciona l en la que dos oxígenos se introducen en las posiciones 2 y 5 del anillo aromático de una tirosina (Davidson, 2011). Este residuo de tirosina está dentro de la secuencia conservada **TxxNYD/Q** (Mu *et al.*, 1992). Además de esta tirosina, son necesarios tres residuos de histidinas que están estrictamente conservados y una segunda tirosina que está localizada en el sitio activo (Li *et al.*, 1998). También se ha descrito un residuo aspártico cerca del centro activo que es importante en la síntesis de TPQ (Moore *et al.*, 2007). La formación de TPQ ocurre por autoproc esamiento que requiere la presencia de cobre (Cai and Klinman, 1994; Matsuzaki *et al.*, 1994). Durante la biogénesis del cofactor se forma un intermediario aminoquinol (Wilmot *et al.*, 1999) y posteriormente un intermediario L-dopaquinona. En este último se introduce un

átomo de oxígeno generando un TPQ reducido que se oxida reduciendo O_2 a H_2O_2 para formar el cofactor TPQ maduro (Klema and Wilmot, 2012). La L-dopaquinona es un intermediario común propuesto en la generación de los dos cofactores quinónicos derivados de tirosina: TPQ y LTQ (Klinman, 2001).

El cofactor LTQ se ha descrito en lisil-oxidasas (LOX) (Wang *et al.*, 1996). Estas enzimas participan en la maduración del colágeno y la elastina en mamíferos, y también se asocian con la proliferación y supresión de células tumorales (Erler *et al.*, 2006). Este cofactor se genera por modificaciones post-traduccionales en las que un residuo de lisina de la proteína precursora se une de forma covalente al anillo aromático de una tirosina modificada a L-dopaquinona por incorporación de un oxígeno (Wang *et al.*, 1996). La modificación ocurre mediante autoprocesamiento en el que participan cobre y oxígeno (Bollinger *et al.*, 2005).

La posición del enlace formado entre la lisina y la tirosina, parecen indicar un mecanismo de biosíntesis similar al de TPQ, asumiéndose que las etapas iniciales de ambos son muy parecidas pero con la diferencia de la unión del nitrógeno de la lisina al intermediario L-dopaquinona (Moore *et al.*, 2007; Davidson, 2011). Por analogía con TPQ, se ha propuesto la formación de un intermediario lisilquinol que luego será oxidado por una segunda molécula de oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y el cofactor LTQ oxidado (Davidson, 2011).

I.2.2.3. Cofactores quinónicos derivados de triptófano.

Hasta la fecha se han descrito dos tipos de cofactores derivados de triptófano: triptófano triptofilquinona (TTQ) y cisteína triptofilquinona (CTQ) (**fig. I.15**). TTQ está presente en la metilamina deshidrogenasa (MADH) de *Paracoccus denitrificans* (McIntire *et al.*, 1991) y en la amina aromática deshidrogenasa (AADH) de *Alcaligenes faecalis* (Govindaraj *et al.*, 1994; Chistoserdov, 2001). Por su parte, CTQ es el cofactor de quinohemoproteínas amino deshidrogenasas (QHNDH) de bacterias como *P. denitrificans* (Datta *et al.*, 2001).

I.2.2.3.1. Triptófano triptofilquinona (TTQ).

El cofactor TTQ se forma por modificaciones post-traduccionales de dos residuos de triptófano de la propia proteína. Se insertan dos oxígenos en las posiciones 6 y 7 del anillo indólico de uno de los triptófanos para generar una quinona, y se forma un enlace covalente entre los anillos indólicos de ambos triptófanos (**fig. I.15**). El ejemplo de cofactor TTQ mejor estudiado es el de la MADH de *P. denitrificans* (Wilmot and Davidson, 2009). MADH cataliza la desaminación oxidativa de metilamina a

formaldehído y amonio usando como aceptor de electrones la amicianina (cobreproteína azul) (**fig. I.17**).

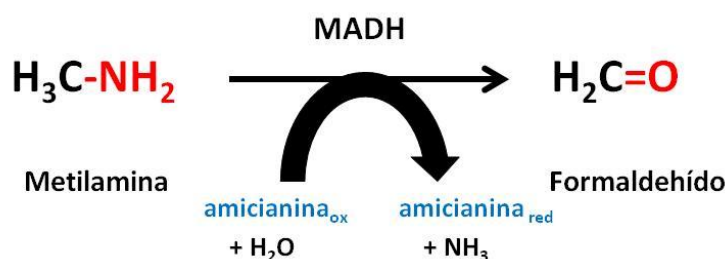


Figura I. 17. Reacción catalizada por MADH.

MADH está implicada en la utilización de metilamina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Davidson, 2001; Davidson and Liu, 2012). MADH posee una estructura tetramérica $\alpha_2\beta_2$ de 119 kDa, en la que cada una de las subunidades β poseen un cofactor de tipo TTQ (Chen *et al.*, 1998). En *P. denitrificans* todos los genes que participan en la utilización de metilamina se encuentran localizados en el locus *mau*, que consta de 11 genes agrupados en el orden *mauRFBEDACJGMN* (van der Palen *et al.*, 1995; van der Palen *et al.*, 1997). La subunidad α y β están codificadas por *mauB* y *mauA* respectivamente, y el gen *mauC* codifica el aceptor de electrones amicianina (van Spanning *et al.*, 1990). *mauD* codifica una proteína homóloga a una disulfuro isomerasa que probablemente participa en la generación de los seis puentes disulfuro presentes en la subunidad β (van der Palen *et al.*, 1997). Otro gen de este locus codifica la enzima MauG que participa en la generación del cofactor de la MADH (Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Por tanto, a diferencia de los cofactores derivados de tirosina, la formación de TTQ no es un proceso autocatalítico pues requiere de la participación de otras enzimas (Davidson, 2011).

MauG es una enzima monomérica de 42 kDa que une dos grupos hemo de tipo c mediante las secuencias de unión a hemo (CXXCH) (Wilmot and Yukl, 2013). MauG presenta similitud de secuencia con citocromo c peroxidasas bacterianas. Sin embargo, sus propiedades catalíticas y redox son muy distintas (Wilmot and Yukl, 2013). La expresión recombinante en *Rhodobacter sphaeroides* de algunos genes del operón *mau* (Graichen *et al.*, 1999) reveló que MauG es necesaria en el proceso de síntesis de TTQ (Pearson *et al.*, 2003). En ausencia de MauG, se genera un precursor de MADH (preMADH) monohidroxilado en el residuo β Trp57 que forma parte del cofactor, aunque el mecanismo de generación de este precursor es todavía desconocido (Pearson *et al.*, 2003; Wilmot and Yukl, 2013). Posteriormente se forma un enlace covalente entre los residuos β Trp57 y β Trp108. Esta modificación no ocurre de manera espontánea sino que necesita la participación de MauG que completa la generación

del cofactor TTQ usando preMADH como sustrato (Pearson *et al.*, 2004; Yukl *et al.*, 2013) (**fig. I.18**).

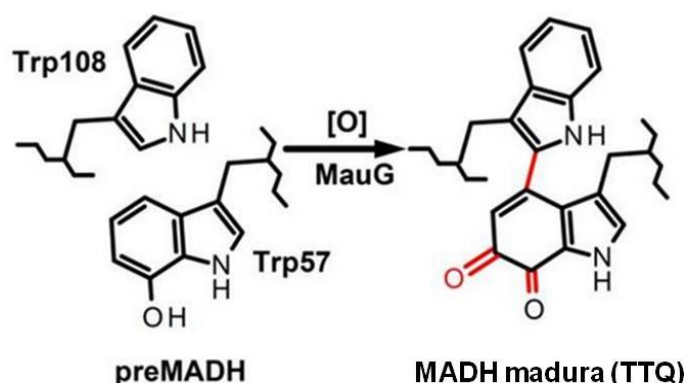


Figura I. 18. Biosíntesis del cofactor TTQ. Estructura química del precursor de MADH (preMADH) y del cofactor TTQ en MADH madura (Davidson and Wilmot, 2013).

La reacción general catalizada por MauG es una oxidación de seis electrones, de manera que MauG en su estado redox bis-Fe(IV) necesita tres ciclos de dos electrones cada uno, para completar la biosíntesis de TTQ (Li *et al.*, 2008; Wilmot and Yukl, 2013). Recientemente se han sugerido el orden para los tres ciclos de dos electrones. Primero se produce la formación del enlace β Trp57-OH y β Trp108 (**fig. I.19.1-2**). Posteriormente, se introduce un segundo átomo de oxígeno en β Trp57 formando un quinol (**fig. I.19.3**). El último ciclo consiste en la oxidación del quinol a quinona lo que da lugar a MADH con el cofactor TTQ (**fig. I.19**) (Yukl *et al.*, 2013).

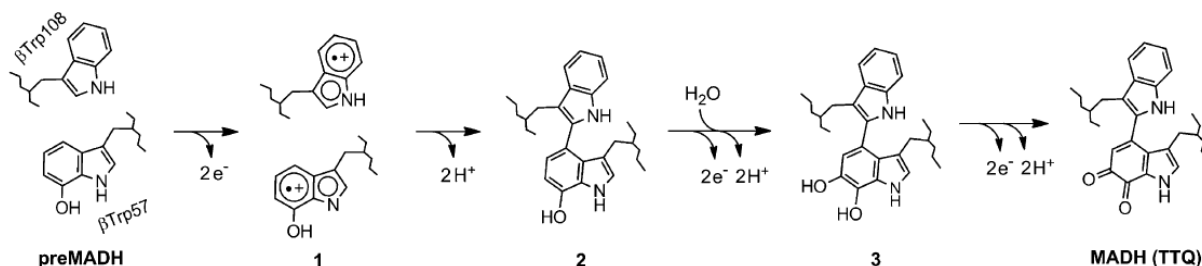


Figura I. 19. Oxidación por seis electrones de preMADH. Se muestra el mecanismo propuesto para la oxidación por seis electrones de preMADH hasta la formación de TTQ en MADH madura por MauG (Yukl *et al.*, 2013).

La oxidación de preMADH por MauG tiene lugar mediante un mecanismo de “electron hopping” en el que participan algunos residuos de Trp de esta proteína que son oxidados de forma reversible (Abu Tarboush *et al.*, 2011; Abu Tarboush *et al.*, 2013a). Este tipo de mecanismo hace que no sea necesario el contacto directo entre la enzima que cataliza la oxidación y el residuo modificado. Algunos de los Trp que participan de

intermediarios se encuentran alejados de los grupos hemo a distancias de 40.1 Å y 19.4 Å (Abu Tarboush *et al.*, 2011; Shin and Davidson, 2014).

Estudios de mutagénesis han determinado varios residuos importantes en MauG. La Gln103 participa en la estabilidad y en las propiedades redox de MauG (Shin *et al.*, 2014). La mutación del Trp93 causa la pérdida de la unión de Ca²⁺ y altera el mecanismo cinético de biosíntesis del cofactor (Shin *et al.*, 2013). Trp294 participa en la unión al grupo hemo (Davidson and Wilmot, 2013). Trp199 interacciona con preMADH durante la síntesis de TTQ (Davidson and Wilmot, 2013; Abu Tarboush *et al.*, 2013a). Finalmente, la mutación de Glu113 afecta a las propiedades redox de MauG (Abu Tarboush *et al.*, 2013b).

I.2.2.3.2. Cisteína triptofilquinona (CTQ).

CTQ es el cofactor de quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QHNDH) de *Paracoccus denitrificans* (Datta *et al.*, 2001) y de *Pseudomonas putida* (Vandenbergh *et al.*, 2001). QHNDH cataliza la desaminación oxidativa de aminas primarias alifáticas permitiendo que la bacteria los utilice como fuente de energía, carbono y nitrógeno (Nakai *et al.*, 2014). A diferencia de lo que ocurre con TTQ, el aceptor de electrones no es una cobreproteína exógena sino dos grupos hemo presentes en la subunidad α (Datta *et al.*, 2001).

QHNDH es un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$, donde la subunidad γ de 82 aminoácidos contiene el cofactor CTQ (Datta *et al.*, 2001). Este cofactor se forma por una serie de modificaciones post-traduccionales en las que un residuo de triptófano incorpora dos oxígenos a su anillo indólico y posteriormente se forma un enlace tioéter entre el triptófano modificado y el grupo tiol de una cisteína (Davidson, 2007) (**fig. I.15**). En la síntesis de QHNDH participan diversas proteínas codificadas por una serie de genes que se localizan en el locus *qhp* y que se organizan siguiendo el orden *qhpGADCBEFR* (Ono *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2014). Las subunidades α , β y γ de QHNDH son codificadas por los genes *qhpA*, *qhpB* y *qhpC* respectivamente. Los genes *qhpD* y *qhpE* codifican proteínas esenciales para que se lleve a cabo la modificación post-traduccionales en la subunidad γ (Nakai *et al.*, 2012). Entre los genes que participan en la generación de QHNDH no se detecta ninguno que codifique alguna proteína homóloga a MauG (Ono *et al.*, 2006). Sin embargo, la subunidad α contiene dos grupos hemo tipo c, lo que sugiere que esta subunidad podría realizar en la formación de CTQ un papel similar a MauG en la generación de TTQ (Ono *et al.*, 2006) (**fig. I.20**).

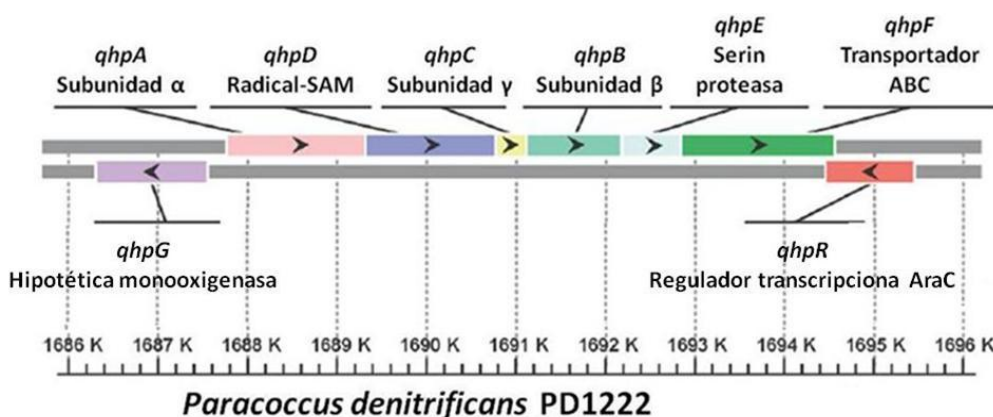


Figura I. 20. Estructura del operón *qhp*. Organización de los genes *qhp* en el genoma de *Paracoccus denitrificans* PD1222 (Nakai *et al.*, 2014).

Se ha propuesto un mecanismo para la formación de QHNDH que constaría de 8 pasos. El proceso comenzaría con la inducción del operón *qhp* por la presencia de *n*-butilamina activándose la transcripción de *qhpADCBEF* y *qhpG* por QhpR, que es un regulador transcripcional de la familia AraC (Nakai *et al.*, 2014) (**fig. I.21 PASOS 1-2**). En la generación de QHNDH activa, primero se forman los enlaces tioéter intrapeptídicos de la subunidad γ naciente (QhpC) por la enzima radical-SAM (QhpD) (Ono *et al.*, 2006) (**fig. I.21 PASO 3**). Una hipotética flavoproteína con actividad monooxigenasa (QhpG) catalizaría la hidroxilación del Trp43 (precursor de CTQ) (**fig. I.21 PASO 4**). Posteriormente, la serin proteasa QhpE eliminaría el péptido líder de 28 aminoácidos presente en el extremo N-terminal de la subunidad γ (Nakai *et al.*, 2012) (**fig. I.21 PASO 5**). Hasta el momento no se tienen datos que indiquen que realmente el paso 4 ocurra antes que el 5. Las tres subunidades de QHNDH (QhpA, QhpB y QhpC) serían translocadas al espacio periplásmico. Las subunidades α y β lo serían a través del translocón Sec o Tat. La subunidad γ sería translocada con la participación de QhpF un transportador ABC (**fig. I.21 PASO 6**). Una vez que todas las subunidades se encuentran en el periplasma, se produce la inserción de dos grupos hemo en la subunidad α (**fig. I.21 PASO 7**). Finalmente, se ha propuesto que tras la formación del heterotrímico se termina de generar el cofactor con la ayuda de los grupos hemo presentes en la subunidad α (**fig. I.21 PASO 8**) (Nakai *et al.*, 2014).

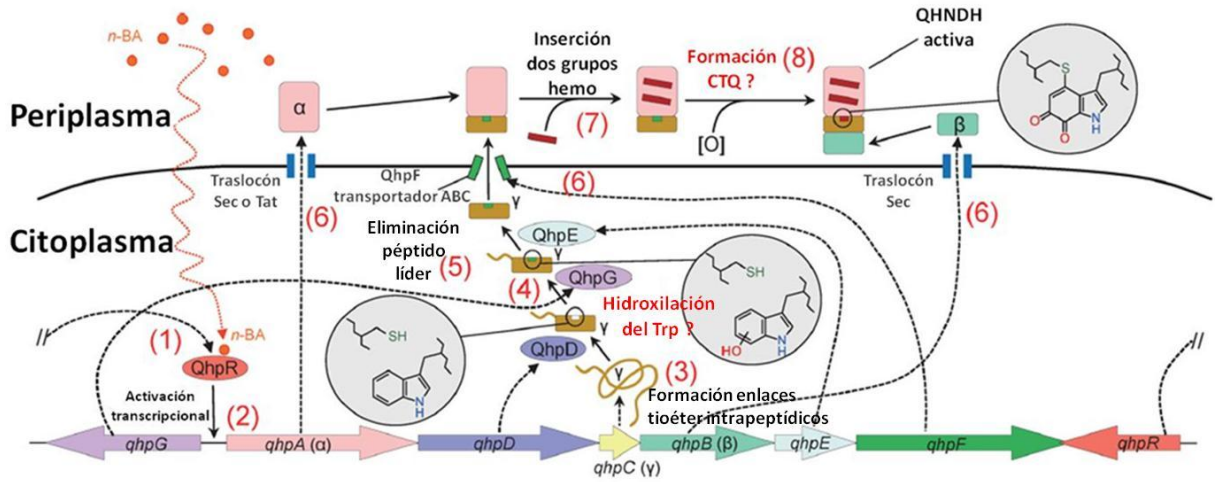


Figura I. 21. Mecanismo propuesto para la formación de QHNDH. Se muestran las proteínas codificadas por los genes *qhp*. Los números entre paréntesis indican la predicción del orden de los eventos. n-BA: n-butylamina. Adaptado de Nakai *et al.*, (2014).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

Los objetivos generales de este trabajo son dos. En primer lugar, se abordarán por primera vez estudios de relación estructura/función en la lisina-épsilon-oxidasa LodA determinando la naturaleza de su cofactor quinónico y los residuos implicados en la generación de dicho cofactor y en la actividad enzimática. En segundo lugar, se estudiará la función de LodB en la generación de la forma activa de LodA.

Estos objetivos generales se dividen en los siguientes objetivos particulares:

1. Expresión recombinante de las proteínas del operón *lod* fusionadas a etiquetas de poli-His.
2. Análisis de la forma activa de LodA y determinación de la naturaleza de su cofactor.
3. Análisis mediante experimentos de mutagénesis de los residuos conservados de LodA importantes para la síntesis del cofactor y en su actividad enzimática.
4. Análisis de los posibles precursores en la síntesis de LodA.
5. Determinación del efecto de LodB sobre la expresión de LodA.
6. Caracterización molecular y análisis bioinformático de LodB.
7. Análisis comparativo de las proteínas de los operones *lod* y *gox*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.

Todas las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se conservaron mediante congelación. Para la preparación de los stocks se añadió glicerol a una concentración final de 20% a un cultivo en fase estacionaria y se guardó inmediatamente a -75 °C.

III.1.1. Cepas de *M. mediterranea*.

En la presente memoria se ha trabajado con la bacteria marina *M. mediterranea* y con diversos mutantes generados a partir de la misma (**tabla III.1**). Así, muchas de las cepas empleadas derivan de la cepa silvestre MMB-1^T (CECT 4803), aislada de aguas del mar Mediterráneo. La cepa MMB-1R es una variante espontánea de MMB-1^T (CECT 4803) resistente al antibiótico rifampicina (Rif^r). La resistencia a este antibiótico la hace especialmente útil en los ensayos de transferencia génica por conjugación.

Cepa	Descripción y genotipo relevante	Fuente o referencia
<i>M. mediterranea</i>		
MMB1-R	MMB-1, Rif ^r espontánea	(Solano <i>et al.</i> , 2000)
LDB	MMB-1R, Δ <i>lodAB</i> Ω mini-Tn10 Gm ^r <i>lodB</i>	(Gomez <i>et al.</i> , 2010)
LDAHa/B	LDB Ω mini-Tn10 Gm ^r Km ^r <i>lodA</i> -Ha-Ha-6His	(Gomez <i>et al.</i> , 2010)
HLDA/B	LDB Ω mini-Tn10 Gm ^r Km ^r 6His- <i>lodA</i>	Este estudio
HLDACT/B	LDB Ω mini-Tn10 Gm ^r Km ^r 6His- <i>lodACT</i>	Este estudio
LDACT2/B	LDB Ω mini-Tn10 Gm ^r Km ^r <i>lodACT2</i>	Este estudio
LDACT/B	LDB Ω mini-Tn10 Gm ^r Km ^r <i>lodACT</i>	Este estudio

Tabla III. 1. Cepas de *M. mediterranea* utilizadas en este trabajo. En la columna central se indica en primer lugar la cepa a partir de la que deriva seguido del genotipo. Otras abreviaturas utilizadas: Ω (se obtuvo por mutagénesis con el transposón que se indica a continuación), Δ (delección del gen que se indica).

III.1.2. Cepas de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo se describen en la **tabla III.2**. La cepa S17-1 (λ pir) es lisogénica para un fago que contiene el gen *pir*. Esta proteína es necesaria para la replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación *ori-R6K*, como es el caso de pBSL182 y sus derivados. Adicionalmente, contiene integradas en el cromosoma funciones RP4 de transferencia por conjugación que permiten la transferencia directa de los plásmidos a la cepa receptora. La cepa Rosetta (DE3) (pRARE) se empleó en la mayoría de los ensayos de expresión recombinante aunque en ocasiones se utilizó la cepa CD03 (pRARE) que está mutada en una catalasa. Por último, la cepa DH5 α fue usada para la construcción de los plásmidos.

Cepa	Descripción y genotipo relevante	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE® (Cm ^r)	Novagen
S17-1 (λ pir)	Tp ^r Sm ^r , <i>recA thi hsdRM⁺</i> , lisogenizada con el fago λ pir RP4:Mu::Km Tn7	(de Lorenzo and Timmis, 1994)
DH5 α	<i>sup E44 Δlac U 169 (ϕ 80 lacZ ΔM5) hsd R17 rec Δ end Δ gyr Δ96 thi-1 rel Δ</i>	(Hanahan, 1983)
CD03 pRARE®	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE® (Cm ^r) <i>katE12::Tn10 katG::Tn5</i>	(Kishishita <i>et al.</i> , 2003)

Tabla III. 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

III.1.3. Plásmidos.

Los diferentes plásmidos construidos y utilizados en este estudio se enumeran en la **tabla III.3**, indicando sus descripciones y fuente o referencia.

Plásmidos	Descripción	Fuente o referencia
pET11b	<i>oriColE1, Amp^r, T7-promoter</i>	Novagen
pETLODA11	pET11b, <i>lodA</i>	(Gomez, 2010)
pETLODB11	pET11b, <i>lodB</i>	(Gomez, 2010)
pETLODAB11	pET11b, <i>lodAB</i>	(Gomez, 2010)
pETGOXB11	pET11b, <i>goxB</i>	Este estudio
pET15-b	<i>oriColE1, Amp^r, T7-promoter</i>	Novagen
pETLODA15	pET15-b, <i>lodA</i>	Este estudio
pETLODB15	pET15-b, <i>lodB</i>	Este estudio
pETLODAB15	pET15-b, <i>lodAB</i>	Este estudio
pETC516A	pET15-b, <i>lodA-C516A, lodB</i>	Este estudio
pETW581A	pET15-b, <i>lodA-W581A, lodB</i>	Este estudio
pETE101A	pET15-b, <i>lodA-E101A, lodB</i>	Este estudio
pETR100A	pET15-b, <i>lodA-R100A, lodB</i>	Este estudio
pETY211A	pET15-b, <i>lodA-Y211A, lodB</i>	Este estudio
pETC488A	pET15-b, <i>lodA-C448A, lodB</i>	Este estudio
pETD512A	pET15-b, <i>lodA-D512A, lodB</i>	Este estudio
pETLODACT15	pET15-b, <i>lodACT</i>	Este estudio
pETLODACT2-15	pET15-b, <i>lodACT2</i>	Este estudio
pETGOXA15	pET15-b, <i>goxA</i>	Este estudio
pETGOXAB15	pET15-b, <i>goxAB</i>	Campillo-Brocal (Tesis Doctoral en preparación)
pETMBP28	<i>oriColE1, Km^r, T7-promoter</i>	Donación del Dr. Fco. Javier Medrano
pETMBPLODB28	pETMBP28, <i>lodB</i>	Este estudio
pETMBPGOXB28	pETMBP28, <i>goxB</i>	Este estudio
pCOLADuet-1	<i>oriColA, Km^r, T7-promoter-1</i>	Novagen
pLODADuet	pCOLADuet, <i>lodA</i>	Este estudio
pMBPLODBDuet	pCOLADuet, <i>MPB^rlodB</i>	Este estudio
pGOXADuet	pCOLADuet, <i>6His-goxA</i>	Este estudio
pBLODAII	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, lodA</i>	(Gomez, 2010)
pBLODA-Ha	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, lodA-Ha-Ha-6His</i>	(Gomez <i>et al.</i> , 2010)
pBLODBII	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, lodB</i>	(Gomez <i>et al.</i> , 2010)
pBHisLODA	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, His^rlodA</i>	Este estudio
pBHisLODACT	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, His^rlodACT</i>	Este estudio
pBLODACT	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, lodACT</i>	Este estudio
pBLODACT2	<i>ori R6K, mob RP4, Amp^r; mini-Tn10 Km^r, lodACT2</i>	Este estudio

Tabla III. 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

III.2. MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES.

A continuación se detallan los medios de cultivo y tampones utilizados en este trabajo. A la composición de los medios descritos a continuación se les adicionó 13 g/L de agar, en el caso de que fuera necesario preparar medios sólidos. El pH de cada medio se ajustó con HCl o NaOH según su requerimiento. Cuando fue preciso, los medios de cultivo se suplementaron con los antibióticos apropiados (Sigma-Aldrich) a la concentración adecuada.

III.2.1. Medios para *M. mediterranea*.

- **MM2216.**

Medio Marino 2216 (Pronadisa). Se trata de un medio complejo para el cultivo de bacterias heterótrofas marinas.

- **MMC.**

NaCl	20 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	7 g/L
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	5,30 g/L
KCl	0,70 g/L
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,25 g/L
Peptona	5 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Citrato de hierro	0,1 g/L
K ₂ HPO ₄	0,075 g/L

El fosfato dipotásico y el citrato de hierro se adicionaron tras autoclavar el medio, a partir de una solución más concentrada para evitar precipitaciones con otras sales durante la esterilización. El pH del medio se ajustó a 7,4 con NaOH.

- **SST.**

Solución salina tamponada (Sanchez-Amat and Torrella, 1990). Reproduce las sales mayoritarias presentes en aguas marinas.

NaCl	20 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	7 g/L
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	5,30 g/L
KCl	0,70 g/L
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,25 g/L
Tris base	6,10 g/L

El pH del medio se ajusta a 7,4 con HCl.

- **MN.**

Medio mínimo nuevo (Hernandez-Romero *et al.*, 2003). Se prepara adicionándole a la SST (una vez autoclavada) los siguientes compuestos:

FeSO ₄ ·7 H ₂ O	2,50 mg/L
K ₂ HPO ₄	75 mg/L
L-glutamato monosódico	2 g/L

- **MNGL.**

Medio mínimo nuevo con D-glucosa y L-lisina. Deriva del medio mínimo nuevo. La fuente de carbono principal es glucosa, y contiene L-glutámico y L-lisina como fuentes de nitrógeno. En este medio se obtienen altos niveles de actividad lisina oxidasa. Se prepara adicionándole a la SST (una vez autoclavada) los siguientes compuestos:

FeSO ₄ ·7 H ₂ O	2,50 mg/L
K ₂ HPO ₄	75 mg/L
D-glucosa	5,40 g/L
L-glutamato monosódico	0,50 g/L
L-lisina monoclóhidrato	0,54 g/L

III.2.2. Medios para *E. coli*.

- **LB.**

Medio Luria-Bertani es un medio rico típico para el cultivo de *E. coli*.

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura.....	5 g/L
NaCl	10 g/L

- **LB 1% de glucosa.**

LB
 Glucosa1%

- **LB2216.**

Este medio fue utilizado en experimentos de conjugación. Se obtuvo mezclando, tras autoclavar por separado, volúmenes iguales de LB con 15 g/L de NaCl y medio 2216. Para inducir la transposasa, se adicionó además IPTG 0,5 mM (Sigma-Aldrich). En este tipo de medio complejo son capaces de crecer tanto *E. coli* como *M. mediterranea*.

- **MEDIO SOB.**

Triptona20 g/L
 Extracto de levadura5 g/L
 NaCl0,58 g/L

- **MEDIO SOC.**

Medio usado para la recuperación de células tras la electroporación.

SOB1 ml
 Mg²⁺ 2 M10 µl
 Glucosa 2 M 10 µl

III.2.3. Tampones utilizados.

A continuación se muestra un listado con los tampones utilizados más frecuentemente.

III.2.3.1. Tampones para electroforesis de ADN.

- **Tampón TAE (50X) (tris-acético-EDTA).**

Usado en electroforesis de ADN en agarosa.

Tris Base.....242,28 g/L
 Ácido acético glacial57 ml/L
 EDTA.....14,6 g/L
 El pH se ajusta a 7,7

Se diluye hasta una concentración 1X para utilizarse en la electroforesis.

- **Tampón de carga para electroforesis de ADN (10X).**

Glicerol	5 ml
Azul de bromofenol	25 mg
Xileno cianol	25 mg
EDTA 20 mM pH 8,0	5 ml

Para electroforesis de plásmidos obtenidos por el método del STET, el tampón de carga contiene 37,5 µl de RNAsa (10 mg/ml) por ml de tampón de carga.

III.2.3.2. Tampones para geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

- **Tampón de recorrido (10X).**

Tris	30 g/L
Glicina	144 g/L
SDS 1%	10 g/L

- **Tampón de carga para electroforesis de geles de poliacrilamida (3X).**

Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	0,6 ml
Glicerol 75%	1 ml
SDS 20%	2,25 ml
Azul de bromofenol 10%	37,5 µl
B-mercaptoetanol 14 M	1,112 ml

III.2.3.3. Tampones para Western Blot.

- **Tampón de transferencia (10X).**

Tris	58,20 g/L
Glicina	29,30 g/L
SDS	3,50 g/L
El pH se ajusta a 9,2	

Para su uso se diluyó hasta una concentración 1X y se le añadió 20% de metanol.

- **Tampón fosfato salino (PBS) (10X).**

KH ₂ PO ₄	10 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
El pH se ajusta a 7,4	

- **Tampón PBST.**

Este tampón se uso para la disolución de anticuerpos y el lavado de las membranas de la técnica Western Blot.

PBS 1X	
Tween 20	0,1%

- **Tampón de bloqueo PBSTB.**

Tampón utilizado para bloquear las membranas en la técnica Western Blot.

PBST 1X	
Leche en polvo	5%

III.2.3.4. Tampones para purificación de proteínas.

III.2.3.4.1. Tampones para purificación en resina Ni-NTA agarosa.

- **Tampón de unión y lavado.**

Usado para la purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidinas.

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH.	

- **Tampón de elución.**

Usado para la purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidinas.

NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl500 mM
Imidazol * 300 mM ó 500 mM
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH.

*Dependiendo de la proteína a purificar el tampón de elución se usó con una concentración determinada de imidazol que se indicará para cada experimento en concreto.

III.2.3.4.2. Tampones para purificación en resina de amilosa.

- **Tampón de unión y lavado.**

Tris-HCl 20 mM
NaCl 200 mM
EDTA 1 mM
El pH se ajusta a 7,4

- **Tampón de elución.**

Tris-HCl 20 mM
NaCl 200 mM
EDTA 1 mM
Maltosa..... 10 mM
El pH se ajusta a 7,4

III.2.3.5. Otros tampones utilizados.

- **Tampón para medida de actividad oxidasa.**

NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl500 mM
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH.

- **Tampón STET.**

Utilizado en las minipreparaciones de plásmidos mediante el método rápido del hervido (Holmes and Quigley, 1981).

Sacarosa.....	8%
Tritón X-100.....	0,5%
EDTA pH 8.....	50 mM
Tris-HCl pH 8.....	50 mM

III.3. CULTIVO DE CEPAS MICROBIANAS.

Las cepas de *Marinomonas* utilizadas en este estudio se sembraron a partir del stock glicerol en placas Petri con el medio de cultivo correspondiente, las cuales se dejaban incubando a 25 °C durante 2-3 días. Tras este tiempo, las placas se conservaban a 15 °C siendo utilizadas durante un período siempre inferior a siete días. Transcurrido este período de tiempo, el cultivo se mantenía viable mediante transferencias sucesivas en placas con medio MM2216 o MMC. Tras 2 ó 3 resiembras se volvía a utilizar la cepa congelada a -75 °C. Los cultivos líquidos se incubaron rutinariamente a 25 °C con agitación orbital a 130 rpm.

Por otra parte, las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se incubaron en medio LB a 37 °C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, las cepas se conservaban a 4 °C durante un período de tiempo inferior a siete días. Los cultivos líquidos de manera rutinaria se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 150 rpm, salvo que se indique expresamente otra cosa. En el caso de que fuera necesario, los cultivos líquidos se suplementaron con los antibióticos adecuados cuando las cepas contenían vectores de clonación o transposones.

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación de una colonia en un matraz de 100 ml con 10 ml de medio, mientras que para los cultivos a mayor escala se utilizaron normalmente matraces de 1 litro con 100 ml de medio. Con el fin de trabajar con cultivos homogéneos (en los cuales todas las células estuvieran en la misma fase de crecimiento) y mantener la reproducibilidad, un medio de cultivo fresco se reinoculaba a partir de un precultivo anterior en medio líquido y en fase estacionaria (16-24 horas), con el fin de obtener una densidad óptica (DO₆₀₀) inicial de 0.05.

En el caso de *Marinomonas*, las células de los precultivos se recogían mediante centrifugación, se lavaban dos veces con SST (previamente a la inoculación) y se reinoculaban a una DO₆₀₀ inicial de 0,05. Estos lavados se realizaron con el fin de evitar

que cualquier producto secretado al medio en el precultivo fuera inoculado en el cultivo a gran escala y pudiera producir un efecto negativo.

III.4. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES CELULARES EN *M. mediterranea*.

La obtención de las fracciones extracelular e intracelular para su posterior análisis, fueron realizados como se describe a continuación.

III.4.1. Fracción extracelular.

Para la obtención de la fracción extracelular, *M. mediterranea* se cultivó en medio líquido MNGL a 25 °C y 130 rpm. Dependiendo del experimento se recogieron muestras de estos cultivos a diferentes tiempos de incubación (8, 10, 12, 24, 48 y 72 horas). Las muestras se centrifugaron a 30000 *xg* durante 5 minutos en una centrifuga *Hettich Universal 32R*. El sobrenadante obtenido se consideró la fracción extracelular, que contiene las proteínas secretadas por la bacteria.

III.4.2. Fracción intracelular.

En el caso de la fracción intracelular, el sedimento obtenido tras la centrifugación de los cultivos para obtener la fracción extracelular descrito en el apartado anterior, se resuspendió en tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4 y se sonicó con un sonicador *Braun Labsonic U* con una potencia relativa de 0,5 durante 4 minutos en ciclos de conexión/desconexión de 0,7/0,3 segundos. Además, los tubos se mantuvieron durante todo el proceso de sonicación sumergidos en hielo con el fin de evitar el calentamiento de las proteínas y su desnaturalización.

Por último, las muestras se centrifugaron a 30000 *xg* durante 5 minutos a 4 °C con el fin de eliminar los restos celulares y obtener el extracto celular. En este extracto se encuentran tanto las proteínas citoplasmáticas como las periplásmicas. Para medir las actividades aminoácido oxidasa en estas muestras intracelulares se precipitaron como se describe en el apartado siguiente.

III.5. PRECIPITACIÓN ETANÓLICA DE *LodA*.

Puesto que las medidas de actividad enzimática están basadas en la detección del peróxido de hidrógeno generado en la reacción, se tuvieron que eliminar las catalasas endógenas presentes en las muestras intracelulares por precipitación etanólica, tanto en *M. mediterranea* (Gomez, 2010) como en *E. coli*. Tanto los extractos intracelulares de *M. mediterranea* como la fracción soluble obtenida de *E. coli*, fueron precipitados por adición de dos volúmenes de etanol absoluto a la muestra. La precipitación fue

llevada a cabo a -20 °C durante 16 horas. Después, las muestras fueron centrifugadas a 13000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se eliminaron, y el pellet fue secado durante una hora para eliminar el etanol residual. Una vez seco el pellet fue resuspendido en tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4 y centrifugado a 13000 xg durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido se utilizó en las medidas de actividad aminoácido oxidasa.

III.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

La determinación de proteínas en las muestras se llevó a cabo mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976); basado en la interacción de un colorante hidrofóbico (Azul de Coomassie G-250) con las proteínas. Este test no presenta interferencias por otros compuestos presentes en los medios de cultivo como la glucosa o la L-lisina, por lo que fue preferido a otros métodos frecuentemente utilizados como el Biuret, Lowry o Bicinconínico. El modo de utilización consistió en la adición del reactivo Bradford (Sigma-Aldrich) a una disolución de la proteína problema así como a una serie de disoluciones de concentraciones crecientes y conocidas de BSA (Sigma-Aldrich) que se utilizaron como recta patrón. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, tras los cuales se procedió a la lectura de la absorción del color azul desarrollado a 595 nm. Se usó un espectrofotómetro *Thermo Multiskan Spectrum*.

III.7. MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS.

III.7.1. Medida de actividad aminoácido oxidasa.

Para estimar la actividades oxidasas mediante la detección de peróxido de hidrógeno generado, se utilizó el ensayo fluorimétrico del *Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase assay* (Invitrogen). Este método está basado en la determinación del peróxido de hidrógeno generado por la oxidasa. La peroxidasa utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar con una estequiometría 1:1 el compuesto reducido *Amplex red* (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) generando la resorfurina, la cual tiene una excitación y una emisión máxima de fluorescencia de aproximadamente 571 y 585 nm respectivamente. La sensibilidad de este ensayo permite detectar hasta 10 picomoles de peróxido de hidrógeno en 100 µl (100 nM). Este método se ha descrito para la determinación de la actividad lisina oxidasa empleando L-lisina como sustrato (Palamakumbura and Trackman, 2002) y para la determinación de la actividad glicina oxidasa en *M. mediterranea* utilizando glicina como sustrato (Campillo-Brocal *et al.*, 2013).

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de ELISA para fluorescencia de 96 pocillos (Nunc) en volúmenes finales de 100 μl . La mezcla de reacción contenía rutinariamente 2 mM de L-lisina o de glicina en tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4, 0,05 mM Amplex red, 0,1 U/ml de peroxidasa y 10 μl de muestra. Las reacciones se midieron a 25 °C durante 15 min en un fluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech). La oxidación del *Amplex red* se siguió utilizando un filtro de excitación de 550 nm y de emisión a 590 nm. La fluorescencia residual debida a la baja oxidación espontánea en ausencia del sustrato, se restó para cada ensayo realizando los controles apropiados. Las actividades específicas se normalizaron en función de los miligramos de proteína presentes en cada ensayo, expresándose como Unidades Relativas de Fluorescencia ($\text{URF} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$):

$$\text{URF} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} = \frac{\text{Pendiente/min}}{\text{V muestra (ml)} \times \text{Factor dilución} \times \text{Proteínas (mg/ml)}}$$

III.7.2. Medidas de fluorescencia: flavinas y proteínas.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas se usa comúnmente para detectar y seguir cambios conformacionales y más concretamente cambios en el ambiente de los fluoróforos. Las flavinas junto a los aminoácidos aromáticos son los responsables principales de la fluorescencia en proteínas. Hay tres aminoácidos aromáticos que son capaces de generar fluorescencia: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) aunque la fluorescencia de proteínas se suele estudiar siguiendo la fluorescencia del triptófano a 280 nm. Por su parte, las flavinas poseen en su estado oxidado un máximo de emisión a 525 nm. La longitud de onda de la absorbancia máxima de la flavina está en 440 nm, aunque puede variar cuando la proteína está unida a flavinas dependiendo de la naturaleza de la unión de la flavina con la proteína (Chapman and Reid, 1999).

Para las medidas de fluorescencia se utilizó una concentración de proteína de 0,3 μM en tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4. Las muestras estudiadas se midieron a 25 °C y tras calentar a 50 °C durante 5 minutos. Como controles se utilizaron FAD y BSA (ambos de Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,3 μM .

La fluorescencia de las muestras se midió en un fluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) usando diferentes longitudes de onda para medir proteínas o flavinas (**tabla 4**).

FLUORESCENCIA	TIPO DE FILTRO	LONGITUD DE ONDA (nm)
FLAVINAS	EXCITACIÓN	440
	EMISIÓN	526
PROTEÍNAS	EXCITACIÓN	280
	EMISIÓN	340

Tabla III. 4. Longitudes de onda utilizadas para las medidas de fluorescencia de proteínas y flavinas.

III.8. ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELES DE ACRILAMIDA.

III.8.1. SDS-PAGE.

Las electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), se realizaron utilizando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) donde las proteínas corren a través de dos geles de diferente densidad: el gel hacinador o concentrador, que es lo suficientemente laxo como para permitir la formación de un frente homogéneo y el gel inferior o separador, que al ser más denso permite que cada proteína tenga una velocidad diferente en función de su masa molecular. Para el desarrollo de estas electroforesis se utilizó una cubeta Mini Protean II y una fuente de alimentación PowerPac Basic de BioRad.

Los geles se prepararon a partir de una disolución al 30% de la mezcla acrilamida/bisacrilamida (29,2% de acrilamida y 0,8% de N,N'-bis-metilen-acrilamida). El gel hacinador, se preparó rutinariamente al 3% con una longitud aproximada de 2 cm y una concentración final de 0,1% de SDS y 0,375 M de Tris-HCl pH 6,8. Por su parte, el gel separador se preparó al 8% con una composición final de 0,1% de SDS y 0,125 M de Tris-HCl pH 8,8. Tanto el gel hacinador como el separador se polimerizaron por adición de un 0,025% de TEMED y 2 μ l de una disolución de persulfato amónico al 0,5%. La composición del tampón de recorrido de electroforesis se muestra en el **apartado III.2.3.2**.

Las muestras aplicadas se diluían previamente en proporción 2:1 (v/v) con tampón de carga (**apartado III.2.3.2**), hasta un volumen final máximo de 30 μ l por calle del gel (20 μ l de muestra y 10 μ l de tampón de carga). En las electroforesis desnaturizantes (inactivantes), la muestra diluida con tampón de carga se incubaba a 95 °C durante 5 min antes de cargarla en el gel, lo cual implicaba la desnaturización de las proteínas, según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las electroforesis no desnaturizantes (no inactivantes), sin tratamiento térmico, se utilizaron cuando se

requería mantener la forma activa de LodA para su localización y detección. En este caso se continuó utilizando el mismo tampón de carga, ya que ninguno de sus componentes altera la actividad lisina oxidasa sino que permite una mejor definición de las bandas proteicas (Lucas-Elio, 2003).

El voltaje aplicado fue entre 60-70 V. Una vez finalizada las electroforesis, se procedió a desmontar la cubeta para recuperar el gel y someterlo a procedimientos de tinción o de transferencia a membrana, según el caso.

III.8.2. Tinción de proteínas con azul de Coomassie.

La tinción inespecífica de proteínas con azul de Coomassie, se realizó incubando el gel, una vez finalizada la electroforesis, con una disolución filtrada de azul Coomassie Brilliant R-250 al 0,05% en una mezcla hidroalcohólica con 25% isopropanol y 10% de ácido acético glacial. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante un período variable de 2 horas a toda la noche según la cantidad de proteína aplicadas a las calles. Tras este período de tinción se realizaron varios lavados con una disolución de desteñido de metanol/acético/agua en proporciones volumétricas 45:10:45. Los geles así desteñidos fueron después fijados con una disolución de ácido acético al 10% durante al menos 15 minutos y guardados en agua destilada a 4 °C.

III.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.

La técnica de Western Blot (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981) combina la resolución de las técnicas electroforéticas con la especificidad de los anticuerpos. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a un soporte sólido cuando se aplica un campo eléctrico perpendicular a ambos, para posteriormente ser detectadas utilizando anticuerpos que reconocen los epítomos que llevan fusionadas las proteínas a estudiar. Las proteínas detectadas llevaban fusionado un epítomo de poli-His.

III.9.1. Transferencia de proteínas a membranas.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de difluoruro polivinilideno (PVDF) (Immobilion-P, Millipore) mediante un sistema de transferencia semiseco y utilizando el equipo *Semy-dry transfer cell* (BioRad). Esta membrana se manipuló siempre usando guantes para evitar la contaminación con las queratinas de la piel y se cortó con el mismo tamaño del gel. Debido a la hidrofobicidad de la membrana, previamente a la transferencia, se sumergió en etanol al 95% durante un minuto, se lavó con agua durante 2-3 minutos y se mantuvo en tampón de transferencia (**apartado III.2.3.3**) durante aproximadamente 10 minutos. Por otra parte, una vez acabada la electroforesis, el gel se mantuvo también unos 10 minutos

en tampón de transferencia. La torre de transferencia se construyó, siguiendo el sentido de la transferencia, con 2 filtros absorbentes (*Extra thick blot paper*, BioRad), la membrana de PVDF, el gel y otros dos filtros más. Dicha torre se empapó con tampón de transferencia evitando la formación de burbujas entre las distintas capas. La transferencia se llevó a cabo durante 60 minutos a 22 V. Con el fin de seguir dicha transferencia visualmente, se utilizó el marcador coloreado *PageRuler™ Prestained* (Thermo Scientific).

III.9.2. Revelado de la membrana.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó sumergiéndola en tampón PBST (**apartado III.2.3.3**) con 5% de leche desnatada como agente bloqueante (PBSTB; **apartado III.2.3.3**) en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos en tampón PBST. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario His-Probe H15 (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1:400 en PBST durante dos horas. La incubación con el anticuerpo primario también se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C.

Tras eliminar el exceso de anticuerpo, aplicando tres nuevos lavados con PBST, la membrana se incubó durante una hora en una dilución 1:4000 del anticuerpo secundario IgG-HRP anti conejo de cabra SC-2004 (Santa Cruz Biotechnology) que está conjugado con una peroxidasa de rábano. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante tres lavados con PBST. Los lavados y la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron a temperatura ambiente y con agitación constante y suave.

Para el revelado se utilizó el sistema ECL Prime Western Blotting detection reagent (Amersham Bioscience) que aumenta la sensibilidad hasta niveles de picogramos. Tras añadir el reactivo que contiene el luminol que es el sustrato quimioluminiscente para la peroxidasa conjugada al anticuerpo, la membrana se expuso a una película *Hyperfilm™ ECL* (Amersham Bioscience) durante un período de tiempo variable entre 30 segundos a un 1 minuto como máximo.

III.10. MANIPULACIÓN DE ADN.

III.10.1. Aislamiento de ADN.

- **Genómico.**

El aislamiento de ADN genómico de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante el kit de purificación de ADN genómico de Wizard[®] de Promega, obteniéndose 100 µl de una concentración de ADN purificado de aproximadamente 100 ng/µl. El protocolo de este kit está basado en un proceso de eliminación de proteínas, restos celulares y ARN del extracto celular y una posterior preparación y rehidratación del ADN bacteriano.

- **Plasmídico.**

Cuando era necesario obtener ADN de plásmido en grandes cantidades para clonación, se realizó la purificación utilizando el método de la lisis alcalina descrito por Sambrock y Rusell (Sambrock and Rusell, 2001) con pequeñas modificaciones. Para confirmar construcciones, la extracción de ADN de plásmido a pequeña escala se realizó empleando el kit de purificación de plásmidos de la casa comercial PROMEGA.

III.10.2. Tratamiento enzimático del ADN.

Los tratamientos enzimáticos más usuales realizados al ADN fueron:

- **Digestión.**

La digestión de muestras de ADN con enzimas de restricción se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador de estas enzimas (Thermo Scientific) y las indicaciones generales descritas por Sambrock y Rusell (Sambrock and Rusell, 2001). Es importante que la cantidad de enzima no supere el 10% del volumen total de la reacción, ya que van conservadas en glicerol y una concentración alta en el medio elimina la especificidad de reconocimiento del enzima.

- **Ligación.**

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo usando la ligasa del fago T4 (New England Biolabs, NEB) incubando las muestras a 25 °C durante una hora. La cantidad de inserto y vector en la mezcla de ligación varió según el experimento y el tamaño relativo entre ellos, aunque generalmente se empleó una relación vector:inserto de 1:3.

III.10.3. Amplificación de ADN por PCR.

Las reacciones de amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se realizó con las enzimas KOD Hot Start Master Mix (Novagen) y Pfu polimerasa (Promega). Las reacciones se realizaron en un termociclador Tc-312 Techne® sometiendo las muestras a un programa que varió según el tamaño del ADN a amplificar y la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos.

Generalmente, las reacciones de amplificación para la creación de construcciones mediante PCR se realizaron con la enzima KOD Hot Start Master Mix (Novagen), ya que asegura la máxima fidelidad del producto amplificado. Esta Master Mix lleva incluida además de la polimerasa los desoxinucleótidos con lo que a la mezcla de reacción solamente hay que adicionarle $0,3 \mu\text{M}$ de cada cebador. El primer paso fue siempre una desnaturalización a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos y luego se realizó un número variable de ciclos (30-35) cada uno con un paso de desnaturalización (20 segundos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$), hibridación (10 segundos a la temperatura de fusión de los cebadores) y polimerización (a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo variable entre 10-25 segundos por cada Kb según el tamaño de ADN a amplificar). Tras el último ciclo, se aplicó un paso final de extensión a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 minuto.

Por otra parte, las reacciones de amplificación de fragmentos de ADN para la creación de construcciones mediante mutagénesis dirigida por PCR se realizó con la enzima Pfu. A la mezcla de reacción se le añadieron $0,25 \mu\text{M}$ de cada cebador y $0,2 \text{ mM}$ de cada desoxinucleótido. El inicio de la reacción consistió siempre en un paso de desnaturalización a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 minuto. Posteriormente, se realizaron 35 ciclos en los que había un paso de desnaturalización (30 segundos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$), hibridación ($57 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 segundos) y polimerización (a $74 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un tiempo variable según el tamaño de ADN a amplificar). Tras el último ciclo, se aplicó un paso final de extensión a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las distintas amplificaciones realizadas a lo largo de esta memoria se muestran en la **tabla III.5**.

Cebadores	Secuencia
MARDIRndel	5'-CAACAAAGGAGTAA <u>CATATG</u> GCGCTT-3'
MARDIRsacl	5'-CTCTGGT <u>GAGCTC</u> CTACAG-3'
MARDIRSmal	5'-AA <u>CCCGGG</u> GATGGGCAGCAGCATCATCATCATCACAGCAGC-3'
MARDIRPETREV	5'-TCGGGCTTTGTTAGCAGCC-3'
MARDIRKpn	5'-TAGCATC <u>GGTACC</u> CGTTTCTGC-3'
MARDIR6	5'- CAACAAAGGAGTAA <u>CATATG</u> GCGCTT -3'
DESDIRndel	5'-GAGGTTAG <u>CATATG</u> GAATCTTAC-3'
MAREXrXho	5'-GAATTCGC <u>CTCGAG</u> CCAATAACAAC-3'
MAREVeco2	5'-GTGCTTGGGA <u>GAATTC</u> GCCTC-3'
MAREVeco3	5'- GGATCTTA <u>GAATTC</u> GATTAGGGC-3'
MAREVHisBamHI	5'-GACCAGTCTGCCTGTCTTCTA <u>GGATCC</u> GCCC-3'
MAREVnrbs (StuI)	5'- <u>AGGCCT</u> CTCCTTTGTTGATAACTA-3'
MAREVCT2Bam	5'-GCAACATTCGCTAGCGTTCA <u>GGATCC</u> CGGCCC-3'
GOXBndel	5'-GACCTGCC <u>CATATG</u> ATTAGCTCGACCC-3'
GOREVsmal	5'-GTTTTGACCTACAC <u>CCCGGG</u> TTAATTGATG-3'
GODIRnde1	5'-GATAGGACGAT <u>CATATG</u> CAAATGACGG-3'
GOXAREVXho1	5'-GTATAGG <u>CTCGAG</u> CTAATCAATTAG-3'
GODIRsacl	5'-AATGGATAG <u>GAGCTC</u> GGACGATACGATG-3'
GOXAREVpSt	5'-CCGACAATC <u>CTGCAG</u> CGTATAGGG-3'
GODIRnde2	5'-GACCTGCC <u>CATATG</u> ATTAGCTCGACCC-3'
GoxBRevXho	5'-CAAATAGGCAATGT <u>CTCGAG</u> ATTCGGTCC-3'
C516ADIR	5'-GACTTCTTTAACGCCACGATTCAGAC-3'
C516AREV	5'-GTCTGAATCGTGGCGTTAAAGAAGTC-3'
W581ADIR2	5'-CAGCTACTGGGCGCCACCGCAAAGC-3'
W581AREV2	5'-GCTTTGCGGTGGCGCCAGTAGCTG-3'
E101ADIR	5'-GGTATGAGTTTCGAGCACTAAATGGCAACCTTC-3'
E101AREV	5'-GAAGGTTGCCATTTAGTGCTCGAACTCATACC-3'
R100ADIR	5'-GCTTGGTATGAGTTTGCAACTAAATGGCAAC-3'
R100AREV	5'-GTTGCCATTTAGTTCTGCAACTCATACCAAGC-3'
Y211ADIR	5'-CAGATCTCAGCGGTGCTGGTGGTGGAGATGA-3'
Y211AREV	5'-TCATCTCCACCACCAGCACCGCTGAGATCTG-3'
C488ADIR	5'-GTTGGATTGCCTATGGCTCCAGGAATAGAAATG-3'
C488AREV	5'-CATTTCTATTCTGGAGCCATAGGCAATCCACC-3'
D512ADIR	5'-GTCCTTGGCAGGCTGCCTTCTTAACTGCACG-3'
D512AREV	5'-CGTGCAGTTAAAGAAGGCAGCCTGCCAAGGAC-3'

Tabla III. 5. Cebadores utilizados en esta memoria. Subrayado y resaltado en rojo se muestran los sitios de restricción.

III.10.4. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos.

De forma general, la separación electroforética de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa D1-LOW EEO (Pronadisa) al 1% en tampón TAE, adicionando a la muestra tampón de carga (**apartado III.2.3.1**). Tras teñir con el colorante de ácidos nucleicos GelRed™ entre 15-30 minutos se observaron las bandas con radiación UV utilizando el transiluminador microDOC. El tamaño de los fragmentos obtenidos se comparó con patrones de ADN de doble hebra de peso molecular conocido obtenidos al utilizar el marcador GeneRuler™ 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific).

Cuando se pretendía extraer algún fragmento de ADN separado durante la electroforesis, se utilizó agarosa de bajo punto de fusión LM-Sieve (Pronadisa) al 1% en tampón TAE al que se le adicionó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Posteriormente, las bandas separadas se visualizaron con radiación UV (Sambrook and Rusell, 2001) y se cortaron las de interés. Para extraer el ADN de la agarosa se utilizó el kit comercial QIAquick de extracción de ADN de la casa QIAGEN.

III.10.5. Secuenciación del ADN.

Los fragmentos de ADN a secuenciar fueron obtenidos por PCR y clonados en los plásmidos correspondientes. Posteriormente dichos plásmidos se purificaron con el kit Wizard® Plus SV Minipreps ADN purification System de Promega y se enviaron a secuenciar. La secuenciación fue realizada por la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

III.10.6. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico.

La introducción de vectores plasmídicos en células de *E. coli* se realizó mediante transformación de células competentes utilizando la técnica de la electroporación (Dower *et al.*, 1988).

III.10.6.1. Preparación de células electrocompetentes.

Para la preparación de células electrocompetentes se partió de un cultivo de 16 horas de *E. coli* en LB. A partir de este cultivo, se reinoculó en el mismo medio dejándolo crecer hasta mitad de fase exponencial (DO_{600} 0,4-0,6). A continuación se realizaron 5 lavados sucesivos con glicerol 10% resuspendiendo las células en glicerol en las siguientes proporciones volumen inicial cultivo/glicerol (v:v): 1:1, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:500. Finalmente, las células resuspendidas del último lavado se distribuyeron en tubos (40 µl) e inmediatamente se guardaron a -75 °C.

III.10.6.2. Transformación de *E. coli*.

Las células competentes fueron transformadas con ADN procedente de una ligación o de una minipreparación plasmídica. Las cepas de *E. coli* utilizadas están descritas en la **tabla III.2**.

En la transformación de *E. coli* se usaron células competentes preparadas como se explica en el apartado anterior. A estas células se les añadió 1 µl de ADN, tanto si la muestra a transformar era una mezcla de ligación como si era un plásmido diluido. Para la electroporación se utilizó el equipo *Eppendorf/Electroporator 2510* aplicando 1700 V, 25 µF y 400 Ω. Tras el choque eléctrico, las células se recuperaron durante 1 hora en 1 ml de medio SOC (**apartado III.2.2**). Tras este tiempo se sembraron en placas de LB con el antibiótico correspondiente para su selección.

III.10.7. Herramientas bioinformáticas utilizadas.

Para la comprobación de las secuencias de ADN secuenciadas por el SAI se usó la página del Institut National de la Recherche Agronomic que posee el servicio MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988), que es muy útil para el alineamiento y la comparación de secuencias. Cuando fue necesario obtener la secuencia reversa y complementaria de una secuencia de ADN se usó la página http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html (Stothard, 2000). Para la búsqueda en secuencias de ADN de lugares de restricción fue usada la herramienta NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze *et al.*, 2003).

El portal de herramientas bioinformáticas ExPASy (<http://www.expasy.org/>) fue utilizado para diversos fines. Se usó principalmente para realizar la transformación de las secuencias de DNA a proteína en formato FASTA (<http://web.expasy.org/translate/>). Para la predicción de diferentes características de una proteína a partir de su secuencia proteica se utilizaron las herramientas ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) y Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/) proporcionadas en ese portal. Además, se hizo uso de la herramienta Peptide Mass que predice a partir de una secuencia proteica dada el tamaño del fragmento digerido por diferentes proteasas ([http://web.expasy.org/peptide mass/](http://web.expasy.org/peptide_mass/)).

La herramienta JPred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) se empleó para predecir la estructura secundaria de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Para la predicción de la localización celular de una proteína se usaron las herramientas (<http://www.psort.org/psortb/index.html>) (Yu *et al.*, 2010) y GnegmPLOC (<http://www.csbio.situ.edu.cn/cgi-bin/GnegmPLOC.cgi>) (Hong-Bin and Kuo-

Chen, 2010). El servidor SignalP 4.1 se usó para predecir la posible presencia de un péptido señal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011).

La página del National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se usó de forma rutinaria para la búsqueda de secuencias de proteínas o de genes, así como de bibliografía acerca de las mismas.

III.10.8. Análisis bioinformático de secuencias.

La detección de genes similares a *lodB* se realizó usando las herramientas disponibles en la página Integrated Microbial Genomes Expert Review (IMG/MER) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/er/main.cgi>) (Markowitz *et al.*, 2014). Se realizó una búsqueda BLASTP frente a la secuencia de *LodB*, con un límite de corte para el valor E $1 \cdot 10^{-10}$ de los genomas que contenían genes similares a *LodA*. Los alineamientos de secuencias de proteínas tanto de *LodA* como de *LodB* se realizaron usando el programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2014) disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Una vez alineadas las secuencias fueron incorporadas al programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Para realizar los análisis filogenéticos de las proteínas similares a *LodA* del grupo AI se utilizaron los métodos del “Vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) y “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood, ML). En el método NJ, las distancias entre secuencias fueron calculadas como la proporción de diferencia (p-distancia), y la exactitud de cada nodo en el árbol construido fue estimada usando análisis estadístico de Bootstrap con 500 réplicas. En el análisis con el método ML para seleccionar el modelo de sustitución más adecuado en la construcción del árbol, se usó la herramienta “Find Best DNA/Protein Mode” que posee el programa MEGA (Hall, 2013).

III.11. EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS EN *E. coli*.

III.11.1. Crecimiento e inducción de la expresión.

Para inducir la expresión de proteínas en *E. coli*, colonias recién transformadas con los vectores que contienen los genes *lodAB*, *lodA*, *lodB*, *goxA* o *goxB* descritos en la **tabla III.3**, se inocularon en medio LB líquido (suplementado con los correspondientes antibióticos) y se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Alcanzada dicha densidad óptica, 3 ml de los cultivos anteriores se inocularon en 100 ml del mismo medio y se incubaron en las condiciones previamente descritas hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Una vez alcanzada dicha densidad óptica, se llevó a cabo la inducción mediante la adición del inductor IPTG. Dependiendo del experimento los cultivos fueron incubados a diferentes temperaturas, o se ensayaron diferentes concentraciones de IPTG por lo que las condiciones se especificarán para cada caso concreto.

III.11.2. Aislamiento de fracciones celulares en sistema recombinante.

Para estudiar la expresión de las proteínas expresadas recombinantemente, y su localización en las cepas de *E. coli* ensayadas, se analizaron las siguientes fracciones celulares:

- **Fracción soluble.**

La fracción soluble comprende las proteínas que se encuentran solubles tanto en la fracción citoplasmática como en el periplasma bacteriano. Para analizar la expresión de proteínas en esta fracción se recogieron alícuotas de los cultivos inducidos y se centrifugaron a 30000 *xg* durante 2 minutos. El sedimento se resuspendió en tampón fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4 y se le adicionó el cocktail de inhibidores de proteasas para extractos celulares bacterianos de Sigma-Aldrich. Tras sonicar durante 4 minutos las muestras se volvieron a centrifugar a 30000 *xg* durante 2 minutos. El sobrenadante obtenido se precipitó con etanol para medir actividad aminoácido oxidasa tal como se describió en el **apartado III.5** para *M. mediterranea*.

- **Fracción de cuerpos de inclusión.**

Para solubilizar las proteínas que se encuentran formando parte de los cuerpos de inclusión, el sedimento obtenido en la última centrifugación para la obtención de la fracción soluble se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 8 con 8 M de urea. Tras centrifugar a 30000 *xg* para eliminar restos no solubilizados, el sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes.

III.12. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Para la purificación de proteínas expresadas de manera recombinante, se usaron diferentes tipos de matriz según la etiqueta que llevara fusionada la proteína a purificar. Si no se especifica lo contrario, para llevar a cabo la purificación se partieron de cultivos de *E. coli* inducidos durante 16 horas. Los sedimentos de células se resuspendieron en tampón de unión a resina correspondiente en cada caso y se purificó la fracción soluble obtenida tras su procesamiento (**apartado III.11.2**). La purificación se realizó en columnas de cromatografía de afinidad dejando pasar la muestra por gravedad (**fig. III.1**).

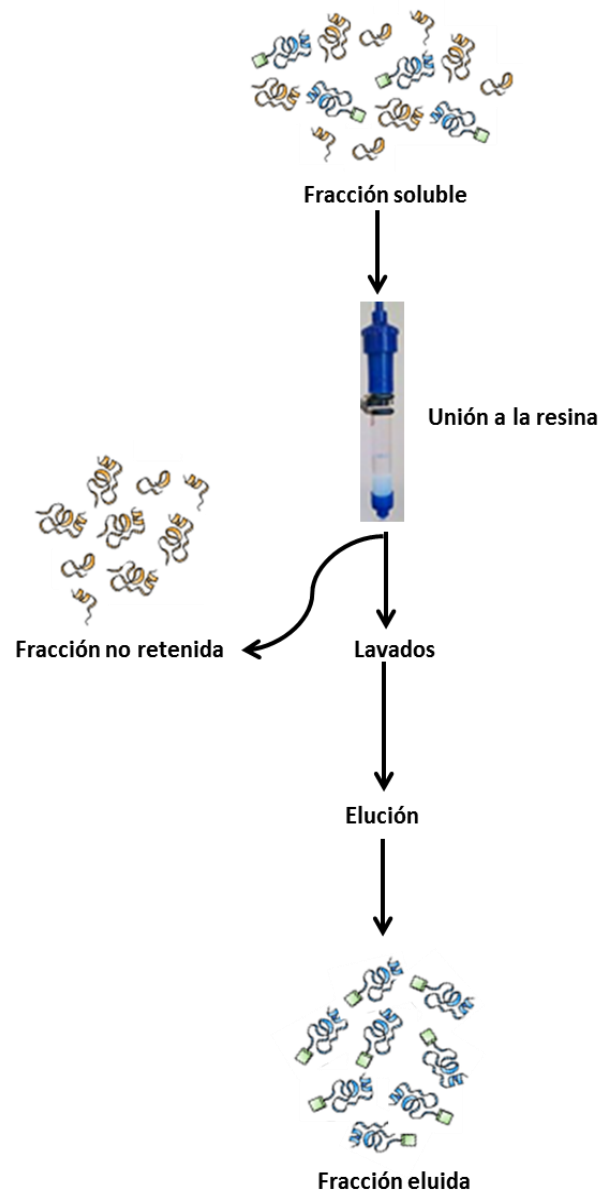


Figura III. 1. Esquema del proceso de purificación de proteínas fusionadas a una etiqueta por gravedad mediante columna de cromatografía.

III.12.1. Matriz de afinidad de níquel.

Las proteínas con fusión a una etiqueta de poli-His, se purificaron mediante el uso de una matriz de alta afinidad con Ni²⁺ (Ni-NTA agarosa de la casa comercial QIAGEN). Se adicionó a una columna de cromatografía el mismo volumen de resina que de muestra a purificar. La resina se equilibró usando 5 volúmenes de tampón de lavado (**apartado III.2.3.4.1**). Tras el equilibrado de la columna se pasó la muestra entre 3 y 5 veces para mejorar la unión de la proteína a la resina. A continuación, se añadieron 10 volúmenes de tampón de lavado para eliminar las proteínas que no se hubiesen unido. La elución de las proteínas adsorbidas a la matriz se realizó mediante la adición de 3 volúmenes de tampón de elución (**apartado III.2.4.4.1**) con 300 mM ó 500 mM de imidazol según el experimento.

La resina se pudo reutilizar hasta cinco veces obteniendo un buen rendimiento, cuando se regeneró la columna tras su uso. Esta regeneración se hizo adicionando 5 volúmenes de NaOH 0,5 M que se dejó en la columna durante 30 minutos. Tras este período de tiempo, se añadieron 10 volúmenes de tampón de lavado, seguidos de 5 volúmenes de agua destilada. Por último, la resina se guardó en etanol al 20% a 4 °C.

III.12.2. Matriz de amilosa.

Las proteínas a las que se les había fusionado en N-terminal una etiqueta MBP (Proteína de unión a maltosa) se purificaron usando una matriz de amilosa (New England Biolabs). En primer lugar, se adicionó a una columna de cromatografía el mismo volumen de resina que de muestra a purificar. La resina se equilibró usando 10 volúmenes de tampón de lavado (**apartado III.2.3.4.2**). Tras el equilibrado de la columna se pasó la muestra entre 3 y 5 veces para mejorar la unión de la proteína a la resina. A continuación, se añadieron 10 volúmenes de tampón de lavado para eliminar las proteínas que no se hubiesen unido. La elución de las proteínas adsorbidas a la matriz se realizó mediante la adición de 3 volúmenes de tampón de elución (**apartado III.2.3.4.2**) con 10 mM de maltosa. Los tampones usados se encontraban previamente enfriados a 4 °C.

La resina se pudo reutilizar hasta cinco veces obteniendo un buen rendimiento cuando se regeneró tras su uso. Esta regeneración se realizó adicionando secuencialmente 3 volúmenes de agua destilada, 3 volúmenes de 0,1% SDS, 1 volumen de agua destilada y 5 volúmenes de tampón de unión. Por último, la resina se guardó en etanol al 20% a 4 °C.

III.13. DIÁLISIS.

La diálisis es un procedimiento que se utiliza para eliminar sales y cambiar la composición de los tampones de las disoluciones. Las membranas utilizadas fueron de la casa Spectra/Por® Biotech CE (ester de celulosa) de medida de exclusión de 30 kDa. Antes de comenzar la diálisis de la muestra, las membranas se incubaron en agua destilada durante 30 minutos para eliminar la azida sódica en la que están conservadas.

Las proteínas que se dializaron se encontraban disueltas en el tampón de elución utilizado para purificarlas. Con ayuda de una pipeta Pasteur se introdujo la muestra en la membrana preparada previamente con cuidado de no tocarla con las manos. La membrana se cerró mediante pinzas especiales de Spectrum Medical Industries dejando una pequeña cámara de aire entre la pinza y la muestra. Finalmente, se introdujeron en un recipiente con tampón de diálisis que se puso en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente haciendo un cambio de tampón a los 30 minutos. El tampón de diálisis utilizado fue generalmente fosfato 50 mM NaCl 500 mM pH 7,4.

III.14. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).

Los ensayos de espectrometría de masas (MS) para el estudio de las diferentes formas moleculares de LodA y GoxA se realizaron en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

III.14.1. Determinación de peso molecular por HPLC-ESI-TOF.

Para determinar la masa molecular de la proteína completa de las diferentes formas moleculares de LodA, se usó el sistema HPLC-ESI-MS-TOF. Consiste en un cromatógrafo líquido HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies) equipado con un automuestreador y una bomba capilar acoplado a un espectrómetro de masas TOF Agilent 6100 (Agilent Technologies) que usa una interfase de ionización de tipo electrospray (ESI).

Las muestras fueron inyectadas en una columna de HPLC Agilent Zorbax Poroshell SB-C8 (5µm, 150 x 0,5 mm, Agilent Technologies) que se recomienda en el análisis de moléculas biológicas de elevado peso molecular. La columna se encontraba termostaticada a 60 °C para optimizar la resolución, según las recomendaciones del fabricante. La inyección de las muestras se realizó con un flujo de 0,2 ml/min. Tras la inyección de la muestra, la columna fue lavada con tampón A (compuesto por agua/acetonitrilo/ácido fórmico, en proporción 95:4.9:0.1) durante 10 minutos y luego las proteínas fueron eluidas usando un gradiente lineal 0-90% durante 30 minutos de

tampón B (compuesto por agua/acetonitrilo/ ácido fórmico, en proporción 10:89.9:0.1). Después se mantuvo en tampón B al 90% durante 10 minutos. La columna fue lavada con tampón A durante 10 minutos antes de cada inyección. La separación de proteínas fue monitorizada a 210 y 280 nm usando un detector de longitud de onda múltiple. La columna se acopló on line al espectrómetro de masas TOF Agilent usando una interfase de ionización de tipo electrospray (ESI).

El espectrómetro de masas funcionó en el rango de medida de 100-2200 m/z. La presión del gas nebulizador fue establecida a 20 psi, mientras que el gas secante se aplicó a un flujo de 8 L/min y a una temperatura de 350 °C. Los parámetros de MS-TOF fueron establecidos con los siguientes valores: voltaje del capilar 3500 V, voltaje de fragmentación 215 V, voltaje skimmer 60 V, voltaje octopolo DC1 34,4 V, voltaje octopolo DC2 34,2 V, voltaje octopolo RF 250 V.

La calibración externa del espectrómetro de masas fue realizada con el kit de calibración ProteoMass™ peptide MALDI-MS (Sigma-Aldrich) usando el pico monoisotópico de dos péptidos estándar (bradiquinina, 757,3997 m/z, y ACTH, 2465,1989 m/z). Como controles se usaron dos proteínas puras comerciales (citocromo C y anhidrasa carbónica, ambas de Sigma-Aldrich). Los datos fueron recogidos y procesados con el software de Análisis cualitativo Workstation Agilent MassHunter (B.03.01) con el que se obtuvo el peso molecular de cada proteína intacta utilizando el algoritmo de deconvolución de este software.

III.14.2. Digestión de proteínas para análisis por MS.

Las proteínas fueron digeridas con diferentes proteasas. En cada caso, las muestras fueron reducidas en el tampón de digestión por adición de 20 mM DTT a 56 °C durante 20 minutos. Luego, las muestras fueron modificadas por el agente alquilante iodoacetamida 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Para la digestión con tripsina se adicionó 50-100 µl de tampón bicarbonato amónico 50 mM pH 8 y ProteaseMax (Promega) al 0,01%. ProteaseMax es un surfactante favorece la digestión con tripsina. La digestión se realizó adicionando entre 0,5-1 microgramos de Trypsin Gold Proteomics Grade (Promega) (aprox. 1:100 p/p) durante 1 hora a 50 °C. La reacción se paró con ácido fórmico al 0,1%. Para las muestras digeridas con quimiotripsina se utilizaron 50-100 µl de tampón Tris-HCl 100 mM CaCl₂ 10 mM pH 8 y ProteaseMax (Promega) al 0,01%. La digestión se realizó adicionando 0,5-1 microgramos de Chymotrypsin Sequencing Grade (Promega) e incubando durante 18 horas a 25 °C. La reacción se paró con ácido fórmico al 0,5%. En el caso de la digestión con pepsina, las muestras fueron resuspendidas en 50-100 µl de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con ProteasaMax (Promega) al 0,01%. Después de la alquilación y la

reducción, se adicionó HCl a una concentración final de 40 mM, y la digestión fue realizada adicionando 0,5-1 microgramos de pepsina (Promega) e incubando durante 18 horas a 37 °C. La reacción se paró calentando la muestra a 95°C. Después de las digestiones, todas las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0,2 µm y secadas usando un Vacuum Concentrator de Eppendorf modelo 5301.

III.14.3. Análisis por HPLC-MS/MS.

La separación y el análisis de las muestras de proteínas digeridas fue realizada con un sistema HPLC-MS que consiste en un cromatógrafo líquido HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies) equipado con un automuestreador y una bomba capilar acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent Technologies) que usa una interfase de ionización de tipo electrospray (ESI). Los parámetros experimentales para el HPLC fueron establecidos con el software Chemstation (Agilent Technologies, Rev. B.01.03), mientras que los parámetros para la trampa de iones fueron establecidos con el software LC/MSD Trap Control (Bruker Daltonik, v5.3).

Las muestras secas procedentes de las digestiones fueron resuspendidas en 10 µl de tampón A, compuesto por agua/acetonitrilo/ácido fórmico (en proporción 94.9:5:0.1). Posteriormente, las muestras fueron inyectadas en una columna de HPLC Zorbax SB-C18 (5 µm, 150 x 0,5 mm, Agilent Technologies), termostatazada a una temperatura de 40 °C, a un flujo de 10 µl/min. Después de la inyección la columna fue lavada con tampón A durante 30 minutos y los péptidos digeridos fueron eluidos usando un gradiente lineal 0-80% durante 120 minutos de tampón B (compuesto por agua/acetonitrilo/acido fórmico en proporción 10:89.9:0.1). Antes de la siguiente inyección de muestra, la columna fue lavada con las condiciones iniciales (tampón A) durante 30 minutos. La columna se acopló al espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus usando una interfase de ionización de tipo electrospray.

La presión del gas nebulizador fue establecida a 15 psi, mientras que el del gas secante se aplicó a un flujo de 8 L/min y a una temperatura de 350 °C. El voltaje del capilar fue establecido en 3500 V, mientras que la velocidad de scan fue establecida a 8100 (m/z)/seg, en el rango de 200 a 2200 m/z, con la optimización de la señal centrada en 1000 m/z, y promediando tres espectros para cada dato. Para la adquisición de cada espectro se fijó una acumulación máxima de 150000 iones o bien un tiempo de medida de 50 ms para evitar la saturación por defecto. Los datos MS/MS fueron recogidos en modo automático (AutoMSn mode). Los tres iones más intensos de cada ciclo fueron subsecuentemente fragmentados usando la disociación inducida por colisión con helio (CID) con una anchura de la ventana de aislamiento de 2 uma (unidades de masa atómica) y una energía relativa de colisión del 35%. El mismo ión fue descartado después de dos scans consecutivos.

El procesamiento de los datos se realizó con los programas DataAnalysis para LC/MSD Trap Versión 3.3 (Bruker Daltonik) y Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev A.03.02.060B, Agilent Technologies). Los datos brutos experimentales fueron procesados bajo las condiciones por defecto como sigue: sin modificar o con cisteínas carbamidometiladas; longitud de la secuencia >1; [MH]⁺ 50–7000 m/z; carga máxima +7; relación señal/ruido mínima (S/N) 25; búsqueda de señales 12C.

La búsqueda MS/MS frente a la secuencia de la proteínas de interés fue realizada con los siguiente criterios: modo búsqueda de identidad, digestión con tripsina (o la proteasa utilizada) con 3 puntos de corte seguidos perdidos como máximo; cisteínas carbamidometiladas opcionalmente; carga del péptido +1, +2, +3; tolerancia de masa del péptido precursor 2,5 Da; tolerancia de masa del ión de masa producido 0,7 uma; instrumento trampa de iones ESI; mínima intensidad de pico coincidente 50%.

III.14.4. Análisis ionización por láser asistida por matriz (MALDI) presión atmosférica (AP).

Las muestras de proteínas digeridas fueron disueltas en 5 µl 0,1% TFA (v/v), y mezcladas con un volumen igual de solución matriz saturada, α-ciano-4-ácido hidroxicinámico al 0,1% TFA en H₂O/ACN (1:1). Estas muestras se aplican a la placa AP-MALDI en gotas de 2 µl, y se deja secar a temperatura ambiente para la co-cristalización. Los experimentos fueron llevados a cabo en una espectrómetro de masas Agilent TOF Serie 6100 (Agilent Technologies), equipado con una fuente de iones AP-MALDI con un láser de N₂ (337 nm). El espectro de masas fue obtenido por acumulación de 200 disparos de láser en modo reflectrón con polaridad positiva y en el rango de 100-10000 m/z. Los principales parámetros TOF-MS fueron como sigue: temperatura capilar 350 °C; voltaje capilar 3500 V; voltaje de fragmentación 215 V; voltaje skimmer 60 V; voltaje octopolo DC1 y DC2 34.4 and 34,2 V, respectivamente y voltaje octopole RF 250 V.

La calibración externa del espectrómetro de masas fue realizada con el kit de calibración ProteoMassTM peptide MALDI-MS (Sigma-Aldrich) usando el pico monoisotópico de dos péptidos estándar (bradiquinina, 757,3997 m/z, y ACTH, 2465,1989 m/z). Los datos fueron recogidos y procesados con el software de Análisis cualitativo Workstation Agilent MassHunter para la obtención de la llamada “huella peptídica” (Peptide Mass Fingerprint, PMF). Los resultados de espectrometría de masas fueron analizados frente a la secuencia de la proteína de interés. La tolerancia de masas de los péptidos fue establecida a 50 ppm.

III.15. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

III.15.1. Clonación de genes en plásmidos de la serie pET.

Para crear el plásmido pETGOXB11, el gen *goxB* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando los cebadores GODIRnde2 (directo) y GOREVsmal (reverso) (tabla III.5). Posteriormente fue clonado usando las enzimas *NdeI* y *SmaI* en el plásmido pET11 (fig. III.2A).

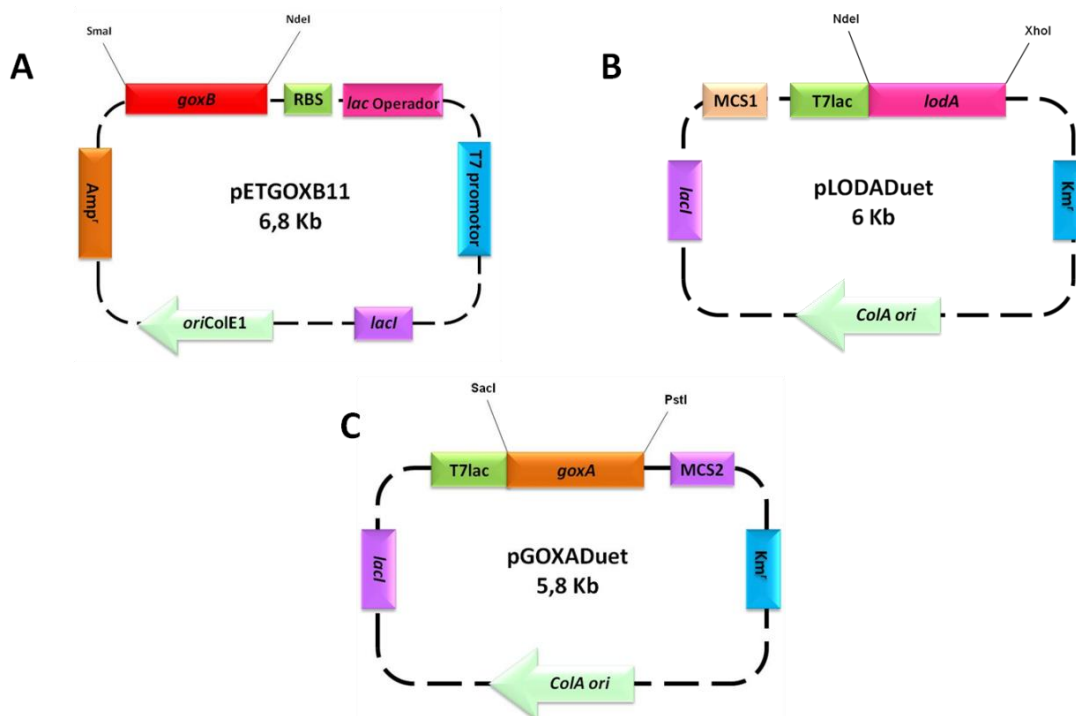


Figura III. 2. Esquemas de los plásmidos creados usando vectores de la serie pET. (A) pETGOXB11; (B) pLODADuet y (C) pGOXADuet.

El plásmido pCOLADuetTM (Novagen) tiene el origen de replicación *ColA* que lo hace compatible con la serie de plásmidos pET (Novagen). Además tiene dos sitios de clonación múltiple para la coexpresión de dos genes diferentes con el mismo plásmido. A partir del plásmido pCOLADuetTM (Novagen) se construyeron dos plásmidos distintos. Por una parte, se construyó el plásmido pLODADuet amplificando el gen *lodA* usando como molde el plásmido pBLODAB (Gomez *et al.*, 2010) y los oligonucleótidos MARDIRnde1 (directo) y MAREXrXho (reverso) (tabla III.5) que llevan, respectivamente, los sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Tras digerir el ADN con estas enzimas, *lodA* fue clonado en el MCS2 (fig. III.2B). Por otra parte, *goxA* se amplificó a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando los cebadores GODIRSacI (directo) y GOXARevPst (reverso) (tabla III.5). Las enzimas *PstI* y *SacI* fueron usadas para clonar *goxA* en el MCS1 de pCOLADuet y crear así el plásmido pGOXADuet (fig. III.2C).

A partir del plásmido pET15 se crearon dos plásmidos que llevaban *lodA* deletada en su extremo C-terminal: pETLODACT15 y pETLODACT2-15. *lodA* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando el cebador directo MARDIRndel (común para ambos genes) y los cebadores reversos MAREVHISBamHI y MAREVCT2Bam (tabla III.5), respectivamente, para cada uno de los genes en particular. Posteriormente, usando los sitios de corte *NdeI* y *BamHI* se clonaron estos genes por separado en el plásmido pET15 (fig. III.3A y B).

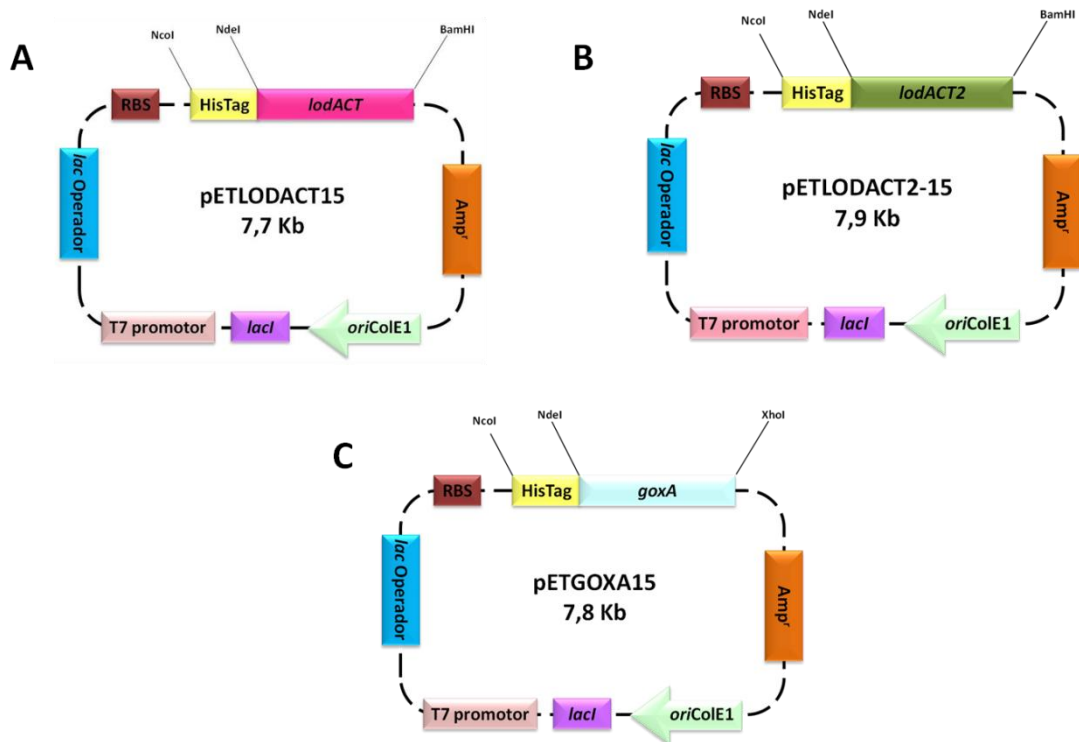


Figura III. 3. Esquemas de los plásmidos creados usando el vector pET15. (A) pETLODACT15; (B) pETLODACT2-15 y (C) pETGOXA15.

Por otra parte, *goxA* fue amplificado a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando el cebador directo GODIRnde1 y reverso GOXAREVxho1 (tabla III.5). Una vez digerido el fragmento amplificado con las enzimas *NdeI* y *XhoI* se clonó en pET15 para obtener el plásmido pETGOXA15 (fig. III.3C).

Por último, los plásmidos pETLODA15, pETLODB15 y pETLODAB15 se generaron a partir de los plásmidos pETLODA11, pETLODB11 y pETLODAB11 construidos previamente (Gomez, 2010) usando los sitios de corte reconocidos por las enzimas *NdeI* y *BamHI*. Se extrajeron los genes de interés de la serie de plásmidos pET11 correspondientes y se clonaron en el plásmido pET15 generando una serie de plásmidos equivalentes pero con fusiones a etiquetas de poli-His (fig. III.4).

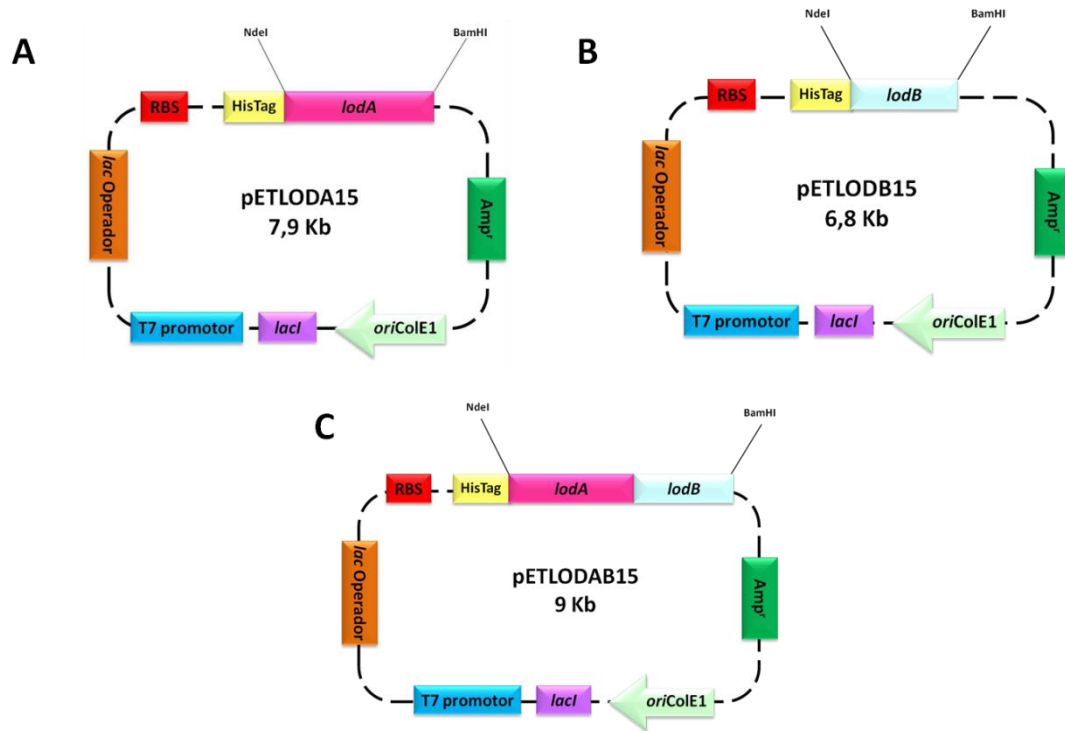


Figura III. 4. Esquemas de los plásmidos conteniendo genes del operón *lodAB* creados a partir de los plásmidos previamente construidos en pET11. (A) pETLODA15; (B) pETLODB15 y (C) pETLODAB15.

III.15.2. Creación de fusiones a MBP usando el plásmido pETMBP28.

Para fusionar *LodB* y *GoxB* a MBP, se usó el plásmido pETMBP28 proporcionado por el Dr. Francisco Javier Medrano del CIB-CSIC (Madrid). Este plásmido permite una fusión His-MBP en el extremo N-terminal de la proteína clonada. Además, lleva un sitio de corte para la proteasa 3C entre His-MBP y dicha proteína.

Se amplificó por PCR el gen *lodB* a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando los oligonucleótidos DESDIRNdel (directo) y MAREVeco3 (reverso) (tabla III.5). Una vez digerido el producto con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*, *lodB* se clonó en pETMBP28 para crear el plásmido pETMBPLODB28 (fig. III.5A). Posteriormente, se usaron las enzimas *NcoI* y *EcoRI* para digerir este vector y obtener el gen *MBPlodB* y subclonarlo en el plásmido pCOLADuetTM, generando de esta forma el plásmido pMBPLODBDuet (fig. III.5B).

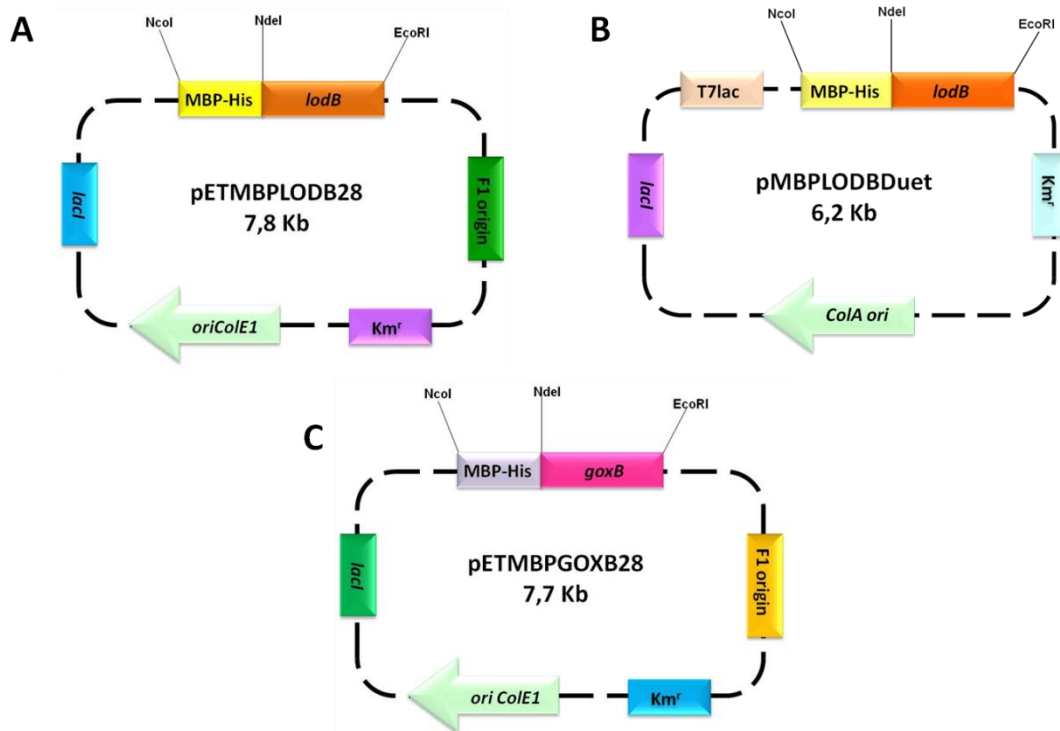


Figura III. 5. Esquema de plásmidos con proteínas fusionadas a MBP para aumentar la solubilidad de la proteína fusionada. (A) pETMBPLODB28; (B) pMBPLODBDuet y (C) pETMBPGOXB28.

Para crear el plásmido pETMBPGOXB28, *goxB* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R usando los cebadores GODIRnde2 (directo) y GOXBRevXho (reverso) (tabla III.5). Usando los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* se clonó *goxB* en el plásmido pETMBP28 (fig. III.5C).

III.15.3. Clonación de los genes *HislodA*, *HislodACT*, *lodACT* y *lodACT2* en el vector pBLODAII.

Con el fin de introducir en *M. mediterranea* una única copia de los genes *HislodA*, *HislodACT*, *lodACT* y *lodACT2* se utilizó el vector pBLODAII. Este vector deriva de pBLODA (Gomez *et al.*, 2010) por sustitución del marcador de resistencia de gentamicina (Gm^r) presente en el transposón *mini-Tn10* por el de kanamicina (Km^r). Este vector es además Amp^r . La transposasa que controla el transposón se encuentra fuera del mismo y está bajo el control del promotor *Ptac*. Dentro del transposón se encuentra un sitio de clonación múltiple (MCS) que permite clonar genes con orientación contraria al del gen de resistencia a Km. Mediante transposición se puede conseguir la inserción del ADN clonado en el cromosoma bacteriano (Alexeyev and Shokolenko, 1995). Esta técnica ya ha sido utilizada por nuestro grupo de investigación en *M. mediterranea* como mecanismo de clonación de genes (Lopez-Serrano *et al.*, 2007).

Para estudiar el efecto de las deleciones en la zona C-terminal de la proteína LodA se construyeron cuatro versiones diferentes de LodA: HisLodACT, HisLodA, LodACT y LodACT2. En las dos primeras construcciones en las que hay una etiqueta de poli-His en N-terminal, el gen *lodA* con la etiqueta de poli-His se amplificó por PCR usando como molde el plásmido pETLODA15 con el cebador directo MARDIRSmal (**tabla III.5**). El cebador reverso dependió del objetivo que se persiguiera. Para crear el gen *HislodACT* con un codón stop que elimina los últimos 46 aminoácidos del extremo C-terminal, se usó el oligonucleótido reverso MAREVHISBamHI (**tabla III.5**). El vector pBHisLODA, que contiene el gen *HislodA* sin deleción en C-terminal fue amplificado de una manera equivalente utilizando en este caso el cebador reverso MARDIRPETREV (**tabla III.5**) en conjunción con MARDIRSmal (**tabla III.5**) para amplificar el gen *HisLodA* sin deleción en C-terminal.

Los cebadores usados contienen las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *SmaI* y *BamHI*. Adicionalmente, la región promotora del operón *lod* se amplificó a partir del plásmido pBLODAB (Gomez *et al.*, 2010) usando los cebadores MARDIRkpn (directo) y MAREVnrbs (reverso) (**tabla III.5**) que contienen respectivamente, los sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *StuI*.

Los dos fragmentos de PCR obtenidos de 2,1 Kb para *HislodACT* y 470 pb para *Plod* se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas: *SmaI* y *BamHI* para *HislodACT* y *KpnI* y *StuI* para la región promotora, y se clonaron en el plásmido pBLODAII que previamente se había linearizado con las enzimas *KpnI* y *BamHI*. De esta forma se creó el vector pBHisLODACT (**fig. III.6**). La triple ligación supuso la inserción de cinco nucleótidos adicionales AACCC entre las secuencias de Shine-Dalgarno y el gen clonado (**fig. III.6B**).

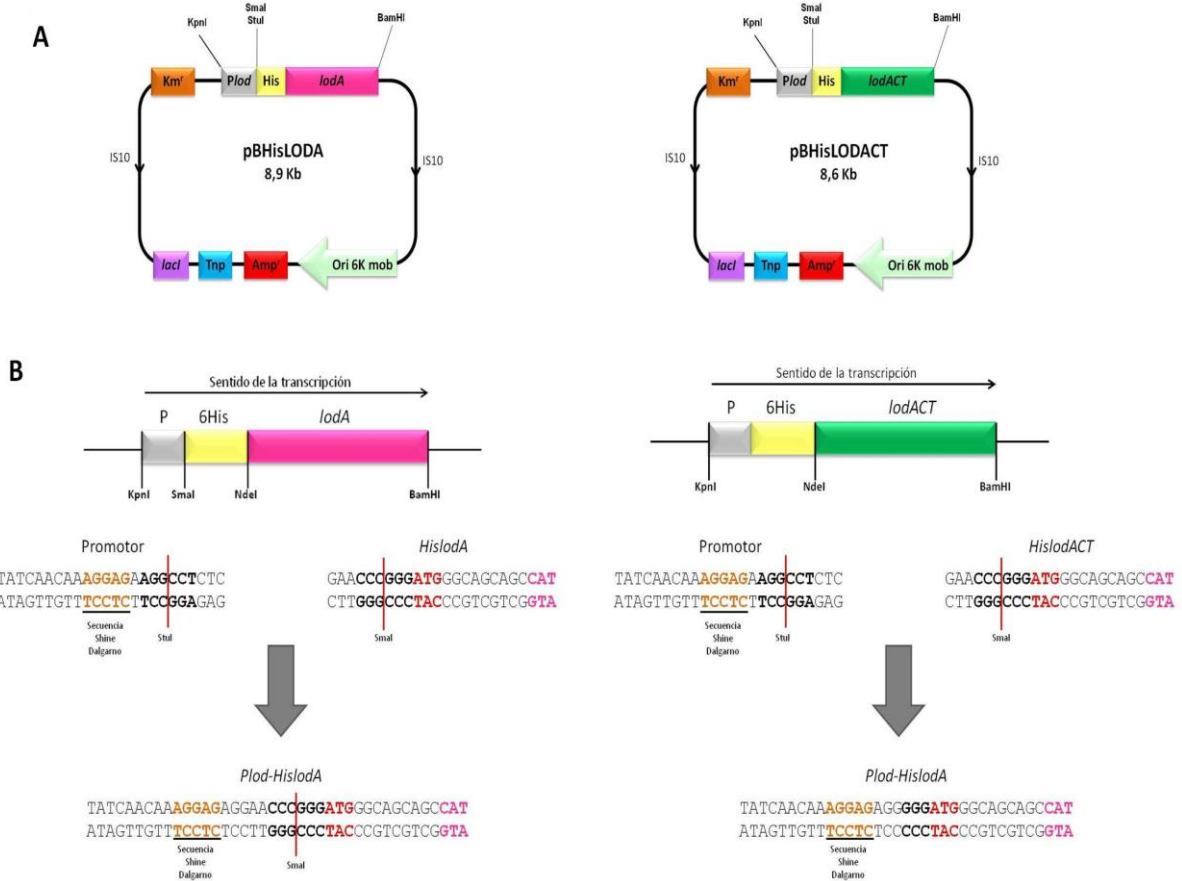


Figura III. 6. Esquema de las fusiones traduccionales de *lodA* con la etiqueta de poli-His en N-terminal. (A) Plásmido pBHisLODA (izq.) y plásmido pBHisLODACT (dcha.). (B) Detalle de la construcción de las fusiones en la zona del promotor. En rojo el codón de inicio del gen *lodA*. En rosa la primera histidina de las 6 que conforman la etiqueta de poli-His. En destacada en naranja la secuencia Shine-Dalgarno.

Para construir el plásmido pBLODACT (**fig. III.7A**) que contiene la delección de 46 aminoácidos en el extremo C-terminal pero carece de etiqueta de poli-His en N-terminal, *lodACT* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R utilizando los cebadores MARDIR6 directo y MAREVHisBamHI reverso (**tabla III.5**). El fragmento obtenido por PCR se digirió con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y se clonó en el plásmido pBLODAII previamente digerido con ambas enzimas.

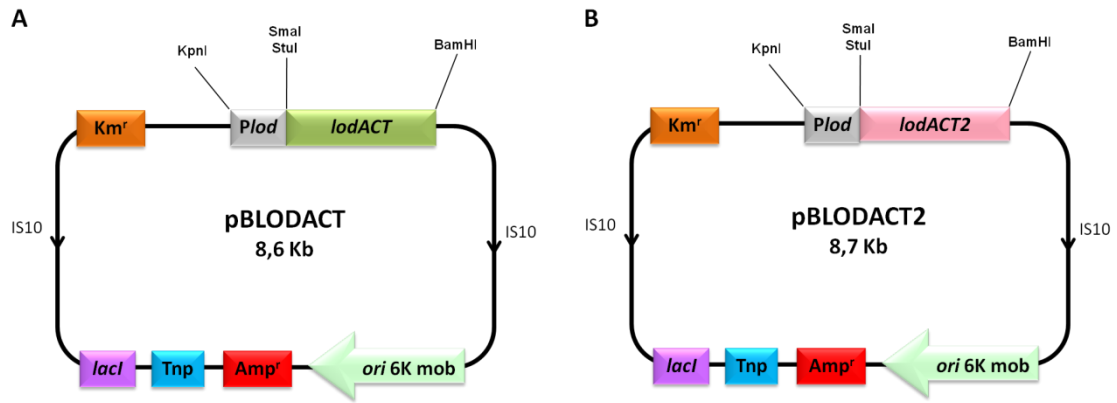


Figura III. 7. Esquema de los plásmidos para conjugación construidos con deleciones en C-terminal. (A) pBLODACT y (B) pBLODACT2.

En la construcción *lodACT2* solamente los últimos 9 aminoácidos del extremo C-terminal son eliminados mediante la introducción de un codón de terminación. Para generar *lodACT2*, se amplificó el gen *lodA* por PCR a partir de ADN genómico de la cepa MMB-1R empleando los oligonucleótidos directo MARDIR6 y reverso MAREVCT2Bam (tabla III.5). Tras la PCR, el producto se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI* y se clonó en el plásmido pBLODAII creando así el plásmido pBLODACT2 (fig. III.7B).

Los plásmidos creados se transformaron en la estirpe *E. coli* S17- λ pir por electroporación, y a continuación se seleccionaron los transformantes resistentes a kanamicina mediante siembra en placas de LB suplementado con dicho antibiótico. Estos plásmidos serán movilizados posteriormente por conjugación a *E. coli*.

III.16. CONJUGACIÓN Y MOVILIZACIÓN DE TRANSPOSONES A *M. mediterranea*.

La introducción de genes mutados en *M. mediterranea* se realizó mediante el uso de transposones con dichos genes. La movilización de transposones a *M. mediterranea* se llevó a cabo mediante vectores plasmídicos conjugativos (Solano *et al.*, 2000). Los vectores utilizados contienen el origen de replicación R6K, de manera que se replican únicamente en cepas bacterianas que sintetizan la proteína π , como S17-1 (λ pir) (Miller and Mekalanos, 1988). En *M. mediterranea*, que no sintetiza la proteína π , los plásmidos anteriores se comportan como suicidas. Los vectores utilizados contienen un transposón con un marcador de resistencia a antibióticos que sólo se mantiene en la cepa receptora de *M. mediterranea* si tras la conjugación ha tenido lugar transposición al cromosoma bacteriano.

Para realizar la conjugación, se partió de cultivos de 16 horas de las cepas de *M. mediterranea* y de *E. coli* en medio MMC y LB, respectivamente, suplementados con los antibióticos correspondientes. A partir de estos cultivos, se reinocularon en los mismos medios líquidos pero sin adicionar antibióticos, y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 4 horas). La ausencia de antibiótico en estos cultivos evita su presencia en la etapa de conjugación, lo que podría inhibir el crecimiento de la cepa receptora (de Lorenzo and Timmis, 1994). Asimismo, la agitación de los cultivos de *E. coli* debe ser suave (unas 50 rpm) para no romper los *pili* que median la transferencia de material génico. A continuación, se depositaron 40 μ l del cultivo *M. mediterranea* en una placa de medio LB2216 (**apartado III.2.2**). Cuando la gota anterior se hubo absorbido por el medio (generalmente 1 hora), se depositaron otros 40 μ l del cultivo de *E. coli* con el plásmido a transferir en el mismo punto de la placa. Una vez secas, las placas se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Como controles, ambas cepas se sembraron también por separado. Transcurrido dicho tiempo, la masa celular se resuspendió en 1 ml de MMC procediendo seguidamente a su plaqueo en medio MMC suplementado con Rif 50 μ g/ml y con el marcador de selección codificado por el transposon en cada conjugación. De esta manera sólo crecen los mutantes de *M. mediterranea* en los que haya tenido lugar la inserción del transposón ya que *E. coli* no crece en estos medios por ser Rif^S.

Dado que la inserción del transposón es al azar, se crea una mutación en la cepa receptora. De las distintas cepas generadas en cada experimento se seleccionaron varias a las que se les midió la expresión del gen de interés. Por ejemplo, actividad lisina oxidasa en el caso de que el gen movilizado fuera *lodA*. De entre estas cepas se seleccionó una con actividad representativa para estudios posteriores.

III.17. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE *lodA* POR PCR.

La técnica de la PCR permite realizar mutagénesis dirigida sobre secuencias de ADN. En este trabajo, los genes con las mutaciones puntuales de *lodA* (C516A, W581A, D512A, R100A, C448A, Y211A, E101A) fueron construidos usando el método de la extensión por solapamiento (Ho *et al.*, 1989) (**fig. III.8**).

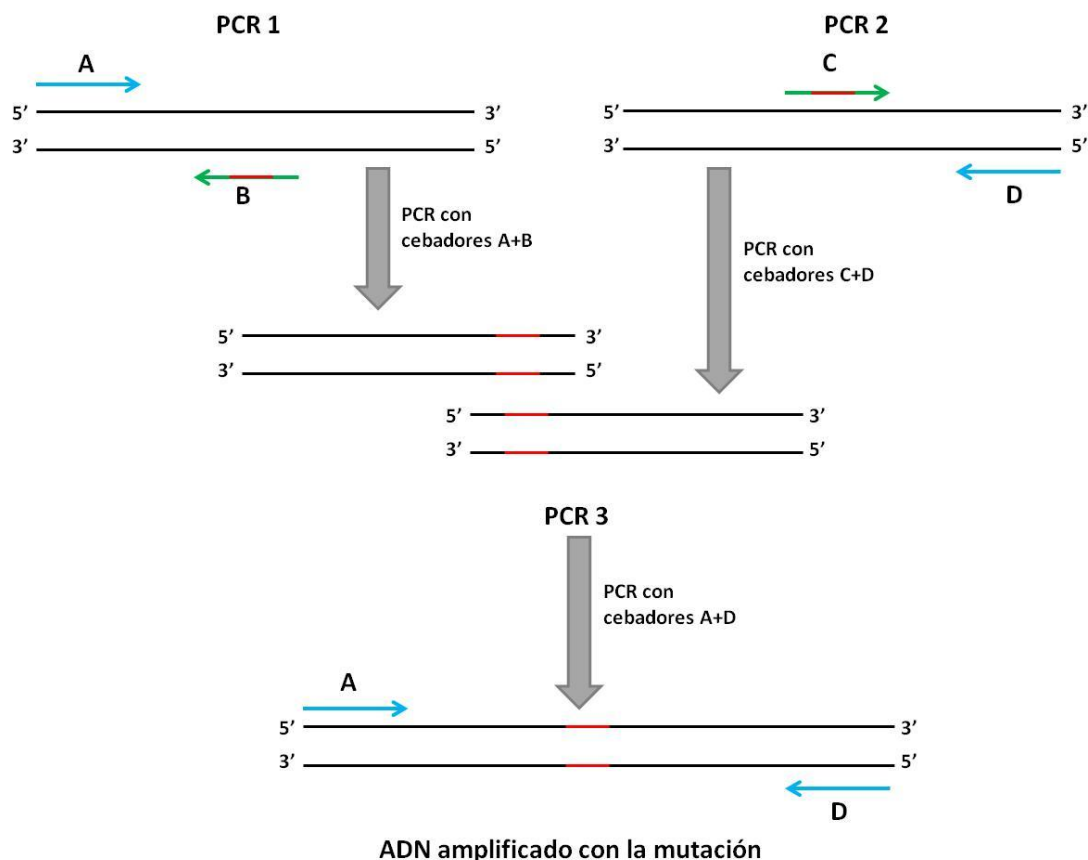


Figura III. 8. Esquema del proceso de mutagénesis dirigida por solapamiento. Las flechas azules y verdes indican los cebadores y su dirección. En rojo la localización de la mutación introducida.

Los cebadores usados para las amplificaciones de cada mutación se indican en la **tabla III.5** y las condiciones de amplificación en el **apartado III.10.3**. En todos los casos como molde para la amplificación de *lodA* por PCR se usó el plásmido pETLODAB15. Para realizar las PCRs se utilizó la enzima Pfu ADN polimerasa (Promega) amplificando de manera independiente dos segmentos solapantes del gen *lodA* que se unirán en una segunda reacción de PCR. En los cebadores centrales, B y C en la **figura III.8**, se introducen los mismos cambios en la secuencia para generar la mutación de interés. Es importante un buen diseño de cebadores teniendo en cuenta la temperatura de fusión que es necesaria, para obtener una buena hibridación del ADN molde. Los fragmentos amplificados se corren en un gel de agarosa y se purifican. En una segunda fase, los productos purificados de la fase anterior se mezclan para que hibriden entre sí. Los

cebadores externos que se utilizaron para realizar el último paso de PCR cuando el gen ya contenía la mutación fueron MARDIRsacl y MAREVeco2 (**tabla III.5**). Tras esta última amplificación por PCR, los fragmentos obtenidos fueron clonados usando los sitios de restricción *Sacl* y *SacII* en el plásmido pETL0DAB15, con lo que se sustituía la copia silvestre de *lodA*. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación del ADN. Todos los pasos de clonación fueron realizados usando la cepa *E. coli* DH5 α y los plásmidos obtenidos fueron electroporados en *E. coli* Rosetta justo antes de la inducción.

IV. RESULTADOS

IV.1 EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LodA y LodB FUSIONADAS A ETIQUETAS DE POLI-HISTIDINAS.

Resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que era posible obtener la expresión recombinante de LodA en *E. coli* Rosetta (DE3) (Gomez, 2010). En cultivos de esta cepa inducidos a 25 °C conteniendo pETLODAB11, un plásmido con el operón completo en los que ni LodA ni LodB estaban fusionadas a un epítipo, LodA se detectaba en la fracción soluble como una banda de aproximadamente 95 kDa. Por el contrario, no se detectaba ninguna banda proteica que pudiera ser claramente asignada a LodB (Gomez, 2010). Partiendo de estos datos previos, se crearon plásmidos en los que se fusionó LodA y LodB a etiquetas de poli-His para facilitar su detección y aislamiento.

IV.1.1. Fusión de LodA y LodB a etiquetas de poli-His y detección por Western Blot.

Con el fin de detectar LodA y LodB solubles, incluso si se encontrasen en bajas concentraciones, se creó una serie de plásmidos en los que se fusionaron estas proteínas a etiquetas de poli-His facilitando su detección mediante la técnica de Western Blot, así como su aislamiento.

En primer lugar se fusionó LodA a la etiqueta de poli-His. Para ello se creó el vector pETLODAB15 (construido como se describe en el **apartado III.15.1**), que contiene el operón *lod* completo y en el que LodA se encuentra fusionada a una etiqueta de poli-His en el extremo N-terminal (HisLodA). La comparación de cultivos recombinantes de *E. coli* con pETLODAB11 y con pETLODAB15, en los que la única diferencia es la presencia de la etiqueta de poli-His en el segundo caso, reveló que los niveles de actividad eran muy parecidos en ambos casos (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que esta etiqueta no afecta a la actividad de LodA.

A continuación, para generar la fusión de poli-His a LodB se creó un sistema de plásmidos compatibles. Por una parte, se construyó (como se describe en el **apartado III.15.1**) el plásmido pLODADuet que contiene el gen *lodA*. Este vector es compatible con plásmidos de la serie pET, por lo que *lodB* se clonó en el vector pETLODB15 (construido como se describe en el **apartado III.15.1**) en el que LodB está fusionado con una etiqueta de poli-His en el extremo N-terminal (HisLodB). Además de estos vectores, se disponían como controles del vector pETLODB11, en el que LodB no se encuentra fusionado a ninguna etiqueta, y el vector original pET15, que no contiene *lodB*.

Cultivos de *E. coli* conteniendo los diferentes vectores anteriormente mencionados fueron inducidos a 15 °C con IPTG y se recogieron muestras a diferentes tiempos (1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas). A continuación se aplicó la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos frente a la etiqueta de poli-His. Aunque se detectaron algunas bandas inespecíficas en todos los cultivos, las bandas que corresponden a HisLodA y HisLodB se pudieron observar claramente en torno a los 95 kDa y los 43 kDa, respectivamente (**fig. IV.1**). Por ejemplo, la banda de LodB con la etiqueta de poli-His fue observada en cultivos que contenían pLODADuet junto a pETLODB15, pero no en los controles en los que este último plásmido fue sustituido por pETLODB11 que contenía *lodB* sin la fusión (**fig. IV.1**). En el resto de cultivos inducidos no se detectaron bandas que pudieran corresponder a LodB. Es de destacar también que la observación de las bandas fue muy temprana. Así LodA se detecta muy claramente ya en el primer Western Blot realizado transcurrida 1 h. En el caso de LodB la banda se observó también a 1 hora aunque más débilmente (**fig. IV.1A**).

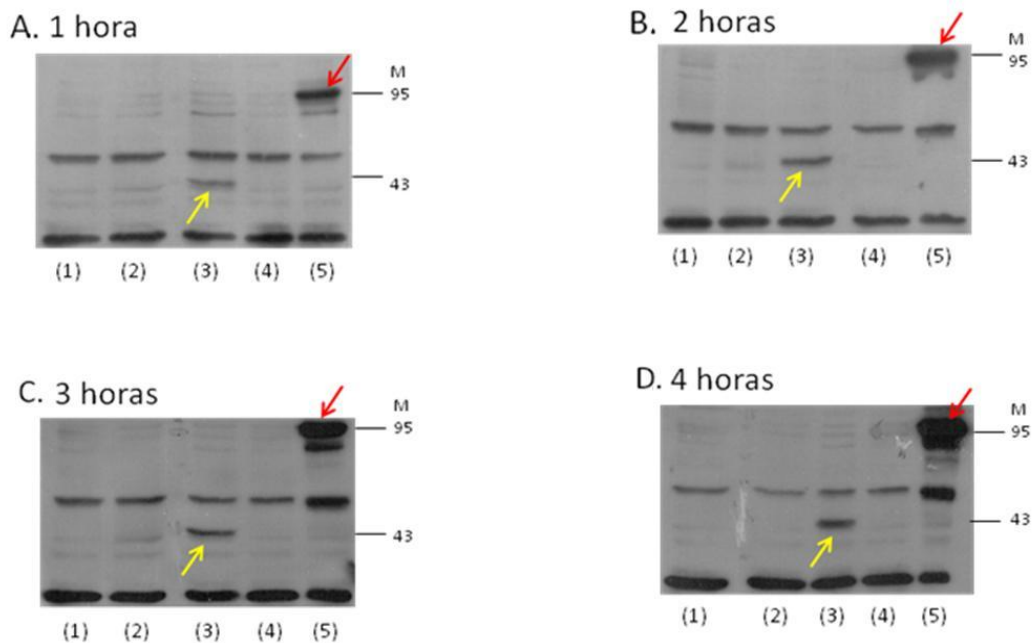


Figura IV. 1. Detección por Western Blot de LodA (flecha roja) y LodB (flecha amarilla) fusionadas a una etiqueta de poli-His. Cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) con diferentes plásmidos fueron inducidos con 1 mM de IPTG a 15 °C. Las muestras fueron recogidas a diferentes tiempos (1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas): (1) pLODADuet [LodA]; (2) pLODADuet + pETLODB11 [LodA + LodB]; (3) pLODADuet + pETLODB15 [LodA + HisLodB]; (4) pLODADuet + pET15 [LodA]; (5) pETLODAB15 [HisLodA + LodB]. SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes.

IV.1.2. Efecto de la temperatura en la expresión de LodA y LodB.

Para estudiar el efecto de la temperatura en la expresión de LodA y LodB, cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo pLODADuet y pETLODB15 fueron inducidos a diferentes temperaturas (15 °C, 25 °C y 37 °C) durante diferentes períodos de tiempo (1 hora, 2 horas y 16 horas) a una concentración de 1 mM de IPTG. Se observó que la actividad L-lisina oxidasa podía ser detectada tempranamente (1 hora) en los cultivos inducidos a 15 °C mientras que en los cultivos a 25 °C se detectó a las 2 horas. Por otra parte, a 37 °C no se detectó actividad (**fig. 2A**). Los niveles de actividad L-lisina oxidasa detectados parecen estar en concordancia con los niveles de HisLodB que mostraron los Western Blot realizados donde se observaron mayores niveles de HisLodB a 15 °C que a 25 °C (**fig. IV.2B**), mientras que a 37 °C no fue detectada (datos no mostrados).

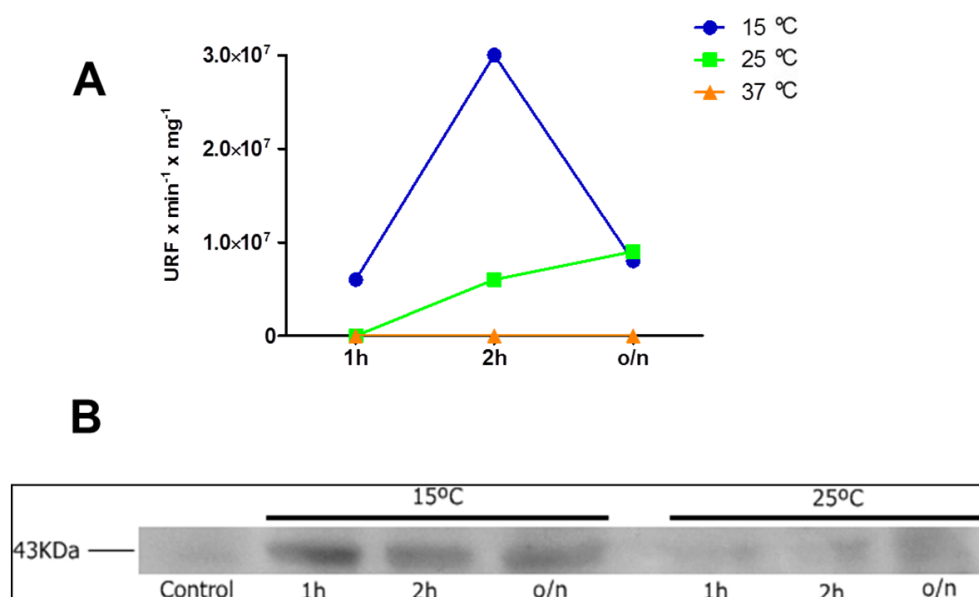


Figura IV. 2. Expresión recombinante de LodA y LodB a diferentes temperaturas. Cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo los plásmidos compatibles pLODADuet + pETLODB15 [LodA + HisLodB] fueron inducidos a 15 °C (●), 25 °C (■) y 37 °C (▲). (A) Actividad L-lisina oxidasa a diferentes tiempos de inducción. (B). Detección de HisLodB por Western a diferentes tiempos de inducción.

La baja cantidad de LodB sintetizada en los cultivos inducidos a 25 °C podría explicar por qué en cultivos a esta temperatura LodB no se observa directamente en geles SDS-PAGE, ni con los plásmidos construidos en esta memoria (datos no mostrados) ni con el plásmido pETLODAB11 (Gomez, 2010). Los resultados obtenidos con la técnica de Western Blot indican que LodB se encuentra en la fracción soluble de todos los cultivos que muestran actividad L-lisina oxidasa, incluso cuando no se detecta por SDS-PAGE, lo que indica su requerimiento para la generación de la forma activa de LodA en el sistema recombinante. Este requerimiento de LodB ha sido también demostrado en el sistema nativo (Gomez *et al.*, 2010).

IV.2. EFECTO DE LodB SOBRE LA EXPRESIÓN DE LodA.

IV.2.1. Expresión recombinante de LodA en presencia y ausencia de LodB.

Con el fin de estudiar el papel de LodB en la expresión de LodA, se utilizaron los vectores pETLODAB15, que contiene el operón completo, y pETLODA15 que contiene *lodA*, pero no *lodB*. LodA expresada a partir de ambos vectores posee fusionada una etiqueta de poli-His en N-terminal. Cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) transformados con estos vectores fueron inducidos a 15 °C durante 16 horas a una concentración de IPTG de 1 mM. En estas condiciones, se confirmó de nuevo que la actividad L-lisina oxidasa solamente podía ser detectada cuando se inducía el operón completo (**fig. IV.3A**). Asimismo, en SDS-PAGE no desnaturizante fue posible observar una forma multimérica de LodA (MLodA) con un tamaño aproximado de 200 kDa que es la que presenta actividad enzimática (Gomez *et al.*, 2010) (**fig. IV.3B**). Por otra parte, generalmente se detectó una banda que podría corresponder a LodB, aunque no siempre fue observada (**fig. IV.3B**). Estos datos confirman de nuevo que LodB es requerida para obtener LodA funcional en el sistema recombinante.

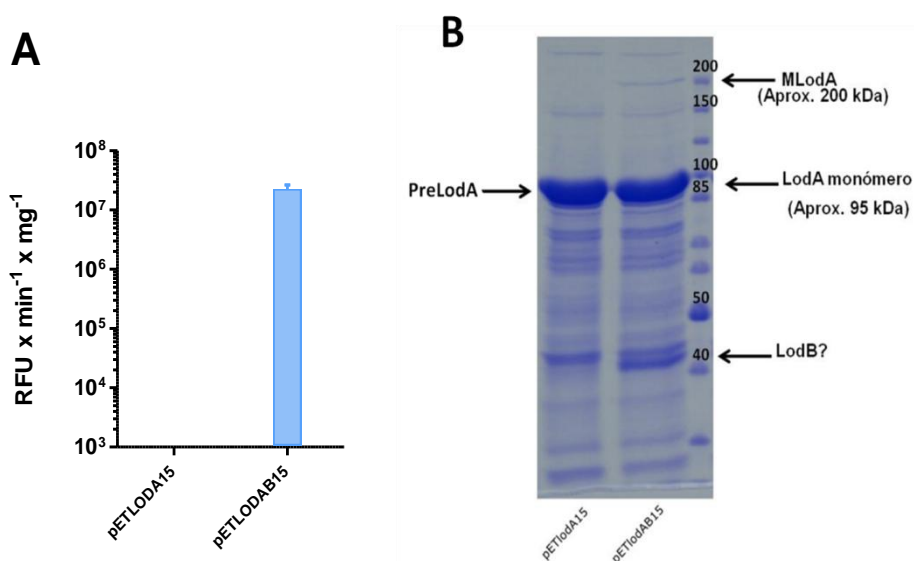


Figura IV. 3. Expresión recombinante de LodA en *E. coli* Rosetta (DE3) con los plásmidos pETLODA15 [HisLodA] o pETLODAB15 [HisLodA + LodB]. Los cultivos fueron inducidos a 15 °C durante 16 h con 1 mM IPTG. (A) Actividad lisina oxidasa. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Las flechas indican las proteínas recombinantes. MLodA: LodA multimérica.

LodA expresada en ausencia de LodB a 15 °C fue detectada en la fracción soluble, aunque en forma inactiva. Esta forma molecular será denominada a partir de ahora como PreLodA. PreLodA se observó como un monómero en torno a los 95 kDa en geles SDS-PAGE bajo condiciones no desnaturizantes. En concordancia con la ausencia de la actividad, no se detectó la forma multimérica en estos extractos (**fig. IV.3B**).

VI.2.2. Aislamiento de diferentes formas moleculares de LodA.

A partir de los cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo pETLODAB15 o pETLODA15 inducidos a 15 °C durante 16 horas con 1 mM de IPTG se aislaron tres formas moleculares de LodA como se detalla a continuación.

IV.2.2.1. Purificación de LodA activa y soluble.

LodA soluble y activa fue aislada de cultivos que contenían el vector pETLODAB15 utilizando la etiqueta de poli-His fusionada a su extremo N-terminal (**apartado III.15.1** de Materiales y métodos). Cuando LodA purificada se analizó en geles SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes, se detectó tanto la forma multimérica (MLodA, 200 kDa) como la monomérica (95 kDa) (**fig. IV.4**).

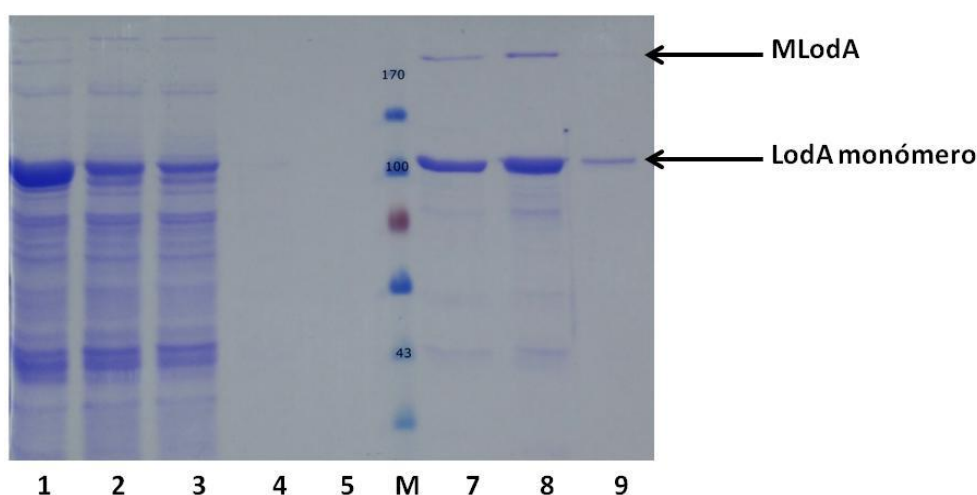


Figura IV. 4. Purificación de LodA activa en resina Ni-NTA. SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes de HisLodA activa purificada a partir de cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) pETLODAB15 [HisLodA + LodB]. 1: Muestra de partida; 2: Fracción no retenida por la resina; 3, 4 y 5: lavados; M: marcador; 7, 8 y 9: eluciones. MLodA: LodA multimérica.

IV.2.2.2. Purificación de PreLodA.

Como se ha indicado previamente, en los cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) que contenían el plásmido pETLODA15, LodA fue detectada en la fracción soluble como una forma monomérica (PreLodA) que carecía de actividad enzimática (**apartado IV.2.1**). Esta forma molecular de LodA que lleva fusionada en su extremo N-terminal una etiqueta de poli-His se purificó usando la resina Ni-NTA (**apartado III.12.1** de Materiales y métodos). En este caso, sólo se observó en geles SDS-PAGE una banda de 95 kDa correspondiente a LodA (**fig. IV.5**).

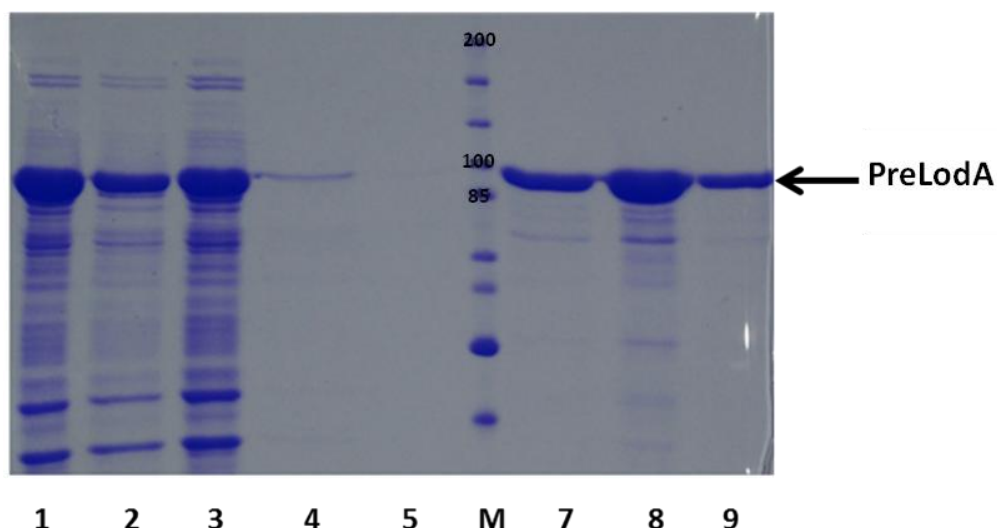


Figura IV. 5. Purificación de PreLodA en resina Ni-NTA. SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes de LodA purificada a partir de la fracción soluble de cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo pETLODA15 [HisLodA]. 1: Muestra de partida; 2: Fracción no retenida por la resina; 3, 4 y 5: lavados; M: marcador; 7, 8 y 9: eluciones.

IV.2.2.3. Aislamiento de LodA a partir de los cuerpos de inclusión.

Por último, una tercera forma molecular de LodA fue obtenida a partir de los cuerpos de inclusión de cultivos que contenían el vector pETLODA15 (HisLodA). Los cuerpos de inclusión fueron obtenidos aplicando el protocolo que se explica en el **apartado III.11.2** de Materiales y métodos. La forma obtenida de LodA en este caso, es una forma monomérica inactiva sintetizada en ausencia de LodB.

I.V.2.3. Caracterización de las diferentes formas moleculares de LodA.

IV.2.3.1. Análisis de las diferentes formas moleculares de LodA mediante HPLC-ESI MS TOF.

Las tres formas moleculares de LodA aisladas se analizaron por HPLC-ESI MS TOF con el fin de comprobar si poseían diferentes masas moleculares (MM), ya que la modificación post-traduccional que genera un cofactor quinónico implica cambios en la masa total de la proteína. Se observó que LodA procedente de los cuerpos de inclusión tenía una masa molecular de $83042,93 \pm 0,72$. Esta MM corresponde a la esperada de la proteína recombinante sin ninguna modificación post-traduccional (83042,91 de acuerdo a http://web.expasy.org/compute_pi/). Es importante tener en cuenta que la masa molecular de LodA nativa sin ningún tipo de etiqueta sería 80879,59, pero la proteína recombinante posee fusionada una etiqueta de poli-His en N-terminal, por lo que su masa molecular es mayor.

Por otra parte, la masa molecular de LodA activa fue de $83070,95 \pm 0,66$. Esto representa un aumento de +28 Da que estaría de acuerdo con la presencia de un cofactor quinónico derivado del triptófano, que podría ser de tipo TTQ o CTQ (Mure, 2004). Finalmente, la masa molecular de la PreLodA (soluble pero inactiva) purificada a partir de cultivos con pETLODA15 fue $83058,79 \pm 0,82$. Esta masa indica un incremento de +16 Da, que sería compatible con la modificación de LodA por adición de un átomo de oxígeno extra. Los resultados expuestos hasta ahora indican que LodB es necesaria para la síntesis completa del cofactor de LodA, pero que hay etapas previas que son independientes de esta proteína. En ausencia de LodB, LodA sufre una modificación post-traducciona l parcial que no es suficiente para generar la forma activa de la enzima. De acuerdo con estos datos, se puede proponer que PreLodA sería sustrato de LodB.

IV.2.3.2. Caracterización de LodA activa.

Como ya se ha descrito en el apartado anterior, la forma de LodA soluble y activa muestra una modificación post-traducciona l que supone un incremento de MM de +28 compatible con un cofactor quinónico derivado del triptófano (TTQ o CTQ).

IV.2.3.2.1 Estructura cristalina de LodA.

En colaboración con los doctores Francisco Javier Medrano y Antonio Romero del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid se ha cristalizado la forma recombinante de LodA de *M. mediterranea* expresada a partir del plásmido pETLODAB15. Este plásmido codifica LodA fusionada a una cola de poli-His en su extremo N-terminal. La estructura cristalina obtenida de la forma recombinante de la enzima está depositada en la base de datos del PDB (ID 2YMW).

La unidad estructural de LodA es un monómero que presenta un dominio central y dos extensiones que sobresalen fuera de él (**fig. IV.6A**). En la unidad asimétrica del cristal de LodA están presentes dos monómeros que contactan ligeramente entre ellos a través de las dos extensiones mencionadas anteriormente (**fig. IV.6B**). Sin embargo, la forma presente en solución es un tetrámero (**fig. IV.6C**). Esta organización se adapta mejor que el monómero a las propiedades de estabilidad de la proteína. Este tetrámero presenta una forma de mancuerna. El mango está formado por las interacciones de las extensiones de los cuatro monómeros y los discos de la pesa por el domino central de los monómeros (**fig. IV.6C**).

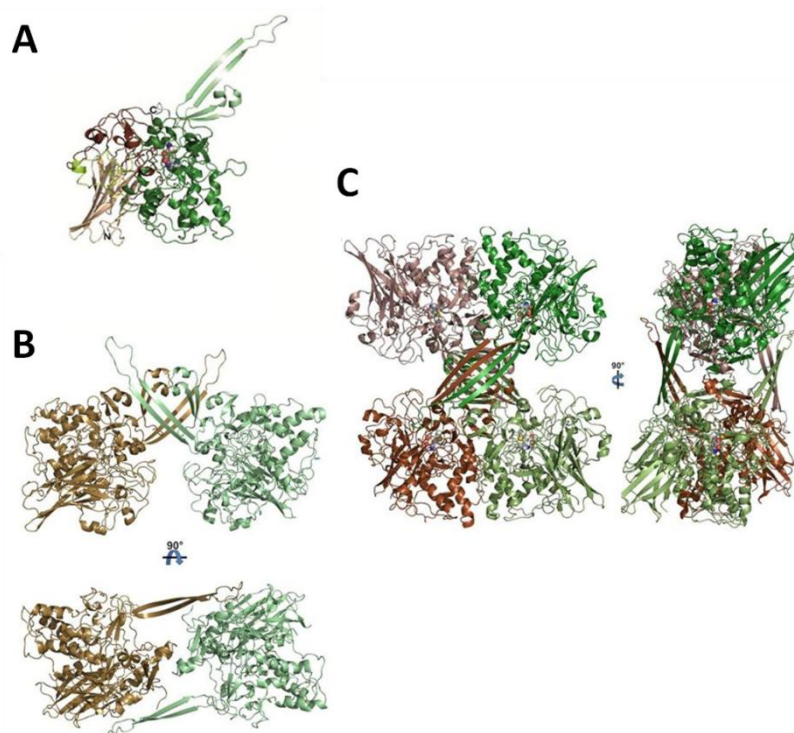


Figura IV. 6. Estructura de LodA. (A) Monómero de LodA. (B) Ensamblaje del dímero presente en la unidad asimétrica de la estructura cristalina. (C) Ensamblaje del tetrámero mostrando la forma de mancuerna.

El mapa de densidad electrónica indica que el centro activo está formado por un residuo de triptófano modificado (Trp581) unido covalentemente a un átomo de azufre de la cisteína 516 dando lugar a un cofactor CTQ (**fig. IV.7A**). Este cofactor había sido descrito previamente en la QHNDH de *Paracoccus denitrificans* (Datta *et al.*, 2001) y *Pseudomonas putida* (Sato *et al.*, 2002). Este resultado concuerda con datos previos de nuestro grupo de investigación que indicaban la presencia de un cofactor quinónico en el centro activo de LodA. Esta proteína era inhibida por β -aminopropionitrilo y además se teñía con nitroazul de tetrazolio (NBT) (Gomez *et al.*, 2006), un reactivo utilizado para la detección de quinoproteínas (Paz *et al.*, 1991). Estos datos también se encuentran apoyados por el espectro de absorción de la proteína pura (**fig. IV.7B**) que es similar a la de QHNDH de *P. denitrificans* (Datta *et al.*, 2001). Durante la realización de este trabajo se ha publicado la estructura de LodA obtenida en el sistema nativo y se ha mostrado que el cofactor es cisteína triptofilquinona (CTQ) (Okazaki *et al.*, 2013).

El análisis de la estructura de LodA ha revelado algunos residuos que están situados cerca del centro activo (**fig. IV.7C**). Algunos de ellos Arg100, Glu101 y Tyr211 parecen disponerse en el canal de entrada al centro activo. En el último caso parece tratarse de un lazo flexible que no se detecta en la estructura de la proteína obtenida de cultivos de *M. mediterranea* (PDB 3WEU).

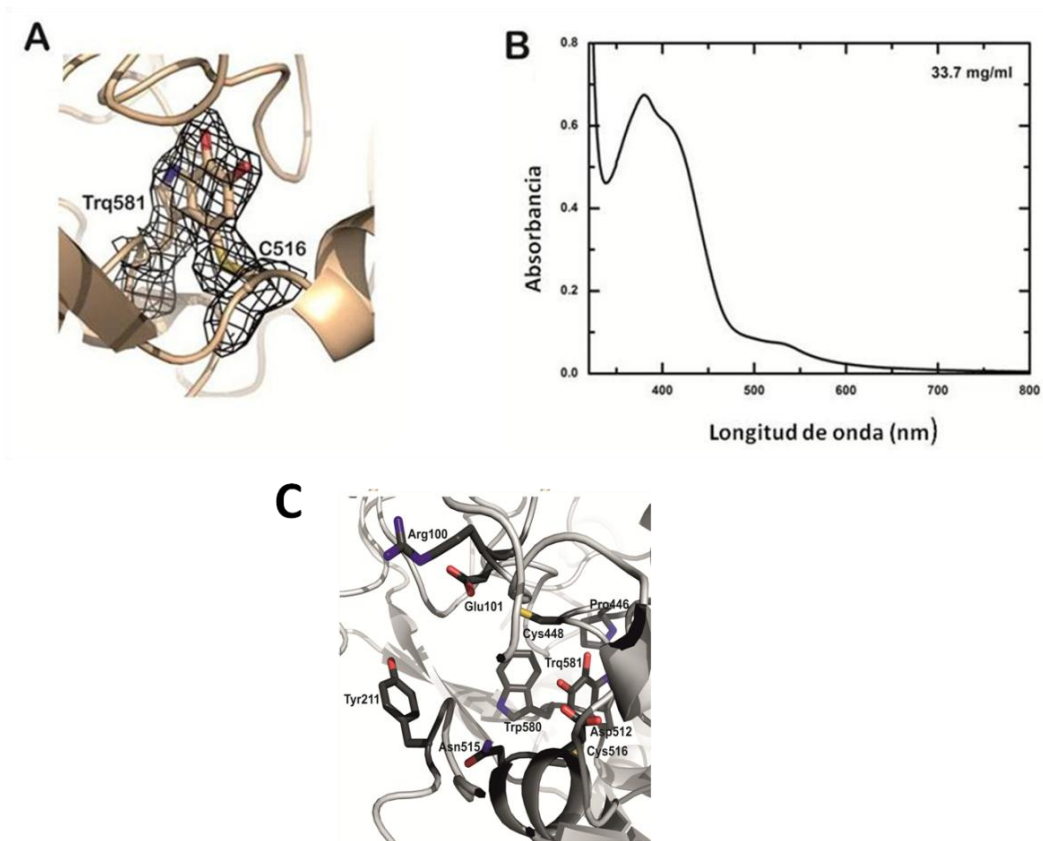


Figura IV. 7. Sitio activo de LodA. (A) Mapa de densidad electrónica del cofactor CTQ. (B) Espectro de absorción de LodA en el rango de cofactor quinónico. (C) Residuos de LodA en el entorno del centro activo y el canal de entrada al centro activo.

IV.2.3.2.2. Análisis de LodA activa por espectrometría de masas (MS).

Como se ha indicado previamente (**apartado IV.2.3.1**), la forma de LodA soluble y activa que contiene el cofactor CTQ muestra una masa molecular (MM) de $83070,95 \pm 0,86$ que corresponde a un incremento de +28 debido a la modificación post-traduccionnal que tiene lugar durante la síntesis del cofactor.

Cuando LodA activa purificada se sometió a digestión con tripsina y posterior análisis por HPLC MS/MS, se obtuvieron 20 péptidos no modificados que cubren un total de 356 aminoácidos (**tabla IV.1**). Adicionalmente se realizó una búsqueda no automatizada de péptidos modificados que permitió detectar una señal débil compatible con la presencia de un dipéptido en el que se localizaría el cofactor CTQ (**fig. IV.8**).

Secuencia	m/z experimental
(R)QGQVFK(V)	706,38
(K)DAYQIK(H)	737,38
(K)AAWYEFK(E)	942,45
(R)NHELDFDK(E)	1049,51
(K)HFESLGLR(T)	1059,56
(R)QSLIIDLGR(S)	1111,65
(R)SSNIRPRSGTR(M)	1230,67
(R)DGSAANKANRMK(Y)	1262,63
(K)NIEWTVHLANK(K)	1324,70
(K)GTTKKGKLMASYFEER(A)	1744,91
(R)DNSYSARGVPWRNASK(T)	1807,88
(K)VFGASNEELTLDSPNVK(N)	1819,91
(R)NFDLVPDMSATGHYK(S)	1972,87
(K)SDYVANFDRDILPIIQR(I)	2035,06
(R)DRNQNDGFPFFTER(N)	2086,92
(K)EVLVGQVTGNSDNETSLPVFFINANK(E)	2921,45
(K)AYFDVNGLTPERDECEETGCEPGDLTK(R)	3231,37
(R)SVSGVMATVEISINNIPETYLHPSYPSGELLQGSK(H)	3717,87
(R)LGNANTDNFVLPMEIGGLPYEHDVLDKPTTTVVNFK(D)	4073,03
(K)VIGDYDQPQQVLMSSVEGDILPLMPMNSGNSVSSSNFYDLTDNVVEK(F)	5348,48
(R)MACPWQADFFN TIQTVNFSEPSVNK(A) + (K)NVDEKVLPAYYSW PPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G) *	1766,8*

Tabla IV. 1. Péptidos de LodA recombinante activa detectados por digestión con tripsina y análisis por HPLC MS/MS. En rojo se indican péptidos más pequeños que también fueron detectados. Los residuos que forman parte del cofactor quinónico están destacados en verde. *Péptido detectado con un incremento en la MM de +28, que es compatible con la presencia de un cofactor quinónico de tipo CTQ uniendo ambos péptidos.

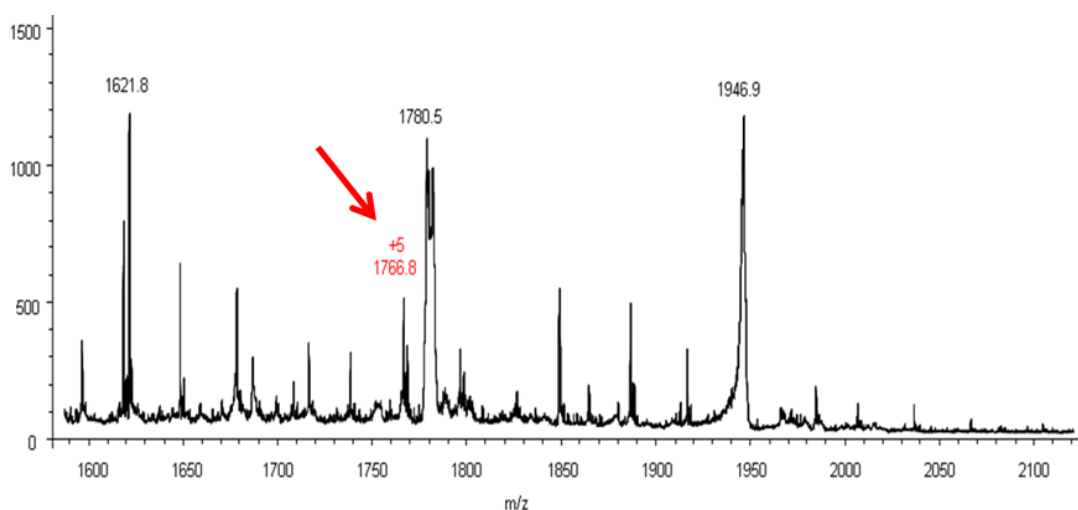


Figura IV. 8. LodA recombinante activa digerida con tripsina y analizada por HPLC-MS/MS. La flecha roja indica un pico compatible con la presencia de un péptido que incluiría el cofactor quinónico. El pico corresponde al péptido que posee una MM de 8828,9 con una carga de +5, relación m/z = 1766,8.

Por otra parte, cuando LodA activa purificada fue sometida de nuevo a digestión con tripsina y el análisis posterior se realizó con MALDI-TOF se obtuvieron un total de 18 péptidos que cubrían el 33,3% de la proteína (**tabla IV.2**). Estos péptidos fueron automáticamente detectados porque no tenían ninguna modificación post-traducciona. La búsqueda manual de péptidos que contuvieran residuos modificados reveló de nuevo (al igual que con el análisis MS/MS) una señal compatible con la presencia de un dipéptido conteniendo el cofactor quinónico CTQ. El dipéptido detectado posee una relación m/z de 8181,85, lo que supone un aumento de +28 con respecto al valor teórico de la suma de los dos péptidos por separado (**tabla IV.2**).

Secuencia	Teórico m/z (monoisotópico)	Experimental m/z (monoisotópico)
(R)QLDNK(V)	617,33	617,33
(K)DAYQIK(H)	737,38	737,38
(R)SSNIRPR(S)	829,46	829,46
(K)ESLEGKGTK(K)	948,50	948,50
(R)NASKTASSER(Q)	1050,52	1050,52
(K)HFESLGLTR(T)	1059,56	1059,56
(R)QSLIIDLGPR(S)	1111,65	1111,65
(R)ELNGNLLYGR(D)	1148,61	1148,61
(K)NIEWTVHLANK(K)	1324,70	1324,70
(K)ANRMKYNYFR(Q)	1525,74	1525,74
(K)DEAGcIRRQGQVFK(V)	1663,83	1663,83
(R)DECEEETGCEPGDLTK(R)	1754,67	1754,67
(K)VFGASNEELTLDSPNVK(N)	1819,91	1819,91
(K)SDYVANFDRDILPIQR(I)	2035,06	2035,06
(R)GINSYSQMVEHWSALAFIR(D)	2209,09	2209,09
(R)RQGQVFKVFGASNEELTLDSPNVK(N)	2663,38	2663,38
(K)AYFDVNGLTPERDEcEEETGcEPGDLTK(R)	3117,33	3117,33
(R)SVSGVMATVEISINNIPETYLHPSYPSGELLQGSK(H)	3717,87	3717,87
(R)MACPWQADFFNcTIQTVNFSEPSVVK(A) +	2977,33 +	8181,85*
(K)VPLPPAYYSWcPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)	5177,52	

Tabla IV. 2. Péptidos de LodA recombinante activa detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF. Los residuos que forman parte del cofactor quinónico están resaltados en verde. Las cisteínas en minúscula fueron detectadas modificadas por carbamidometilación (+57). *MM del dipéptido que corresponde a un incremento de +28, compatible con la presencia de un cofactor quinónico de tipo CTQ uniendo los péptidos.

Los resultados en este apartado revelan que el incremento de MM de la proteína completa detectado en el **apartado IV.2.3.1** es debido a la generación del cofactor CTQ. Los dos residuos que forman parte del cofactor están en diferentes péptidos que se mantienen unidos mediante el cofactor. Es importante destacar que en estos estudios no se detectaron péptidos que contuvieran los residuos que forman parte del cofactor, Cys516 and Trp581, sin modificar.

IV.2.3.3. Análisis de la forma precursora de LodA (PreLodA) por espectrometría de masas (MS).

Cuando PreLodA fue analizada por espectrometría de masas para determinar su masa molecular total, mostró un incremento de MM de +16 lo que sugiere que podría corresponder a una forma intermedia de la enzima. Con el fin de caracterizar esta posible forma intermedia en la formación de LodA activa, se realizaron análisis adicionales de espectrometría de masas.

PreLodA purificada se sometió a digestión con tripsina y a análisis por MS/MS, en el cual se detectaron 12 péptidos que cubrían el 26% de la proteína completa (**tabla IV.3**). Con esta técnica no se detectó ningún péptido que contuviera la Cys516, residuo que forma parte del cofactor quinónico. Por el contrario, se detectó un péptido de 45 aminoácidos que muestra un aumento de MM de +16 y que contiene el Trp581 que forma parte del cofactor CTQ.

Secuencia	m/z experimental
(R)MAcPWQADFFNcTIQTVNFSEPSVNK(A)	1545,74
(K)EVLVGQVTGNSEDNETSLPVFFINANK(E)	1461,85
(R)NFDLVPDAMYDSATGHYK(S)	988,15
(K)VFGASNEELTLDSPNVK(N)	1819,02
(K)NIEWTVHLANK(K)	1325,55
(R)NHELDFDK(E)	1049,20
(R)QSLIIDLGPR(S)	1113,19
(K)NIEWTVHLANK(K)	1326,52
(R)DILPIIQR(I)	968,31
(R)ELNGNLLYGR(D)	1149,12
(K)HFESLGTLR(T)	530,10
(K)VPLPPAYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)*	1732,9

Tabla IV. 3. Péptidos de PreLodA detectados tras digestión con tripsina y su análisis por MS/MS. Residuos que forman parte del cofactor quinónico resaltados en verde. *Péptido con +16.

Con el fin de profundizar en el análisis e intentar detectar el péptido que contiene la Cys516, PreLodA purificada se sometió a digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF. Se detectaron 19 péptidos que cubrían el 41,5% del total de la proteína (**tabla IV.4**). En este nuevo análisis, se detectaron dos péptidos que contenían los residuos Cys516 y Trp581, respectivamente (**tabla IV.4; fig. IV.9**).

Secuencia	m/z teórico (monoisotópico)	m/z experimental (monoisotópico)
(K)YYNYFR(Q)	925,42	925,42
(K)AAWYEFER(E)	942,45	942,45
(R)NHELDFDK(E)	1049,51	1049,51
(K)HFESLGLR(T)	1059,56	1059,56
(R)QSLIIDLGPR(S)	1111,65	1111,65
(K)LMASYFEER(A)	1145,53	1145,53
(R)ELNGNLLYGR(D)	1148,61	1148,61
(K)NIEWTVHLANK(K)	1324,70	1324,70
(K)GTTKGLMASYFEER(A)	1744,91	1744,90
(R)NQNDGFPPFTETER(N)	1815,79	1815,79
(K)VFGASNEELTLDSPNVK(N)	1819,91	1819,91
(R)ELNGNLLYGRDNSYSAR(G)	1941,94	1941,94
(R)NFDLVPDMSATGHYK(S)	1972,87	1972,88
(R)GINSYSQMVEHWSALAFIR(D)	2209,09	2209,09
(R)THYEWGNLPAGVSPDQSSVSATK(N)	2530,22	2530,22
(K)EVLVQVTGNSEDNETSLPVFFINANK(E)	2921,45	2921,45
(R)MAcPWQADFFNcTIQTVNFSEPSVVK(A)	3091,37	3091,37
(K)AYFDVNGLTPERDEcEEETGCEPGDLTK(R)	3174,35	3174,35
(K)VPLPPAYYSWcPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)	5177,52	5193,52*

Tabla IV. 4. Péptidos de PreLodA detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF.

Residuos que forman parte del cofactor quinónico resaltados en verde. Las cisteínas en minúscula fueron detectadas modificadas por carbamidometilación (+57). *Péptido que contiene el Trp581, detectado con la MM indicada que corresponde a un incremento de +16.

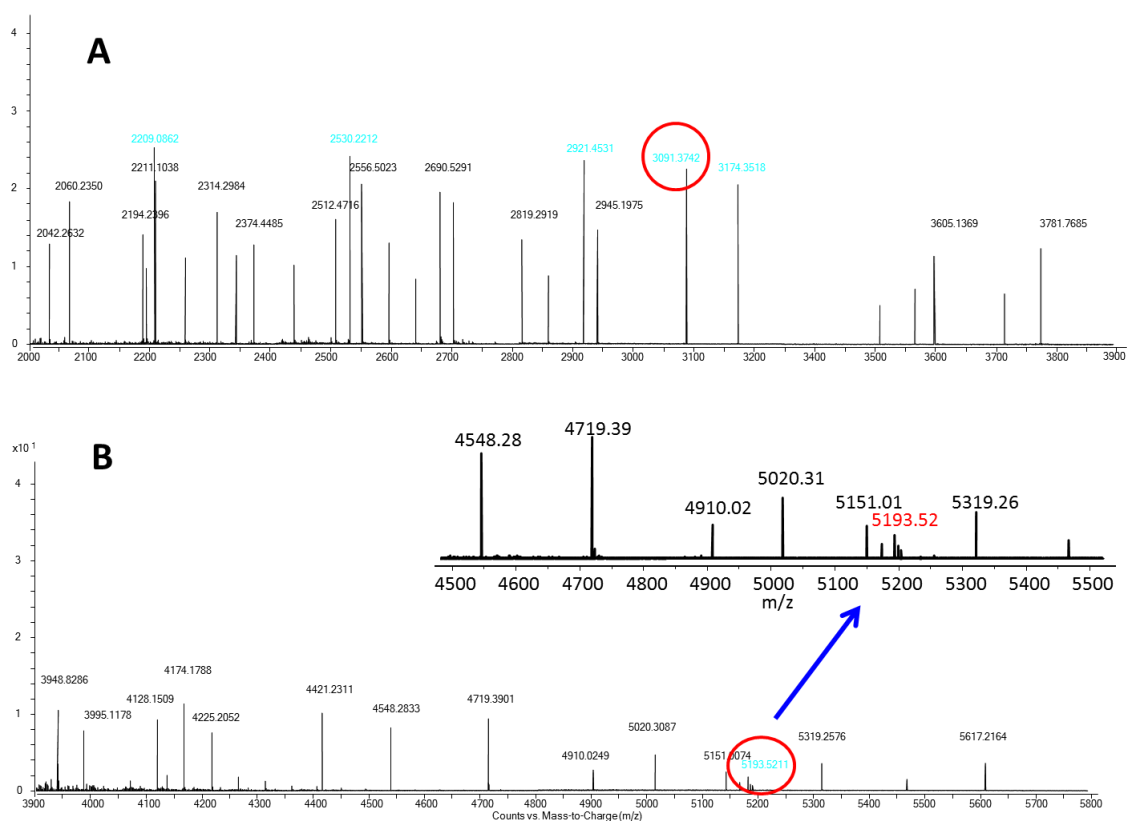


Figura IV. 9. Análisis de PreLodA recombinante por MALDI-TOF tras digestión con tripsina. (A) Se muestra un pico compatible con el péptido que contiene la Cys516 forma parte del cofactor quinónico sin ninguna modificación. (B) Se muestra un pico compatible con el péptido con un aumento de +16 en su masa que contiene el Trp581. En azul se muestran los picos correspondientes a LodA.

El primer péptido detectado contiene dos cisteínas, incluyendo Cys516, que fueron detectadas carbamidometiladas. La relación m/z de 3091,38 de este péptido, coincide con su masa teórica esperada (**tabla IV.4; fig. IV.9A**). Esto indica que este residuo está libre, es decir, que no está formando parte del cofactor. El segundo péptido detectado contenía el Trp581 y poseía una relación m/z de 5193,52 (**tabla IV.4, fig. IV.9B**). Este valor al compararlo con la masa teórica esperada era indicativo de un incremento de +16.

Para determinar cuál era el residuo modificado en este último péptido detectado (VPLPPAYYSYWWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR), una nueva muestra de PreLodA se digirió con tripsina y fue sometida a un análisis ESI-MS/MS para intentar secuenciar el péptido. Aunque se detectó el mismo pico indicado en la **tabla IV.3**, no fue posible obtener resultados concluyentes del análisis, probablemente debido al gran tamaño que tiene este péptido.

Con el fin de evitar el problema anteriormente mencionado, PreLodA fue digerida con proteasas alternativas. En primer lugar se realizó un análisis de la secuencia de LodA usando una herramienta que predice el tamaño de los fragmentos esperados tras la

digestión por diferentes proteasas (http://web.expasy.org/peptide_mass/). En función de los resultados obtenidos, se eligieron para los ensayos posteriores las proteasas quimiotripsina y pepsina, que proporcionaban fragmentos de pequeño tamaño conteniendo el Trp581. Los productos de PreLodA obtenidos tras la digestión con cada una de ellas por separado fueron analizados por ESI-MS/MS.

Con ambas enzimas fue posible detectar un péptido que contenía el Trp581 y que mostraba el incremento de +16. Con quimiotripsina el péptido detectado fue WWPPQSPWDVL ($m/z=1426,61$). Cuando se usó pepsina, el péptido detectado fue WPPQSPWL ($m/z=913,43$). El análisis ESI-MS/MS de este último péptido indicó claramente que el residuo con el incremento de MM de +16 es el Trp581, porque el único ión γ con ese aumento de masa fue el que contenía ese residuo (**fig. IV.10**). Este incremento de masa es compatible con la inserción de un único átomo de oxígeno en forma de grupo hidroxilo.

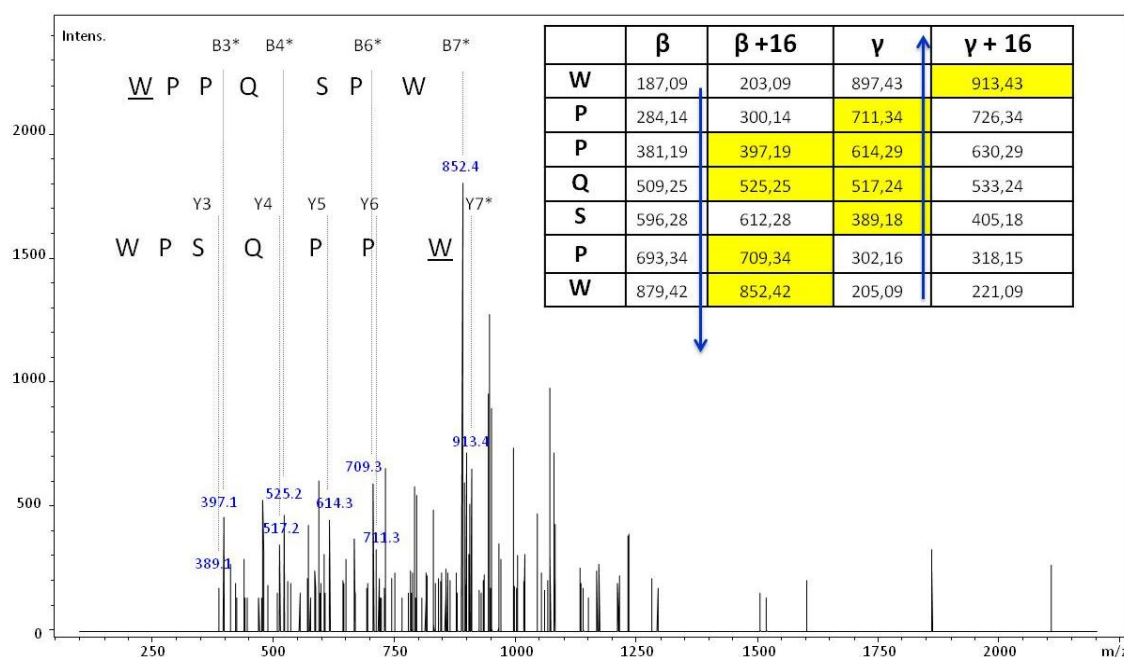


Figura IV. 10. Espectro del péptido W(581)PPQSPW obtenido por digestión con pepsina de PreLodA recombinante y su análisis por ESI-MS/MS. Los iones γ y β detectados se muestran resaltados en color amarillo. Los iones marcados con un asterisco (*) muestran un incremento de masa de +16 debido a una modificación post-traducciona. La tabla insertada muestra los iones teóricos que se podrían detectar, resaltando en amarillo los detectados.

II.2.3.4. Análisis de LodA obtenida de los cuerpos de inclusión por espectrometría de masas (MS)

A partir de cultivos inducidos con vectores que contenían solo *lodA* se obtuvo una tercera forma molecular inactiva a partir de los cuerpos de inclusión. Cuando se analizó por MS la MM de la proteína completa, el resultado obtenido indicó la ausencia de modificación post-traducciona de la proteína (**apartado IV.2.3.1**). Con el objetivo de detectar los péptidos que contuvieran los residuos que forman parte del cofactor, esta muestra fue digerida con tripsina y analizada por MALDI-TOF. Se detectaron 13 péptidos que cubrían el 32,09% del total de la proteína (**tabla IV.5**).

Secuencia	m/z teórico (monoisotópico)	m/z experimental (monoisotópico)
(R)SGTRMRG(-)	764,38	764,383
(R)GVPWRNASK(T)	1014,55	1014,55
(K)HFESLGLTLR(T)	1059,56	1059,56
(R)QSLIIDLGPR(S)	1111,65	1111,65
(K)NIEWTVHLANK(K)	1324,70	1324,70
(R)SSNIRPRSGTR(M)	1230,67	1230,67
(K)DEAGCIRRQGQVFK(V)	1606,83	1606,81
(R)DRNQNDGPFPTETER(N)	2086,92	2086,92
(K)NIEWTVHLANKKAAWYEFR(E)	2376,22	2376,22
(R)THYEWGNLPAGVSPDQSSVSATK(N)	2530,22	2530,22
(K)RMACPWQADFFNCTIQTVNFSEPSVNK(A)	3133,43	3133,43
(K)VFGASNEELTLDSPNVKNIEWTVHLANKK(A)	3253,69	3253,69
(K)VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)*	5177,52	5193,52

Tabla IV. 5. Péptidos de LodA extraída de los cuerpos de inclusión detectados por digestión con tripsina y análisis por MALDI-TOF. Los residuos que forman parte del cofactor quinónico resaltados en verde. *Péptido que contiene el Trp581 detectado con una MM que corresponde a un incremento de +16.

En este nuevo análisis, se detectaron dos péptidos que contenían los residuos Cys516 y Trp581, respectivamente (**tabla IV.5**). Se detectó un péptido de 27 aminoácidos (RMACPWQADFFNCTIQTVNFSEPSVNK) que contenía la Cys516 sin modificar (**tabla IV.5**). También se detectó un péptido que contenía el Trp581, con una relación m/z de 5193,52 (**tabla IV.5**). Este valor comparado con la masa teórica esperada indicó un incremento +16. Este último dato inesperado sugiere que LodA obtenida a partir de los cuerpos de inclusión presenta al igual que PreLodA un átomo de oxígeno extra en el triptófano que forma parte del cofactor. Sin embargo, la MM de la proteína completa no muestra esta modificación. Esta diferencia podría ser debida a que durante el proceso de extracción de los cuerpos de inclusión y posterior digestión con proteasas se facilitase la autooxidación de este residuo generando así PreLodA.

IV.3. ANÁLISIS DE RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LodA.

IV.3.1. Residuos en el entorno del centro activo.

Hasta el momento, LodA y GoxA son las únicas oxidasas descritas que contiene un cofactor de tipo CTQ (Okazaki *et al.*, 2013; Campillo-Brocal *et al.*, 2013). Debido a su carácter novedoso se conoce poco acerca de este tipo de proteínas, particularmente en relación al mecanismo de síntesis del cofactor. Por ello, para profundizar en el estudio de las relaciones estructura-función en este tipo de proteínas se analizaron mediante mutagénesis dirigida diversos residuos localizados en el entorno del centro activo.

Como se ha comentado antes, LodA y GoxA de *M. mediterranea* son las únicas enzimas conocidas que poseen un cofactor derivado del triptófano con actividad oxidasa. Las otras enzimas con este tipo de cofactor, MADH y AADH que contienen un cofactor TTQ y QHNDH que contiene un cofactor CTQ son deshidrogenasas (McIntire *et al.*, 1991; Govindaraj *et al.*, 1994; Datta *et al.*, 2001). Aunque en su estructura general MADH y QHNDH no se parecen, comparten que próximo a su centro activo hay dos residuos de aspártico conservados que ocupan posiciones idénticas (Jones *et al.*, 2005). Entre la estructura general de LodA y QHNDH tampoco existe parecido. Sin embargo, si se compara la estructura del entorno del centro activo de LodA y de la subunidad γ de QHNDH si se observan similitudes (**fig. IV.11.A**). Se puede observar que además del cofactor CTQ, los dos residuos de aspártico conservados (Asp12 y Asp33) en QHNDH anteriormente mencionados ocupan posiciones similares a un residuo de aspártico (Asp512) y a un residuo de cisteína (Cys448) en LodA (**fig. IV.11A**). Por otra parte, si se compara LodA con MADH se observa un resultado parecido, aunque tampoco existe similitud en el plegamiento general de estas dos proteínas, los dos aspárticos conservados de MADH (Asp32 y Asp76) están cercanos a la posición del Asp512 y la Cys448 de LodA (**fig. IV.11B**). Estos datos sugieren que los residuos localizados en estas posiciones podrían tener un papel importante en la catálisis, en la síntesis del cofactor, o en ambos procesos.

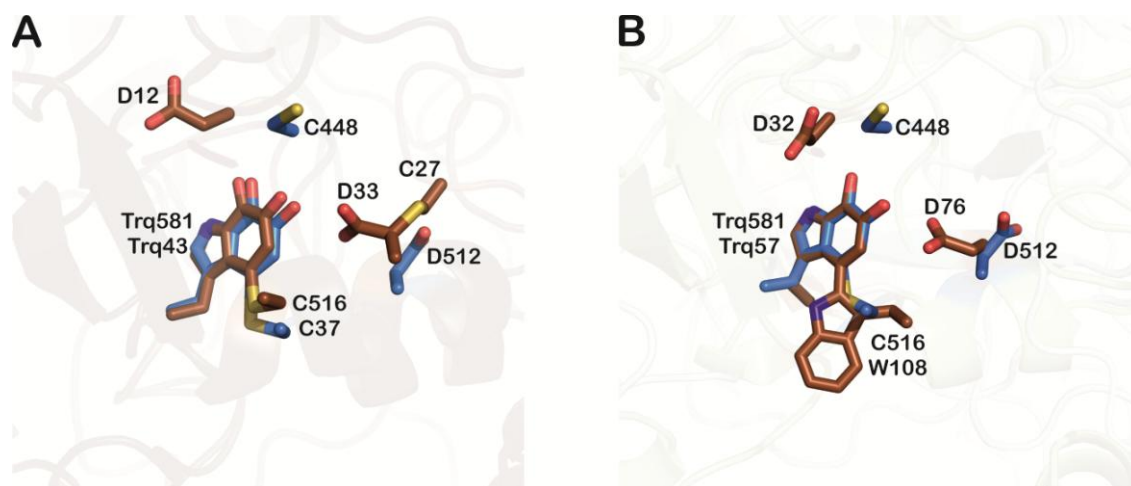


Figura IV. 11. Superposición de residuos en el entorno del centro activo de LodA con otras proteínas con cofactores derivados del Trp. (A) Superposición con QHNDH. Se muestran ambos cofactores CTQ y los residuos Cys448 y Asp512 de LodA (PBD ID 2YMW) con los correspondientes residuos Asp12 y Asp33 de la subunidad y de QHNDH (PDB ID IJIV). (B) Superposición con MADH (PDB ID 2BBK). Los residuos triptofilquinona fueron alineados manualmente. Después de esto, los residuos Asp32 y Asp76 de la subunidad β de MADH se localizan en posiciones similares a los residuos Cys448 y Asp512 de LodA.

Con el fin de explorar el mecanismo de síntesis del cofactor de LodA, se mutaron a Ala (**apartado III.17** de Materiales y métodos) los residuos que forman parte del cofactor quinónico (Cys516 y Trp581) y los dos residuos Asp512 y Cys448 que se encuentran bien alineados con los dos aspárticos conservados en QHNDH y MADH. Las versiones mutantes de LodA fueron analizadas en comparación con la proteína sin mutar (HisLodA) expresadas todas en ellas en presencia de LodB.

La mutación en el triptófano del cofactor, W581A, generó una proteína con una MM de $82929,3 \pm 0,64$. Esta MM podría corresponder a la proteína mutante sin ninguna modificación post-traducciona. De acuerdo a estas observaciones, LodA W581A no mostró actividad (**fig. IV.12A**). En concordancia con estos resultados, la forma multimérica de LodA (MLodA) que es la que muestra actividad enzimática no pudo ser detectada (**fig. IV.12B**). Estos resultados confirman que la síntesis del cofactor es esencial para la actividad LodA.

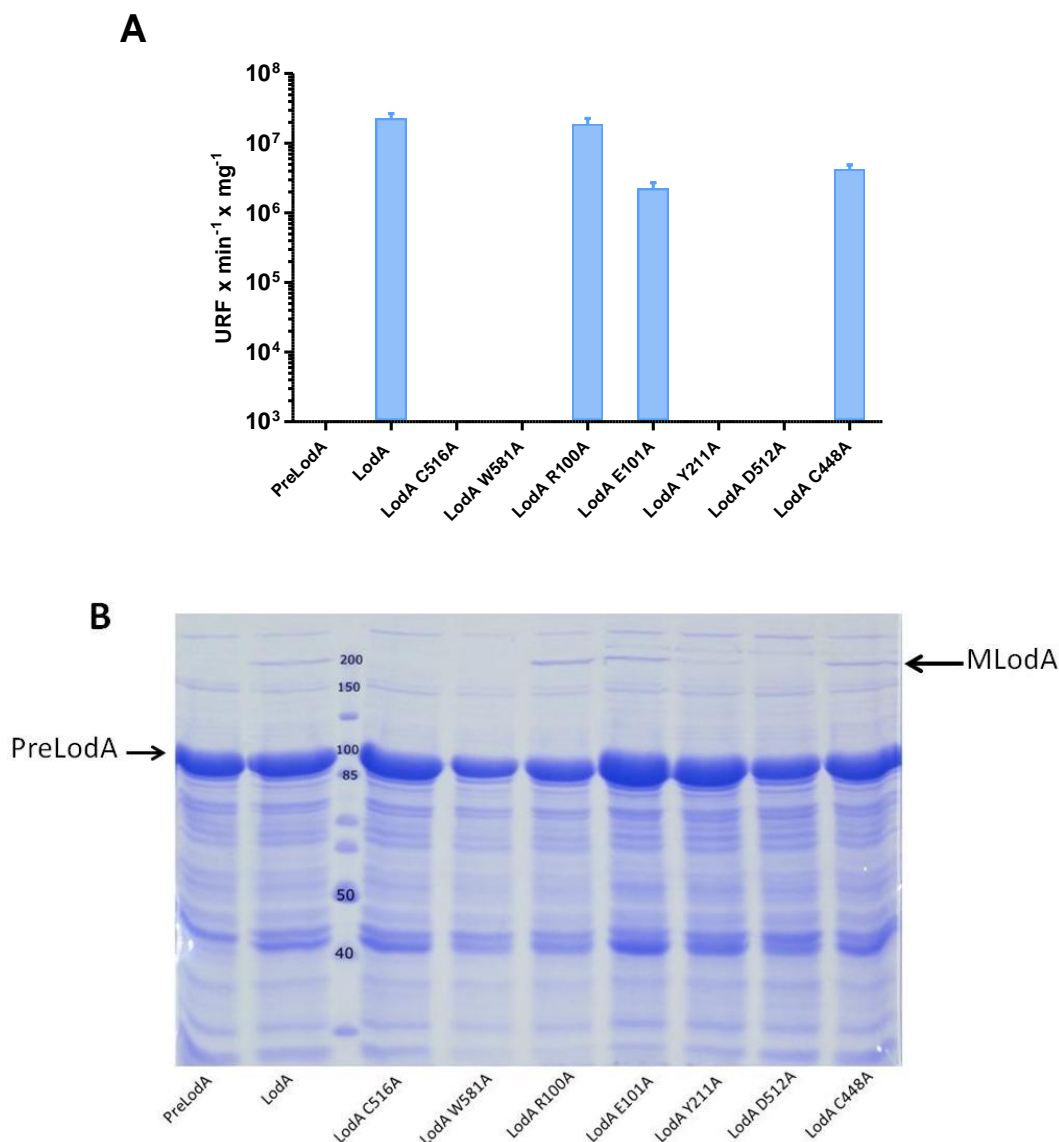


Figura IV. 12. Expresión heteróloga de HisLodA y de algunos mutantes en *E. coli* Rosetta (DE3). Los mutantes fueron generados en el plásmido pETLODAB15 conteniendo los genes *lodA* y *lodB*. PreLodA solo contiene *lodA* expresada desde el plásmido pETLODA15. En todos los casos, LodA se expresa fusionada a una etiqueta de poli-His en N-terminal. (A) Actividad enzimática de la proteína purificada y (B) SDS-PAGE de extractos bajo condiciones no desnaturalizantes. MLodA: LodA multimérica.

Cys516 es el segundo residuo que forma parte del cofactor CTQ en la proteína nativa. La mutación de este residuo a Ala genera una proteína en el sistema recombinante con una MM de $83012,34 \pm 0,77$. De la misma manera que en el mutante previo, esta MM está en concordancia con la masa molecular esperada de la proteína mutante sin ninguna modificación post-traducciona. Para confirmar este punto, LodA C516A fue digerida con tripsina y los péptidos obtenidos fueron analizados por MALDI-TOF. Dos picos de interés fueron detectados (**tabla IV.6**). El primero corresponde al péptido que contiene la mutación C516A. El segundo péptido contiene el Trp581 sin ningún tipo de modificación post-traducciona. La detección de este último pico y el hecho de que la

MM de la proteína completa esté sin modificar indican que la mutación C516A impide la primera hidroxilación de Trp581. Una posible explicación para este resultado sería que la mutación en Cys516 podría generar algún tipo de cambio conformacional en la proteína que afectaría a la orientación del Trp581 evitando la primera hidroxilación que se produce en ausencia de LodB. Tanto la mutación en la Cys516 como la no hidroxilación del Trp581 impiden la síntesis del cofactor. En consecuencia, la proteína mutada no muestra actividad enzimática, ni se detecta la forma multimérica en SDS-PAGE (**fig. IV.12**).

	Secuencias	m/z	Modificación post-traduccional de la MM
LodA activa	(R)MACPWQADFFNCTIQTVNFSEPSVNK(A) + (K)VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)	8181,85	+28
PreLodA	(R)MACPWQADFFNCTIQTVNFSEPSVNK(A)	3091,37	0
	(K)VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYAR(G)	5193,52	+16
LodA C516A	(R)MACPWQADFFNCTIQTVNFSEPSVNK(A)	2945,36	0
	(K)VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQINYARGIN SYSQMVEHWSALAFIR(D)	7367,58	0
LodA D512A	(R)MACWQAFFNCTIQTVNFSEPSVNK(A)	2933,34	0
	(K)NVDEK VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQIN YARGINSYSQMVEHWSALAFIR (D)	7952,88	0
LodA C448A	(K)NVDEK VPLPPAYYSYWPPQSPWDVLTGELDTGQLHSHLPAGQQIN YARGINSYSQMVEHWSALAFIR (D)	7952,88	0

Tabla IV. 6. Péptidos que contienen los residuos del cofactor CTQ detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis con MALDI-TOF de diferentes formas moleculares de LodA recombinante. Los residuos que forman parte del cofactor quinónico están resaltados en verde. Los residuos mutados aparecen en amarillo. Las cisteínas en minúscula fueron detectadas modificadas por carbamidometilación (+57).

La mutación LodA D512A también genera una proteína inactiva (**fig. IV.12**). La masa molecular de esta proteína fue de $83000,4 \pm 0,81$. Como en los mutantes previos, esta MM correspondía a la proteína mutante sin ninguna modificación post-traduccional. Los análisis por MALDI-TOF mostraron dos picos interesantes (**tabla IV.6**). Uno de ellos posee una relación $m/z = 2933,34$ y contiene el residuo mutado. El segundo péptido, con relación $m/z = 7952,88$, contiene el Trp del cofactor sin ninguna modificación post-traduccional. Este pico es el mismo que fue detectado en el mutante C516A, excepto que es 5 aminoácidos (NVDEK) más largo en el extremo N-terminal, indicando que la tripsina no digirió un sitio. Los resultados obtenidos indican que Asp512 es esencial

para la biosíntesis del cofactor en LodA a nivel de la primera hidroxilación que genera PreLodA. Un papel similar ha sido propuesto para el residuo Asp76 conservado en MADH (Jones *et al.*, 2005).

La proteína que se genera en el sistema recombinante cuando LodA tiene la mutación C448A muestra una MM de $83012,62 \pm 0,75$, que de nuevo corresponde a la masa de la proteína sin ninguna modificación. De acuerdo con este resultado, el análisis mediante MALDI-TOF de LodA C448A reveló que el Trp581 está sin modificar ya que se observó el mismo pico que en el mutante D512A con una relación $m/z = 7952,88$ (**tabla IV.6**). Sin embargo, a diferencia de todos los mutantes previos analizados, la actividad enzimática de este mutante no fue nula, sino que fue aproximadamente el 19% de actividad de la enzima silvestre (**fig. IV.12A**). Además, en geles SDS-PAGE fue posible detectar MLodA (**fig.IV.12B**). Estos resultados son de difícil interpretación. Una posibilidad es que la mutación C448A genere una mezcla de LodA activa e inactiva, la mayoría de ella en la última forma, siendo esta la detectada en nuestro análisis. Cuando MADH fue mutado en el residuo Asp12 que se encuentra localizado en una posición similar a la Cys448 de LodA, se obtuvo un resultado similar, detectándose una mezcla de formas moleculares (Jones *et al.*, 2005). Resultados recientes obtenidos en colaboración con el laboratorio del Dr. Víctor L. Davidson (UCT, USA) sugieren una posibilidad alternativa consistente en la modificación de la actividad enzimática de la proteína (Sehanobish *et al.*, 2015).

IV.3.2. Residuos en el canal de entrada al centro activo.

La estructura de LodA muestra una serie de residuos que podrían encontrarse en el canal de entrada al centro activo (**fig. IV.7C**). De estos, los residuos Tyr211, Glu101 y Arg100 fueron mutados a Ala y las versiones mutantes de LodA generadas fueron analizadas en comparación con la proteína silvestre.

De entre los tres residuos analizados, solamente la mutación Y211A genera pérdida completa de actividad (**fig. IV.12A**). Pese a esta pérdida de actividad, LodA Y211A sí genera la forma multimérica como se observa en los geles SDS-PAGE (**fig. IV.12B**). Analizando esta proteína por HPLC-ESI MS TOF se observó una MM de $82978,5 \pm 0,37$, lo que supone un aumento de +28, indicativo de que presenta el cofactor. Sin embargo, también fue posible detectar la MM (82950,82) de la proteína sin modificar, sugiriendo que está presente una mezcla de proteína modificada y sin modificar.

Por otra parte, aunque en el mutante E101A fue posible detectar MLodA en geles SDS-PAGE (**fig. IV.12B**) solamente se observó el 10% de actividad de la enzima nativa (**fig.IV.12A**). Estos resultados indican que la mutación de este residuo afecta a la actividad enzimática de la proteína. Por último, en el mutante R100A se detectan

niveles de actividad similares a la enzima nativa (**fig. IV.12A**), observándose MLodA en los geles SDS-PAGE (**fig. IV.12B**). Ambos datos sugieren que este residuo no es importante para la generación de la forma activa de LodA ni para su actividad enzimática.

IV.3.3. Análisis del extremo C-terminal de LodA.

Análisis previos de LodA mostraron que aunque es una proteína secretada al medio extracelular (Lucas-Elio *et al.*, 2005), no era posible reconocer en su extremo N-terminal ningún tipo de péptido señal (Lucas-Elio *et al.*, 2006). Esto sugiere que LodA posee un mecanismo de secreción no convencional. En este sentido, en el extremo C-terminal se detecta un dominio con numerosos residuos con carga positiva (**fig. IV.13**). Por similitud con otras proteínas, estos residuos podrían estar relacionados con mecanismos de secreción (Vergunst *et al.*, 2005). Datos previos de nuestro grupo de investigación mostraron que las fusiones realizadas en extremo C-terminal de LodA causaban una disminución en la actividad enzimática extracelular detectada respecto a la cepa silvestre, sugiriendo que esta zona podría participar en el mecanismo de secreción de la proteína en *M. mediterranea* (Gomez *et al.*, 2010).

```

1  MALSVHPSIG  VARLGNANTD  NFVLNPMEIG  GLPYEHDVDL  KPTTTVVNFK
51  DEAGCIRROG  QVFKVFGASN  EELTLDSPNV  KNIEWTVHLA  NKKAAWYEFR
101 ELNGNLLYGR  DNSYSARGVP  WRNASKTASS  ERQSLIIDLG  PRSVSGVMAT
151 VEISINNIPE  TYLHPSYPSG  ELLQGSKHFE  SLGTLRTDSQ  GRLIVLGGYG
201 FAGGNTDLSG  YGGGDDWYDD  ISDGSVTCVV  TYSDDSSETS  TAWMVVGS PD
251 FAPEIVNIST  LSDTCFDVGV  RNFDLVPMY  DSATGHYKSD  YVANFDRDIL
301 PIIQRISQYQ  WVSINVQSMG  FFSFQFDYRD  GSAANKANRM  KYNYFRQLD
351 NKVIGDYDQP  QQVLMSSSEV  GDILPLMPMN  SGSNSVSSSN  FYDLTDNVVE
401 KFLALDATQL  FLLGQWAEGE  FTAGPADDYP  VSDMDTASIG  NCVGLPMCPG
451 IEMTWSLQNP  VIYKDAYQIK  HYQDKAYFDV  NGLTPERDEC  EEETGCEPGD
501 LTKRMACPWQ  ADFFNCTIQT  VNFSEPSVNK  ASQTETVTSR  THYEWGNLPA
551 GVSVPDQSSV  SATKNVDEKV  PLPPAYYSYW  WPPQSPWDVL  TGELDTEGQL
601 HSHLPAGQQI  NYARGINSYS  QMVEHWSALA  FIRDRNQND  GFPFFTETER
651 NHELDFDFKEV  LVGQVTGNSE  DNETSLPVFF  INANKESLEG  KGTKKGK LMA
701 SYFEEERAFSK  VRSSNIRPRS  GTRMRG

```

Figura IV. 13. Secuencia aminoacídica de LodA. En azul se marcan los residuos básicos del extremo C-terminal. En amarillo se destacan los 46 aminoácidos del extremo C-terminal rico en residuos básicos deletados en LodACT. Subrayados en rojo aparecen los 9 residuos deletados en LodACT2. Resaltados en verde se muestran la Cys516 y el Trp581 que forman parte del cofactor quinónico.

Para analizar si los residuos básicos situados en el extremo C-terminal participan en el mecanismo de secreción de LodA, se crearon mutantes de esta proteína en los que se deletaron fragmentos de diferentes tamaños en su extremo C-terminal. La actividad de los mutantes se ensayó tanto en el sistema recombinante, para ver su efecto sobre la actividad, como en el nativo. En este último, además del efecto de la

delección sobre la actividad, se podría detectar si esta afecta a la secreción de la proteína.

IV.3.3.1. Sistema recombinante.

Con el fin de comprobar si deleciones en el extremo C-terminal tenían algún tipo de efecto sobre la actividad lisina oxidasa, se construyeron dos plásmidos en los que LodA tenía deleciones de diferente tamaño en este extremo. pETLODACT15 contiene el gen *lodACT* (delección de 46 aminoácidos) y pETLODACT2-15 el gen *lodACT2* (delección de 9 aminoácidos) (**fig. IV.13**). La construcción de estos vectores se describe en el **apartado III.15.1** de Materiales y métodos.

Ambos vectores están contruidos a partir del vector pET15 que añade una etiqueta de poli-His al extremo N-terminal de LodA. Para expresar LodB necesaria para la síntesis del cofactor (**apartado IV.4.2.1**) se utilizó el vector pETMBPLODB28. Este plásmido lleva LodB fusionada a una etiqueta de MBP en el extremo N-terminal (**apartado III.15.2**), y permite la generación de LodB en altas cantidades. Ensayos preliminares mostraron que este vector permitía obtener actividad lisina oxidasa en cultivos inducidos que además contienen otro vector que exprese LodA (**fig. IV.14A**). En concordancia con estos resultados, en estos cultivos se detectó la forma multimérica y activa de LodA (MLodA) (**fig. IV.14B**).

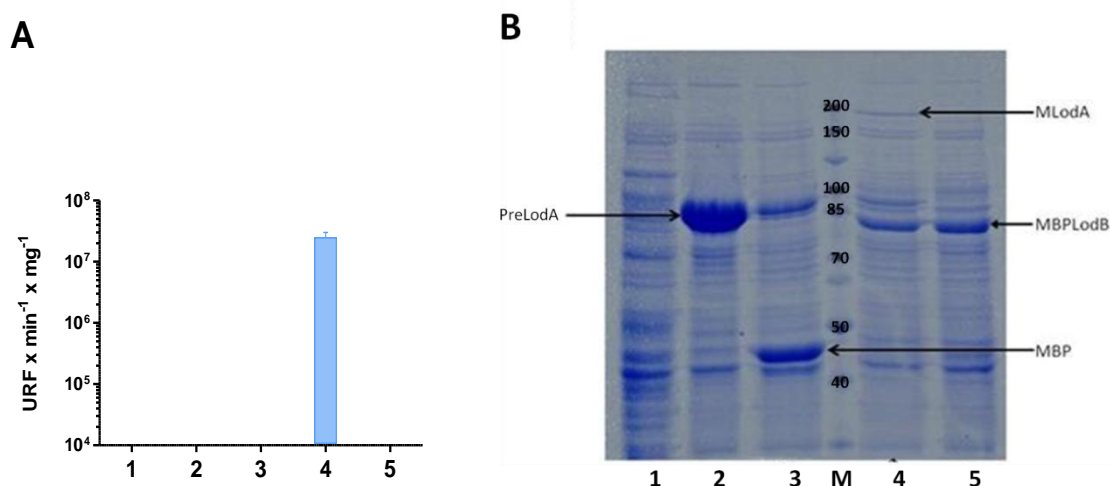


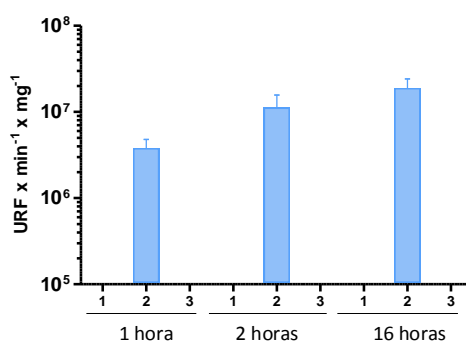
Figura IV. 14. Expresión recombinante de LodA en presencia de LodB fusionada a MBP. Cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo diferentes combinaciones de plásmidos fueron inducidos durante 16 h. (1) Control [sin plásmido]; (2) pETLODA11 [LodA]; (3) pETMBP28 [MBP], (4) pETLODA11 + pETMBPLODB28 [LodA + MBPLodB] y (5) pETMBPLODB28 [MBPLodB]. (A) Actividad lisina oxidasa. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. MLodA: multímero de LodA.

A continuación, se comparó la actividad obtenida cuando se expresó la copia silvestre de LodA con la de los dos plásmidos con deleciones en C-terminal. Estas deleciones se construyeron sobre la versión de LodA que contiene una fusión de poli-His en N-terminal (HisLodA). En todos los casos la inducción se realizó a 15 °C, a una concentración de IPTG de 1 mM. Se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de inducción (1 hora, 2 horas y 16 horas) para analizar la fracción soluble por SDS-PAGE y medir actividad lisina oxidasa.

En primer lugar, se ensayó la expresión de la proteína HisLodACT. Los cultivos con pETLODA15 + pETMBPLODB28 que expresaba HisLodA, mostraron actividad desde la primera hora de inducción. Por el contrario, en los cultivos en los que se indujo HisLodACT, la actividad lisina oxidasa no fue detectada ni tras 16 horas de inducción (**fig. IV.15A**). El análisis por SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes mostró que en los cultivos con HisLodA la forma multimérica activa de LodA (MLodA) fue detectada en cualquiera de los tiempos analizados. Sin embargo, cuando HisLodA tenía el extremo C-terminal deletado, MLodA no fue detectada (**fig. IV.15B**). Estos datos indican que los 46 residuos de la zona C-terminal son importantes para obtener la forma activa de LodA.

La presencia de la etiqueta de poli-His en HisLodACT ha permitido su purificación de los cultivos inducidos (datos no mostrados), indicando que se ha expresado correctamente pero no se ha generado la forma multimérica activa.

A



B

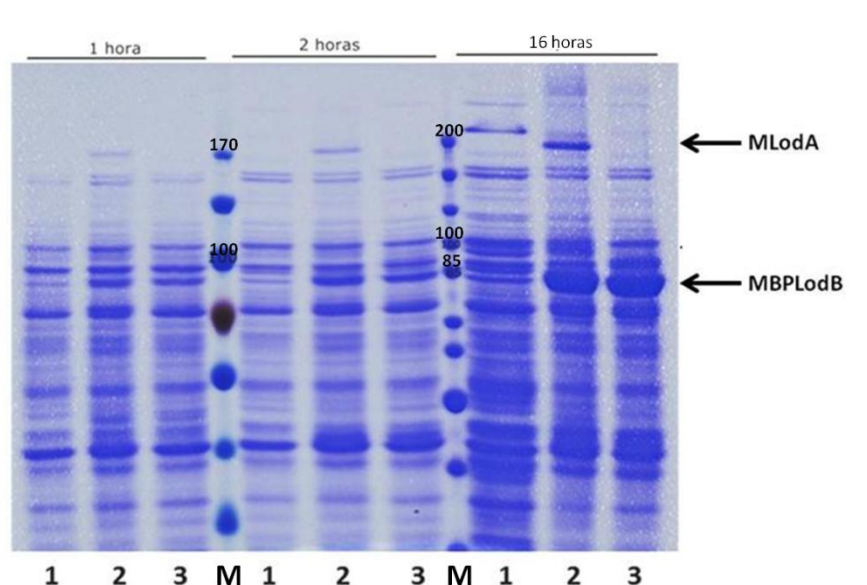
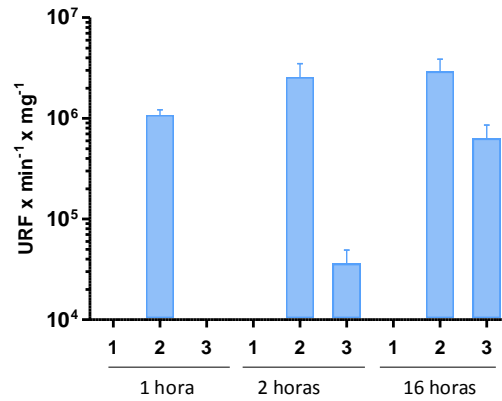


Figura IV. 15. Expresión recombinante de HisLodA y la versión mutante HisLodACT. (1) Control negativo [sin plásmido]; (2) pETLODA15 + pETMBPLODB28 [HisLodA + MBPLodB] y (3) pETLODACT15 + pETMBPLODB28 [HisLodACT + MBPLodB]. (A) Medida de actividad lisina oxidasa de los cultivos inducidos a diferentes tiempos (1 hora, 2 horas y 16 horas). (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Las flechas indican las proteínas detectadas. MLodA: multímero de LodA.

En una segunda serie de experimentos se decidió estudiar el efecto de la delección de un menor número de aminoácidos. La proteína HisLodACT2 carece de los últimos 9 residuos del extremo C-terminal (**fig. IV.13**). Las medidas de actividad lisina oxidasa mostraron que la actividad en el cultivo con HisLodACT2 fue menor que en la copia silvestre durante las primeras horas, pero aumentó con el tiempo (**fig. IV.16A**). Al igual que en el experimento anterior, cuando LodA completa estaba presente se detectó el multímero en cualquier tiempo de inducción. Sin embargo, en los cultivos inducidos que contenían HisLodACT2 únicamente se observó la forma multimérica en el período más largo de incubación (16 horas) (**fig. IV.16B**). Estos datos sugieren que LodA se genera más lentamente. Una posibilidad es que la zona C-terminal delecionada

participe en la generación de la forma activa de LodA, por ejemplo, interaccionando de algún modo con LodB.

A



B

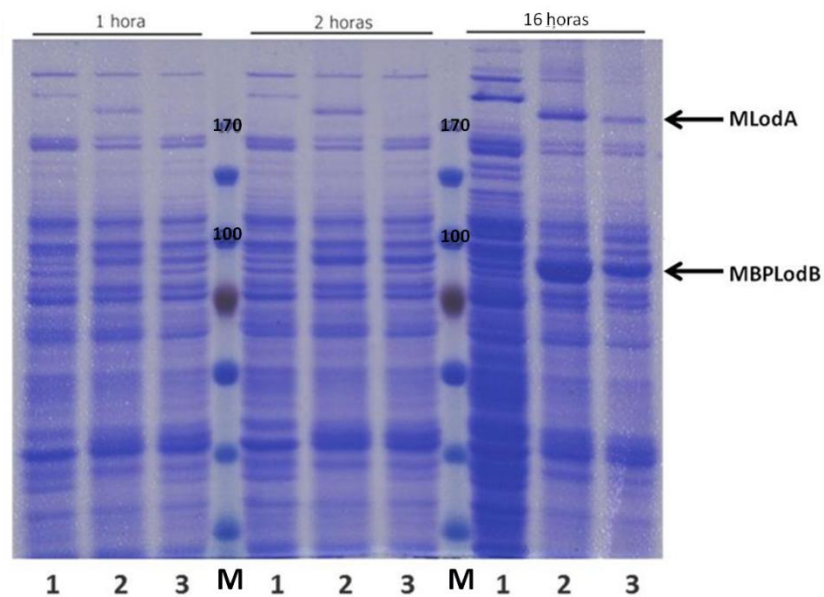


Figura IV. 16. Expresión recombinante de HisLodA y la versión mutante HisLodACT2. (1) Control negativo [sin plásmido]; (2) pETLODA15 + pETMBPLODB28 [HisLodA + MBPLodB] y (3) pETLODACT2-15 + pETMBPLODB28 [HisLodACT2 + MBPLodB]. (A) Medida de actividad lisina oxidasa de los cultivos inducidos a diferentes tiempos (1 hora, 2 horas y 16 horas). (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Las flechas indican las proteínas detectadas. MLodA: multímero de LodA.

IV.3.3.2. Sistema nativo.

Para estudiar el posible papel del extremo C-terminal de LodA en su secreción en *M. mediterranea*, se construyeron vectores conjugativos en los que se clonaron tanto la copia silvestre de *lodA*, con fusión de poli-His en N-terminal, como las versiones con deleciones en el extremo C-terminal descritas en el apartado anterior. Estos vectores fueron usados para la posterior movilización a *M. mediterranea* de los genes indicados. En primer lugar, se construyeron los plásmidos pBHisLODA que contiene el gen que codifica HisLodA y pBHisLODACT que codifica HisLodACT. La construcción de estos plásmidos se explica en el **apartado III.15.3** de Materiales y métodos. Se usó también un plásmido control que codifica LodA sin ningún tipo de modificación (pBLODAII) y el plásmido pBLODAHa que contiene LodA con una etiqueta de poli-His y un epítipo de Ha en el extremo C-terminal (Gomez *et al.*, 2010).

Los plásmidos descritos anteriormente se movilaron a la cepa *M. mediterranea* LDB que tiene delecionado el operón *lod* y se le ha introducido una copia del gen *lodB* (Gomez *et al.*, 2010). Se utilizó el protocolo descrito en el **apartado III.16** de Materiales y métodos, y se seleccionaron los transconjugantes. De esta forma se obtuvieron las cepas de *M. mediterranea* HLDA/B, HLDACT/B, LDA/B y LDAHa/B.

Las cepa LDA/B mostró niveles de actividad comparable a los de la cepa silvestre en concordancia con datos previos (Gomez *et al.*, 2010) (**fig. IV.17**). Por el contrario, en las cepas en las que LodA tenía una fusión en el extremo N-terminal (HLDA/B) o C-terminal (LDAHa/B) se observaron niveles de actividad inferiores a la cepa silvestre (**fig. IV.17**). En estos experimentos se observó además, que la deleción de 46 aminoácidos en C-terminal determinaba que no se observara actividad (**fig. IV.17**).

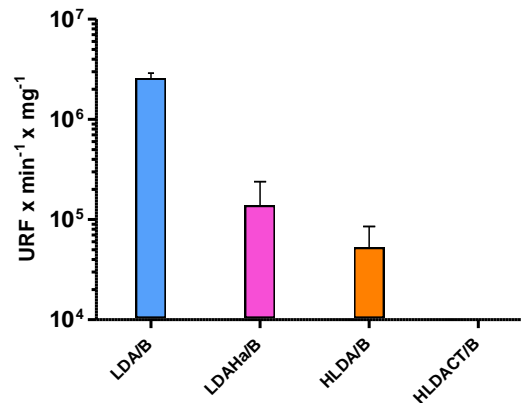


Figura IV. 17. Actividad lisina oxidasa en cepas de *M. mediterranea* con diferentes versiones de LodA modificadas en los extremos N o C-terminal. Actividad lisina oxidasa en sobrenadantes a las 48 horas en medio MNGL. LDA/B: cepa con copia silvestre de LodA. LDAHa/B: LodA fusionada en C-terminal a una etiqueta de poli-His y Ha; HLDA/B: LodA con fusión de poli-His en N-terminal; HLDACT/B: LodA igual que la anterior pero con 46 aminoácidos deletados en el extremo C-terminal.

Puesto que la presencia de etiquetas tanto en el extremo N- como C-terminal, tenía un efecto en la actividad de LodA, y esto podía interferir con la detección del efecto de las deleciones en C-terminal, en otra serie de experimentos se construyeron plásmidos que codificaban LodA sin fusiones y con las deleciones. El plásmido pBLODACT que contiene el gen que codifica LodACT (delección de 46 aminoácidos) y pBLODACT2 contiene el gen que codifica LodACT2 (delección de 9 aminoácidos). La construcción de estos plásmidos se explica en el **apartado III.15.3** de Materiales y métodos. La movilización de estos plásmidos se realizó utilizando el protocolo descrito en el **apartado III.16** de Materiales y métodos y se seleccionaron los transconjugantes. Las cepas obtenidas *M. mediterranea* LDACT2/B y LDACT/B, expresan LodA mutada en C-terminal sin ningún tipo de fusión en N-terminal. Estas cepas y la cepa control LDA/B se cultivaron en medio MNGL y se recogieron muestras a diferentes tiempos (4, 8, 10, 24, 32, 48 y 72 horas). En estas muestras se midió actividad lisina oxidasa tanto en los extractos celulares como en sobrenadantes.

Tras analizar la fracción soluble y los sobrenadantes recogidos a diferentes tiempos no se detectó actividad lisina oxidasa en cultivos de LDACT/B (datos no mostrados). Estos datos concuerdan con los obtenidos en el sistema recombinante y en el nativo con HLDACT/B indicando que la presencia de estos 46 aminoácidos es esencial para la actividad enzimática. La ausencia de actividad impide estudiar si además esta zona participa en la secreción.

A continuación, se analizó la cepa LDACT2/B que tiene una delección más pequeña en LodA. Al igual que en la cepa con LodA silvestre, en los sobrenadantes de esta cepa se

detectó actividad lisina oxidasa a partir de las 24 horas. Sin embargo, los niveles detectados son menores que los detectados en la cepa control (**fig. IV.18**).

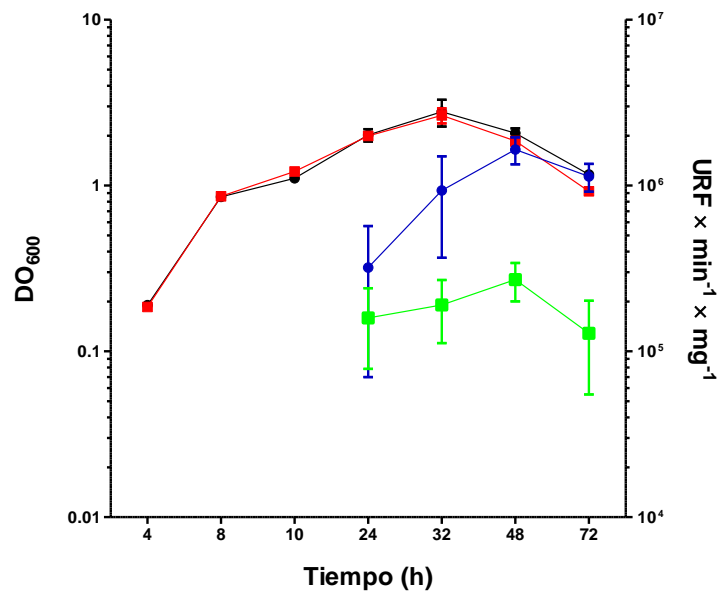


Figura IV. 18. Actividad lisina oxidasa en sobrenadantes de cultivos de *M. mediterranea* LDA/B (WT) y LDACT2/B medio MNGL. En el eje izquierdo se representa el crecimiento celular medido como DO_{600} . En la derecha, la actividad lisina oxidasa extracelular detectada. DO WT: ●, DO LodACT2: ■, SN WT: ●, SN LodACT2: ■.

Paralelamente se analizaron los extractos celulares. En este caso, fue necesaria una etapa intermedia de precipitación con etanol, para eliminar las catalasas que interfieren con la medida de actividad lisina oxidasa. Se observó que en la cepa LDACT2/B la actividad aparecía más tarde que en la cepa control, y además en comparación con ésta era menor (**fig. IV.19**). Estos datos concuerdan con los obtenidos en el sistema recombinante donde la delección de 9 aminoácidos en el extremo N-terminal determinaba que la actividad apareciese después y fuese menor que en la cepa control (**fig. IV.16B**).

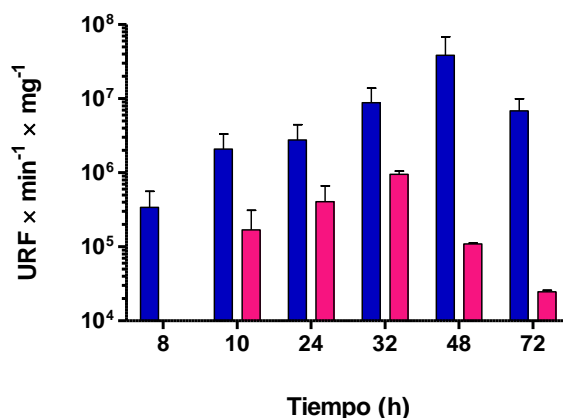


Figura IV. 19. Actividad lisina oxidasa en extractos celulares de *M. mediterranea* LDA/B y LDACT2/B. *M. mediterranea* fue cultivada en medio MNGL a diferentes tiempos. La cepa LDA/B (barras azules) contiene una copia silvestre de LodA. La cepa LDACT2/B (barras rosas) contiene LodA con una delección de 9 aminoácidos en C-terminal.

Los datos obtenidos en este apartado sugieren que la zona C-terminal de LodA es importante para la generación de la forma activa de esta enzima. La delección de un fragmento grande de la misma hace que no se detecte la enzima activa, mientras que la delección de sólo 9 aminoácidos determina que se sintetice más lentamente. Los datos obtenidos no parecen apoyar que los 9 aminoácidos delecionados participen en el proceso de secreción de LodA. Aunque la actividad detectada en los sobrenadantes es menor en las cepas con LodA delecionada en 9 aminoácidos que en la cepa con la copia silvestre, el porcentaje en que disminuye esta actividad está en un orden de valor similar al descenso observado en su síntesis. Una hipótesis alternativa a su posible papel en secreción para la zona C-terminal de LodA es que participe en la interacción con LodB, o incluso que sea una zona importante en la formación de la estructura final de la proteína, participando en el plegamiento o la formación del dímero.

IV.3.4. Análisis de secuencia de proteínas similares a LodA.

Nuestro grupo de investigación ha detectado mediante análisis BLAST un total de 168 proteínas similares a LodA en los genomas secuenciados y depositados en la base de datos del IMG (Integrate Microbial Genomes) a fecha de enero de 2014. En estas proteínas se ha podido establecer diferentes grupos en función de análisis filogenéticos (**fig. I.9**) (Campillo-Brocal *et al.*, 2015). Las secuencias de las proteínas similares a LodA fueron alineadas usando el programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2014). El alineamiento reveló en estas proteínas un gran número de residuos conservados (**fig. IV 20**).

```

1  MALSVH[SIG] VARLGNANTD NFVLN[PM]EIG GLPYEHDVDL KPTTTVVNFK DEAGCIRR[QG]
61  QVFKVFGASN EELTLDSPNV KNIE[WT]VHLA NKKAAWYEFK ELNGNLLYGR DNSYSARGVP
121 WRNASKTASS ERQSLIIDLG PRSVSGVMAT VEISINNIPE TYLHPSYPSG ELLQGSKHFE
181 SLGTLRTDSQ GRLIVLGGY[G] FAGGNTDLG YGGGDDWY[D] ISD[GS]VTCVV TYSDDSETS
241 TAWMVVGS[PD] FAFPEIVNIST LSDTCFDVGV RNFDLVPDMY DSATGHYKSD YVANFDRDIL
301 PIIQRISQYQ WVSNVQMSG FFSFQFDYRD GSAANKANRM KYYNYFRQLD NKVIGDYDQP
361 QQVLMSSSEVE GDILPLMPMN SGSNSVSSSN FYDLTDNVVE KFLALDATQL FLLGQWAE[GE]
421 FTAGPADDYP VSDMTASIG NCVGLPMC[EG] IEMTWSLQNP VIYKDAYQIK HYQDKAYFDV
481 NGLTPERDEC EEETGCEP[GD] LTKRMACEWQ A[DF]FNCTIQT VNFSEPSVNK ASQTEVT[SR]
541 THYEWGNLPA GVSVPDQSSV SATKNVDEKV PLPPAYYSYW WPPQS[EW]DVL TGELDTEGQL
601 HSHLPAGQQI NYARGINSYS QMVEHWSALA FIRDRNQND GFPFFTETER NHELDFEKEV
661 LVGQVTGNSE DNETSLEPFF INANKESLEG KGTKKGK[LM]A SYFEERAFSK VRSSNIRPRS
721 GTRMRG
    
```

Figura IV. 20. Análisis de la secuencia de proteínas similares a LodA. Sobre la secuencia de LodA aparecen destacados en verde los residuos conservados en el 100% de las proteínas analizadas. Los dos residuos subrayados son los residuos del cofactor. En rojo, se destacan otros residuos conservados en más del 90% de las proteínas seleccionadas. Destacados en gris aparecen algunos dominios propuestos como conservados en estas proteínas.

LodA se encuentra englobada dentro del denominado grupo IA (fig. I.9). Este grupo tiene un total de 21 proteínas tal como se muestra en la figura IV.21.

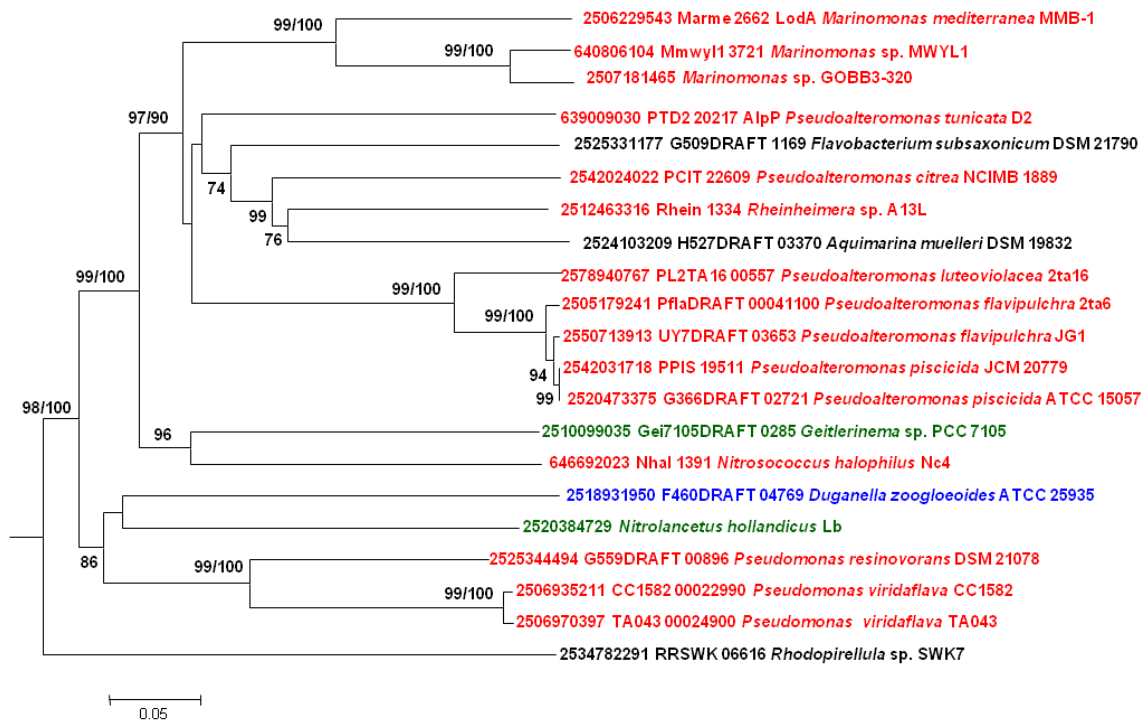


Figura IV. 21. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA del grupo IA. El árbol fue construido con el programa MEGA usando el método NJ. Las distancias evolutivas fueron calculadas como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70% (bootstrap > 70%) para los árboles construidos por los métodos NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, las betaproteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

Además de los residuos conservados en todas las proteínas similares a LodA, en el grupo IA se detectan otros residuos conservados específicos de este grupo que se muestran, para regiones determinadas, en los **apéndices A1-A5**. De entre las proteínas del subgrupo IA que contiene LodA de *M. mediterranea*, se ha demostrado también actividad L-lisina-épsilon oxidasa en la proteína AlpP de *Pseudoalteromonas tunicata* (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Ambas proteínas, LodA y AlpP fueron inicialmente descritas como proteínas antimicrobianas (James *et al.*, 1996; Lucas-Elio *et al.*, 2005). El grupo IA incluye también otras proteínas sintetizadas por diferentes microorganismos para los que se sabe que sintetizan proteínas con actividad antimicrobiana. Varios de estos microorganismos pertenecen al género *Pseudoalteromonas*, por ejemplo, en *P. flavipulchra* JG1 se han detectados dos genes similares a *lodA*, uno de ellos (UY7DRAFT 03653) pertenecen al grupo IA. El producto de este gen es una proteína antimicrobiana, PfaP, que muestra alta similitud con AlpP y LodA (Yu *et al.*, 2012). En otra cepa de la misma especie, también se ha detectado una proteína antimicrobiana que tiene una secuencia similar a la proteína PfaP. Esta proteína muestra actividad L-aminoácido oxidasa pero en este caso, además de L-lisina es capaz de oxidar otros aminoácidos tales como L-Met, Gln y Leu (Chen *et al.*, 2010b). En algunas cepas de *P. luteoviolacea* cuyo genoma no ha sido secuenciado todavía, se ha detectado una L-aminoácido oxidasa que posee un amplio rango de sustrato (Met, Gln, Leu, Glu, Phe, Trp, etc.) (Gomez *et al.*, 2008). Hasta el momento, hay dos cepas de *P. luteoviolacea* secuenciadas. La cepa B no muestra ningún gen similar a *lodA*, aunque hay que tener en cuenta que recientemente se ha propuesto que esta cepa está clasificada erróneamente, y que debería ser reclasificada (Cress *et al.*, 2013). En la cepa 2ta16, se han detectado dos genes. Uno de ellos está incluido en el grupo IA, y el segundo se localiza en el grupo IB (**fig. I.9**). Dado que hasta la fecha, no se conoce actividad antimicrobiana en esta cepa, no es posible establecer una relación entre proteínas antimicrobianas y los genes similares a *lodA* detectados *P. luteoviolacea*.

Por otra parte, en *Rheinheimera aquatica* GR5 se ha detectado una proteína con actividad lisina oxidasa demostrada, que tiene un fragmento de péptido con alta similitud a LodA y AlpP (Chen *et al.*, 2010a; Chen *et al.*, 2010c). Este fragmento también es similar al producto del gen Rhein1334 de *Rheinheimera* sp. A13L que pertenece al grupo IA de proteínas similares a LodA. Es interesante destacar que esta cepa contiene un segundo gen similar a *lodA*, pero es filogenéticamente distante ya que se engloba en el grupo III (Campillo-Brocal *et al.*, 2015).

En el análisis global de las secuencias de las proteínas similares a LodA se puede observar una serie de residuos de triptófano altamente conservados que podrían ser candidatos a participar en un mecanismo de “electron hopping” mediante el que tiene lugar la oxidación de los residuos que formarán parte del cofactor (Abu Tarboush *et al.*, 2011). Se observan también otros residuos conservados que podrían participar en el

proceso de generación del cofactor o en la especificidad del sustrato que parecen determinar los subgrupos detectados tras el análisis filogenético de las proteínas similares a LodA.

Es interesante señalar que los residuos Cys516 y Trp581 de LodA, que forman parte del cofactor quinónico CTQ, como se ha detectado en este estudio para la proteína recombinante y también se ha demostrado en el sistema nativo (Okazaki *et al.*, 2013), alinean con cisteínas y triptófanos presentes en todas las proteínas similares a LodA. Esto sugiere que deben poseer el mismo tipo de cofactor. Respecto a otros residuos mutados en LodA (**apartado IV.3.1**) se puede observar que el Asp512 que se reveló como esencial para la síntesis del cofactor, también está conservado en todas las proteínas (**fig. IV.20**) y lógicamente, en las del grupo IA (**apéndice A.1**). Por otra parte el residuo Cys448 de LodA no se encuentra conservado en todas las proteínas de esta familia, pero sí está conservado en las proteínas del grupo IA que son las más similares a LodA, sugiriendo que cumple un papel importante (**apéndice A.2**).

En relación a los residuos que, de acuerdo a la estructura cristalina de LodA, se encuentran en el canal de entrada al centro activo (**apartado IV.3.2**) se puede observar que ninguno de ellos está conservado en el conjunto de proteínas similares a LodA (**fig. IV.20**). Sin embargo, el residuo Glu101 está conservado en 19 de las 21 proteínas detectadas del grupo IA (**apéndice A.3**). Esta observación sugiere que puede estar relacionado con el mecanismo catalítico de estas enzimas. Algo similar ocurre con el residuo Tyr211 que está conservado dentro del grupo IA en las 15 proteínas más similares a LodA, pero no en otras 5 que son más distantes (**apéndice A.4; fig. IV.20**). El residuo Glu101 está conservado en todas menos una de las proteínas del grupo IA (**apéndice A.3**). Por el contrario, estos residuos, Tyr211 y Glu101, no están conservados en otras proteínas similares a LodA más alejadas, sugiriendo que pueden participar en los procesos enzimáticos de oxidación de L-lisina. Esta hipótesis está apoyada por la observación de que su mutación afecta a la actividad enzimática. Finalmente, el residuo Arg100, cuya mutación no mostró ningún efecto, no está conservado en las proteínas del grupo IA.

En relación a la zona terminal de LodA rica en residuos básicos es interesante señalar que una zona similar se encuentra en algunas de las proteínas similares a LodA detectadas en distintos genomas bacterianos. En particular se detecta en todas aquellas que muestran un mayor grado de similitud a LodA (**apéndice A.5**).

IV.4. ANÁLISIS DE LodB.

LodB es una proteína necesaria para la síntesis de la forma activa de LodA. Los datos presentados en esta memoria sugieren que actúa sobre el precursor PreLodA en la última etapa de generación del cofactor quinónico (**apartado IV.2**). Con anterioridad a este trabajo, no se había descrito ninguna flavoproteína que participara en la generación de un cofactor quinónico. En el análisis de LodB se ha procedido en primer lugar a su análisis bioinformático, que se ha dividido en dos apartados: análisis de secuencia y búsqueda de genes que codifiquen proteínas similares a LodB en genomas bacterianos secuenciados.

IV.4.1. Análisis bioinformático de LodB.

IV.4.1.1. Análisis de secuencia de LodB.

LodB (GenBank: AAY33850) es una hipotética flavoproteína de 369 aminoácidos con una masa molecular teórica de 41420,73 Da y un punto isoeléctrico de 5,52 (http://web.expasy.org/compute_pi/). Posee un total de 43 residuos cargados negativamente y 31 positivamente y su índice de estabilidad es 45,83 por lo que se clasifica como proteína inestable (<http://web.expasy.org/protparam/>). Este último dato podría contribuir a explicar porque no se observa claramente la banda proteica correspondiente a LodB en geles SDS-PAGE.

El uso de diferentes herramientas para predecir la localización celular de LodB como PSORTb versión 3.0.2 (<http://www.psорт.org/psорт/index.html>) (Yu *et al.*, 2010), Gneg-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/GnegmPLOC.cgi>) (Hong-Bin and Kuo-Chen, 2010) y el servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011) predicen que LodB es una proteína intracelular que carece de péptido señal. Estas predicciones están en concordancia con los resultados experimentales de nuestro grupo (Gomez *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se analizó la estructura secundaria de LodB empleando la herramienta de predicción de estructura secundaria JPred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). Este análisis predice una estructura secundaria con un 30,08% de dominio alfa hélice sobre todo en C-terminal, un 23,03% de hoja beta y un 46,89% de estructura desordenada (**fig. IV.22A**).

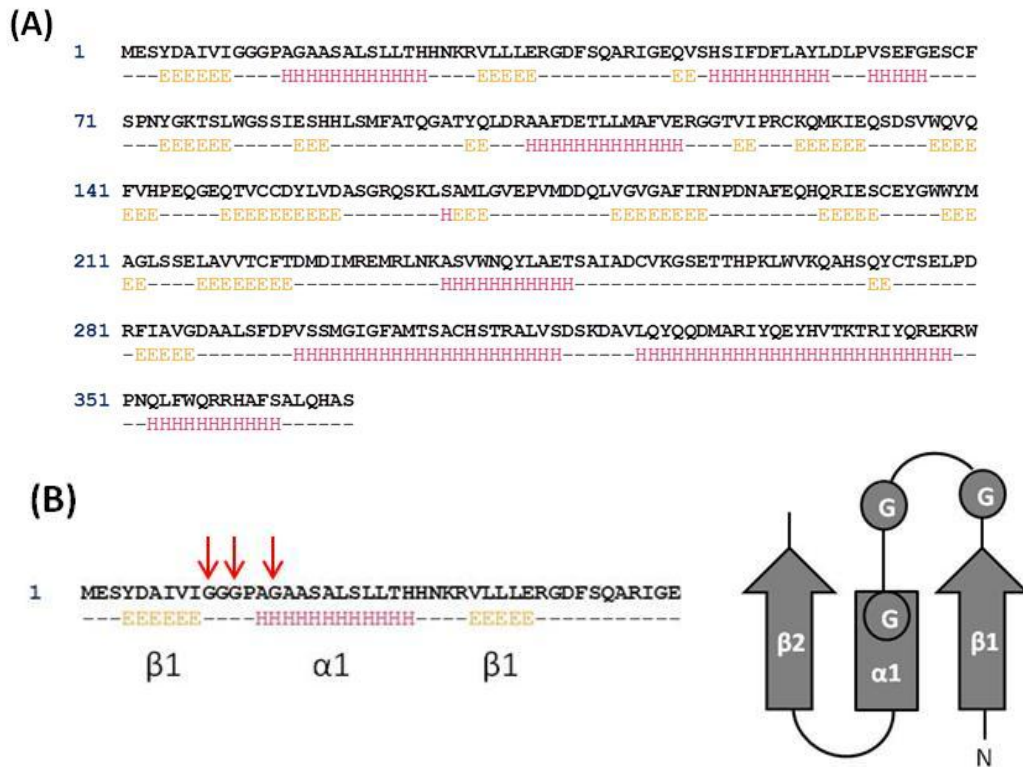


Figura IV. 22. Análisis de secuencia de LodB. (A) Predicción de la estructura secundaria de LodB usando la herramienta Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>). H: hélice alfa. E: hoja beta. (B) Análisis del dominio DBM. Disposición de las glicinas conservadas (flechas rojas y círculos) en la primera mitad del dominio de Rossmann de LodB (GGGPAG).

El análisis de secuencia de LodB revela en su región N-terminal la secuencia **A₆IVIGGGPAGAASALSLLTHHNKRVLLE**, que encaja perfectamente con el motivo de unión a dinucleótidos (DBM) **xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)₈hxE**. Analizando la predicción de estructura secundaria de LodB se observa claramente una estructura $\beta_1\alpha_1\beta_2$, en esta zona, en la que la disposición de las glicinas coincide con la característica del motivo de Rossmann (Bottoms *et al.*, 2002) (**fig. IV.22B**). Este motivo es característico de enzimas que contienen FAD como cofactor (Dym and Eisenberg, 2001). En concreto, esta secuencia es característica de la familia estructural glutatión reductasa (GR) que puede dividirse en dos grupos. La familia GR₁ esta compuesta por proteínas que además del dominio de unión a dinucleótidos contienen un segundo dominio de unión a NAD(P) (Dym and Eisenberg, 2001). Este segundo dominio esta caracterizado como un motivo **GxGxxG** adicional que no se ha detectado en LodB. De acuerdo a esto, LodB parece pertenecer al grupo GR₂. Este grupo se caracteriza por no mostrar el dominio de unión a NAD(P), aunque en algunas enzimas de este grupo se ha demostrado que sí unen este segundo cofactor (Eppink *et al.*, 1998). Entre las enzimas incluidas en el grupo GR₂ están la fenolhidroxilasa, *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa, glucosa oxidasa y D-aminoácido oxidasa (DAO) (Dym and Eisenberg, 2001).

Las enzimas que pertenecen al grupo GR₂ solo muestran buen alineamiento en la zona N-terminal donde está localizado el motivo DBM. Sin embargo, en algunas enzimas del grupo GR₂, así como en las del GR₁ es posible detectar el motivo GD que presenta la secuencia consenso **T(S)(X)₅F(Y)hhGD** que parece participar en la unión del cofactor (Vallon, 2000; Dym and Eisenberg, 2001). Estas enzimas han sido clasificadas como miembros de la familia de flavoproteínas monooxigenasas Clase A (van Berkel *et al.*, 2006). LodB muestra una secuencia similar **T₂₇₅SELDPFIAVGD**. Por el contrario, no se han detectado en LodB otros motivos conservados como el motivo DG típico, descrito para monooxigenasas (Eppink *et al.*, 1997).

IV.4.1.2. Detección de genes similares a *lodB* en genomas con genes de la familia *lodA*.

Como se ha indicado previamente, nuestro grupo identificó 168 genomas que contenían genes que codifican proteínas similares a LodA. La búsqueda BLAST usando como proteína problema la secuencia de LodB frente a dichos genomas reveló que todos ellos, excepto en un caso, contienen también un gen similar a *lodB*. Los genes que codifican proteínas similares a LodB están generalmente localizados aguas abajo de los genes que codifican una proteína similar a LodA. Por ejemplo, en el operón *lod* el gen *lodA* está seguido por *lodB* (**fig. IV.23A**). En la mayoría de los genomas analizados, de manera similar al operón *lod*, ha sido posible detectar aguas abajo, o muy cercano en el genoma, al gen similar a *lodA* un gen similar a *lodB* que muestra un dominio conservado COG0644 (FixC) descrito en flavoproteínas (**apéndice A.6**).

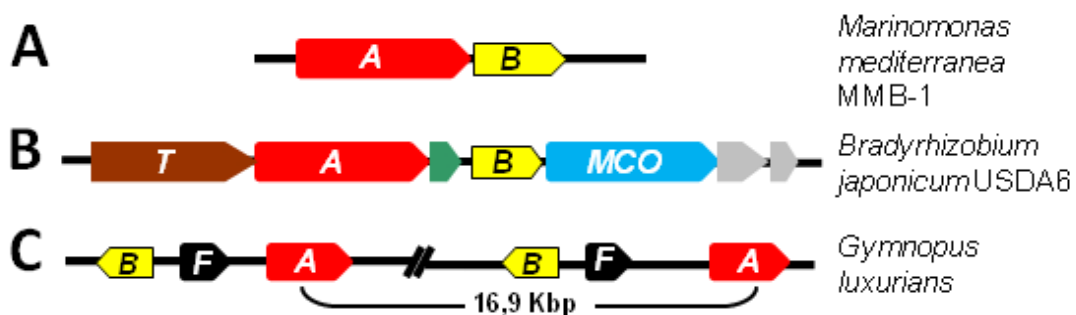


Figura IV. 23. Organización de los genes similares a *lodA* (A, marcados en rojo) y los genes similares a *lodB* (B, marcados en amarillo) en los diferentes genomas seleccionados. (A) Disposición del operón *lod* en *M. mediterranea*. (B) Operón de *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 conteniendo genes similares a *lodA* y *lodB* separados por un pequeño gen coloreado en verde. El gen en marrón codifica una proteína que contiene el dominio pfam00264 (tirosinasa, T). El producto del gen de color azul contiene los dominios pfam07731 y pfam07732 característicos de multicobre oxidasas. (C) Organización de los genes en el genoma *Gymnopus luxurians* que muestra dos copias de genes similares a *lodA* y *lodB*. Los genes en color negro codifican proteínas con un dominio similar a ferritina (F) (PF12902).

El único genoma en el cual no se pudo detectar ningún gen similar a *lodB* cerca del gen similar a *lodA* fue en *Cryptosporangium arvum*. En otros dos casos que aparentemente están en la misma situación, la pérdida del gen similar a *lodB* podría ser accidental. En relación al gen similar a *lodA* CSE45_2361 de *Citreicella* sp. SE45, hay una gran región intergénica aguas abajo de este gen. La examinación de esta secuencia permite la detección en dirección 3'-5' de un ORF no anotado que codifica una proteína similar a las proteínas similares a *LodB*. En *Nitrolacentus hollandicus* LD el genoma secuenciado está incompleto y los genes similares a *lodA* están al final de un contig, por lo que no es posible localizar el gen similar a *lodB*. Sin embargo, un gen con número de acceso 2520384730 localizado en un contig diferente podría ser un buen candidato.

Hay algunas modificaciones respecto al patrón general de los genes similares a *lodB* localizados aguas abajo de los genes similares a *lodA*. Por ejemplo, en 10 genomas (cuatro de ellos *Bradyrhizobium*) los genes similares a *lodB* están localizados aguas abajo de los genes similares a *lodA* pero separados de él por un pequeño gen adicional que codifica una proteína pequeña de entre 138-142 aminoácidos (**apéndice A.6; fig. IV.23B**). Hasta ahora ninguna proteína de este grupo ha sido caracterizada, así que su función permanece desconocida, y además no poseen ningún dominio conservado. Interesantemente, los operones que contienen este tipo de genes pequeños también incluyen otros genes que codifican hipotéticas tirosinasas y MCO (**fig. IV.23B**). *M. mediterranea* también sintetiza ambas enzimas (tirosinasa y MCO) que se encuentran correguladas con *LodA*, aunque no están codificadas por genes localizados en el mismo operón (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Estas observaciones sugieren una posible relación funcional entre todas estas enzimas.

Con respecto a las excepciones a la organización general discutida antes, en *Acidovorax avenae* RS-1, y *Oceanospirillum beijerinckii* DSM7166 (H579DRAFT_00201), los genes similares a *lodA* están seguidos no por uno, sino por dos genes con similitud con flavoproteínas. La comparación de estas proteínas con *LodB* revela que la primera muestra una gran similitud con la región N-terminal de *LodB*, mientras que la segunda tiene similitud con el extremo C-terminal. Por ejemplo, el producto del gen H579DRAFT_00202 de *Oceanospirillum beijerinckii* DSM7166 muestra un 47% de similitud de secuencia entre los residuos 4-118 de *LodB* y el producto de H579DRAFT_00203 muestra un 42% de similitud entre los residuos 130-160 de *LodB*. Estos datos sugieren como explicación más probable que esos genes similares a *lodB* sean resultado de la división de un gen previo.

La mayoría de genes similares a *lodA* se han detectado en genomas bacterianos, aunque también se han detectado cinco genes fúngicos similares a *lodA*. En estos casos, los genes similares a *lodB* están normalmente localizados en la orientación contraria a los similares a *lodA*. Además, merece la pena mencionar que en estos casos, se detecta un gen que codifica una proteína similar a ferritina (**fig. 23C**). Aparte de en hongos, en la actinobacteria *Actinoplanes globisporus* también se ha observado que los genes similares a *lodA* y *lodB* se encuentran orientados en sentido contrario.

Las secuencias de las proteínas detectadas similares a LodB fueron alineadas usando el programa Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2014). Este alineamiento reveló una serie de residuos conservados en todas ellas (**fig. IV.24**).

```

1  MESYDAIVI G G P A G A A S A L S L L T H N K R V L L L E R G D F S Q A R I G E Q V S H S I F D F L A Y L D L
61  P V S E F G E S C F S P N Y G K T S L W G S S I E S H H L S M F A T Q G A T Y Q L D R A A F D E T L L M A F V E R G G T
121  V I P R C K Q M K I E Q S D S V W Q V Q F V H P E Q G E Q T V C C D Y L V D A S G R Q S K L S A M L G V E P V M D D Q L
181  V G V G A F I R N P D N A F E Q H Q R I E S C E Y G W Y M A G L S S E L A V V T C F T D M D I M R E M R L N K A S V W
241  N Q Y L A E T S A I A D C V K G S E T T H P K L W V K Q A H S Q Y C T S E L P D R F I A V G D A A L S F D P V S S M G I
301  G F A M T S A C H S T R A L V S D S K D A V L Q Y Q Q D M A R I Y Q E Y H V T K T R I Y Q R E K R W P N Q L F W Q R R H
361  A F S A L Q H A S .

```

Figura IV. 24. Análisis de la secuencia de proteínas similares a LodB. En verde aparecen destacados los residuos conservados en el 100% de las proteínas. En amarillo, se destacan otros residuos conservados en el 90% de las proteínas seleccionadas.

Es de destacar que los residuos conservados en la secuencia DBM (**xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)₈hxhE**) descrita en LodB en el apartado anterior puede ser detectada en la mayoría de proteínas similares a LodB. El motivo GD (Eggink *et al.*, 1990; Dym and Eisenberg, 2001) también podría estar presente en las proteínas similares a LodB. Se observa que la Gly286 está conservada en todas y el Asp287 en la mayoría. En el caso de LodB se observa una alta similitud con la secuencia **T(S)(X)₅F(Y)hhGD**.

Aparte de los residuos conservados, la comparación de LodB en términos globales de similitud con otras proteínas similares proporciona valores de identidad siempre menores al 50% y de similitud en el rango 40-60%. Por ejemplo, en *P. tunicata* aguas abajo del gen TTD2_20212 que codifica la lisina oxidasa AlpP, se encuentra un gen que codifica una proteína que muestra un 41,8% de identidad y un 60,1% de similitud con LodB de acuerdo al alineamiento de secuencia realizado con EMBOSS Needle (McWilliam *et al.*, 2013). Cuando se compara LodB con GoxB de *M. mediterranea*, que es codificada por el operón que codifica la glicina oxidasa GoxA (Campillo-Brocal *et al.*, 2013), se observa un 26% de identidad y un 42,8% de similitud. Un tercer operón *Xo* ha sido descrito en el genoma de *M. mediterranea* del que hasta el momento se

desconoce su función (Lucas-Elio *et al.*, 2012b). En este caso también se detecta un gen *xoB* aguas abajo del gen *xoA*, que es similar a *lodA* y *goxA*. La comparación de la proteína XoB con LodB muestra un 25,8% de identidad y un 42,2% de similitud, porcentajes muy similares a los obtenidos con GoxB.

Los niveles de identidad de LodB con otras flavoproteínas no codificadas en operones similares a *lod* es menor, siendo generalmente inferior al 20%. Por ejemplo, recientemente se ha propuesto que la flavoproteína QhpG participa en la biosíntesis del cofactor CTQ de QHNDH (Nakai *et al.*, 2014). QhpG muestra un buen alineamiento con LodB en el motivo DBM. La identidad y similitud global de QhpG con LodB es del 18 y 27,7% respectivamente. La búsqueda BLAST realizada en la base de datos del PDB revela similitud con tres secuencias depositadas (3EI7, 3I3L and 3NIX). La más similar a LodB es 3EI7: 19,3% de identidad y 31,08% de similitud, y corresponde a una halogenasa dependiente de FAD de una mixobacteria (Watanabe *et al.*, 2008). La comparación de LodB con una flavoproteína monooxigenasa, la *p*-hidroxibenzoato hidroxilasa (PHBH) de *Pseudomonas fluorescens* (PDB ID 1BF3), proporciona resultados similares: 18,7% de identidad y 31,2% de similitud. Estos bajos niveles de similitud con proteínas y con la estructura determinada hacen que sea de gran interés futuro la determinación de la estructura de LodB.

IV.4.2. Caracterización de LodB.

En este apartado se abordarán estudios encaminados al aislamiento de LodB con el fin de caracterizar esta proteína.

IV.4.2.1. Generación de LodB fusionado a una etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP) y purificación.

En ensayos preliminares, la caracterización de LodB planteaba el problema de que esta proteína no se expresaba en gran cantidad ni en el sistema recombinante ni en el nativo (Gomez *et al.*, 2010; Gomez, 2010). Los datos en el **apartado IV.1** mostraron que la fusión de una cola de poli-His en N-terminal a LodB permite su detección por Western Blot. Sin embargo, la cantidad de proteína que observada era pequeña y de hecho, en los geles SDS-PAGE no siempre era detectable. Con el fin de incrementar el rendimiento en la obtención de LodB recombinante se construyó un sistemas de vectores que fuese compatible con *lodA* clonado en vectores de la serie pET. Para ello se construyó el plásmido pMBPLOBBDuet como se detalla en el **apartado III.14.2** de Materiales y métodos. A partir de este plásmido LodB se expresa fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo N-terminal.

Los niveles de actividad obtenidos cuando se cotransformaron los plásmidos compatibles pMBPLODB28Duet y pETLODA11, fueron comparables a los obtenidos cuando se expresó el vector pETLODAB15 (**fig. IV.25**). De nuevo, en estos experimentos se observó que la expresión de únicamente LodA o LodB no permite obtener la actividad lisina oxidasa (**fig. IV.25A**) ni la detección de MLodA (**fig. IV.25B**).

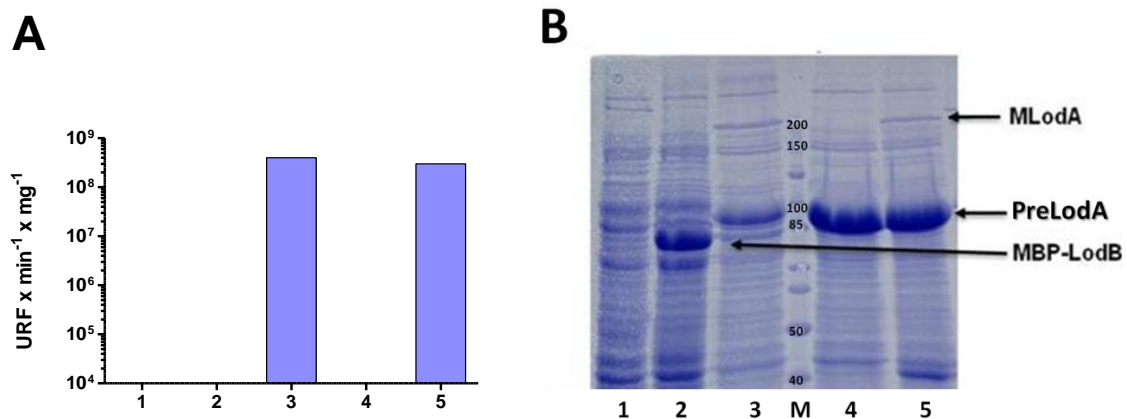


Figura IV. 25. Expresión recombinante de LodA en cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) conteniendo LodB fusionado a una etiqueta de MBP. Los cultivos fueron inducidos durante 16 h. (1) Control [sin plásmido]; (2) pMBPLODBDuet [MBPLodB]; (3) pETLODA11 + pMBPLODBDuet [LodA + MBPLodB]; (4) pETLODA11 + pCOLADuet [LodA] y (5) pETLODAB11 [LodA + LodB]. (A) Medidas de actividad lisina oxidasa a las 16 h de inducción. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes. Las flechas indican las proteínas detectadas. MLodA: multímero de LodA.

Al desconocer la actividad enzimática de LodB no es posible determinar si toda la proteína ha sido sintetizada de forma correcta conteniendo el cofactor, o si solamente hay una fracción de ella que lo sea. Indirectamente la actividad lisina oxidasa detectada muestra que se ha obtenido un buen rendimiento en la síntesis de LodA activa sugiriendo que al menos una parte significativa de LodB es funcional. Otro plásmido construido es pETMBPLODB28. En este plásmido LodB tiene la misma fusión de MBP en el extremo N-terminal pero difiere en el origen de replicación. Como se demostró en los experimentos de análisis de LodA con deleciones en C-terminal (**apartado IV.3.3.1**), dicho plásmido también permitió generar la forma activa de LodA.

Una vez generada la fusión de LodB a MBP y visto que su concentración era alta y se podía detectar en geles SDS-PAGE, se procedió a su purificación en resina de amilosa gracias a la etiqueta MBP que lleva fusionada. La purificación se realizó como se describe en el **apartado III.12.2** de Materiales y métodos. Cuando se purificó MBPLodB a partir de los cultivos cotransformados con pETLODA11 + pETMBPLODB28 se observó que LodA se copurificaba junto a MBPLodB (**fig. IV.26A**). Este resultado era interesante porque podría indicar que LodA y LodB están formando un complejo. Para comprobar esta posibilidad, se realizaron experimentos adicionales en los que se trata de ver que

ocurría con LodA en ausencia de LodB. En el primero se cotransformaron los plásmidos pETLODA11 + pETMBP28. En un segundo experimento se indujo el plásmido pETLODA11 en ausencia de MBPLodB. Se observó que al igual que ocurría con MBPLodB, cuando las muestras se pasaban por columna de amilosa, LodA se purificaba en presencia de MBP y ausencia de LodB (**fig. IV.26B**), e incluso cuando solamente está presente ella misma (**fig. IV.26C**). Estos datos sugieren que la copurificación de LodA se debe a que interacciona con la resina de amilosa a partir de la cual se va liberando y no porque se forme algún tipo de complejo entre LodA y LodB. No obstante, estos datos no permiten descartar que se forme el complejo entre LodA y LodB.

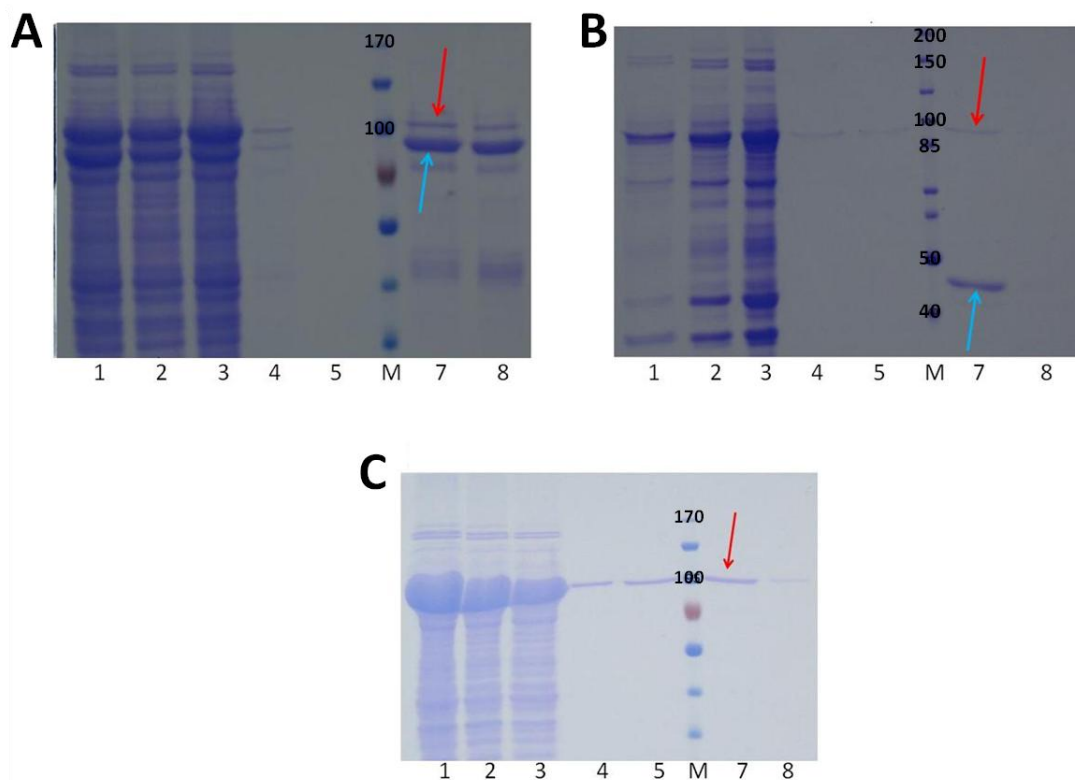


Figura IV. 26. Purificación de LodA en presencia o ausencia de MBPLodB en columnas de amilosa. (A) Purificación de MBPLodB a partir de cultivos inducidos con los plásmidos pETLODA11 + pETMBPLODB28 [LodA + MBPLodB]. Flecha roja: LodA. Flecha azul: MBPLodB. (B) Purificación de LodA a partir de cultivos inducidos con los plásmidos pETLODA11 + pETMBP28 [LodA + MBP]. Flecha roja: LodA. Flecha azul: MBP. (C) Purificación de LodA a partir de cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) con el plásmido pETLODA11 [LodA]. Flecha roja: LodA. SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. (1: Muestra de partida; 2: Fracción no retenida por la resina; 3, 4 y 5: lavados; M: marcador; 7 y 8: eluciones).

Un problema de la unión de LodA a las columnas de amilosa fue que dificultaba la purificación de LodB. Para evitar la posible interferencia de LodA, se purificó MBPLodB a partir de cultivos que únicamente contenían expresaban MBPLodB. En estos experimentos se ensayó los vectores pETMBPLODB28 y pMBPLODB28Duet. El primero dio un mayor rendimiento (datos no mostrados) por lo que fue utilizado

rutinariamente (**fig. IV.27**). La banda de aproximadamente 50 kDa que copurificó con MBPLodB tiene un origen indeterminado.

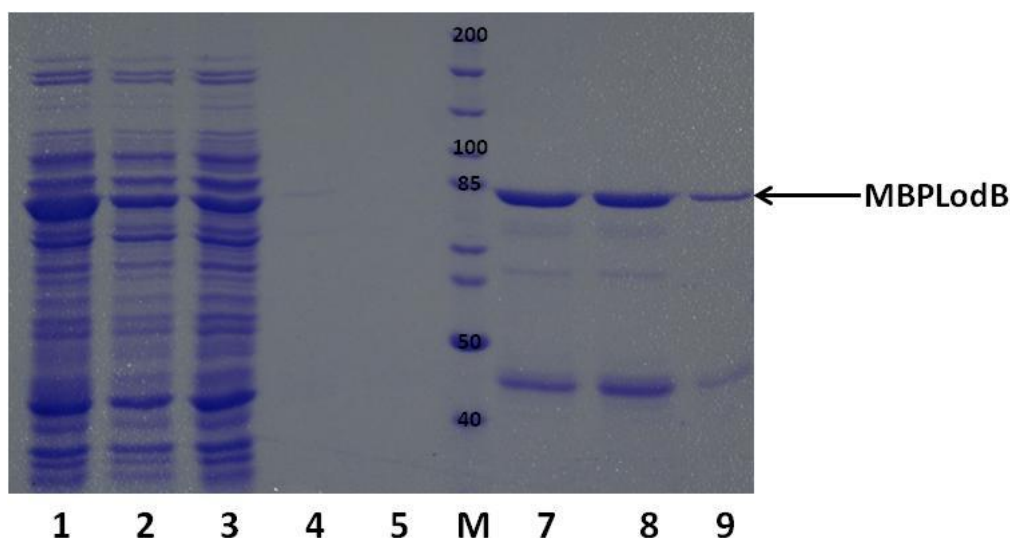


Figura IV. 27. Purificación de MBPLodB a partir de *E. coli* Rosetta (DE3) pETMBPLODB28 en resina de amilosa. LodB en este plásmido lleva una etiqueta MBP en N-terminal. 1: Muestra de partida; 2: Fracción no retenida por la resina; 3, 4, 5 y 6: lavados; M: marcador; 7, 8 y 9: eluciones.

IV.4.2.2. Intentos de detección del cofactor en MBPLodB.

El análisis de la secuencia proteica de LodB sugiere que es una flavoproteína puesto que presenta un motivo de unión a dinucleótidos típico de flavoproteínas (GxGxxG) en su extremo N-terminal (**apartado IV.4.1.1**). Tras la purificación de MBPLodB se examinó la coloración de las eluciones obtenidas en la purificación, ya que la flavina proporciona un color amarillo a la flavoproteína. Sin embargo, no se observó coloración amarilla en las muestras purificadas. Se realizó el espectro de absorción en la región UV-visible de MBPLodB a partir de una muestra dializada (como se explica en el **apartado I.13** de Materiales y métodos) y concentrada usando filtros Amicon® Ultra 30K hasta una concentración de 922 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sin embargo, siguió sin detectarse coloración y tampoco el espectro de absorción reveló los picos típicos de flavinas que se presentan en torno a 370 y 450 nm (**fig. IV.28**). Estos datos sugieren que MBPLodB bajo estas condiciones se sintetiza sin el cofactor.

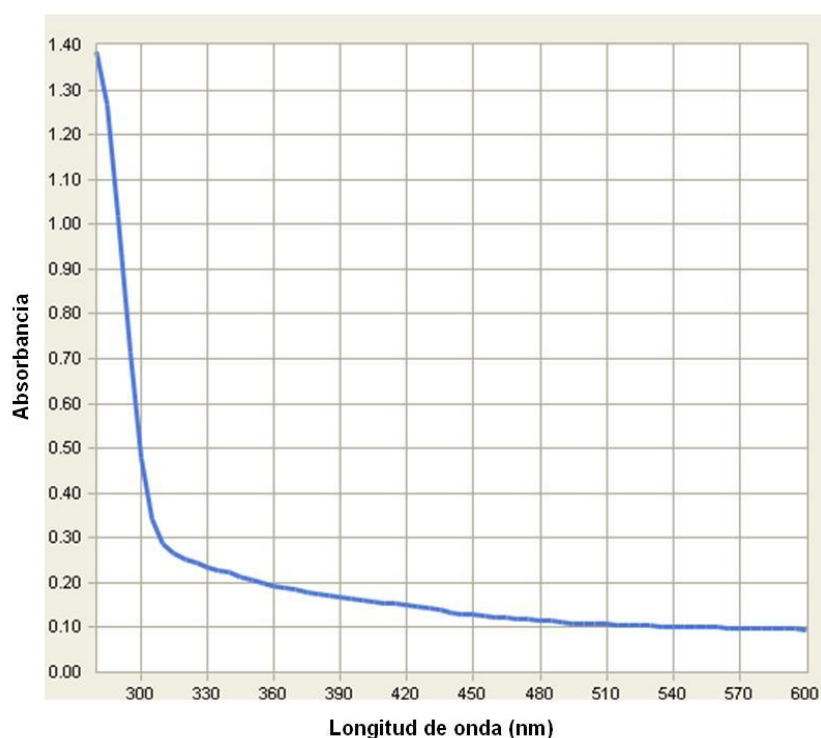


Figura IV. 28. Espectro de absorción de MBPLodB purificada. Concentración: 922 $\mu\text{gr/ml}$.

En las flavoproteínas, las flavinas cuando se encuentran en estado oxidado poseen fluorescencia adicionalmente a la que presentan las proteínas debida a los aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, para comprobar de un modo alternativo si MBPLodB contiene el cofactor se midió fluorescencia de flavinas (526 nm) y fluorescencia de proteínas (360 nm) utilizando el BSA y el FAD, como control negativo y positivo, respectivamente de la fluorescencia debida a flavinas.

Muestras de MBPLodB purificadas a partir de los plásmidos pETMBPLODB28 y pMBPLODBDuet se dializaron (como se explica en el **apartado 1.13** de Materiales y métodos) y concentraron usando filtros Amicon® Ultra 30K. Estas muestras se usaron a una concentración de 0,3 μM y se calentaron a 50 °C durante 5 min con la finalidad de desnaturar de manera parcial la proteína para exponer la flavina, siempre y cuando estuviera presente.

Los resultados obtenidos no permiten poner de manifiesto la presencia de flavinas en las muestras de MBPLodB (**fig. IV.29**). Este resultado puede ser debido a que la proteína se sintetice sin el cofactor. Los resultados obtenidos concuerdan con la ausencia de coloración amarilla en la muestra y la ausencia de los picos característicos de las flavinas del espectro de absorción UV-visible de MBPLodB.

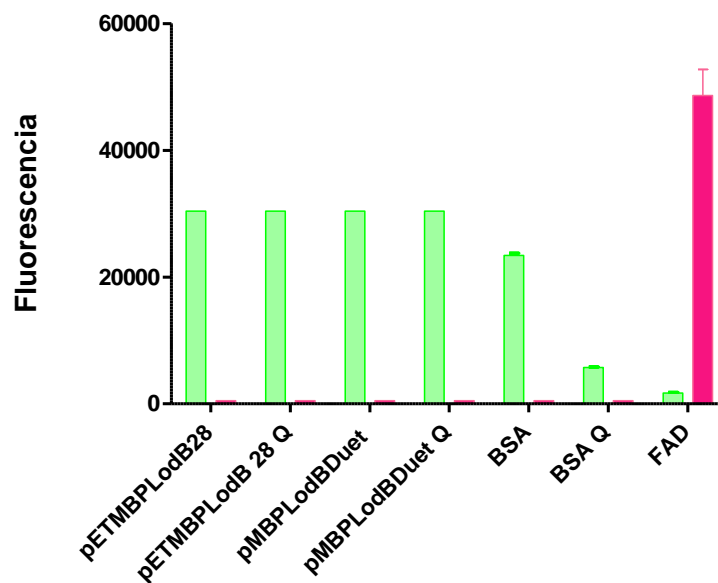


Figura IV. 29. Medida de fluorescencia de muestras de MBPLodB purificadas con una concentración de 0,3 μM . Las muestras se obtuvieron a partir de cultivos con los plásmidos pMBPLODBDuet y pETMBPLODB28 inducidos 2 horas a 15 °C con 1 mM de IPTG. Control positivo de fluorescencia de flavinas: FAD (0,3 μM) y control negativo: BSA (0,3 μM). (Q): muestras calentadas 50 °C/5 min. Barra verde: fluorescencia a 360 nm y barra fucsia: fluorescencia a 526 nm.

Aunque se probaron otras condiciones de inducción diferentes de los cultivos con MBPLodB, no se obtuvo en ningún caso MBPLodB con cofactor. Esta dificultad para obtener de forma recombinante flavoproteínas que contengan el cofactor es un problema común en muchos casos (Pollegioni *et al.*, 2013). En este sentido, y a modo de ejemplo, recientemente se ha publicado un artículo en el que se realizaban diversas modificaciones en las condiciones de inducción para aumentar la cantidad de proteína sintetizada con cofactor flavínico sin obtener un resultado positivo (Lencina *et al.*, 2013).

IV.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROTEÍNAS DEL OPERÓN *lod* Y *gox*.

Como se ha discutido en el **apartado IV.4.1.2**, los operones con genes similares a *lodA* contienen generalmente genes similares a *lodB*. Uno de esos operones en *M. mediterranea* codifica una glicina oxidasa denominada GoxA (Campillo-Brocal *et al.*, 2013) (**apartado I.1.4.2**). Se ha propuesto que GoxA es una quinoproteína en base a su sensibilidad a inhibidores de cofactores quinónicos y la similitud de las secuencias de LodA y GoxA (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). Los modelos de homología de la estructura de GoxA apoyan que esta proteína contiene también CTQ como cofactor. El cofactor CTQ en GoxA estaría formado por modificaciones en la Cys551 y el Trp566. El residuo de aspártico que es crítico para la biosíntesis de CTQ en LodA está también conservado en GoxA, y corresponde al residuo Asp547 (Campillo-Brocal, Tesis Doctoral en preparación).

La glicina oxidasa de *M. mediterranea* está codificada por el operón *gox*, que de forma similar al operón *lod* está formado por los genes *goxA* y *goxB* (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). La similitud entre LodB y GoxB sugiere que pueden realizar un papel similar. El objetivo de este apartado ha sido comparar la generación del cofactor en LodA y GoxA, así como estudiar si la similitud entre LodB y GoxB permite que sean intercambiables.

IV.5.1. Análisis de la forma precursora (PreGoxA) por espectrometría de masas (MS).

Experimentos de coexpresión de *goxA* y *goxB* (pETGOXAB15), usando la cepa *E. coli* CD03 ha permitido la síntesis y el aislamiento de la GoxA activa (Campillo-Brocal, Tesis Doctoral en preparación). Esta cepa tiene mutada el gen que codifica catalasa permitiendo la detección de actividades enzimáticas que liberan peróxido de hidrógeno en extractos celulares (Kishishita *et al.*, 2003). Cuando se purificó GoxA en estos cultivos se observó una banda con un peso molecular compatible con GoxB que es también copurificada, lo que sugiere una fuerte interacción molecular entre GoxA y GoxB a diferencia de lo que ocurría el sistema LodA/LodB (**fig. IV.30B**). El análisis por espectrometría de masas de estas bandas permitió confirmar que efectivamente corresponden respectivamente a GoxA activa con el cofactor quinónico formado (incremento de MM de +28) y a GoxB (Campillo-Brocal, Tesis Doctoral en preparación).

Cuando se expresó GoxA a partir del plásmido pETGOXA15, que carece del gen que codifica GoxB, de forma similar a lo que ocurre en el sistema LodA/LodB, se generó una forma soluble inactiva de GoxA (**fig. IV.30**). Esa forma se denominó PreGoxA por su similitud con PreLodA.

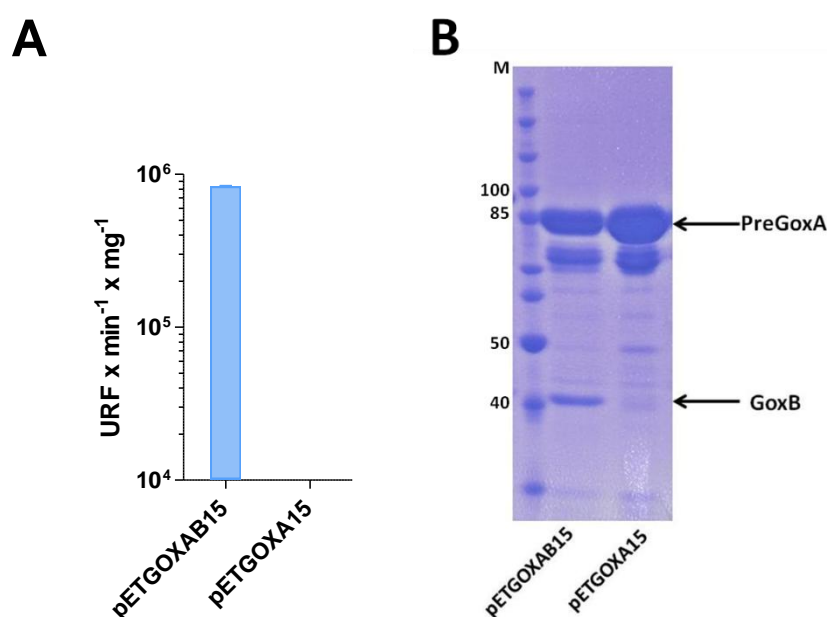


Figura IV. 30. Expresión heteróloga de GoxA en *E. coli* CD03 con los plásmidos pETGOXA15 [GoxA] o pETGOXAB15 [GoxA + GoxB]. (A) Actividad glicina oxidasa en extractos celulares de cultivos inducidos. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes de muestras purificadas usando la etiqueta de poli-His de GoxA.

Tanto GoxA como PreGoxA se purificaron utilizando la etiqueta de poli-His que llevan fusionadas a su extremo N-terminal (**fig. IV.30B**). Una tercera forma molecular, GoxA inactiva, fue obtenida de los cuerpos de inclusión generada por la inducción de cultivos con pETGOXA15. Para analizar los precursores en la síntesis de GoxA, PreGoxA y la forma obtenida de los cuerpos de inclusión fueron sometidas a digestión con tripsina y un posterior análisis por MALDI-TOF.

Cuando se analizó PreGoxA se detectaron varios picos que corresponden a péptidos sin modificar (**tabla IV.7**). Además, se detectó una señal compatible con el péptido “WMGLPWQCDAFSCQQVLMQEDFPTAVWWPALLPIDVLPEENYTQLMDESLLDDSER” con un incremento de masa de +16 (**tabla IV.7**). Por similitud con PreLodA, se propone que la modificación en este péptido tiene lugar en el triptófano que forma parte del cofactor.

Secuencia	m/z teórico (monoisotópico)	m/z experimental (monoisotópico)
(K)TDEHGR(L)	714,32	714,32
(K)QAQRFR(I)	805,44	805,442
(K)HIYPIFR(R)	945,53	945,53
(R)GNVEDRFK(W)	964,48	964,48
(R)NYDNAADPFR(L)	1182,52	1182,52
(R)LGIYPTIGiR(V)	1262,67	1262,69
(K)SAIASTHREEAPK(D)	1396,72	1396,72
(R)FRIYAFDDQDR(V)	1445,68	1445,68
(R)QGWLGVGNFSDPAYIK(Q)	1751,88	1751,88
(K)FRNPNNVSDTAYLDER(L)	1910,90	1910,90
(K)QLADPSPANQAFRQDIFTK(F)	2147,09	2147,09
(K)AEKGDPALGTSPPLAHQWAGDLTR(W)	2488,26	2488,26
(K)AAWYGFNNPLDNGELAPGIPGQKR(N)	2585,29	2585,29
(R)DFLSMAGSVTALSAPFLIPKSAIASTHR(E)	2888,53	2888,53
(R)SISGINQNGDTENDTYQFVGQFWNEETVK(L)	3320,50	3320,50
(R)WMGLPWQCDAFS <u>Q</u> QVLMQEDFPTAVW <u>W</u> PALLPIDVLPEENYQLMDESLLDDSER(V)*	6485,95	6501,95 (+16)*

Tabla IV. 7. Péptidos de PreGoxA recombinante detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis por MALDI-TOF. Los residuos que participan en la generación del cofactor quinónico están resaltados en verde. Las cisteínas en minúscula fueron detectadas modificadas por carbamidometilación (+57). *La MM del péptido indica un incremento de +16 por modificación post-traducciona.

Finalmente, cuando GoxA fue obtenido de los cuerpos de inclusión y digerido con tripsina, se detectaron varios picos, incluyendo un pico, $m/z = 6713,12$ que podría corresponder al péptido “WMGLPWQCDAFSQQVLMQEDFPTAVWWPALLPIDVLPEENYQLMDESLLDDSERVK” que contiene la cisteína y el triptófano del cofactor sin ningún tipo de modificación (**tabla IV.8**).

Secuencia	m/z teórico (monoisotópico)	m/z experimental (monoisotópico)
(K)KQAQR(F)	630,37	630,37
(R)GNVEDR(F)	689,32	689,32
(K)DGTQAIK(K)	732,39	732,39
(K)LVQNIGR(L)	799,48	799,48
(R)IPSMYAR(N)	837,43	837,43
(K)EMYVEVGR(G)	982,47	982,47
(R)MLVINGGER(S)	988,52	988,52
(R)LLTLEKAEK(G)	1044,63	1044,63
(R)IYAFDDQDR(V)	1142,51	1142,51
(R)LGIYPTIGIcR(V)	1262,67	1262,69
(K)GPKGAGTGGLSAVPK(E)	1296,73	1296,73
(R)FKWNPSMGDLPN(-)	1405,66	1405,66
(R)NQYFVSDEERER(M)	1571,71	1571,71
(R)QGWLVGVNFSDPAYIK(Q)	1751,88	1751,88
(R)NPNNVSDTAYLDERLK(M)	1848,91	1848,91
(K)QLADPSPANQAFRQDIFTK(F)	2147,09	2147,09
(K)RRDFLSMAGSVTALSAPFLIPK(S)	2377,31	2377,31
(K)AAWYGFNNPLDNGELAPGIPGQKR(N)	2585,29	2585,29
(K)LQPDALTEAALEPcSGGAFHPGVELTYLR(I)	3218,58	3218,58
(R)SISGINQNGDTENDTYQFVGQFWNEETVK(L)	3320,50	3320,50
(R)WMGLPWQCDAFSQQVLMQEDFPTAVWVALLPIDVLPEENYTLQLMDESLDDSERVK(F)*	6713,12	6713,12*

Tabla IV. 8. Péptidos de GoxA obtenida de los cuerpos de inclusión de cultivos inducidos con pETGOXA15 detectados por digestión con tripsina y su posterior análisis por MALDI-TOF. Los residuos que participan en la generación del cofactor quinónico están resaltados en verde. Las cisteínas en minúscula fueron detectadas modificadas por carbamidometilación (+57). *Péptido detectado conteniendo la Cys y el Trp del cofactor sin modificación.

En conclusión, el análisis de la síntesis recombinante de GoxA ha revelado, de forma similar a LodA, la presencia de tres diferentes formas moleculares. La forma activa de GoxA contiene el cofactor quinónico (Campillo-Brocal, Tesis Doctoral en preparación). Cuando la proteína fue obtenida de los cuerpos de inclusión no estaba sujeta a ninguna modificación post-traducciona. En ausencia de GoxB, se generó una forma soluble inactiva intermediaria (PreGoxA) parcialmente modificada con un incremento de +16. Estos resultados son similares a los obtenidos con LodA (**apartado IV.2.3.3**) y sugieren un papel similar de LodB y GoxB en la generación de la forma activa de su quinoproteína asociada.

IV.5.2. Especificidad de interacción de las flavoproteínas con las quinoproteínas asociadas.

La similitud de los intermediarios en la síntesis de LodA y GoxB, unido a la similitud de secuencia de LodB y GoxB nos llevó a estudiar si en el sistema recombinante se puede sustituir LodB por GoxB, y viceversa, y si de esa manera se obtiene la correspondiente quinoproteína activa.

Una serie de plásmidos compatibles conteniendo los genes *lodA*, *lodB*, *goxA* y *goxB* por separado fueron construidos como se indica en el **apartado III.15** de Materiales y métodos con el fin de estudiar la síntesis de las quinoproteínas en presencia de diferentes flavoproteínas. En consonancia con otros resultados de esta memoria, se observó actividad lisina oxidasa cuando se coindujeron LodA y LodB (**fig. IV.31**). La presencia de los *lodA* y *lodB* en el mismo plásmido (pETLODAB11) o en plásmidos diferentes (pLODADuet + pETLODB11) no afectó de forma significativa al nivel de actividad obtenida. Sin embargo, no se detectó actividad lisina oxidasa ni se detectó MLodA cuando el plásmido conteniendo *lodB* fue sustituido por un plásmido conteniendo *goxB* (**fig. IV.31**).

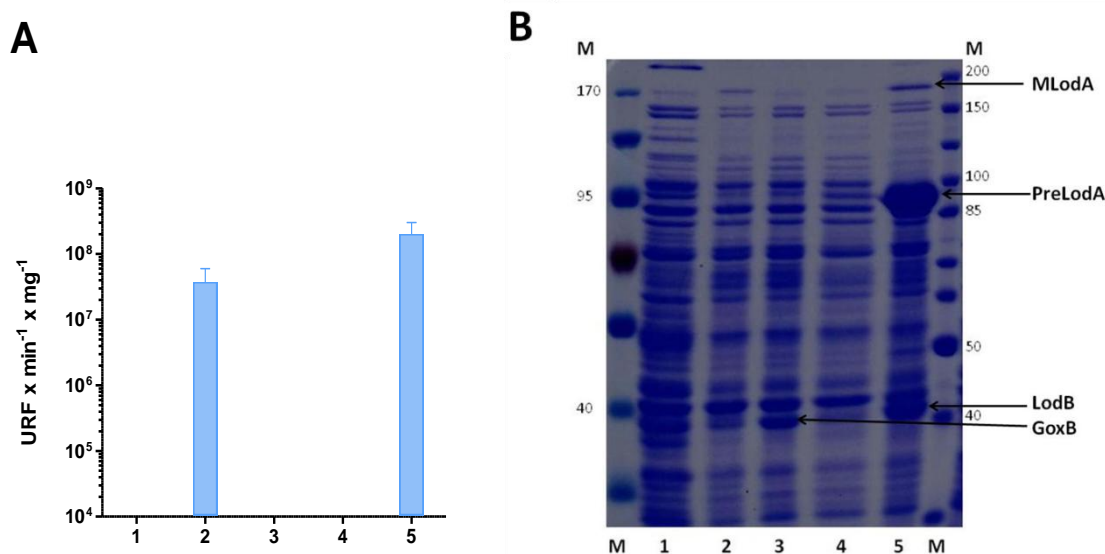


Figura IV. 31. Especificidad de la interacción de LodA con LodB. Cultivos de *E. coli* Rosetta (DE3) con diferentes plásmidos fueron inducidos a 15°C con 1mM de IPTG y recogidos a las 16 horas. (A) Actividad lisina oxidasa tras precipitar la fracción soluble con EtOH. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes de extractos celulares: (1) Control [sin plásmido]; (2) pLODADuet + pETLODB11 [LodA + LodB]; (3) pLODADuet + pETGOXB11 [LodA + GoxB]; (4) pLODADuet + pET11 [LodA]; (5) pETLODAB11 [LodA + LodB]; M: marcador. MLodA: LodA multimérica.

De forma similar, GoxA fue inducida y purificada a partir de cultivos en los que se expresó sola, en presencia de LodB o en presencia de GoxB. Sólo en el último caso se detectó actividad enzimática (**fig. IV.32A**). En estos cultivos se volvió a observar la

copurificación de GoxA y GoxB indicativo de la formación de un complejo entre ambas proteínas (**fig. IV.32B**).

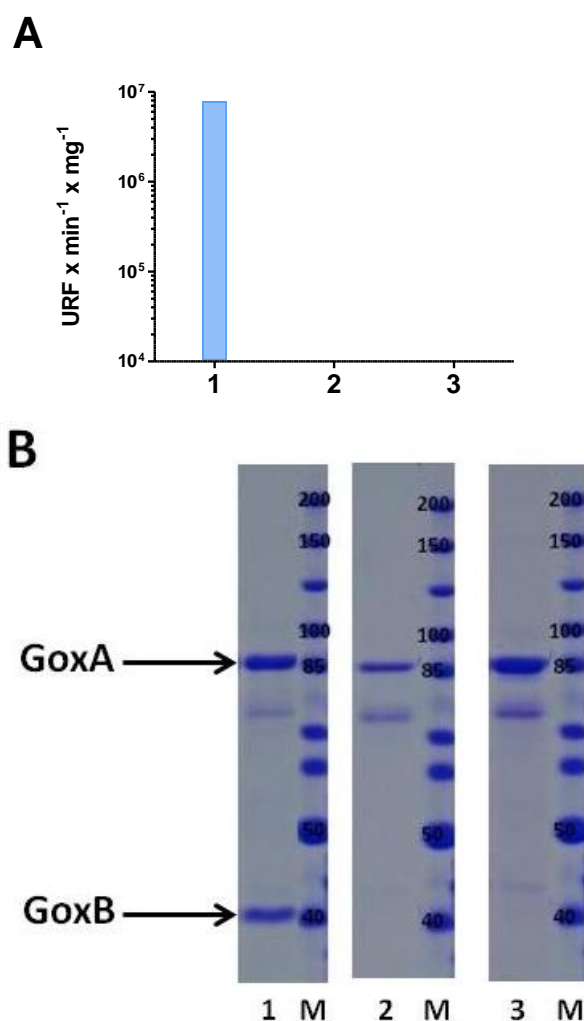


Figura IV. 32. Especificidad de la interacción de GoxA con GoxB. Cultivos de *E. coli* CD03 con diferentes plásmidos fueron inducidos a 15 °C en LB 1% de glucosa con 0,5 mM de IPTG y recogidos a las 16 h. (A) Actividad lisina oxidasa de la primera elución de las muestras purificadas. (B) SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes de la primera elución de las muestras purificadas en resina Ni-NTA: (1) pGOXADuet + pETGOXB11 [HisGoxA + GoxB]; (2) pGOXADuet + pETLODB11 [HisGoxA + LodB]; (3) pGOXADuet + pET11 [HisGoxA].

Los resultados mostrados en este apartado ponen de manifiesto que la quinoproteína funcional solamente se obtiene en presencia de la flavoproteína asociada. Este dato sugiere que se produce una interacción altamente específica entre las proteínas codificadas en un mismo operón. Estos resultados también están en consonancia con los obtenidos previamente en el sistema nativo (Gomez *et al.*, 2010). En ese sistema se está expresando GoxB y muy probablemente también la proteína XoB codificada por el tercer operón similar a *lod*, lo que revela que la función de LodB no puede ser sustituida por otras proteínas.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El estudio del metabolismo de aminoácidos es importante ya que además de ser necesarios para la síntesis de proteínas, pueden ser usados como fuente de carbono, energía y/o nitrógeno por microorganismos. Además de esto, los aminoácidos participan en otros procesos como la biosíntesis de metabolitos secundarios y pigmentos. Entre las distintas enzimas que actúan sobre estos compuestos se encuentran las L-aminoácido oxidasas (LAOs). Generalmente, estas enzimas son descritas como flavoproteínas que oxidan L-aminoácidos en posición alfa liberando el correspondiente cetoácido, amonio y peróxido de hidrógeno (Macheroux *et al.*, 2001). Las LAOs más estudiadas son las producidas por serpientes (Du and Clemetson, 2002), aunque también se han detectado en otros organismos tales como bacterias, hongos, gasterópodos marinos y peces (Yu and Qiao, 2012).

La búsqueda y caracterización de nuevas actividades LAO tiene también gran interés debido a las múltiples aplicaciones biotecnológicas que se han propuesto para estas enzimas. A las LAOs se les ha atribuido actividad antitumoral, antimicrobiana, antiviral y citotóxica (Lukasheva *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2012) Además, pueden ser usadas en biotransformaciones (Liu *et al.*, 2013) y como biosensores (Lee and Huh, 2009). Sin embargo, la expresión recombinante de LAOs con cofactor flavínico muestra dificultades lo que conlleva una limitación para su aplicación biotecnológica (Pollegioni *et al.*, 2013).

Por ello, el descubrimiento de dos nuevas LAOs sintetizadas por *M. mediterranea*, LodA (EC 1.4.3.20) (Lucas-Elio *et al.*, 2006) y GoxA (Campillo-Brocal *et al.*, 2013) que no son flavoproteínas, sino que pertenecen a una nueva familia de quinoproteínas supone la aparición de un nuevo campo de estudio que consideramos muy interesante. Estas quinoproteínas muestran propiedades diferentes al resto de LAOs. Particularmente destacado es que poseen un cofactor quinónico que se genera mediante modificación post-traducciona de aminoácidos, tal como se ha estudiado en esta memoria y se discute más adelante. Además, son muy resistentes a algunas condiciones ambientales (Lucas-Elio *et al.*, 2005) y muestran una alta especificidad de sustrato (Gomez *et al.*, 2006; Campillo-Brocal *et al.*, 2013). En el caso de LodA, la alta especificidad que muestra frente al aminoácido L-lisina ha permitido su uso como biosensor de este aminoácido (Matsuda and Asano, 2010). Desde el punto de vista fisiológico, es poco lo que se conoce de estas proteínas. En el caso de LodA se ha observado que participa en el desarrollo de biopelículas microbianas (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

En comparación con las LAOs típicas, la presencia de un cofactor quinónico en LodA y GoxA supone una ventaja, en relación a sus aplicaciones biotecnológicas, ya que no sería necesaria la adición de un cofactor externo. Desde el punto de vista científico, el

estudio de los procesos de modificación post-traducciona de proteínas reviste una gran importancia ya que este tipo de modificaciones contribuye a ampliar la gran diversidad proteica detectada en los seres vivos (Davidson, 2011).

En esta memoria se ha abordado estudios de relación estructura-función en LodA. Se ha descrito el cofactor que presenta esta enzima y se han iniciado estudios para la caracterización del proceso de generación del cofactor y el papel que juega la flavoproteína LodB, codificada en el mismo operón, en dicho proceso.

V.1. ANÁLISIS DE LodA.

Partiendo de resultados previos de nuestro grupo en los que se había observado que era posible expresar LodA de forma recombinante (Gomez, 2010), en esta memoria se han diseñado diversos vectores que han permitido fusionar LodA y/o LodB a diferentes etiquetas lo que ha facilitado su aislamiento y caracterización.

Con anterioridad a estos trabajos sobre LodA, la expresión recombinante de quinoproteínas solo había sido posible en el caso del cofactor dissociable PQQ, donde el operón que codifica este cofactor en *Gluconobacter oxydans* había sido clonado en *E. coli* (Yang *et al.*, 2010) y en el caso de TTQ, donde la enzima MADH había sido expresada con éxito en *Rhodobacter sphaeroides* (Graichen *et al.*, 1999). En la generación de MADH con el cofactor TTQ es necesaria la presencia de otras proteínas adicionales codificadas por genes en el operón *mau*, denominado así por utilización de metilamina. Este operón contiene un total de 11 genes, algunos de los cuales codifican proteínas con función desconocida (van der Palen *et al.*, 1995; van der Palen *et al.*, 1997). El hecho de que el operón *lod* de *M. mediterranea* solo tenga dos genes, el que codifica LodA y un segundo gen que codifica la flavoproteína LodB (Lucas-Elio *et al.*, 2005) supone una gran ventaja para la expresión recombinante lo que ha facilitado su estudio.

Un resultado relevante de este estudio ha sido detectar que LodA expresada recombinantemente contiene CTQ como cofactor quinónico. Estos datos se encuentran en concordancia con los datos estructurales de LodA aislada de cultivos de *M. mediterranea* (Okazaki *et al.*, 2013). Todas las oxidasas con cofactor quinónico descritas previamente, tanto en bacterias como en animales, poseían un cofactor quinónico derivado de Tyr (Janes *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1996). Por su parte, los cofactores derivados de Trp solamente se habían detectados en deshidrogenasas bacterianas (McIntire *et al.*, 1991; Datta *et al.*, 2001). LodA es por tanto, la primera oxidasa bacteriana descrita que posee un cofactor derivado del triptófano de tipo CTQ. Una diferencia destacable entre LodA y el resto de enzimas con un cofactor derivado del triptófano es el tamaño. LodA es una proteína relativamente grande de 726

aminoácidos. Por el contrario, MADH es una proteína oligomérica, en la que el cofactor se localiza en una subunidad pequeña de 131 aminoácidos (Chen *et al.*, 1998). En el caso de QHNDH la subunidad γ con el cofactor es de 82 aminoácidos (Datta *et al.*, 2001). El gran tamaño de LodA podría contribuir a hacer innecesarias algunas proteínas accesorias que participan en la generación del cofactor de las otras enzimas. Por ejemplo, en la generación del cofactor CTQ de QHNDH, participan otras proteínas codificadas en el operón *qhp* que está compuesto por 6 genes (Nakai *et al.*, 2014). En la síntesis de CTQ en QHNDH, la proteína QhpD es necesaria para orientar de forma apropiada los residuos del cofactor durante la biogénesis del cofactor (Ono *et al.*, 2006). En el caso de la subunidad beta de MADH se detectan algunos puentes disulfuro (Chen *et al.*, 1998), para los que se ha propuesto que participan en la correcta orientación de los residuos que participan en la biosíntesis del cofactor (Jones *et al.*, 2005). En el caso de LodA, no se detectan puentes disulfuro y la orientación de los residuos participantes en el cofactor se podría obtener gracias al correcto plegamiento de la proteína.

V.1.1. Análisis de residuos mutados en LodA.

Al ser LodA una proteína novedosa, no existían datos previos sobre la posible función de sus distintos residuos y dominios. Se ha procedido a estudiar algunos de estos residuos mediante mutagénesis dirigida. Para la selección de estos residuos se ha tenido en consideración los datos estructurales, así como la conservación de dichos residuos en proteínas similares a LodA (**fig. IV.21**). La estructura cristalina de LodA obtenida en *E. coli*, muestra que posee un cofactor quinónico derivado del triptófano de tipo CTQ, formado por la Cys516 y un Trp581 modificado. Estos dos residuos están conservados en todas las proteínas similares a LodA detectadas, lo que sugiere que todas ellas tienen el mismo tipo de cofactor. La mutación de los residuos conservados Cys516 y Trp581 genera una forma de LodA enzimáticamente inactiva en ambos casos. En el caso concreto de la proteína con la mutación C516A, el Trp581 se detecta sin modificar. Este resultado indica que la mutación en la cisteína del cofactor impide la primera hidroxilación que, como se discute más adelante, es un proceso autocatalizado y la primera etapa en la generación del cofactor. Una posible explicación a este resultado es que la Cys516 sea necesaria para orientar el Trp581 y permitir la primera hidroxilación que genera PreLodA.

El residuo Asp512 localizado cerca del centro activo de LodA está conservado en todas las proteínas similares a LodA. Por otra parte, el residuo Cys448, aunque no está conservado en todas las proteínas similares a LodA sí lo está en las que forman el grupo IA que son las más relacionadas filogenéticamente con LodA (**apéndices A.1 y A.2**). Estos residuos se encuentran localizados en posiciones similares a dos residuos de aspártico conservados en MADH y QHNDH (**fig. IV.11B**). La mutación D512A

determina que la primera hidroxilación del Trp581 no tenga lugar evitando de esta manera la formación de PreLodA, al igual que ocurre en la biogénesis del cofactor TTQ de MADH (Jones *et al.*, 2005). Por otra parte, la mutación C448A en LodA, produce también un resultado similar al obtenido con MADH, detectándose una mezcla de formas moleculares de LodA activa y PreLodA (Jones *et al.*, 2005). El análisis de la actividad enzimática del mutante C448A también ha mostrado un aumento de la Km para lisina (Sehanobish *et al.*, 2015).

Se han analizado varios residuos en los que el análisis de la estructura revela que están en el canal de entrada al centro activo. El análisis por MS de los mutantes en los residuos Glu101 y Tyr211 muestra un incremento de MM de +28 indicando que la formación del cofactor no está afectada. Sin embargo, la actividad detectada para el mutante E101A es menor que en la proteína nativa y en el caso del mutante Y211A es nula. Se ha descrito que el mecanismo de actuación de LodA responde a una cinética tipo ping pong teniendo a la lisina y al O₂ como sustratos (Sehanobish *et al.*, 2014). Resultados recientes obtenidos en colaboración con el laboratorio del Dr. Víctor Davidson indican que la Tyr211 puede estar de hecho formando una puerta de entrada al centro activo y que su situación podría afectar a la entrada y/o salida de sustratos y productos (Sehanobish *et al.*, 2015). Por otra parte, el mutante R100A no está afectado en la generación de LodA activa lo que indica que no es un residuo importante (**apéndice A.3**). Los resultados obtenidos por mutagénesis concuerdan con los datos obtenidos a partir de los análisis de secuencia de residuos conservados de proteínas parecidas a LodA que pertenecen al grupo IA. El residuo Glu101 está conservado en 19 de las 21 proteínas, Tyr211 en las 15 más próximas a LodA, mientras que Arg100 no está conservado.

V.1.2. Análisis del extremo C-terminal de LodA.

El estudio del mecanismo de secreción de proteínas bacterianas es importante ya que este proceso participa en la adquisición de nutrientes, en la interacción de la bacteria con el entorno y en la liberación de factores de virulencia en patógenos (Dautin and Bernstein, 2007). En bacterias Gram-negativas las proteínas destinadas a la secreción tienen que atravesar dos membranas: la membrana citoplasmática y la membrana externa. Para ello presentan diversos sistemas de exportación de proteínas (Saier, 2006). En general, las enzimas que contienen un cofactor quinónico aunque son sintetizadas en el citoplasma, realizan su función mayoritariamente fuera de la célula, ya sea en el espacio periplásmico en bacterias Gram negativas o dentro de la matriz extracelular en el caso de mamíferos (Klinman and Bonnot, 2014).

Las proteínas con cofactor derivado de Trp como MADH y QHNDH, actúan en el espacio periplásmico (Husain and Davidson, 1987; Takagi *et al.*, 1999). La subunidad

alfa de MADH que contiene el cofactor TTQ posee una secuencia señal de secreción en N-terminal bastante larga (Chistoserdov and Lidstrom, 1991). Por su parte, la subunidad gamma que contiene el cofactor CTQ en QHNDH no presenta una secuencia señal típica de secreción aunque sí se ha detectado la presencia de un péptido líder de 28 aminoácidos en N-terminal (Nakai *et al.*, 2014). Este péptido líder debe ser eliminado para poder exportarla del citoplasma al espacio periplásmico con la participación de QhpF, un transportador ABC. Las otras dos subunidades que forman QHNHD son transportadas al espacio periplásmico utilizando el translocón Sec o Tat (Nakai *et al.*, 2014). A diferencia de estas, LodA no es una proteína periplásmica sino que es secretada al medio extracelular (Lucas-Elio *et al.*, 2005). Sin embargo, el análisis de su secuencia no ha revelado secuencias claramente indicativas de motivos de secreción (Lucas-Elio *et al.*, 2006).

En *Agrobacterium tumefaciens* se ha detectado una secuencia señal en el extremo C-terminal que consiste en una serie de residuos con carga positiva que corresponden al motivo $RX_{(7)}RXRXRX(n)$ (Vergunst *et al.*, 2005). Una secuencia parecida puede ser detectada en la zona C-terminal de LodA (RAFSKVRSSNIRPRSGTRMRG) (**figura IV.13**). Al analizar la estructura cristalina de LodA esta zona C-terminal no se observa, lo que podría estar relacionado con que estos residuos participen en el mecanismo de secreción. Apoyando la hipótesis de un papel importante para esta región en C-terminal, está el hecho de que el análisis de secuencia de proteínas similares a LodA del grupo IA revela que también muestran secuencias de residuos con carga positiva en el extremo C-terminal (**apéndice A.5**).

En esta memoria se han realizado dos tipos de deleciones en la zona C-terminal de LodA donde se localizan estos residuos. Se ha observado que la deleción de los últimos 46 aminoácidos de esta zona no permite que se sintetice LodA activa ni en el sistema recombinante ni en el nativo. Sin embargo, cuando se realizó una deleción de menor tamaño (9 aminoácidos) de la zona C-terminal de LodA se observó que la proteína sintetizada se generaba más lentamente que la nativa en ambos sistemas. Además, los niveles de actividad alcanzados eran menores. En el sistema nativo este descenso de actividad era menor tanto a nivel citoplasmático como extracelular. Por lo tanto, no se han obtenido evidencias de que la zona C-terminal participe en la secreción de LodA.

Los datos presentados en esta memoria muestran que la deleción en el extremo C-terminal de LodA afecta a la generación de la forma activa de LodA. Esto podría ser debido a que la zona delecionada interaccione con LodB, o que participe de alguna manera en la formación/estabilización del multímero de LodA o en el plegamiento correcto de la proteína. A la vista de estos resultados, tampoco se puede descartar completamente la implicación de la zona C-terminal en el mecanismo de secreción de LodA.

V.2. SÍNTESIS DEL COFACTOR.

LodA es la primera quinoproteína con cofactor CTQ que se ha expresado de forma recombinante en *E. coli*. La puesta a punto de un sistema recombinante con proteínas fusionadas a etiquetas nos ha permitido caracterizar los intermediarios generados durante el proceso de síntesis del cofactor, y en consecuencia, obtener información sobre el proceso de formación del cofactor CTQ de LodA.

Los análisis por MS de LodA expresada en presencia de LodB, mostraron un incremento de MM de +28 Da. Este incremento es el esperado en la modificación post-traducciona que genera el cofactor quinónico CTQ. El cofactor además se ha observado en la estructura de LodA. Este resultado muestra claramente que LodB es necesaria, y al mismo tiempo suficiente en el sistema recombinante, para la formación del cofactor quinónico. Por el contrario, cuando LodA se expresó en ausencia de LodB se detectó como una forma enzimáticamente inactiva a la que denominamos PreLodA. PreLodA presenta un incremento de MM de +16 debido a la inserción de un grupo hidroxilo en Trp581. Es posible que PreLodA se genere por un mecanismo autocatalítico ya que, hasta ahora, no se ha detectado que participe ninguna otra proteína en el proceso. Además, parece poco probable que alguna enzima presente en *E. coli* sea capaz de realizar la hidroxilación inicial del Trp de LodA. En el caso de la generación del cofactor de MADH, también se ha detectado un intermediario monohidroxilado (preMADH) del que se desconoce el mecanismo de generación (Pearson *et al.*, 2003; Yukl *et al.*, 2013). A favor de que se trate de un proceso autocatalítico se encuentra el hecho de que la mutación de un residuo Asp, conservado en proteínas con cofactor derivado del Trp, conduce a la generación de una proteína sin la hidroxilación inicial, tal como se ha observado en LodA D512A y en el caso de MADH (Jones *et al.*, 2005).

En concordancia con los datos expuestos en esta memoria, se propone que PreLodA es el sustrato de LodB para generar el cofactor CTQ, de forma semejante a lo que ocurre en la generación de TTQ de MADH (Jensen *et al.*, 2010). En este último caso, la oxidación de preMADH llevada a cabo por MauG tiene lugar mediante un proceso de “electron hopping” en el que participan varios residuos de Trp. Algunos de estos triptófanos están en la superficie de la proteína, mientras que el modificado en el cofactor está en el interior, de manera que no hay contacto directo entre el Trp del cofactor y MauG (Pearson *et al.*, 2003; Abu Tarboush *et al.*, 2011). Es interesante señalar que en la secuencia de LodA se pueden observar una serie de residuos de triptófano altamente conservados. Trp85 y Trp509 en el 100% y Trp217, Trp243, Trp311 y Trp416 en más del 90% de las proteínas similares a LodA (**fig. IV.22**). Estos residuos podrían ser candidatos a participar en el mecanismo de “electron hopping” en el que la oxidación de LodA por parte de LodB tendría lugar sin que la segunda enzima

tenga acceso al residuo modificado en el cofactor por estar en el mismo interior de la proteína. Aunque de momento este tipo de mecanismo de acción no ha sido descrito para ninguna flavoproteína, recientemente se ha descrito en una tiorredoxina reductasa que es posible un cierto nivel de comunicación entre el cofactor FAD de esta enzima y el estado de oxidación de un Trp localizado en la superficie (Xu *et al.*, 2015). El hecho de que el cofactor CTQ de LodA se encuentre en el interior de la proteína, y el que los dos residuos que forman parte del mismo se encuentren alejados en la estructura primaria de la proteína parece descartar que la oxidación de los mismos tenga lugar antes del plegamiento de LodA. Para estudiar el mecanismo de generación de CTQ en LodA será preciso poner a punto mecanismos “in vitro” de generación del cofactor quinónico, además de mutagénesis dirigida de algunos de los Trp mencionados anteriormente. Además, serían interesantes estudios comparativos de la actividad catalítica de LodB y MauG.

En la biosíntesis del cofactor CTQ de QHNDH se ha demostrado que la flavoproteína QhpG es requerida. Basándose en el análisis de su secuencia se ha propuesto que es una flavoproteína monooxigenasa (Nakai *et al.*, 2014). El análisis de secuencia de LodB también indica que es una flavoproteína. Sin embargo, la similitud global de QhpG y LodB es baja y cae en el rango de similitud detectado con otras enzimas, tales como *p*-fenol hidroxilasa, que son enzimas catabólicas que no participan en ningún tipo de modificación post-traducciona de proteínas (**apartado IV.4.1.2**). La baja similitud entre QhpG y LodB podría indicar que realizan diferentes funciones en la generación del cofactor CTQ en QHNDH y LodA. En la generación de CTQ en QHNDH ha sido propuesto que QhpG tiene actividad peptidil-triptófano monooxigenasa y que participa en la primera hidroxilación del Trp generando un producto intermediario monohidroxilado. En estos estudios se menciona la interacción de QhpG con la subunidad gamma que posee el enlace tioéter. Sin embargo, no fue detectada ninguna forma monohidroxilada que correspondiera a preCTQ. En este modelo, el intermediario monohidroxilado es oxidado por los dos hemo tipo c de la subunidad alfa de QHNDH, que de esta forma actuaría de manera parecida a MauG (Nakai *et al.*, 2014). (**fig. I.21**). Por el contrario en LodA la primera hidroxilación es independiente de LodB. Esta flavoproteína actúa precisamente sobre la forma monohidroxilada (PreLodA).

Una diferencia importante en la síntesis del cofactor de LodA con otras quinoproteínas es que hasta ahora no se han obtenido evidencias de la participación de metales en el proceso. En este sentido, en la biogénesis de cofactores derivados de Tyr se ha demostrado que es necesaria la presencia de un metal como agente oxidante (Cai and Klinman, 1994; Bollinger *et al.*, 2005). De la misma forma, en la generación de cofactores derivados del Trp se necesita la participación de proteínas que poseen grupos hemo, como es el caso de MauG en la generación de TTQ de MADH (Wang *et*

al., 2003), y de la subunidad alfa en la generación de CTQ en la QHNDH (Nakai *et al.*, 2014). Sin embargo, en el sistema LodA/LodB no se ha detectado la participación de metales, ni de proteínas que posean grupos hemo. Adicionalmente, la baja similitud de LodB con otras proteínas previamente descritas que participan en la biogénesis de cofactores quinónicos sugiere que la maduración del cofactor de LodA ocurre por un mecanismo de modificación post-traducciona que no se ha descrito anteriormente. En consecuencia, el estudio de la generación de CTQ en LodA podría revelar nuevos mecanismos de modificación post-traducciona de proteínas.

V.3. ESTUDIO DE OTROS OPERONES SIMILARES A *lod* Y *gox*.

Análisis bioinformáticos han revelado que se pueden detectar genes que codifican proteínas similares a LodA en diversos genomas microbianos (aproximadamente en el 1% de los genomas secuenciados depositados en la base de datos del IMG). La mayoría de las proteínas codificadas por los operones detectados aparecen anotadas como proteínas hipotéticas. Teniendo en cuenta su relación filogenética, las proteínas similares a LodA se pueden agrupar en diferentes grupos. El hecho de que LodA y GoxA se encuentren en grupos diferentes sugiere que estas proteínas tienen actividades enzimáticas distintas dependiendo del grupo al que pertenezcan (Campillo-Brocal *et al.*, 2015).

Los genes similares a *lodA* detectados en otros genomas microbianos se encuentran generalmente en un operón que también contiene un gen que codifica una proteína similar a LodB. Esta observación sugiere una importante presión evolutiva para que se mantenga la organización del operón. La organización de genes en operones es una característica principalmente de bacterias pero también se ha observado en algunos eucariotas. Los operones suelen codificar genes con funciones relacionadas, por ejemplo, proteínas que interactúan o que participan en una misma ruta metabólica. Esto proporciona una ventaja al reducir el número de promotores que se usan e incrementa la posibilidad de cotransferencia de los genes. Además, parece ser que la cotranscripción puede reducir el coste metabólico de la producción de complejos de proteínas (Sneppen *et al.*, 2010). Se ha visto que hay relación entre el tamaño del genoma y la aparición de operones, a mayor tamaño del genoma, los operones tienden a presentarse en menor número, ser más cortos y estar menos conservados (Nuñez *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de la existencia de numerosas hipótesis que intentan explicar el por qué los genes se organizan en operones, todavía no hay una explicación definitiva (Ray and Igoshin, 2012). El hecho de que, como se ha demostrado en este trabajo, la proteína similar a LodB sea específica para su quinoproteína asociada y, juegue un papel esencial en el proceso de generación del cofactor, sin duda es un factor importante.

Los operones similares a *lod* detectados en esta memoria presentan un patrón general en el que el gen similar a *lodA* va seguido de un gen similar a *lodB*, como ocurre en el caso de *M. mediterranea* (**fig. IV.23A**). Sin embargo, se han detectado algunas modificaciones a este patrón. Por ejemplo, en *Bradyrhizobium japonicum* USDA6 los genes similares a *lodA* y *lodB* se encuentran separados por un pequeño gen adicional que no presenta ningún dominio conservado. Además, este tipo de operón presenta genes que podrían corresponder a hipotéticas tirosinasas y MCOs (**fig. IV.23B**). Las tirosinasas son enzimas que participan en la síntesis de melaninas y que han sido aisladas de hongos, bacterias y plantas. Dependiendo del organismo que las presente su función puede ser diferente (Zaidi *et al.*, 2014). En este sentido, las melaninas pueden tener carácter protector frente a la radiación UV (Patel *et al.*, 1996), pero también pueden funcionar como factores de virulencia (Valeru *et al.*, 2009; Alspaugh, 2014). Dentro de las MCOs se encuentran las lacasas. Este tipo de enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son capaces de oxidar una gran variedad de sustratos (Thurston, 1994). En bacterias se ha observado que la presencia de lacasas está relacionada con diferentes funciones tales como la síntesis de pigmentos que protegen frente a la luz UV y el peróxido de hidrógeno (Singh *et al.*, 2011), o resistencia frente a Cu (Lee *et al.*, 1994). Es interesante señalar que *M. mediterranea* también sintetiza una lacasa (PpoA) y una tirosinasa (PpoB). Estos genes no se encuentran localizados en el mismo operón que *LodA*. Sin embargo, muestran elementos reguladores comunes con *LodA* siendo, por ejemplo, todas ellas incluidas durante la fase estacionaria de crecimiento (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Estas observaciones sugieren una posible relación funcional entre todas estas enzimas en la que los pigmentos generados por la tirosinasa y la lacasa podrían proporcionar protección al microorganismo frente a diferentes tipos de estrés celular, quizás incluso frente a la propia LAO.

En los operones detectados en hongos, como por ejemplo, *Gymnopus luxurians* el gen similar a *lodB* se encuentra orientado en sentido inverso al gen similar a *lodA* (**fig. IV.23C**). Además, en este tipo de operones se ha detectado la presencia de un gen que codifica una hipotética proteína con dominio de ferritina. Se ha observado que en bacterias las proteínas que poseen un dominio de ferritina participan en la tolerancia a diversos tipos de estrés (Gauss *et al.*, 2012; Milecka *et al.*, 2015). De la misma forma que en el operón descrito anteriormente que presentaba genes de hipotéticas MCOs y tirosinasas, la presencia de un gen adicional con dominio de ferritina sugiere que las proteínas similares a *LodA* participan en mecanismos de adaptación a ciertas condiciones ambientales por determinar en futuros trabajos.

El análisis del genoma de *M. mediterranea* ha revelado dos operones adicionales similares a *lod*: *gox* y *xo* (Lucas-Elio *et al.*, 2012b). Este último codifica una proteína cuya actividad enzimática no ha podido ser caracterizada hasta el momento. El operón

gox está compuesto por los genes *goxA* y *goxB*. La glicina oxidasa GoxA codificada por este operón tiene propiedades diferentes a las glicinas oxidasas descritas hasta la fecha (Campillo-Brocal *et al.*, 2013). En este trabajo se ha observado que, de forma similar a LodA, en la síntesis de esta glicina oxidasa también se genera un intermedio monohidroxlado, denominado PreGoxA. Este resultado sugiere que el mecanismo de formación del cofactor es un proceso igual en todas las proteínas similares a LodA. En el caso de GoxA también es necesaria la actividad de la proteína asociada, GoxB, que está codificada en el mismo operón que codifica la quinoproteína. Sin embargo, los datos mostrados en esta memoria indican que el papel de LodB y GoxB no son intercambiables y que cada flavoproteína actúa específicamente sobre su quinoproteína compañera. De acuerdo con estas observaciones, la mutación de *lodB* en el sistema nativo, determina que se genere LodA no activa, a pesar de la presencia de GoxB y la flavoproteína del tercer operón. Como se ha discutido anteriormente, esta especificidad de interacción debe de estar relacionada con la conservación de la estructura de operones con genes que codifican una LAO y una flavoproteína implicada en la síntesis del cofactor quinónico de la primera. En relación con esto, se ha propuesto que proteínas que forman complejos tienden a ser codificadas en operones (Sneppen *et al.*, 2010). En el caso de GoxA/GoxB se han obtenido evidencias de la formación del complejo (Campillo-Brocal, Tesis Doctoral en preparación).

V.4. MODELO DE FORMACIÓN DEL COFACTOR CTQ EN LodA.

En el caso de la síntesis del cofactor CTQ en LodA se puede proponer un modelo de generación del mismo compatible con los datos expuestos en esta Tesis Doctoral (**fig. V.1**).

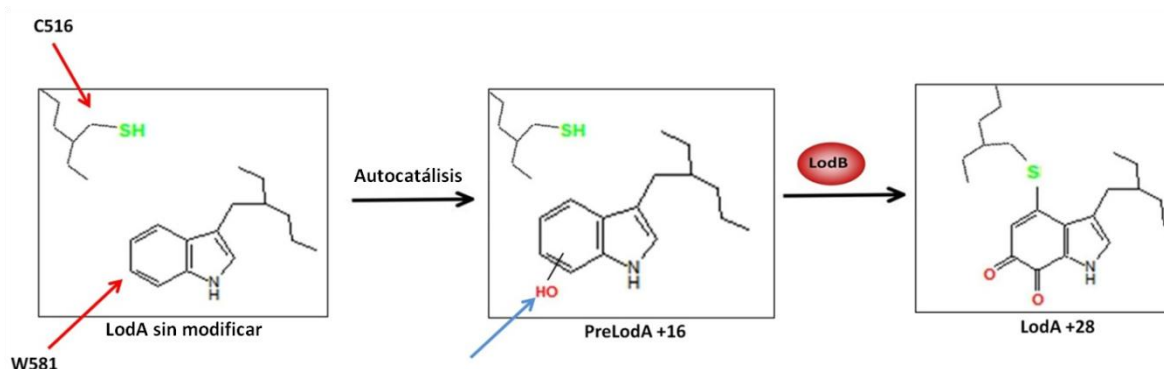


Figura V. 1. Modelo de formación del cofactor CTQ en LodA de *M. mediterranea*.

Inicialmente LodA se sintetiza a nivel ribosómico con la Cys516 y el Trp581 sin modificar. La primera hidroxilación del Trp581 genera un intermediario, PreLodA, con un incremento de MM de +16. PreLodA se genera mediante un proceso independiente de LodB, en el cual el residuo Asp512 está involucrado puesto que su mutación a Ala

impide la generación de PreLodA. A continuación, en este modelo LodB actuaría sobre el intermediario monohidroxiado. Solo la coexpresión de LodA y LodB permite la generación del cofactor completo sugiriendo que LodB podría jugar un papel similar a MauG en la generación de MADH, completando la síntesis del cofactor por oxidación del intermediario. La actividad enzimática concreta de LodB y su actuación sobre LodA será objeto de estudio en trabajos posteriores. Una hipótesis sería que LodB podría tener actividad hidroxil triptófano monooxigenasa generando un Trp con dos grupos hidroxilos. Las moléculas con dos grupos hidroxilos muy cercanas, tales como el catecol, tienden a ser inestables, oxidándose a quinona rápidamente. Las quinonas son compuestos muy reactivos lo cual podría explicar la interacción con el residuo de cisteína para generar el cofactor CTQ definitivo.

VI. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes a las que se ha llegado en este trabajo, se enumeran a continuación:

1. Se ha puesto a punto un sistema de expresión recombinante de las proteínas LodA y/o LodB fusionadas a etiquetas lo que ha facilitado su aislamiento y caracterización. LodA activa contiene el cofactor CTQ, tal como ha revelado su estructura cristalina obtenida en colaboración con los Drs. Francisco Javier Medrano y Antonio Romero del CIB, CSIC. CTQ se origina por modificación de los residuos Cys516 y Trp581. Estos residuos están conservados en todas las proteínas similares a LodA.
2. LodB es requerida para la síntesis de la forma activa de LodA. En ausencia de LodB se obtiene una forma soluble inactiva, PreLodA. Esta forma está modificada post-traduccionalmente por hidroxilación del residuo Trp581. El residuo Asp512, también conservado en todas las proteínas similares a LodA, es esencial en la generación del precursor PreLodA, ya que su mutación determina la ausencia del precursor y, en consecuencia, de la proteína activa.
3. Se han analizado por mutagénesis dirigida otros residuos. Destacan los residuos Tyr211 y Glu101 situados en el canal de acceso al centro activo. Su mutación a Ala determina la pérdida de actividad enzimática en el primer caso, y un descenso significativo en el caso de la mutación Glu101.
4. Los datos obtenidos indican que extremo C-terminal está implicado en la síntesis de la forma activa de LodA. No se han obtenido evidencias que indiquen que participe en su secreción.
5. Se ha creado un sistema de plásmidos con LodB fusionado a una etiqueta de MBP que ha aumentado su solubilidad permitiendo su purificación. Bajo las condiciones ensayadas en esta memoria, no se ha conseguido detectar el cofactor flavínico de LodB lo que ha impedido su caracterización.
6. En los operones analizados, el gen que codifica una proteína similar a LodA se encuentra generalmente seguido de un gen que codifica una hipotética flavoproteína similar a LodB. Se han observado variaciones a este patrón general. En uno de ellos, entre el gen *lodA* y *lodB* se observa un gen adicional que codifica una proteína que no tiene ningún motivo conservado. Este tipo de operones también contiene otros genes que codifican hipotéticas tirosinasas y MCOs. En hongos se ha detectado otro patrón en el que los genes similares a

lodB se encuentran localizados en la orientación contraria al gen *lodA*, y presenta un gen que codifica una proteína hipotética con dominio de ferritina.

7. La síntesis de la forma activa de GoxA tiene lugar de forma similar a la de LodA. Se sintetiza una forma monohidroxilada en el triptófano que forma parte del cofactor quinónico en ausencia de GoxB.
8. Se ha observado que las flavoproteínas que se sintetizan en el mismo operón son muy específicas de la quinoproteína que modifican. En el caso de LodA y GoxA se ha demostrado que no son intercambiables.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abu Tarboush,N., Jensen,L.M., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2013a) A Trp199Glu MauG variant reveals a role for Trp199 interactions with pre-methylamine dehydrogenase during tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *FEBS Lett* **587**: 1736-1741.

Abu Tarboush,N., Yukl,E., Shin,S., Feng,M., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2013b) Carboxyl group of Glu113 is required for stabilization of the diferrous and bis-Fe(IV) states of MauG. *Biochemistry* **52**: 6358-6367.

Abu Tarboush,N., Jensen,L.M.R., Yukl,E.T., Geng,J., Liu,A., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2011) Mutagenesis of tryptophan199 suggests that hopping is required for MauG-dependent tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 16956-16961.

Ahn,M.Y., Ryu,K.S., Lee,Y.W., and Kim,Y.S. (2000) Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Arch Pharm Res* **23**: 477-481.

Airenne,T., Nymalm,Y., Kidron,H., Smith,D., Pihlavisto,M., Salmi,M. *et al.* (2005) Crystal structure of the human vascular adhesion protein-1: unique structural features with functional implications. *Protein Sci* **14**: 1964-1974.

Alexeyev,M.F., and Shokolenko,I.N. (1995) Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Gene* **160**: 59-62.

Alspaugh,J.A. (2014) Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genet Biol* **S1087-1845**: 00161-00163.

Ande,S., Fussi,H., Knauer,H., Murkovic,M., Ghisla,S., Fröhlich,K., and Macheroux,P. (2008) Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Yeast* **25**: 349-357.

Arima,J., Sasaki,C., Sakaguchi,C., Mizuno,H., Tamura,T., Kashima,A. *et al.* (2009) Structural characterization of l-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS J* **276**: 3894-3903.

Arima,J., Tamura,T., Kusakabe,H., Ashiuchi,M., Yagi,T., Tanaka,H., and Inagaki,K. (2003) Recombinant expression, biochemical characterization and stabilization through proteolysis of an L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *J Biochem* **134**: 805-812.

Baek,J.O., Seo,J.W., Kwon,O., Seong,S.I., Kim,I.H., and Kim,C.H. (2008) Heterologous expression and characterization of L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. *Chi J Biotech* **24**: 21-29.

Baek,J.O., Seo,J.W., Kwon,O., Seong,S.I., Kim,I.H., and Kim,C.H. (2011) Expression and characterization of a second L-amino acid deaminase isolated from *Proteus mirabilis* in *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* **51**: 129-135.

Bai,X., Lai,Q., Dong,C., Li,F., and Shao,Z. (2014) A taxonomic study was carried out on strain D104T which was isolated from deep-sea subsurface sediment sample from the Arctic Ocean. *A van Leeuw J Microb* **106**: 449-455.

Baumann,L., Baumman,P., Mandel,M., and Allen R.D. (1972) Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol* **110**: 402-429.

Bohmer,A., Muller,A., Passarge,M., Liebs,P., Honeck,H., and Muller,H.G. (1989) A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. *Eur J Biochem* **182**: 327-332.

Bollinger,J.A., Brown,D.E., and Dooley,D.M. (2005) The formation of lysine tyrosylquinone (LTQ) is a self-processing reaction. Expression and characterization of a *Drosophila* lysyl oxidase. *Biochemistry* **44**: 11708-11714.

Bonnot,F., Lavarone,A., and Klinman,J. (2013) Multistep, eight-electron oxidation catalyzed by the cofactorless oxidase, PqqC: identification of chemical intermediates and their dependence on molecular oxygen. *Biochemistry* **52**: 4667-4675.

Bossi,R., Negri,A., Tedeschi,G., and Mattevi,A. (2002) Structure of FAD-bound L-aspartate oxidase: insight into substrate specificity and catalysis. *Biochemistry* **41**: 3018-3024.

Bottoms,C.A., Smith,P.E., and Tanner,J.J. (2002) A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domain. *Protein Sci* **11**: 2125-2137.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Braun,M., Kim,J.M., and Schmid,R.D. (1992) Purification and some properties of an extracellular l-amino acid oxidase from *Cellulomonas cellulans* AM8 isolated from soil. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 594-598.

Brearley,G.M., Price,C.P., Atkinson,T., and Hammond,P.M. (1994) Purification and partial characterisation of a broad-range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarum* 2Pfa isolated from soil. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 670-676.

Burchard,R.P., and Sorongon,M.L. (1998) A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4079-4083.

Burnette,W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal Biochem* **112**: 195-203.

- Cai,D., and Klinman,J.P. (1994) Evidence of a self-catalytic mechanism of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine quinone biogenesis in yeast copper amine oxidase. *J Biol Chem* **269**: 32039-32042.
- Calderon,J., Olvera,L., Martinez,L.M., and Davila,G. (1997) A *Neurospora crassa* mutant altered in the regulation of L-amino acid oxidase. *Microbiology* **143**: 1969-1974.
- Campillo-Brocal,J.C., Chacon-Verdu,M., Lucas-Elío,P., and Sanchez-Amat,A. (2015) Distribution in microbial genomes of genes similar to *lodA* and *goxA* which encode a novel family of quinoproteins with amino acid oxidase activity. *BMC Genomics* **16**.
- Campillo-Brocal,J.C., Lucas-Elio,P., and Sanchez-Amat,A. (2013) Identification in *Marinomonas mediterranea* of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity. *MicrobiologyOpen* **2**: 684-694.
- Chang,H.W., Roh,S.W., Kim,K.H., Nam,Y.D., Yoon,J.H., Oh,H.M., and Bae,J.W. (2008) *Marinomonas basaltis* sp. nov., a marine bacterium isolated from black sand. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2743-2747.
- Chapman,S.K., and Reid,G.A. Flavoprotein protocols. *Methods in Molecular Biology*. (131). 1999. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Chen,L., Doi,M., Durley,R.C., Chistoserdov,A.Y., Lidstrom,M.E., Davidson,V.L., and Mathews,F.S. (1998) Refined crystal structure of methylamine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **276**: 131-149.
- Chen,W.M., Lin,C.Y., Young,C.C., and Sheu,S.Y. (2010a) *Rheinheimera aquatica* sp. nov., an antimicrobial activity producing bacterium isolated from freshwater culture pond. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 1386-1392.
- Chen,W.M., Lin,C.Y., Chen,C.A., Wang,J.T., and Sheu,S.Y. (2010b) Involvement of an L-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enzyme Microb Tech* **47**: 52-58.
- Chen,W.M., Lin,C.Y., and Sheu,S.Y. (2010c) Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by L-lysine oxidase activity. *Enzyme Microb Tech* **46**: 487-493.
- Chimetto,L.A., Cleenwerck,I., Brocchi,M., Willems,A., De Vos,P., and Thompson,F.L. (2011) *Marinomonas brasiliensis* sp. nov., isolated from the coral *Mussismilia hispida*, and reclassification of *Marinomonas basaltis* as a later heterotypic synonym of *Marinomonas communis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1170-1175.
- Chistoserdov,A.Y. (2001) Cloning, sequencing and mutagenesis of the genes for aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes faecalis* and evolution of amine dehydrogenases. *Microbiology* **147**: 2195-2202.

- Chistoserdov,A.Y., and Lidstrom,M.E. (1991) The small-subunit polypeptide of methylamine dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 has an unusual leader sequence. *J Bacteriol* **173**: 5909-5913.
- Cona,A., Rea,G., Angelini,R., Federico,R., and Tavladoraki,P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* **11**: 80-88.
- Corpet,F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* **16**: 10881-10890.
- Costa,T., Burin,S., Menaldo,D., Castro,F., and Sampaio,V. (2014) Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins* **20**.
- Cress,B.F., Erkert,K.A., Barquera,B., and Koffas,M.A.G. (2013) Draft genome sequence of *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strain B (ATCC 29581). *Genome Announc* **1**.
- Datta,S., Mori,Y., Takagi,K., Kawaguchi,K., Chen,Z.W., Okajima,T. *et al.* (2001) Structure of a quinoxinoprotein amine dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14268-14273.
- Dautin,N., and Bernstein,H.D. (2007) Protein secretion in Gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.
- Davidson,V.L. (2001) Pyrroloquinoline quinone (PQQ) from methanol dehydrogenase and tryptophan tryptophylquinone (TTQ) from methylamine dehydrogenase. *Adv Protein Chem* **58**: 95-140.
- Davidson,V.L. (2005) Structure and mechanism of tryptophylquinone enzymes. *Bioorg Chem* **33**: 159-170.
- Davidson,V.L. (2011) Generation of protein-derived redox cofactors by posttranslational modification. *Mol Biosyst* **7**: 29-37.
- Davidson,V.L. (2007) Protein-derived cofactors. Expanding the scope of post-translational modifications. *Biochemistry* **46**: 5283-5292.
- Davidson,V.L., and Liu,A. (2012) Tryptophan tryptophylquinone biosynthesis: A radical approach to posttranslational modification. *Biochim Biophys Acta* **1824**: 1299-1305.
- Davidson,V.L., and Wilmot,C.M. (2013) Post-translational biosynthesis of the protein-derived cofactor tryptophan tryptophylquinone. *Annu Rev Biochem* **82**: 531-550.
- Davis,M.A., Askin,M.C., and Hynes,M.J. (2005) Amino acid catabolism by an *areA*-regulated gene encoding an L-amino acid oxidase with broad substrate specificity in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3551-3555.
- de Lorenzo,V., and Timmis,K.N. (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.

- Dijkman,W.P., de Gonzalo,G., Mattevi,A., and Fraaije,M.W. (2013) Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 5177-5188.
- Dong,C., Bai,X., Lai,Q., Xie,Y., Chen,X., and Shao,Z. (2014) Draft genome sequence of *Marinomonas* sp. Strain D104, a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from the deep-sea sediment of the Arctic ocean. *Genome Announc* **2**: 1211-1213.
- Dower,W.J., Miller,J.F., and Ragsdale,C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* **16**: 6127-6145.
- Drechsel,H., Thieken,A., Reissbrodt,R., Jung,G., and Winkelmann,G. (1993) Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. *J Bacteriol* **175**: 2727-2733.
- Du,X.Y., and Clemetson,K.J. (2002) Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* **40**: 659-665.
- Duine,J.A., and Frank,J. (1979) Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium-X*. *A van Leeuw J Microbiol* **45**: 151-152.
- Dym,O., and Eisenberg,D. (2001) Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**: 1712-1728.
- Eggink,G., Engel,H., Vriend,G., Terpstra,P., and Witholt,B. (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* **212**: 135-142.
- Ehara,T., Kitajima,S., Kanzawa,N., Tamiya,T., and Tsuchiya,T. (2002) Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett* **531**: 509-512.
- Endo,H., Hayashi,Y., Kitani,Y., Ren,H., Hayashi,T., and Nagashima,Y. (2008) Optical enzyme sensor for determining L-lysine content using L-lysine oxidase from the rockfish *Sebastes schlegeli*. *Anal Bioanal Chem* **391**: 1255-1261.
- Eppink,M.H., Schreuder,H.A., and van Berkel,W.J. (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Protein Sci* **6**: 2454-2458.
- Eppink,M.H., Schreuder,H.A., and van Berkel,W.J. (1998) Lys42 and Ser42 variants of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens* reveal that Arg42 is essential for NADPH binding. *Eur J Biochem* **253**: 194-201.
- Erler,J.T., Bennewith,K.L., Nicolau,M., Dornhofer,N., Kong,C., Le,Q.T. *et al.* (2006) Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**: 1222-1226.
- Espinosa,E., Marco-Noales,E., Gomez,D., Lucas-Elio,P., Ordax,M., Garcias-Bonet,N. *et al.* (2010) Taxonomic study of *Marinomonas* strains isolated from the seagrass *Posidonia oceanica*, with descriptions of *Marinomonas balearica* sp. nov. and *Marinomonas pollencensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 93-98.

Espinosa,E. Characterization of the microbiota of the genus *Marinomonas* associated to *Posidonia oceanica*. 2007. Honor Thesis. University of Murcia.

Fernandez,E., Sanchez-Amat,A., and Solano,F. (1999) Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell Res* **12**: 331-339.

Fernandez-Gomez,R., Zerrouk,H., Sebti,F., Loyens,M., Benslimane,A., and Quaiissi,M.A. (1994) Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. *Toxicon* **32**: 875-882.

Fraaije,M.W., and Mattevi,A. (2000) Flavoenzyme: diverse catalyst with recurrent features. *TIBS* **25**: 126-132.

Garcia-Borron,J.C., and Solano,F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res* **15**: 162-173.

Gauss,G.H., Reott,M.A., Rocha,E.R., Young,M.J., Douglas,T., Jeffrey-Smith,C., and Martin-Lawrence,C. (2012) Characterization of the *Bacteroides fragilis bfr* gene product identifies a bacterial DPS-like protein and suggests evolutionary links in the ferritin superfamily. *J Bacteriol* **194**: 15-27.

Genet,R., Benetti,P.H., Hammadi,A., and Menez,A. (1995) L-tryptophan 2',3'-oxidase from *Chromobacterium violaceum*. Substrate specificity and mechanistic implications. *J Biol Chem* **270**: 23540-23545.

Geueke,B., and Hummel,W. (2003) Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein Expr Purif* **28**: 303-309.

Geueke,B., and Hummel,W. (2002) A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization. *Enzyme Microb Tech* **31**: 77-87.

Gomez,D., Espinosa,E., Bertazzo,M., Lucas-Elio,P., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2008) The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 925-930.

Gomez,D., Lucas-Elio,P., Sanchez-Amat,A., and Solano,F. (2006) A novel type of lysine oxidase: L-lysine-epsilon-oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1764**: 1577-1585.

Gomez,D., Lucas-Elio,P., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2010) Both genes in the *Marinomonas mediterranea lodAB* operon are required for the expression of the antimicrobial protein lysine oxidase. *Mol Microbiol* **75**: 462-473.

Gomez,D. Síntesis y caracterización molecular en *Marinomonas mediterranea* de una novedosa proteína antimicrobiana con actividad L-lisina-épsilon-oxidasa. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2010.

- Goosen,N., Huinen,R.G., and van de Putte,P. (1992) A 24-amino-acid polypeptide is essential for the biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone. *J Bacteriol* **174**: 1426-1427.
- Govindaraj,S., Eisenstein,E., Jones,L.H., Sanders-Loehr,J., Chistoserdov,A.Y., Davidson,V.L., and Edwards,S.L. (1994) Aromatic amine dehydrogenase, a second tryptophan tryptophylquinone enzyme. *J Bacteriol* **176**: 2922-2929.
- Graichen,M.E., Jones,L.H., Sharma,B.V., van Spanning,R.J.M., Hosler,J.P., and Davidson,V.L. (1999) Heterologous expression of correctly assembled methylamine dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **181**: 4216-4222.
- Guo,C., Liu,S., Yao,Y., Zhang,Q., and Sun,M. (2012) Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* **60**: 302-311.
- Gupta,P., Chaturvedi,P., Pradhan,S., Delille,D., and Shivaji,S. (2006) *Marinomonas polaris* sp. nov., a psychrohalotolerant strain isolated from coastal sea water off the subantarctic Kerguelen islands. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 361-364.
- Halada,P., Leitner,C., Sedmera,P., Haltrich,D., and Volc,J. (2003) Identification of the covalent flavin adenine dinucleotide-binding region in pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor*. *Anal Biochem* **314**: 235-242.
- Hall,B.G. (2013) Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol* **30**: 1229-1235.
- Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166** : 557-580.
- Hernandez-Romero,D., Lucas-Elio,P., Lopez-Serrano,D., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2003) *Marinomonas mediterranea* is a lysogenic bacterium that synthesizes R-bodies. *Microbiology* **149**: 2679-2686.
- Hernandez-Romero,D., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2005) Polyphenol oxidase activities expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6808-6815.
- Heruth,D.P., Pond,F.R., Dilts,J.A., and Quackenbush,R.L. (1994) Characterization of genetic determinants for R body synthesis and assembly in *Caedibacter taeniospiralis* 47 and 116. *J Bacteriol* **176**: 3559-3567.
- Heuts,D.P.H.M., Scrutton,N.S., McIntire,W.S., and Fraaije,M.W. (2009) What's in a covalent bound? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS J* **276**: 3405-3427.
- Hiro,I., Tsugeno,Y., Hirashiki,I., Ogata,F., and Ito,A. (1996) Characterization of rat monoamine oxidase A with noncovalently-bound FAD expressed in yeast cells. *J Biochem* **120**: 759-65.

- Ho,S.N., Hunt,H.D., Horton,R.M., Pullen,J.K., and Pease,L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Holmes,D.S., and Quigley,M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Holscher,T., Weinert-Sepalage,D., and Gorisch,H. (2007) Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153**: 499-506.
- Hong-Bin,S., and Kuo-Chen,C. (2010) Gneg-mPLOC: A top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins. *J Theor Biol* **264**: 326-333.
- Hossain,G.S., Li,J., Shin,H., Du,G., Liu,L., and Chen,J. (2014) L-Amino acid oxidases from microbial sources: types, properties, functions, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 1507-1515.
- Husain,M., and Davidson,V.L. (1987) Purification and properties of methylamine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol* **19**: 1712-1717.
- Isobe,K., Asami,S., Domon,H., Fukuta,Y., and Asano,Y. (2012) Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Pseudomonas* sp. AIU 813. *J Biosci Bioeng* **114**: 257-261.
- Isobe,K., Fukuda,N., and Nagasawa,S. (2008) Analysis of selective production of Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-amino acid oxidase and Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-amino acid by *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *J Biosci Bioeng* **105**: 152-156.
- Isobe,K., and Nagasawa,S. (2007) Characterization of Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-lysine oxidizing enzyme from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *J Biosci Bioeng* **104**: 218-223.
- Ivanova,E.P., Onyshchenko,O.M., Christen,R., Lysenko,A.M., Zhukova,N.V., Shevchenko,L.S., and Kiprianova,E.A. (2005) *Marinomonas pontica* sp. nov., isolated from the Black Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 275-279.
- Izidoro,L.F., Sobrinho,J.C., Mendes,M.M., Costa,T., Grabner,A.N., Rodrigues,V.M. *et al.* (2014) Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Res Int* **2014**: 19 pages.
- James,S.G., Holmstrom,C., and Kjelleberg,S. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2461. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2783-2788.
- Janes,S.M., Mu,D., Wemmer,D., Smith,A.J., Kaur,S., Maltby,D. *et al.* (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science* **248**: 981-987.

- Jensen,L.M.R., Sanishvili,R., and Davidson,V.L. (2010) In crystallo posttranslational modification within a MauG/pre-methylamine dehydrogenase complex. *Science* **327**: 1392-1394.
- Jones,L.H., Pearson,A.R., Tang,Y., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2005) Active site aspartate residues are critical for tryptophan tryptophylquinone biogenesis in methylamine dehydrogenase. *J Biol Chem* **280**: 17392-17396.
- Jung,Y.T., Oh,T.K., and Yoon,J.H. (2012) *Marinomonas hwangdonensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 2062-2067.
- Kim,C., Han,S., Kim,K., Cho,B., Kim,Y.H., Koo,B., and Kim.Y.C. (2003) Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedium*. *Curr Microbiol* **47**: 457-461.
- Kim,J., Harada,R., Kobayashi,M., Kobashi,N., and Sode,K. (2010a) The inhibitory effect of pyrroloquinoline quinone on the amyloid formation and cytotoxicity of truncated alpha-synuclein. *Mol Neurodegener* **5**: 20.
- Kim,J., Kobayashi,M., Fukuda,M., Ogasawara,D., Kobayashi,N., Sungwoong,H. *et al.* (2010b) Pyrroloquinoline quinone inhibits the fibrillation of amyloid proteins. *Prion* **4**: 26-31.
- Kishishita,S., Okajima,T., Kim,M., Yamaguchi,H., Hirota,S., Suzuki,S. *et al.* (2003) Role of copper ion in bacterial copper amine oxidase: spectroscopic and crystallographic studies of metal-substituted enzymes. *J Am Chem Soc* **125**: 1041-1055.
- Klema,V.J., and Wilmot,C.M. (2012) The role of protein crystallography in defining the mechanisms of biogenesis and catalysis in copper amine oxidase. *Int J Mol Sci* **13**: 5375-5405.
- Klinman,J., and Bonnot,F. (2014) Intrigues and intricacies of the biosynthetic pathways for the enzymatic quinocofactors: PQQ, TTO, CTQ, TPQ, and LTQ. *Chem Rev* **114**: 4343-4365.
- Klinman,J.P. (2001) How many ways to craft a cofactor? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14766-14768.
- Kumari,P., Poddar,A., and Das,S.K. (2014) *Marinomonas fungiae* sp. nov., isolated from the coral *Fungia echinata* from the Andaman Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 487-494.
- Kusakabe,H., Kodama,K., Kuninaka,A., Yoshino,H., Misono,H., and Soda,K. (1980) A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J Biol Chem* **255**: 976-981.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lata,S., and Pundir,C.S. (2013) L-amino acid biosensor based on L-amino acid oxidase immobilized onto NiHCNFe/e-MWCNT/PPy/GC electrode. *Int J Biol Macromol* **54**: 250-257.

Lau,K.W., Ren,J., Wai,N.L., Lau,S.C., Qian,P.Y., Wong,P.K., and Wu,M. (2006) *Marinomonas ostreistagni* sp. nov., isolated from a pearl-oyster culture pond in Sanya, Hainan Province, China. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2271-2275.

Lee,Y.A., Hendson,M., Panopoulos,N.J., and Schroth,M.N. (1994) Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *J Bacteriol* **176**: 173-188.

Lee,Y.C., and Huh,M.H. (2009) Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids. *J Food Biochem* **23**: 173-185.

Leese,C., Fotheringham,I., Escalettes,F., Speight,R., and Grogan,G. (2012) Cloning, expression, characterization and mutational analysis of L-aspartate oxidase from *Pseudomonas putida*. *J Mol Catal B Enzym* **85**: 17-22.

Lencina,A.M., Ding,Z., Schurig-Briccio,L.A., and Gennis,R.B. (2013) Characterization of the Type III sulfide:quinone oxidoreductase from *Caldivirga maquilingensis* and its membrane binding. *Biochim Biophys Acta* **1827**: 266-275.

Li,R., Klinman,J.P., and Mathews,F.S. (1998) Copper amine oxidase from *Hansenula polymorpha*: the crystal structure determined at 2.4 Å resolution reveals the active conformation. *Structure* **6**: 293-307.

Li,X., Fu,R., Liu,A., and Davidson,V.L. (2008) Kinetic and physical evidence that the diheme enzyme MauG tightly binds to a biosynthetic precursor of methylamine dehydrogenase with incompletely formed tryptophan tryptophylquinone. *Biochemistry* **47**: 2908-2912.

Liu,L., Hossain,G.S., Shin,H., Li,J., Du,G., and Chen,J. (2013) One-step production of alpha-ketoglutaric acid from glutamine acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *J Biotechnol* **164**: 97-104.

Lopez-Serrano,D. Estudios moleculares sobre la melanogénesis en *Marinomonas mediterranea*. Caracterización del operón *ppoB*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2005.

Lopez-Serrano,D., Sanchez-Amat,A., and Solano,F. (2002) Cloning and molecular characterization of a SDS-activated tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Res* **15**: 104-111.

Lopez-Serrano,D., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2007) Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology* **153**: 2241-2249.

Lopez-Serrano,D., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2004) Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene* **342**: 179-187.

Lucas-Elio,P. Caracterización de la Marinocina, un compuesto con actividad antimicrobiana sintetizado por *Marinomonas mediterranea*. Mecanismos regulatorios comunes entre su síntesis y la expresión de actividades polifenol oxidasa. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 2003. Universidad de Murcia.

Lucas-Elio,P., Goodwin,L., Woyke,T., Pitluck,S., Nolan,M., Kyrpides,N.C. *et al.* (2012a) Complete genome sequence of *Marinomonas posidonica* type strain (IVIA-Po-181(T)). *Stand Genomic Sci* **7**: 31-43.

Lucas-Elio,P., Goodwin,L., Woyke,T., Pitluck,S., Nolan,M., Kyrpides,N.C. *et al.* (2012b) Complete genome sequence of the melanogenic marine bacterium *Marinomonas mediterranea* type strain (MMB-1^T). *Stand Genomic Sci* **6**: 63-73.

Lucas-Elio,P., Hernandez,P., Sanchez-Amat,A., and Solano,F. (2005) Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* **1721**: 193-203.

Lucas-Elio,P., Marcos-Noales,E., Espinosa,E., Ordax,M., Lopez,M.M., Garcias-Bonet,N. *et al.* (2010) *Marinomonas alcarazii* sp. nov., *M. rhizomae* sp. nov., *M. foliarum* sp. nov., *M. posidonica* sp. nov. and *M. aquiplantarum* sp. nov., isolated from the microbiota of the seagrass *Posidonia oceanica*. *Int J Syst Evol Microbiol*: 2191-2196.

Lucas-Elio,P., Gomez,D., Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (2006) The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. *J Bacteriol* **188**: 2493-2501.

Lukasheva,E.V., and Berezov,T.T. (2002) L-Lysine alpha-oxidase: physicochemical and biological properties. *Biochemistry (Mosc)* **67**: 1152-1158.

Lukasheva,E.V., Efremova,A.A., Treshalina,E.M., Arinbasarova,A.Y., Medentzev,A.G., and Berezov,T.T. (2011) L-Amino acid oxidases: Properties and molecular mechanisms of action. *Biochem Moscow Suppl Ser B* **5**: 337-345.

Macheroux,P., Kappes,B., and Ealick,S.A. (2011) Flavogenomics: a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS J* **278**: 2625-2634.

Macheroux,P., Seth,O., Bollschweiler,C., Schwarz,M., Kurfurst,M., Au,L.C., and Ghisla,S. (2001) L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. *Eur J Biochem* **268**: 1679-1686.

Macian,M.C., Arahál,D.R., Garay,E., and Pujalte,M.J. (2005) *Marinomonas aquamarina* sp. nov., isolated from oysters and seawater. *Syst Appl Microbiol* **28**: 145-150.

Mai-Prochnow,A., Lucas-Elio,P., Egan,S., Thomas,T., Webb,J.S., Sanchez-Amat,A., and Kjelleberg,S. (2008) Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several Gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **190**: 5493-5501.

Markowitz,V.M., Chen,I.M., Chu,K., Szeto,E., Palaniappan,K., Pillay,M. *et al.* (2014) IMG/M 4 version of the integrated metagenome comparative analysis system. *Nucl Acids Res* **42**: D568-D573.

Martinez-Martinez,I., Navarro-Fernandez,J., Garcia-Carmona,F., and Sanchez-Ferrer,A. (2008) Implication of a mutation in the flavin binding site on the specific activity and substrate specificity of glycine oxidase from *Bacillus subtilis* produced by directed evolution. *J Biotechnol* **133**: 1-8.

Massad,G., Zhao,H., and Mobley,H.L. (1995) *Proteus mirabilis* amino acid deaminase: cloning, nucleotide sequence, and characterization of *aad*. *J Bacteriol* **177**: 5878-5883.

Massey,V., and Hemmerich,P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem Soc Trans* **8**: 246-257.

Matsuda,M., and Asano,Y. (2010) Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028(T). *Anal Biochem* **406**: 19-23.

Matsumura,H., Umezawa,K., Takeda,K., Sugimoto,N., Ishida,T., Samejima,M. *et al.* (2014) Discovery of a eukaryotic pyrroloquinoline quinone-dependent oxidoreductase belonging to a new auxiliary activity family in the database of carbohydrate-active enzymes. *PLoS ONE* **9**: e104851.

Matsuzaki,R., Fukui,T., Sato,H., Ozaki,Y., and Tanizawa,K. (1994) Generation of the topa quinone cofactor in bacterial monoamine oxidase by cupric ion-dependent autooxidation of a specific tyrosyl residue. *FEBS Lett* **351**: 360-364.

McIntire,W.S., Wemmer,D.E., Chistoserdov,A., and Lidstrom,M.E. (1991) A new cofactor in a prokaryotic enzyme: tryptophan tryptophylquinone as the redox prosthetic group in methylamine dehydrogenase. *Science* **252**: 817-824.

McWilliam,H., Li,W., Uludag,M., Squizzato,S., Park,Y.M., Buso,N. *et al.* (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucl Acids Res* **41**: W597-W600.

Meulenberg,J., Sellink,E., Riegman,N., and Postman,P. (1992) Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon. *Mol Gen Genet* **232**: 284-294.

Milecka,D., Samluk,A., Wasiak,K., and Krawczyk-Balska,A. (2015) An essential role of a ferritin-like protein in acid stress tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Microbiol* **197**: 347-351.

- Miller, V.L., and Mekalanos, J.J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583.
- Min, Z., Wang, L., Jin, J., Wang, X., Zhu, B., Chen, H., and Cheng, Y. (2014) Pyrroloquinoline quinone induces cancer cell apoptosis via mitochondrial-dependent pathway and down-regulating cellular Bcl-2 protein expression. *J Cancer* **5**: 609-624.
- Misra, H.S., Rajpurohit, Y., and Khairnar, N. (2012) Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci* **37**: 313-325.
- Molina-Quintero, L.R., Lucas-Elio, P., and Sanchez-Amat, A. (2010) Regulation of the *Marinomonas mediterranea* antimicrobial protein lysine oxidase by L-lysine and the sensor histidine kinase PpoS. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6141-6149.
- Molla, G., Nardini, M., Motta, P., D'Arrigo, P., Panzeri, W., and Pollegioni, L. (2014) Aminoacetone oxidase from *Streptococcus oligofermentas* belongs to a new three-domain family of bacterial flavoprotein. *Biochem J* **464**: 387-399.
- Moore, B.M., and Flurkey, W.H. (1990) Sodium dodecyl sulphate activation of a plant polyphenoloxidase. *J Biol Chem* **265** : 4982-4988.
- Moore, R.H., Spies, M.A., Culpepper, M.B., Murakawa, T., Hirota, S., Okajima, T. *et al.* (2007) Trapping of a dopaquinone intermediate in the TPQ cofactor biogenesis in a copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J Am Chem Soc* **129**: 11524-11534.
- More, S., Kiran, K., Veena, S., and Gadag, J. (2010) Purification of an L-amino acid oxidase from *Bungarus caeruleus* (Indian krait) venom. *J Venom Anim Toxins* **16**: 60-75.
- Mu, D., Janes, S.M., Smith, A.J., Brown, D.E., Dooley, D.M., and Klinman, J.P. (1992) Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *J Biol Chem* **267**: 7979-7982.
- Müller, F. (1991) Free flavins: Synthesis, chemical and physical properties. In *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, vol. I. CRC Press, Ed. Boca Raton, Fl., Inc., pp. 1-71.
- Mure, M. (2004) Tyrosine-derived quinone cofactors. *Acc Chem Res* **37**: 131-139.
- Nagashima, Y., Tsukamoto, C., Kitani, Y., Ishizaki, S., Nagai, H., and Yanagimoto, T. (2009) Isolation and cDNA cloning of an antibacterial L-amino acid oxidase from the skin mucus of the great sculpin *Myoxocephalus polyacanthocephalus*. *Comp Biochem Physiol , Part B: Biochem Mol Biol* **154**: 55-61.
- Nakai, T., Ono, K., Kuroda, S., Tanizawa, K., and Okajima, T. (2012) An unusual subtilisin-like serine protease is essential for biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *J Biol Chem* **287**: 6530-6538.

- Nakai,T., Deguchi,T., Frebort,I., Tanizawa,K., and Okajima,T. (2014) Identification of genes essential for the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *Biochemistry* **53**: 895-907.
- Nishiya,Y., and Imanaka,T. (1998) Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* **438**: 263-166.
- Nuñez,P., Romero,H., Farber,M., and Rocha,E. (2013) Natural selection for operons depends on genome size. *Genome Biol Evol* **5**: 2242-2254.
- Nuutinen,J.T., Marttinen,E., Soliymani,R., Hilden,K., and Timonen,S. (2012) L-Amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporium* displays substrate preference towards glutamate. *Microbiology* **158**: 272-283.
- Ojha,S., Meng,E.C., and Babbitt,P.C. (2007) Evolution of function in the "Two dinucleotide binding domains" flavoproteins. *PLoS Comput Biol* **3**: 1268-1280.
- Okazaki,S., Nakano,S., Matsui,D., Akaji,S., Inagaki,K., and Asano,Y. (2013) X-Ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine- ϵ -oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *J Biochem* **154**: 233-236.
- Olsthoorn,A.J., and Duine,J.A. (1996) Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Biochem Biophys* **336**: 42-48.
- Ono,K., Okajima,T., Tani,M., Kuroda,S., Sun,D., Davidson,V.L., and Tanizawa,K. (2006) Involvement of a putative [Fe-S]-cluster-binding protein in the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *J Biol Chem* **281**: 13672-13684.
- Palamakumbura,A.H., and Trackman,P.C. (2002) A fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Anal Biochem* **300**: 245-251.
- Patel,K.R., Wyman,J.A., Patel,K.A., and Burden,B.J. (1996) A mutant of *Bacillus thuringiensis* producing a dark-brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. *J Invertebr Pathol* **67**: 120-124.
- Paz,MA., Fluckiger,R., Boak,A., Kagan,H.M., and Gallop,PM. (1991) Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J Biol Chem* **262**: 689-692.
- Pearson,A.R., Jones,L.H., Higgins,L., Ashcroft,A.E., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2003) Understanding quinone cofactor biogenesis in methylamine dehydrogenase through novel cofactor generation. *Biochemistry* **42**: 3224-3230.
- Pearson,A.R., De la Mora-Rey,T., Graichen,M.E., Wang,Y., Jones,L.H., Marimanikkupam,S. *et al.* (2004) Further insights into quinone cofactor biogenesis: Probing the role of mauG in methylamine dehydrogenase tryptophan tryptophylquinone formation. *Biochemistry* **43**: 5494-5502.
- Petersen,T., Brunak,S., von Heijne,G., and Nielsen,H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**: 785-786.

- Pokrovsky,V.S., Treshalina,H.M., Lukashova,E.V., Sedakova,L.A., Medentzev,A.G., Arinbasarova,A.Y., and Berezov,T.T. (2013) Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine a-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D. *Anticancer drugs* **24**: 846-851.
- Pollegioni,L., Motta,P., and Molla,G. (2013) L-Amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 9323-9341.
- Pond,F.R., Gibson,I., Lalucat,J., and Quackenbush,R.L. (1989) R-body-producing bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 25-67.
- Prabakaran,S.R., Suresh,K., Manorama,R., Delille,D., and Shivaji,S. (2005) *Marinomonas ushuaensis* sp. nov., isolated from coastal sea water in Ushuaia, Argentina, sub-Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 309-313.
- Qi,L., Qiao,J., Yang,G., and Chen,Y. (2009) Chiral ligand-exchange CE assays for separation of amino acid enantiomers and determination of enzyme kinetic constant. *Electrophoresis* **30**: 2266-2272.
- Ray,J., and Igoshin,O. (2012) Interplay of gene expression noise and ultrasensitive dynamics affects bacterial operon organization. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002672.
- Raymann,K., Bobay,L.M., Doak,T.G., and Lynch,M. (2013) A genomic survey of Reb homologs suggests widespread occurrence of R-bodies in Proteobacteria. *G3 Gene* **3**: 505-516.
- Romanenko,L.A., Tanaka,N., and Frolova,G.M. (2009) *Marinomonas arenicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2834-2838.
- Romanenko,L.A., Uchino,M., Mikhailov,V.V., Zhukova,N.V., and Uchimura,T. (2003) *Marinomonas primoryensis* sp. nov., a novel psychrophile isolated from coastal sea-ice in the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 829-832.
- Rossmann,M.G., Moras,D., and Olsen,K.V. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199.
- Saier,M.H. (2006) Protein secretion system in Gram-negative bacteria. *Microbe* **1**: 414-419.
- Salisbury,S.A., Forrest,H.S., Cruse,W.B., and Kennard,O. (1979) A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature* **280**: 843-844.
- Sambrook,J., and Russell,D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Amat,A. (2006) Inclusions in prokaryotes R-bodies. *J M Shively (ed)*: 331-341.
- Sanchez-Amat,A., Lucas-Elio,P., Fernandez,E., Garcia-Borrón,J.C., and Solano,F. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 104-116.

Sanchez-Amat,A., and Solano,F. (1997) A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 787-792.

Sanchez-Amat,A., and Torrella,F. (1990) Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine bdellovibrios. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2717-2725.

Sanchez-Amat,A., Solano,F., and VP (2005) Genus III. *Marinomonas* Van Landschoot and De Ley 1984, 91^{VP} (Effective publication Van Landschoot and De Ley 1983, 3071). In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. Brenner,D.J., Krieg,N.R., Staley,J.T., and Garrity,G.M. (eds). New York: Springer, pp. 284-289.

Satoh,A., Kim,J.K., Miyahara,I., Devreese,B., Vandenberghe,I., Hacidalihoglu,A. *et al.* (2002) Crystal structure of quinoxinoprotein amine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. Identification of a novel quinone cofactor engaged by multiple thioether cross-bridges. *J Biol Chem* **277**: 2830-2834.

Sehanobish,E., Chacón-Verdú,M.D., Sanchez-Amat,A., and Davidson,V.L. Roles of active site residues in LodA, a cysteine tryptophylquinone dependent ϵ -lysine oxidase. Comunicación personal. 2015.

Sehanobish,E., Shin,S., Sanchez-Amat,A., and Davidson,V.L. (2014) Steady-state kinetic mechanism of LodA, a novel cysteine tryptophylquinone-dependent oxidase. *FEBS Lett* **588**: 752-756.

Shin,S., and Davidson,V.L. (2014) MauG, a diheme enzyme that catalyzes tryptophan tryptophylquinone biosynthesis by remote catalysis. *Arch Biochem Biophys* **0**: 112-118.

Shin,S., Feng,M., and Davidson,V.L. (2013) Mutation of Trp(93) of MauG to tyrosine causes loss of bound Ca(2+) and alters the kinetic mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *Biochem J* **456**: 129-137.

Shin,S., Yukl,E., Sehanobish,E., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2014) Site-directed mutagenesis of Gln103 reveals the influence of this residue on the redox properties and stability of MauG. *Biochemistry* **53**: 1342-1349.

Sievers,F., Wilm,A., Dineen,D., Gibson,T.J., Karplus,K., Li,W. *et al.* (2014) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539.

Sikora,L., and Marzluf,G.A. (1982) Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **186**: 33-39.

Singh,G., Bhalla,A., Kaur,P., Capalash,N., and Sharma,P. (2011) Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev Environ Sci Biotechnol* **10**: 309-326.

Singh,S., Gogoi,B.K., and Bezbaruah,R.L. (2009) Optimization of medium and cultivation conditions for L-amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus*. *Can J Microbiol* **55**: 1096-1102.

Sneppen,K., Pedersen,S., Krishna,S., Dodd,I., and Semsey,S. (2010) Economy of operon formation: cotranscription minimizes shortfall in protein complexes. *mBio* **1**: e00177-10.

Solano,F., Garcia,E., Perez de Egea,E., and Sanchez-Amat,A. (1997) Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3499-3506.

Solano,F., Lucas-Elio,P., Fernandez,E., and Sanchez-Amat,A. (2000) *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: Isolation of a multipotent polyphenol oxidase mutant. *J Bacteriol* **182**: 3754-3760.

Solano,F., and Sanchez-Amat,A. (1999) Studies on the phylogenetic relationships of melanogenic marine bacteria: proposal of *Marinomonas mediterranea* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 1241-1246.

Stolen,C., Madanat,R., Marti,L., Kari,S., Yegutkin,G., Sariola,H. *et al.* (2004) Semicarbazide sensitive amine oxidase overexpression has dual consequences: insulin mimicry and diabetes-like complications. *FASEB J* **18**: 702-704.

Stothard,P. (2000) The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**: 1102-1104.

Stredansky,M., Monosik,R., Mastihuba,V., and Sturdik,E. (2013) Monitoring of PQQ-dependent glucose dehydrogenase substrate specificity for its potential use in biocatalysis and bioanalysis. *Appl Biochem Biotechnol* **171**: 1032-1041.

Sugawara,A., Matsui,D., Komeda,H., Asano,Y., and Isobe,K. (2014) Characterization and application of aminoamide-oxidizing enzyme from *Aspergillus carbonarius* AIU 205. *J Biosci Bioeng* **117**: 263-268.

Tachon,S., Chambellon,E., and Yvon,M. (2011) Identification of a conserved sequence in flavoproteins essential for the correct conformation and activity of the NADH oxidase NoxE of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **193**: 3000-3008.

Takagi,K., Torimura,M., Kawaguchi,K., Kano,K., and Ikeda,T. (1999) Biochemical and electrochemical characterization of quinoxinoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **38**: 6935-6942.

Takahashi,E., Ito,K., and Yoshimoto,T. (1999) Cloning of L-amino acid deaminase gene from *Proteus vulgaris*. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 2244-2247.

Tamaki,H., Matsuoka,T., Yasuda,Y., Hanada,S., Kamagata,Y., Nakamura,K., and Sakasegawa,S. (2010) A novel laccase with urate oxidation activity from *Lysobacter* sp. T-15. *J Biochem* **148**: 481-489.

- Tamura,K., Stecher,G., Peterson,D., Filipski,A., and Kumar,S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Thurston,C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
- Todd,J.D., Rogers,R., Li,Y.G., Wexler,M., Bond,P.L., Sun,L. *et al.* (2007) Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science* **315**: 666-669.
- Tong,H., Chen,W., Shi,W., i,F., and Dong,X. (2008) SO-LAAO, a novel L-amino acid oxidase that enables *Streptococcus oligofermentans* to over-compete *Streptococcus mutans* by generating H₂O₂ from peptone. *J Bacteriol* **190**: 4716-4721.
- Toth-Petroczy,A., and Tawfik,D.S. (2014) The robustness and innovability of protein folds. *Curr Opin Struct Biol* **26**: 131-138.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Toyama,H., Chistoserdova,L., and Lidstrom,M.E. (1997) Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology* **143**: 595-602.
- Treshalina,H.M., Lukasheva,E.V., Sedakova,L.A., Firsova,G.A., Guerassimova,G.K., Gogichaeva,N.V., and Berezov,T.T. (2000) Anticancer enzyme L-lysine alpha-oxidase. Properties and application perspectives. *Appl Biochem Biotechnol* **88**: 267-273.
- Valeru,S.P., Rompikuntal,P.K., Ishikawa,T., Vaitkevicius,K., Sjoling,A., Dolganov,N. *et al.* (2009) Role of melanin pigment in expression of *Vibrio cholerae* virulence factors. *Infect Immun* **77**: 935-942.
- Vallon,O. (2000) New sequence motifs in flavoproteins: Evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins: Struct, Funct, Genet* **38**: 95-114.
- van Berkel,W.J., Kamerbeek,N.M., and Fraaije,M.W. (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* **124**: 670-689.
- van der Palen,C.J., Reijnders,W.N., De,V.S., Duine,J.A., and van Spanning,R.J. (1997) MauE and MauD proteins are essential in methylamine metabolism of *Paracoccus denitrificans*. *A van Leeuw* **72**: 219-228.
- van der Palen,C.J., Slotboom,D.J., Jongejan,L., Reijnders,W.N., Harms,N., Duine,J.A., and van Spanning,R.J. (1995) Mutational analysis of *mau* genes involved in methylamine metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem* **230**: 860-871.
- van Landschoot,A., and de Ley,J. (1983) Intra- and intergenic similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other Gram- negative bacteria. *J Gen Microbiol* **129**: 3057-3074.

- van Spanning,R.J.M., Wansell,C.W., Reijnders,W.N.M., Oltmann,L.F., and Stouthamer,A.H. (1990) Mutagenesis of the gene encoding amicyanin of *Paracoccus denitrificans* and the resultant effect on methylamine oxidation. *FEBS Lett* **275**: 217-220.
- Vandenberghe,I., Kim,J., Devreese,B., Hacısalıhıoglu,A., Iwabuki,H., Okajima,T. *et al.* (2001) The covalent structure of the small subunit from *Pseudomonas putida* amine dehydrogenase reveals the presence of three novel types of internal cross-linkages, all involving cysteine in a thioether bond. *J Biol Chem* **276**: 42923-42931.
- Vargas,L., Quintana,J., Pereañez,J., Nuñez,V., Sanz,L., and Calvete,J. (2013) Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* **15**: 1-11.
- Vergunst,A.C., van Lier,M.C., den Dulk-Ras,A., Stuve,T.A., Ouwehand,A., and Hooykaas,P.J. (2005) Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 832-837.
- Vincze,T., Posfai,J., and Roberts,R. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **31**: 3688-3691.
- Wagh,J., Shah,S., Bhandari,P., Archana,G., and Kumar,G.N. (2014) Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (*pqq*) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 5117-5129.
- Wang,S.X., Mure,M., Medzihradsky,K.F., Burlingame,A.L., Brown,D.E., Dooley,D.M. *et al.* (1996) A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science* **273**: 1078-1084.
- Wang,Y., Li,X., Jones,L.H., Pearson,A.R., Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2005) MauG-dependent in vitro biosynthesis of tryptophan tryptophylquinone in methylamine dehydrogenase. *J Am Chem Soc* **127**: 8258-8259.
- Wang,Y., Graichen,M., Liu,A., Pearson,A., Wilmot,C., and Davidson,V. (2003) MauG, a novel diheme protein required for tryptophan tryptophylquinone biogenesis. *Biochemistry* **42**: 7318-7325.
- Wang,Z., Chen,G., Yu,G., and Liu,C. (2014) Pyrroloquinoline quinone protects mouse brain endothelial cells from high glucose-induced damage in vitro. *Acta Pharmacol Sin* **35**: 1402-1410.
- Watanabe,N., Clay,M.D., van Belkum,M.J., Cherney,M.M., Vederas,J.C., and James,M.N. (2008) Mechanism of substrate recognition and PLP-induced conformational changes in LL-diaminopimelate aminotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **384**: 1314-1329.

- Weber,S., and Schleicher,E. Flavins and Flavoproteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 1(1146). 2014. Springer Science+Business Media New York.
- Weckslar,S.R., Stoll,S., Tran,H., Magnusson,O.T., Wu,S.P., King,D. *et al.* (2009) Pyrroloquinoline quinone biogenesis: demonstration that PqqE from *Klebsiella pneumoniae* is a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme. *Biochemistry* **48**: 10151-10161.
- Wierenga,R.K., Terpstra,P., and Hol,W.G.J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**: 101-107.
- Wilmot,C.M., and Davidson,V.L. (2009) Uncovering novel biochemistry in the mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **13**: 462-467.
- Wilmot,C.M., Hajdu,J., McPherson,M., and Phillips,S. (1999) Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science* **286**: 1724-1728.
- Wilmot,C.M., and Yukl,E. (2013) MauG: a di-heme enzyme required for methylamine dehydrogenase maturation. *Dalton Trans* **42**: 3127-3135.
- Wittenberg,C., and Triplett,E.L. (1985) A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **290** : 12535-12541.
- Xu,J., Eriksson,E., Cebula,M., Sandalova,T., Hedström,E., Pader,I. *et al.* (2015) The conserved Trp114 residue of thioredoxin reductase 1 has a redox sensor-like function triggering oligomerization and crosslinking upon oxidative stress related to cell death. *Cell Death Dis* **6**: e1616.
- Yang,C.A., Cheng,C.H., Lee,J.W., Lo,C.T., Liu,S.Y., and Peng,K.C. (2012) Monomeric L-amino acid oxidase-induced mitochondrial dysfunction in *Rhizoctonia solani* reveals a novel antagonistic mechanism of *Trichoderma harzianum* ETS 323. *J Agric Food Chem* **60**: 2464-2471.
- Yang,C.A., Cheng,C.H., Liu,S.Y., Lo,C.T., Lee,J.W., and Peng,K.C. (2011a) Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. *FEBS J* **278**: 3381-3394.
- Yang,C.A., Cheng,C.H., Lo,C.T., Liu,S.Y., Lee,J.W., and Peng,K.C. (2011b) A novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 associated with antagonism of *Rhizoctonia solani*. *J Agric Food Chem* **59**: 4519-4526.
- Yang,H., Johnson,P.M., Ko,K.C., Kamio,M., Germann,M.W., Derby,C.D., and Tai,P.C. (2005) Cloning, characterization and expression of escapin, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*. *J Exp Biol* **208**: 3609-3622.

- Yang,X.P., Zhong,G.F., Lin,J.P., Mao,D.B., and Wei,D.Z. (2010) Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* *pqqABCDE* gene cluster. *J Indust Microbiol Biotechnol* **37**: 575-580.
- Yoon,J.H., Kang,S.J., and Oh,T.K. (2005) *Marinomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2303-2307.
- Yu,M., Wang,J., Tang,K., Shi,X., Wang,S., Zhu,W.M., and Zhang,X.H. (2012) Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. *Microbiol* **158**: 835-842.
- Yu,N., Wagner,M., Laird,M., Melli,G., Rey,S., Lo,R. *et al.* (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**: 1608-1615.
- Yu,P., Wright,S., Fan,E., Lun,Z., and Gubisne-Harberle,D. (2003) Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1647**: 193-199.
- Yu,Z., and Qiao,H. (2012) Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase. *Appl Biochem Biotech* **167**: 1-13.
- Yukl,E.T., Liu,F., Krzystek,J., Shin,S., Jensen,L.M.R., Davidson,V.L. *et al.* (2013) Diradical intermediate within the context of tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *PNAS* **110**: 4569-4573.
- Yukl,E.T., and Wilmot,C.M. (2012) Cofactor biosynthesis through protein post-translational modification. *Curr Opin Chem Biol* **16**: 54-59.
- Zaidi,K.U., Ali,A.S., Ali,S.A., and Naaz,I. (2014) Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochem Res Int* **854687**.
- Zhang,D.C., Li,H.R., Xin,Y.H., Liu,H.C., Chen,B., Chi,Z.M. *et al.* (2008) *Marinomonas arctica* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1715-1718.
- Zhang,Q., Zhang,J., Jiang,C., Qin,J., Ke,K., and Ding,F. (2014) Involvement of ERK1/2 pathway in neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone-induced SH-SY5Y cell injury. *Neuroscience* **270**: 183-191.
- Zhang,Y.J., Wang,J.H., Lee,W.H., Wang,Q., Liu,H., Zheng,Y.T., and Zhang,Y. (2003) Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun* **309**: 598-604.
- Zhou,P., Liu,L., Tong,H., and Dong,X. (2012) Role of operon *aoSo-mutT* in antioxidant defense in *Streptococcus oligofermentans*. *PLoS ONE* **7**: e38133.

VIII. APÉNDICES

A. 2. Alineamiento de las proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de *Rhodopirelulla* sp. SWK7, en la zona de LodA C448. Alineamiento de todas las proteínas. En azul residuos 100% conservados y en rojo residuos > 90% conservados. h: residuo hidrofóbico; 1: N o S. El residuo C448 aparece marcado en amarillo.

Gen	Organismo	Secuencia de residuos de LodA '430-463'
		xhSDMDxxxhGNCVGxPxCPGIEVTWSxx1xxhY
Marme_2662	LodA <i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	PVSDMDTASIGNCVGLPMC h PGIEMTWSLQNPVIY
Mmwyl1_3721	<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	PVNEMDAASIGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNSKLY
	<i>Marinomonas</i> sp GOBB3-320	YVNEMDAASIGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNSKLY
PTD2_20217	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	AVHPLDKASIGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPPLY
G509DRAFT_1169	<i>Flavobacterium subsaxonicum</i> DSM 21790	PVSLDDTASVGNCVGLMPCPGIEVTWSMQNPAVY
PCIT_22609	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	PVDPLDQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPVKY
Rhein_1334	<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	PVNPLDQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSMQNPAVY
H527DRAFT_03370	<i>Aquimarina muelleri</i> DSM 19832	AISEIDMASVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQENIY
PL2TA16_00557	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	GVFYADQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSMQNPAVY
PflaDRAFT_00041100	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	GVFYADQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPVY
UY7DRAFT_03653	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	GVFYADQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPVY
PPIS_19511	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	GVFYADQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPVY
G366DRAFT_02721	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	GVFYADQGSVGNCVGLMPCPGIEVTWSLQNPVY
Gei7105DRAFT_0285	<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	GVDDRDRASVGNVVGLPQCPGIEVTWTTQNPVIY
Nhal_1391	<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	PLCSATSAAMGNCVGLMPCPGIEVTWSMQNPAIY
F460DRAFT_04769	<i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935	GIAALDRAAIGNCVGEPMPCPGIEVTWSVRNPVIY
	<i>Nitrolanceus hollandicus</i> Lb	GIHPLDRVDIGNCVGDPMPCPGIEVTWSVRNPAIY
G559DRAFT_00896	<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	GVTALDRASVGNCVGGPLCPGIEVTWSLYSPELY
CC1582_00022990	<i>Pseudomonas viridaflava</i> CC1582	NVTDLDRASVGNCVGGPFPCPGIEVTWSLYSKALY
TA043_00024900	<i>Pseudomonas viridaflava</i> TA043	NVTDLDRASVGNCVGGPFPCPGIEVTWSLYSKALY

A. 3. Alineamiento de las proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de *Rhodopirelulla* sp. SWK7, en la zona de LodA E101. En azul residuos 100 % conservados y en rojo residuos > 90% conservados. 1: V o I; 2: L o V; 3: F o Y. El residuo E101 aparece marcado en amarillo.

Gen	Organismo	Secuencia de residuos '80-118' en LodA
		1xxIxWTVH2ANKKAAWYx3xELxGNLLxGxxNSYxxxx
Marme_2662	LodA <i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	VKNIEWTVHLANKKAAWYEFRE ¹ LNGNLLYGRDNSYSARG
Mmwyl1_3721	<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	VKSIEWNVHLANKKAAWYAFSELNGNLLYGEANSYKNRG
	<i>Marinomonas</i> sp GOBB3-320	VKSIEWSVHLANKKAAWYAFSELNGNLLYGEANSYKNRG
PTD2_20217	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	IEAIVWTVHLANKKAAWYQYSELQGNLLYGETNSYTARK
G509DRAFT_1169	<i>Flavobacterium subsaxonicum</i> DSM 21790	VANIEWTVHLASKKAEWYQYSELQGNLLYGSANSYQNQD
PCIT_22609	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	VKAINWNVHLANKKAAWYQYSELEGNLLYGKNSYVNRE
Rhein_1334	<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	VQSIQWTVHLANKKAAWYQYSELQGNLLYGPQNSYQQQK
H527DRAFT_03370	<i>Aquimarina muelleri</i> DSM 19832	VNSIVWTAHLANKKAAWYQYSELEGNLLYGNENSYSNRK
PL2TA16_00557	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	VKAITWTVHVANKKAAWYEFNELQGNLLFGEDNSYKCRG
PflaDRAFT_00041100	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	VKSIWTVHVANKKAAWYEFNELQGNLLYGQDNSYSNRN
UY7DRAFT_03653	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	VKSIWTVHVANKKAAWYEFNELQGNLLYGQDNSYSNRN
PPIS_19511	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	VKSIWTVHVANKKAAWYEFNELQGNLLYGQDNSYSNRN
G366DRAFT_02721	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	VKSIWTVHVANKKAAWYEFNELQGNLLYGQDNSYSNRN
Gei7105DRAFT_0285	<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	VASIEWTVHLANKKAAWYQFSEYKGNLLFGDANSYTNQN
Nhal_1391	<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	VASIHWTVHLANKKAAWYQFSELQGNLLLGEGNSYKNQK
F460DRAFT_04769	<i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935	IAKIEWKVHVANKKAAWWNYVPLLDLMFGQNNSYETWT
	<i>Nitrolancetus hollandicus</i> Lb	VAKIEWTVHVANKKAAWYQFAEYEGNMLGPDNSYEARG
G559DRAFT_00896	<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	VASVQWTVHVANKKAVWYNFQELQGNLLGPDNSYEKVG
CC1582_00022990	<i>Pseudomonas viridaflava</i> CC1582	IAGIEWTVHLANKKAAWYSFSELQGNLLGPDNSYEACN
TA043_00024900	<i>Pseudomonas viridaflava</i> TA043	IAGIEWTVHLANKKAAWYSFSELQGNLLGPDNSYEACN

A. 4. Alineamiento de proteínas similares a LodA incluidas en el grupo IA, excepto la de *Rhodopirelulla* sp. SWK7, en la zona de LodA Y211. En azul residuos 100 % conservados y en rojo residuos > 90% conservados. h: residuo hidrofóbico; 1: G o S; 2 Y o F; 3: G o A; 4: S o A. El residuo Tyr211 aparece destacado en amarillo.

Gen	Organismo	Secuencia de residuos '182-230' en LodA
		LGxhxTDxxGRLLhVhGGxGxAGGxxxhx1.23GxxxWxDDx4DGxVxCxh
Marme_2662	LodA <i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	LGTLRTDSQGRLIVLGGYGFAGGNTDLSGYGGGDDWYDDISDGSVTCVV
Mmwyl1_3721	<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	LGTLTDDKGRLLIVLGGYGRAGGNTDLEGGGGDEWFDDISDGPVTCVV
	<i>Marinomonas</i> sp. GOBB3-320	LGTLRTDNKGRLLIVLGGYGRAGGNTDLEGGGGDEWFDDISDGPVTCVV
PTD2_20217	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	LGTLKTDNKGRLIVFGGYGHAGGDEALTSYGGSDTWHDDTADGPVYCEV
G509DRAFT_1169	<i>Flavobacterium subsaxonicum</i> DSM 21790	LGNLLTDASGRLLVVLGGYGNAGGNEPLTSYGGSSDTHDDISDGPVYCTV
PCIT_22609	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	LGDLKTDNEGRLIVLGGYGHAGGDKPLVSYGGSDTWHDDIADGPVYCTV
Rhein_1334	<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	LGDLLTDDLGRLLIVLGGYGNAGGDEPLTSYGGSDTWHDDISDGPVYCTV
H527DRAFT_03370	<i>Aquimarina muelleri</i> DSM 19832	LGDLLTDEGRLLIVLGGYGHAGGNEPLTSYGGSDTWHDDISDGPVYCTI
PL2TA16_00557	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	LGNILTDNEGRLVVLGGYGNAGGNEPLESYGGADTWHDDIADGTVYCTV
PflaDRAFT_00041100	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	LGDIILTDNEGRLVVLGGKGNAGGNLPLESYGGADTWHDDIADGTVYCTV
UY7DRAFT_03653	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	LGDIILTDNEGRLVVLGGKGNAGGNQPLESYGGADTWHDDIADGTVYCTV
PPIS_19511	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	LGDIILTDNEGRLVVLGGKGNAGGNQPLESYGGADTWHDDIADGTVYCTV
G366DRAFT_02721	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	LGDIILTDNEGRLVVLGGKGNAGGNQPLESYGGADTWHDDIADGTVYCTV
Gei7105DRAFT_0285	<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	LGTLKTDSSGRLVVLGGYGFKSGGDLPLSSYGGADTWYDDISDGSVTCTI
Nhal_1391	<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	LGTIKTDREGRLVVLGAYGRAGGDEPITSYGGADTWYDDIADGPVECTV
F460DRAFT_04769	<i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935	LGEMRTDSAGNLLVIGAYGRAGGIDPITGFGGGDTWNDDIADGPVTATV
	<i>Nitrolancetus hollandicus</i> Lb	LGDLLTDADGRLLVVLGGYGFKAGGSEPIITSFAGADTWHDDVSDGPVSKL
G559DRAFT_00896	<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	LGEMRTDQQGRLLVVLGGYGHAGGNQSIITSFAGADGWHDDISDGPVTCTL
CC1582_00022990	<i>Pseudomonas viridaflava</i> CC1582	LGGVLTDNKGRLLVVLGGYGHAGGDQSIITSFAGADTWHDDTSDGPVTCTL
TA043_00024900	<i>Pseudomonas viridaflava</i> TA043	LGGVLTDKKGRLLVVLGGYGHAGGDQSIITSFAGADTWHDDTSDGPVTCTL

A. 6. Genes que codifican flavoproteínas hipotéticas similares a *lodB* detectados en los genomas que contienen genes similares a *lodA*. Los genes adicionales localizados entre ambos genes en algunos de los genomas se muestran en rojo. Algunos genes similares a *lodB* que parecen estar partidos en dos se muestran en azul.

Genoma	gene_oid	Locus Tag	Tamaño de la secuencia de Aa	COGs
<i>Terriglobus saanensis</i> SP1PR4, DSM 23119	649914560	AcIPR4_2530	140	
<i>Terriglobus saanensis</i> SP1PR4, DSM 23119	649914561	AcIPR4_2531	369	COG0644
<i>Actinoplanes globisporus</i> DSM 43857	2515244412	A3CQDRAFT_07979	336	COG0644
<i>Amycolatopsis balhimycina</i> DSM 44591	2517477566	A3CEDRAFT_0691	385	COG0644
<i>Amycolatopsis vancoremycina</i> DSM 44592	2546378691	H480_25952	116	pfam01494
<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054, NBRC 14216	2511595486	KSE_06180	391	COG0644
<i>Microlunatus phosphovorius</i> NM-1	650913490	MLP_20450	371	COG0644
<i>Streptomyces afghaniensis</i> 772	2546772915	STAFG_1984	368	COG0644
<i>Streptomyces auratus</i> AGR0001	2533914305	SU9_01645	390	COG0644
<i>Streptomyces flavidovirens</i> DSM 40150	2523212644	G412DRAFT_06356	327	COG0644
<i>Streptomyces purpureus</i> KA281, ATCC 21405	2516519009	StrpuDRAFT_3615	437	COG0644
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	646659179	SCAB_78071	396	COG0644
<i>Streptomyces</i> sp. HPH0547	2541458762	HMPREF1486_04899	396	COG0644
<i>Streptomyces turgidiscabies</i> Car8	2541331107	STRTUCAR8_01196	221	COG0644
<i>Rudanella lutea</i> DSM 19387	2517151028	RudluDRAFT_3651	372	COG0644
<i>Aquimarina latercula</i> DSM 2041	2523972985	H526DRAFT_00680	382	COG0644
<i>Aquimarina latercula</i> DSM 2041	2523972986	H526DRAFT_00681	147	
<i>Aquimarina muelleri</i> DSM 19832	2524103210	H527DRAFT_03371	370	COG0644
<i>Chryseobacterium gregarium</i> DSM 19109	2523744442	H561DRAFT_01491	369	COG0644
<i>Donghaeana dokdonensis</i> DSW-6	2540718438	DDD_3115	364	COG0644
<i>Flavobacterium soli</i> DSM 19725	2523123555	G508DRAFT_03148	370	COG0644
<i>Flavobacterium subsaxonicum</i> DSM 21790	2525331178	G509DRAFT_1170	379	COG0644
<i>Kordia algicida</i> OT-1	641459907	KAOT1_07773	358	COG0654
<i>Kordia algicida</i> OT-1	641460224	KAOT1_05627	369	COG0644
<i>Owenweeksia hongkongensis</i> DSM 17368	2509012460	Oweho_2120	371	COG0644
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	2523672834	H518DRAFT_02975	373	COG0644
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	2523673416	H518DRAFT_03558	354	COG0644
<i>Lewinella cohaerens</i> DSM 23179	2515281511	A3EUDRAFT_02928	365	COG0644
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> DSM 785	2509059540	Haur_00884	356	COG0644
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	643475667	PCC8801_2626	356	COG0644
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802	644981410	Cyan8802_3477	356	COG0644
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701	2535024169		355	COG0644
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7336	2506749097	Syn7336_3774	373	COG0644
<i>Synechococcus</i> sp. WH7805	639022018	WH7805_00985	210	COG0644
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7103	2507474091	Cal7103DRAFT_00009900	379	COG0644
<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	2510099034	Gei7105DRAFT_0284	375	COG0644
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	2509841120	Lepto7375DRAFT_1137	380	COG0644
<i>Lyngbya majuscula</i> 3L	2506481955	LYNGBM3L_45970	421	COG0644
<i>Paenibacillus pinihumi</i> DSM 23905	2524187776	H583DRAFT_01924	376	COG0644
<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	637435364	RB4288	374	COG0644
<i>Rhodopirellula baltica</i> SH28	2537186272	RBSH_01580	365	COG0644
<i>Rhodopirellula</i> sp. SWK7	2534782292	RRSWK_06617	453	COG0644
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	637086589	CC0555	369	COG0644
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	639721040	Mmc1_0291	361	COG0644
<i>Agrobacterium vitis</i> S4	643648895	Avi_5262	366	COG0644
<i>Ancylobacter</i> sp. FA202	2517476493	A3M1DRAFT_4582	362	COG0644
<i>Ancylobacter</i> sp. 501b	2520000087	D895DRAFT_0837	362	COG0644
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM2783	2513671318	YY7DRAFT_00617	259	COG0654
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123	2528856989	K287DRAFT_08451	138	

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123	2528856990	K287DRAFT_08452	343	COG0644
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	2513941114	A3AODRAFT_03550	339	COG0644
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	2513943877	A3AODRAFT_06317	138	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	2513943878	A3AODRAFT_06318	324	COG0644
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	2512000709	BJ6T_51950	138	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	2512000710	BJ6T_51960	324	COG0644
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	2512002545	BJ6T_70310	335	COG0644
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCGE-LA001	2520791138	BCCGELA001_11564	328	COG0644
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Cp5.3	2524441265	K289DRAFT_05853	347	COG0644
<i>Bradyrhizobium</i> sp. EC3.3	2513716745	YUUDRAFT_02263	368	COG0644
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM3983	2513638821	YUADRAFT_02115	368	COG0644
<i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	2511394680	PMI42_01601	138	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	2511394681	PMI42_01602	324	COG0644
<i>Mesorhizobium</i> sp. WSM4349	2515624896	B041DRAFT_00945	375	COG0644
<i>Methylobacterium</i> sp. 10	2546997098	K368DRAFT_2873	356	COG0644
<i>Microvirga lotononidis</i> WSM3557	2509073502	MicloDRAFT_00001390	370	COG0644
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	637969518	Nham_1020	138	
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	637969519	Nham_1021	392	COG0644
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	637971095	Nham_2641	401	COG0644
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	638920628	NB311A_15282	415	COG0644
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 128C53	2515651855	B062DRAFT_04547	355	COG0644
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39	2513714294	YUSDRAFT_07290	138	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39	2513714295	YUSDRAFT_07291	386	COG0644
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> STM6155	2513599305	YY3DRAFT_04970	353	COG0644
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	637475603	RPA2472	366	COG0644
<i>Xanthobacter</i> sp. 126	2517234184	XAN126DRAFT_4634	370	COG0644
<i>Xanthobacter</i> sp. 126	2517234372	XAN126DRAFT_4822	352	COG0644
<i>Citricella</i> sp. SE45	647844930	CSE45_3262	369	COG0644
<i>Pelagibaca bermudensis</i>	648284618	R2601_05868	349	COG0644
<i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094 (scaffold version)	2523511523	salmuc_02446	380	COG0644
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	2512035868	AZOLI_p50416	371	COG0644
<i>Azospirillum</i> sp. B510	646556649	AZL_e04110	386	COG0644
<i>Fodinicurvata sediminis</i> DSM 21159	2523907282	G502DRAFT_3287	368	COG0644
<i>Inquilinus limosus</i> DSM 16000	2523933295	G537DRAFT_06396	384	COG0644
<i>Nisaea denitrificans</i> DSM 18348	2525379172	K328DRAFT_3845	382	COG0644
<i>Nisaea</i> sp. BAL199	641432190	BAL199_14692	395	COG0644
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	2523407329	G578DRAFT_2846	377	COG0654
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	2523407710	G578DRAFT_3227	389	COG0644
<i>Tistrella mobilis</i> KA081020-065	2519490908	TMO_c0490	397	COG0644
<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC 31461	2547435672	KK7DRAFT_01672	138	
<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC 31461	2547435673	KK7DRAFT_01673	365	COG0644
<i>Sphingomonas</i> sp. S17	651582059	SUS17_587	358	COG0644
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860	650735003	Acav_2542	386	COG0644
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> RS-1	2547287638	AASARDRAFT_02022	123	COG0644
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> RS-1	2547287639	AASARDRAFT_02023	170	COG0644
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> DSM 16503	2524227849	G456DRAFT_01747	357	COG0644
<i>Azohydromonas australica</i> DSM 1124	2527176976	H537DRAFT_05060	418	COG0644
<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	642413907	BamiOP4010DRAFT_0032	394	COG0644
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	2563064355	PMI06_008728	350	COG0644
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	2563064360	PMI06_008733	373	COG0644
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	646771439	BC1002_7112	372	COG0644
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	2524916786	F559DRAFT_00292	363	COG0644
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	2524920576	F559DRAFT_04085	142	
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	2524920577	F559DRAFT_04086	374	COG0644
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	2514031882	A3A5DRAFT_06867	374	COG0644
<i>Delftia acidovorans</i> CCUG 15835	2541343205	HMPREF9702_04266	404	COG0644

VIII. APÉNDICES

<i>Delftia acidovorans</i> CCUG 274B	2541346199	HMPREF9701_00977	404	COG0644
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	641298632	Daci_3529	409	COG0644
<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	650860804	DelCs14_3290	409	COG0644
<i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935	2518931951	F460DRAFT_04770	386	COG0644
<i>Massilia timonae</i> CCUG 45783	2532942464	HMPREF9710_03283	380	COG0644
<i>Pusillimonas</i> sp. T7-7	650826133	PT7_3641	391	COG0644
<i>Ralstonia solanacearum</i> MolK2	2541798313		341	COG0644
<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82	651230828	RSPO_m00448	361	COG0644
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	637454100	CV3269	365	COG0644
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	2512829100	COCOR_02747	390	COG0644
<i>Cystobacter fuscus</i> DSM 2262	2538044954	D187_001637	379	COG0644
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	641164697	PPSIR1_31253	382	COG0644
<i>Ferrimonas kyonanensis</i> DSM 18153	2524104646	H598DRAFT_00620	372	COG0644
<i>Marinimicrobium agarilyticum</i> DSM 16975	2524121844	G547DRAFT_01230	369	COG0644
<i>Marinobacterium rhizophilum</i> DSM 18822	2519006290	F451DRAFT_01569	364	COG0644
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	2542023515	PCIT_20079	371	COG0654
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	2542023928	PCIT_22139	360	COG0654
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	2542024023	PCIT_22614	386	COG0644
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	2505176535	PflaDRAFT_00014020	359	COG0644
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	2505179240	PflaDRAFT_00041090	378	COG0644
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	2550713914	UY7DRAFT_03654	378	COG0644
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	2550715158	UY7DRAFT_04899	359	COG0644
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	2505183674	PlutDRAFT_00005320	376	COG0644
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	2505186350	PlutDRAFT_00032080	373	COG0644
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	2520471308	G366DRAFT_00652	359	COG0644
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	2520473374	G366DRAFT_02720	378	COG0644
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	2542029829	PPIS_10010	359	COG0644
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	2542031717	PPIS_19506	378	COG0644
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	2541424620	PRUB_04176	370	COG0644
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	2541428756	PRUB_24671	383	COG0644
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20495	2540458793		386	COG0644
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Bsw20308	2540452161	D172_1357	386	COG0644
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> UST010723-006	2542035140	PSPO_13062	385	COG0644
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	637919380	Sde_0318	482	COG0644
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	643424059	swp_0648	366	COG0644
<i>Shewanella</i> sp. 38A_GOM-205m	2546918703	N512DRAFT_04274	393	COG0644
<i>Shewanella woodyi</i> MS32, ATCC 51908	641635854	Swoo_4289	372	COG0644
<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	646692022	Nhal_1390	390	COG0644
<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	2512463315	Rhein_1333	378	COG0644
<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	2512464577	Rhein_2599	369	COG0644
<i>Arsenophonus nasoniae</i> DSM 15247	2526112036	G468DRAFT_01094	369	COG0644
<i>Arsenophonus</i> sp. ArN	2510071412	ArN_00015330	369	COG0644
<i>Methylomonas</i> sp. 11b	2516192575	Meth11bDRAFT_4056	364	COG0644
<i>Methylomonas</i> sp. MK1	2522499055	G006DRAFT_1988	364	COG0644
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	637833462	HCH_03140	392	COG0644
<i>Hahella ganhwensis</i> DSM 17046	2520615830	F566DRAFT_05358	409	COG0644
<i>Halomonas anticariensis</i> DSM 16096	2524952842	F567DRAFT_04167	378	COG0644
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	2506228519	Marme_1654	379	COG0644
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	2506229271	Marme_2397	385	COG0644
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	2506229542	Marme_2661	369	COG0644
<i>Marinomonas</i> sp. GOBB3-320	2504626911	M320_pool_00037290	372	COG0644
<i>Marinomonas</i> sp. MED121	638943767	MED121_12490	378	COG0644
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	640806103	Mmwyl1_3720	372	COG0644
Oceanospirillum beijerinckii DSM 7166	2524095415	H579DRAFT_00202	142	COG0644
Oceanospirillum beijerinckii DSM 7166	2524095416	H579DRAFT_00203	252	COG0644
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166	2524097886	H579DRAFT_02674	388	COG0644
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> MTCC 11365	2546621804	L293_0744	283	COG0644
<i>Acinetobacter</i> sp. NBRC 100985	2533901542		367	COG0654

<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM 14971	2518262900	C502DRAFT_01576	370	COG0654
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	642701565	CJA_0226	391	COG0644
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	642705101	CJA_3777	363	COG0644
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	639009029	PTD2_20212	368	COG0644
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NZ17	2506351878	PfINZI7_00013270	384	COG0644
<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	2525344493	G559DRAFT_00895	360	COG0644
<i>Pseudomonas viridiflava</i> CC1582 (CC1582)	2506935212	CC1582_00023000	360	COG0644
<i>Pseudomonas viridiflava</i> TA043 (TA043)	2506970398	TA043_00024910	360	COG0644
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> ART-Xtg29	2536428631	XTG29_02242	385	COG0644
<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	2509255934	estExt_Genemark1.C_160146.1	435	COG0644
<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	2509255937	fgenes1_kg.16_#_157_#_Locus9113v1rpk9.56.1	446	COG0644
<i>Hypholoma sublateritium</i> FD-334 SS-4	2509219407	gm1.4995_g.1	393	COG0644
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	645819476	LACBIDRAFT_321484	468	COG0644
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	645908371	POSPLDRAFT_96921	402	COG0644

