



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Identificación y Caracterización de una Glicina
Oxidasa en *Marinomonas mediterranea*
Pertenece a una Nueva Familia de
Quinoproteínas

D. Jonatan Cristian Campillo Brocal
2016



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Identificación y caracterización de una glicina
oxidasa en *Marinomonas mediterranea*
perteneciente a una nueva familia de
quinoproteínas**

D. Jonatan Cristian Campillo Brocal

2016

El presente trabajo ha sido entregado para optar al grado de doctor en "Biología Molecular y Biotecnología". Asimismo ha sido propuesto para Mención de Doctorado Internacional en virtud a la estancia predoctoral realizada en el "Laboratorio de Biodiversidad Microbiana y Biotecnológica" (LBBM) situado en el Observatorio Oceanográfico de Banyuls sur Mer (Francia).

Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada durante el periodo de disfrute de una beca-contrato predoctoral de la Universidad de Murcia y ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto BIO2010-15226) y por la Fundación Séneca de la Región de Murcia (Proyecto 11867/PI/09).

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

1. **Campillo-Brocal, J. C., P. Lucas-Elío and A. Sánchez-Amat. (2013)** Identification in *Marinomonas mediterranea* of a novel quinoprotein with glycine oxidase activity. *MicrobiologyOpen*. 2 (4): 684-694. doi: 10.1002/mbo3.107.
2. **Chacón-Verdú, M. D., J. C. Campillo-Brocal, P. Lucas-Elío, V. L. Davidson and A. Sánchez-Amat. (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*. 1854 (9): 1123–1131. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.018.
3. **Campillo-Brocal, J. C., M. D. Chacón-Verdú, P. Lucas-Elío and A. Sánchez-Amat. (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.
4. **Campillo-Brocal, J. C., P. Lucas-Elío and A. Sánchez-Amat. (2015)** Distribution in different organisms of amino acid oxidases with FAD or a quinone as cofactor and their role as antimicrobial proteins in marine bacteria. *Marine Drugs*. 13 (12): 7403-7418. Review. doi: 10.3390/md13127073.
5. **Sehanobish, E., J. C. Campillo-Brocal, H. R. Williamson, A. Sánchez-Amat and V. L. Davidson. (2016)** Interaction of GoxA with its modifying enzyme and its subunit assembly are dependent on the extent of cysteine tryptophylquinone biosynthesis. *Biochemistry*. 55 (16): 2305–2308. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00274.

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 Internacional de la Federación Española de Biotecnólogos (BAC2013). Sevilla (España).
- XIV International Symposium 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).
- The Aragolab Students Meeting (Journée Aragoyenne) (2014). Banyuls sur Mer (Francia).
- OxiZymes 2014. Viena (Austria).
- The Fourth International Conference on Cofactors (ICC-04) (2014). Parma (Italia).
- OxiZymes 2016. Wageningen (Holanda).

AGRADECIMIENTOS

En las siguientes líneas tengo la intención de mostrar mi gratitud por la ayuda recibida a lo largo de estos años de Tesis Doctoral, enfrentándome a la ardua tarea de no olvidar ningún nombre, de ser breve y de no caer excesivamente en el sentimentalismo y la cursilería. De antemano pido disculpas por no ser capaz de expresar lo agradecido que estoy y lo mucho que les debo a esas personas que han contribuido a la conquista de este sueño.

En primer lugar, como no podía ser de otra forma quisiera dar las gracias a mis directores de Tesis y mentores, el **Dr. Antonio Sánchez Amat** y la **Dra. Patricia Elío Lucas**. Con Patricia descubrí la Microbiología allá por mi segundo año de carrera. Muchas gracias por ello y por tu disposición, generosidad, positividad y porque contigo di mis primeros pasos en un laboratorio. Antonio hizo que quisiera adentrarme aún más en este microscópico mundo y despertó mi faceta como investigador. Gracias por tu apoyo y enseñanzas, y por transmitir tu pasión por la ciencia y la investigación día tras día. Ambos me habéis enseñado prácticamente todo lo que se científicamente hablando y por ello os estaré eternamente agradecido.

Agradecer al profesor **Marcelino Suzuki**, por darme la posibilidad de realizar una estancia en su laboratorio y por hacerme de vez en cuando un hueco en su complicada agenda. En general, agradecer la enorme hospitalidad y ayuda recibida durante esta estancia por la gente del Observatorio Oceanográfico de Banyuls sur Mer (Francia) que me permitió crecer como científico y como persona: **Luis, Méryl, Sandra, Mehdi** y en especial a **Laurent** y a **Sonja**, por estar siempre dispuestos a echarme una mano tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al personal del Servicio de Biología Molecular del SAI de la Universidad de Murcia, principalmente al **Dr. Alejandro Torrecillas** por la espectrometría de masas y al **Dr. Cesar Flores** por la secuenciación de ADN. Por vuestro eficiente y gran trabajo.

A todos los profesores e investigadores del **dpto. de Genética y Microbiología** por vuestro apoyo en algún u otro momento a lo largo de estos años. Especialmente al profesor de profesores, **Francisco Torrella**, por su sabiduría, sentido del humor y por transmitir tan efusivamente su inquietud científica. A **Alejandro**, siempre tan servicial. A **Luis Miguel y Paco** por nuestras acaloradas charlas sobre fútbol y deportes varios.

A los compañeros de facultad y laboratorio con los que he tenido la suerte de coincidir, por todos los momentos que hemos vivido juntos incluyendo experimentos, comidas, autoclaves, festejos varios, etc. A **Dani, Luisa, Sandra, Aida, Mari Carmen** y en especial a **Rafa y Mariola** con los que he compartido la mayor parte de este camino. Porque nadie mejor que vosotros sabe lo que se sufre y disfruta haciendo el Doctorado. Sin olvidar al “chico del pollo” **Fabio**, ese “cazzo” de italiano que me aportó un soplo de aire fresco durante su corta estancia en Murcia. También a mis amigos del dpto. de Fisiología Animal, **María, Bea, Antonio** y en especial a **Domingo**, un auténtico figura. Una mención distinguida para mis “biofriends”, con los que inicié mi andadura por la facultad de Biología. Al principio sólo eran compañeros de carrera, pero poco a poco se fueron convirtiendo en los mejores amigos que uno puede desear: **Ana, Débora, Antonio, Edu, Jesús, Vero, Mari Paz, Juanjo, Rafa, Pablo y Pedro**.

He dejado para el final y no por ello menos importante a mi **familia**. Aprovecho la ocasión para expresar, ya que no lo hago muy a menudo, lo realmente afortunado que me siento de tenerlos. Aquí puedo incluir a los miembros del “**Ekipo**” con los que he vivido tanto que han pasado a ser parte de mi familia. A la familia **Algarra-Oñate**, por ser mi segunda familia. A mis primos, tíos y sobre todo mis abuelos. A mis hermanos **Santi e Indira**, y a mis padres **Santiago y Teresa**, porque les debo todo lo que soy. Por enseñarme que los estudios eran lo primero y por inculcarme que sin esfuerzo y sacrificio no hay recompensa. Cuanto me enorgullece compartir las ganas de seguir formulando preguntas y de seguir aprendiendo día tras día. Por último, especialmente gracias a ti, **Blanca**, porque nadie como tú sabe bien lo que significa para mi poder estar hoy escribiendo estos agradecimientos y culminando este triunfo. Por ser compañera de vida, por darle sentido a mi mundo y porque sin tu apoyo y amor incondicional no lo habría conseguido. Por todo y por mucho más, ¡gracias!

*“Según vamos adquiriendo conocimiento,
las cosas no se hacen más comprensibles
sino más misteriosas”*

Albert Schweitzer



*Para mi familia y amigos,
para M. mediterranea,
para quien sostiene este libro,
y en especial a ti, Blanca*

ABREVIATURAS

aa: aminoácido	Gox: glicina oxidasa
Amp: ampicilina	GoxA: glicina oxidasa de <i>Marinomonas mediterranea</i> (producto de Marme_1655)
amu: unidad de masa atómica	HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
AO: aminoácido oxidasa	HRP: peroxidasa de rábano
AP: presión atmosférica	IMG: Integrated Microbial Genomes (DOE-JGI, USA)
Ara: arabinosa	IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo	JGI: Joint Genome Institute (USA)
BLAST: herramienta bioinformática de alineamiento de secuencias de tipo local	Kb: kilobases de DNA o 1000 pb
BSA: albúmina de suero bovino	kDa: kilodalton
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo	Km: kanamicina
Cm: cloranfenicol	LAO: L-aminoácido oxidasa
CTQ: cisteína triptofilquinona	LOD: actividad lisina oxidasa
DAO: D-aminoácido oxidasa	LodA: L-lisina épsilon-oxidasa (producto de Marme_2662)
DBM: motivo de unión a dinucleótidos	LTQ: lisina tirosilquinona
DMSO: dimetil sulfóxido	m/v: relación masa/volumen
DNA: ácido desoxirribonucleico	m/z: relación masa/carga
DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600nm	MADH: metilamina deshidrogenasa
Dopa: 3,4-dihidroxifenilalanina	MALDI: ionización por desorción láser asistida por una matriz
DTT: ditioneitol	mau: operón de utilización de metilamina
EC: Comisión de Enzimas	MCO: multicobreo oxidasa
EDTA: etilén diamino tetracetato (sal disódica)	MCS: sitio de clonación múltiple
ESI: ionización por electrospray	ML: máxima verosimilitud (Maximum Likelihood)
EtOH: etanol	
FAD: flavín dinucleótido	
FMN: flavín mononucleótido	
Gm: gentamicina	
GOX: actividad glicina oxidasa	

MM: masa molecular
mob: región de movilización por conjugación de plásmidos
MS/MS: espectrometría de masas en tándem
MS: espectrometría de masas
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
NCBI: National Center for Biotechnology Information (USA)
Ni-NTA agarosa: agarosa con níquel unido a nitrilotriacetato
NJ: vecino más cercano (Neighbor-Joining)
nt: nucleótidos
o/n: overnight (aproximadamente 16 h de incubación)
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
PHB: poli- β -hidroxibutirato
pI: punto isoeléctrico
Poli-His: etiqueta de poli-histidinas
ppm: partes por millón
PPO: actividad polifenol oxidasa
Ppo: polifenol oxidasa
PQQ: pirroloquinolín quinona

psi: unidad de presión (libra por pulgada cuadrada)
QHNDH: quinohemoproteína deshidrogenasa
RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends
reb: genes que codifican los cuerpos R
Rif: rifampicina
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: transcriptasa inversa seguida de PCR
SDS: dodecil sulfato sódico
TAT: Twin Arginine Translocation
Tc: tetraciclina
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFA: ácido trifluoroacético
TH: actividad tirosina hidroxilasa
Tm: temperatura de fusión del oligo
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
XoA: producto de Marme_2396
 Δ : delección (en la descripción de genotipos)

Índices

Índice de contenidos

Índices.....	i
I. Introducción	1
I.1. Aminoácido oxidasas (AOs).	3
I.1.1. Características generales de las L-aminoácido oxidasas (LAOs).	4
I.1.1.1. Las flavinas.	5
I.1.1.2. Motivos de unión a flavinas.	7
I.1.1.3. LAOs de organismos superiores.	9
I.1.1.4. LAOs de origen microbiano.	11
I.1.1.5. Glicina oxidasas.	14
I.1.2. L-lisina épsilon-oxidasas de <i>Marinomonas mediterranea</i> (LodA), una aminoácido oxidasas con cofactor quinónico.	16
I.1.2.1. Características generales de cofactores quinónicos.	17
I.1.2.2. Características bioquímicas y relevancia fisiológica de LodA.	20
I.1.2.3. El cofactor CTQ de LodA.	24
I.1.3. Aplicaciones biotecnológicas de las LAOs.	27
I.2. El género <i>Marinomonas</i>.	30
I.2.1. Características generales de <i>Marinomonas mediterranea</i>	32
I.2.1.1. Polifenol oxidasas sintetizadas por <i>Marinomonas mediterranea</i>	35
I.2.1.2. Sistema PpoS/PpoR: regulación de la expresión génica en <i>M. mediterranea</i>	36
I.2.1.3. Análisis genómico de <i>M. mediterranea</i>	38
II. Objetivos.....	39
III. Materiales y Métodos.....	43
III.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	45
III.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	46
III.1.2. Cepas de <i>Marinomonas mediterranea</i> y otros microorganismos.	47
III.2. Plásmidos.	48
III.3. Medios de cultivo.	50
III.3.1. Medios para <i>Marinomonas</i> y otras bacterias marinas.	50
III.3.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> , <i>C. violaceum</i> y <i>C. crescentus</i>	53
III.4. Tampones utilizados.	54
III.4.1. Tampones para electroforesis de ADN. Geles de agarosa.	54
III.4.2. Tampones para electroforesis de proteínas. Geles de poliacrilamida SDS-PAGE.	55
III.4.3. Tampones para purificación de proteínas en resina Ni-NTA agarosa.	56
III.4.4. Otros tampones.	56
III.5. Obtención de la fracción celular y extracelular de cultivos de <i>M. mediterranea</i>.	57
III.5.1. Fracción extracelular (sobrenadante).	57
III.5.2. Fracción celular (extractos).	58
III.6. Precipitación etanólica de las aminoácido oxidasas.	58
III.7. Determinación de proteínas.	59
III.8. Diálisis.	59
III.9. Determinación de actividades aminoácido oxidasas.	60
III.9.1. Ensayos de actividad enzimática.	60
III.9.1.1. Determinación fluorimétrica de peróxido de hidrógeno.	60

III.9.1.2. Determinación colorimétrica de peróxido de hidrógeno.....	62
III.9.1.3. Determinación colorimétrica de la producción de amonio.	63
III.9.1.4. Definición de una Unidad de glicina oxidasa y comparación entre los diferentes métodos de medida.	64
III.9.2. Antibiógramas.	65
III.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	65
III.10.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie en geles SDS-PAGE.	67
III.10.2. Ensayos de actividad a partir de geles SDS-PAGE en el fluorímetro y mediante la realización de antibiógramas.	67
III.11. Concentración de GoxA.	68
III.12. Manipulación del ADN.....	68
III.12.1. Aislamiento de muestras de ADN.	68
III.12.2. Amplificación del ADN por PCR.	69
III.12.3. Tratamiento enzimático del ADN.....	71
III.12.4. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos.	72
III.12.5. Secuenciación del ADN.	73
III.12.6. Transformación de <i>E.coli</i> con ADN plasmídico.	73
III.12.7. Mutagénesis por transposición y conjugación en <i>M. mediterranea</i>	74
III.13. Deleción e inserción del operón <i>gox</i> en <i>M. mediterranea</i>.	75
III.14. Expresión heteróloga de proteínas en <i>E. coli</i>.	79
III.14.1. Construcción de plásmidos para la expresión recombinante de los operones <i>gox</i> , <i>ndgox</i> , <i>tsgox1</i> y <i>tsgox2</i>	79
III.14.2. Crecimiento e inducción de la expresión.	81
III.14.3. Aislamiento de fracciones celulares del sistema recombinante.	82
III.14.4. Purificación de proteínas recombinantes en matriz de afinidad por níquel.....	83
III.15. Obtención del ARN total y generación de cDNA.	84
III.16. Determinación mediante RT-PCR de la unidad transcripcional que contiene el operón <i>gox</i>.....	85
III.17. Localización del inicio de la transcripción del operón <i>gox</i> mediante la técnica 5'- RACE.	86
III.18. Fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i>.....	87
III.18.1. Construcción de plásmidos y cepas que contienen las fusiones con <i>lacZ</i>	87
III.18.2. Determinación de la actividad β -galactosidasa.	90
III.19. Espectrometría de masas (MS).	91
III.19.1. Digestión de proteínas para el análisis por MS.	91
III.19.2. Análisis por HPLC-MS/MS.	92
III.19.3. Análisis por ionización láser asistida por matriz (MALDI) presión atmosférica (AP).....	94
III.20. Herramientas y análisis bioinformáticos de secuencias.....	95
III.20.1. Herramientas bioinformáticas empleadas para el tratamiento de secuencias.	95
III.20.2. Detección de proteínas similares a GoxA/LodA y su análisis filogenético.	97
IV. Resultados 99	99
IV.1. Identificación y caracterización en <i>M. mediterranea</i> de una nueva glicina oxidasa. 101	101
IV.1.1. Identificación en el mutante LD de actividad antimicrobiana en presencia de glicina.....	102
IV.1.2. Caracterización de la glicina oxidasa de <i>M. mediterranea</i> en comparación con otras glicina oxidases descritas.	105
IV.1.2.1 Parámetros cinéticos.	106
IV.1.2.2. Especificidad de sustrato.	107
IV.1.2.3. Sensibilidad frente a inhibidores típicos de quinoproteínas.....	107
IV.1.3. Identificación del gen que codifica la proteína con actividad GOX.	109

IV.1.4. Determinación del operón <i>gox</i> e identificación del inicio de la transcripción.	110
IV.1.5. Estudio comparativo de la secuencia de GoxA y de GoxB.	114
IV.1.5.1. Análisis de secuencia de GoxA.	114
IV.1.5.2. Análisis del cofactor y modelo tridimensional de GoxA.	116
IV.1.5.3. Análisis de secuencia de GoxB.	117
IV.1.6. Comprobación de que el operón <i>gox</i> codifica la glicina oxidasa de <i>M. mediterranea</i>	119
IV.2. Expresión recombinante del operón <i>gox</i>.	121
IV.2.1. Detección de actividad glicina oxidasa en cultivos inducidos de <i>E. coli</i> Rosetta que expresan el operón <i>gox</i>	121
IV.2.2. Optimización de la expresión recombinante del operón <i>gox</i>	123
IV.2.2.1. Expresión del operón <i>gox</i> en <i>E. coli</i> CD03.	123
IV.2.2.2. Incubación de los extractos celulares a 25 °C.	125
IV.2.2.3. Inducción a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones de IPTG.	126
IV.2.3. Purificación de GoxA recombinante y tamaño aproximado de la forma activa.	129
IV.2.4. Análisis mediante espectrometría de masas de GoxA y GoxB recombinantes.	132
IV.2.5. Rango de sustratos y parámetros cinéticos de la GoxA recombinante.	134
IV.3. Regulación del operón <i>gox</i>.	137
IV.3.1. Expresión del operón <i>gox</i> en diferentes condiciones de cultivo.	137
IV.3.1.1. Efecto regulatorio de la glicina y de la L-lisina.	137
IV.3.1.1.1. Regulación transcripcional. Construcción de fusiones transcripcionales entre <i>Pgox</i> y el gen <i>lacZ</i>	138
IV.3.1.2. Posible relación de la glicina oxidasa con la fuente de nitrógeno en el medio.	142
IV.3.1.3. Regulación de la glicina oxidasa por L-tirosina.	146
IV.3.2. Regulación de la actividad glicina oxidasa por PpoS y PpoR.	151
IV.4. Descripción de una nueva familia de quinoproteínas similares a LodA.	153
IV.4.1. Identificación de genes similares a <i>lodA</i> y <i>goxA</i> en genomas microbianos.	154
IV.4.2. Análisis de las secuencias de las proteínas similares a LodA.	158
IV.4.3. Análisis filogenético de las proteínas similares a LodA.	160
IV.4.3.1. Grupo I.	162
IV.4.3.2. Grupo II.	164
IV.4.3.3. Grupo III.	167
IV.4.3.4. Grupo IV.	169
IV.4.3.5. Grupo V.	169
IV.4.4. Exploración de nuevas oxidasas pertenecientes a la familia LodA.	170
IV.4.4.1 Detección de actividad glicina oxidasa en microorganismos que codifican proteínas similares a LodA del grupo II.	170
IV.4.4.1.1. Detección de actividad glicina oxidasa en el sistema nativo.	171
IV.4.4.1.2. Expresión recombinante de NdGoxA, TsGox1A y TsGox2A en <i>E. coli</i>	174
IV.4.4.1.3. Intentos de detección de actividad en NdGoxA y TsGox1A.	175
IV.4.4.1.4. Optimización de la expresión de TsGox2A recombinante.	177
IV.4.4.1.5. Caracterización de la glicina oxidasa recombinante de <i>Thalassobaculum salexigens</i> , TsGox2A.	180
IV.4.4.1.5.1. Especificidad de sustrato y Km para TsGox2A recombinante.	180
IV.4.4.1.5.2. Sensibilidad de TsGox2A a inhibidores de quinoproteínas.	181
IV.4.4.1.5.3. Análisis de secuencia de TsGox2A. ..	182
IV.4.4.2. Análisis de actividad aminoácido oxidasa en otros microorganismos.	183
V. Discusión.	187
V.1. Identificación y caracterización de nuevas quinoproteínas con actividad glicina oxidasa.	191
V.1.1. Comparación de GoxA y TsGox2A con las flavoproteínas con actividad glicina oxidasa.	192
V.1.2. Análisis de GoxB.	196
V.1.3. Expresión recombinante del operón <i>gox</i>	198
V.2. Regulación del operón <i>gox</i>.	202

V.3. Posible función fisiológica de GoxA.	210
V.4. Descripción de una nueva familia de quinoproteínas con actividad aminoácido oxidasa.....	214
VI. Conclusiones	225
VII. Summary and Conclusions	231
VII.1. Background.	233
VII.2. Results and Discussion.	235
VII.2.1. Identification and characterization in <i>M. mediterranea</i> of a novel glycine oxidase.....	235
VII.2.2. Recombinant expression of the <i>gox</i> operon.....	237
VII.2.3. Regulation and physiological function of the <i>gox</i> operon.	239
VII.2.4. Description of a new family of quinoproteins similar to LodA	242
VII.3. Conclusions.	245
VIII. Bibliografía	249
IX. Apéndices.....	283

Índice de figuras

I. INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Reacción catalizada por las L-aminoácido oxidasas (LAOs) (EC 1.4.3.2).	4
Figura I.2. Estructura química de la riboflavina, flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD)	6
Figura I.3. Espectro de absorción UV-visible del FMN y ciclo catalítico típico de flavoproteínas.	7
Figura I.4. Típica topología del motivo de Rossmann	8
Figura I.5. Algunos organismos productores de LAOs.....	10
Figura I.6. Reacciones catalizadas por la glicina oxidasa de <i>B. subtilis</i> con los sustratos glicina, sarcosina, D-Ala y N-etil-glicina.	14
Figura I.7. Estructura química de los cofactores quinónicos conocidos	18
Figura I.8. Biosíntesis del cofactor TTQ.....	19
Figura I.9. Reacción catalizada por L-lisina épsilon-oxidasa (LodA) (EC 1.4.3.20)	21
Figura I.10. Esquema propuesto para la expresión de la actividad LOD en <i>M. mediterranea</i>	23
Figura I.11. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de biopelículas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R y del mutante SB1 afectado en LodA.....	24
Figura I.12. Mapa de densidad electrónica del cofactor CTQ en LodA formado por los residuos Cys-516 y Trp-581 y espectro de absorción de LodA pura en el rango de cofactor quinónico	25
Figura I.13. Modelo de formación del cofactor CTQ en LodA de <i>M. mediterranea</i>	25
Figura I.14. Superposición de residuos en el entorno del centro activo de LodA con otras proteínas que poseen cofactores quinónicos derivados del Trp	26
Figura I.15. Micrografías electrónicas de diferentes especies pertenecientes al género <i>Marinomonas</i> ..	30
Figura I.16. Fotografías de <i>M. mediterranea</i>	33
Figura I.17. Micrografías electrónicas de <i>M. mediterranea</i> mostrando los cuerpos R	34
Figura I.18. Esquema de las reacciones típicas catalizadas por lacasas y tirosinasas	35

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1. Reacción acoplada de oxidación del Amplex Red por la peroxidasa de rábano (HRP) en presencia del peróxido de hidrógeno generado por la actividad GOX	61
Figura III.2. Reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa para determinar la producción de amonio generado por la actividad GOX	63
Figura III.3. Esquema del proceso para la obtención de la cepa con la delección en el operón <i>gox</i>	77
Figura III.4. Esquema del plásmido pBGXAB.....	78

Figura III.5. Esquema de los plásmidos empleados para la expresión heteróloga de la glicina oxidasa de <i>M. mediterranea</i>	80
Figura III.6. Esquema de los plásmidos pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211	81
Figura III.7. Esquema seguido para determinar inicio de la transcripción del operón <i>gox</i> mediante la técnica 5'-RACE	87
Figura III.8. Esquema de los plásmidos pBPGOX1 y pBPGOX2	88
Figura III.9. Actividad β -galactosidasa de las cepas de MMB-1R conteniendo las fusiones del promotor <i>gox</i> y el gen <i>lacZ</i> a las 16 h de cultivo en medio MMC	89
Figura III.10. Actividad β -galactosidasa de las cepas T102 y T103 que contienen la fusión <i>Pgox1</i> con el gen <i>lacZ</i> a las 16 h de cultivo en medio MMC	90

IV. RESULTADOS

Figura IV.1. Mapa genómico de <i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	102
Figura IV.2. Actividad antimicrobiana y oxidasa en los sobrenadantes de la cepa LD	103
Figura IV.3. Reacción catalizada por las glicina oxidasas de <i>B. subtilis</i> y <i>G. kaustophilus</i>	104
Figura IV.4. Cálculo de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de la Gox de <i>M. mediterranea</i> en el sistema nativo	106
Figura IV.5. Sensibilidad de la Gox de <i>M. mediterranea</i> frente a inhibidores de quinoproteínas	108
Figura IV.6. Identificación de Marme_1655 como el gen que codifica la Gox en <i>M. mediterranea</i>	110
Figura IV.7. Determinación de la unidad transcripcional que contiene Marme_1655	112
Figura IV.8. Extremo 5' y zona promotora del operón <i>gox</i> analizada por la técnica 5'-RACE	114
Figura IV.9. Secuencia peptídica de GoxA destacando los residuos y regiones conservadas propuestas para las proteínas similares a LodA, los residuos conservados implicados en la generación del cofactor CTQ y el péptido señal de las Twin-Argininas	115
Figura IV.10. Comparación entre las secuencias peptídicas de LodA y GoxA que intervienen en la formación del cofactor CTQ y modelo tridimensional de GoxA	117
Figura IV.11. Análisis de secuencia de GoxB	118
Figura IV.12. Actividad GOX en los sobrenadantes de las cepas LD, LGD y LGDAB	120
Figura IV.13. Expresión heteróloga del pETGOXAB11 en <i>E. coli</i> Rosetta	123
Figura IV.14. Medidas de actividad y SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes de la fracción soluble de las cepas de <i>E. coli</i> CD03(pRARE) y Rosetta, que fueron transformadas con el plásmido pETGOXAB11, y con el pETLODAB11 y pET11 como controles	124
Figura IV.15. Incremento de la actividad GOX al incubar los extractos celulares a 25 °C	126
Figura IV.16. Expresión heteróloga del pETGOXAB11 en <i>E. coli</i> CD03(pRARE) a diferentes tiempos de inducción y distintas concentraciones de IPTG	127
Figura IV.17. Expresión recombinante del pETGOXAB11 en <i>E. coli</i> CD03(pRARE) a diferentes temperaturas y tiempos de inducción	128

Figura IV.18. Purificación de GoxA recombinante con resina Ni-NTA	130
Figura IV.19. Localización de la actividad GOX expresada recombinantemente en geles SDS-PAGE	131
Figura IV.20. Cálculo de los parámetros cinéticos (Vmax y Km) de GoxA recombinante	135
Figura IV.21. Actividad GOX en los sobrenadantes de la cepa <i>M. mediterranea</i> LD a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNG, MNGL y MNGG	138
Figura IV.22. Secuencia de las dos versiones del promotor <i>gox</i> utilizadas para construir fusiones transcripcionales.....	139
Figura IV.23. Actividad β -galactosidasa durante la curva de crecimiento de las cepas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1LACG1 y MMB-1RLACG2 cultivadas en medio MNGL.....	140
Figura IV.24. Actividad β -galactosidasa durante la curva de crecimiento de la cepa MMB-1LACG1 cultivada en los medios MNG y MNGL	141
Figura IV.25. Actividad β -galactosidasa durante la curva de crecimiento de las cepas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1LACG1 y MMB-1RLACL1 cultivadas en medio MNGL.....	141
Figura IV.26. Actividad GOX y LOD en los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH ₄ , MNB+Glu (MNG), MNB+Lys y MNB+Gly	143
Figura IV.27. Actividad GOX y LOD normalizada por mg de proteína en los extractos de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R al principio y al final de la fase exponencial en los medios MNB+NH ₄ , MNB+Glu (MNG), MNB+Lys y MNB+Gly	144
Figura IV.28. Proteínas secretadas a los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH ₄ , MNB+Glu (MNG), MNB+Lys y MNB+Gly.....	144
Figura IV.29. Actividad GOX y LOD normalizada por mg de proteína en los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH ₄ , MNB+Glu (MNG), MNB+Lys y MNB+Gly	145
Figura IV.30. Crecimiento en los medios MNB+Gly y MGly de la cepa silvestre de <i>M. mediterranea</i> y del mutante con la delección en la glicina oxidasa	146
Figura IV.31. Actividad GOX en los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento cultivada en los medios 2216, MMC y MNG.....	147
Figura IV.32. Actividad GOX y LOD en los sobrenadantes de la cepas MMB-1R y PPOBDEL al inicio de la fase estacionaria de crecimiento en los medios MNGL y MNGLT	148
Figura IV.33. Región promotora del operón <i>gox</i> y <i>lod</i> indicando las posibles cajas TyrR.....	149
Figura IV.34. Actividad GOX en los sobrenadantes y actividad β -galactosidasa durante la curva de crecimiento de <i>M. mediterranea</i> MMB-1RLACG1 en los medios MNGL y MNGLT	150
Figura IV.35. Actividad β -galactosidasa de las cepas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1RLACG1 y MMB-1RLACL1 en los medios MNGL y MNGLT al principio de la fase estacionaria y en fase estacionaria tardía.....	150
Figura IV.36. Actividad GOX en los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R, T102 y T103 al inicio de la fase estacionaria de crecimiento en medio MNGL.	151

Figura IV.37. Actividad β -galactosidasa en medio MNGL durante las curvas de crecimiento de las cepas de <i>M. mediterranea</i> MMB-1RLACG1, T102LACG1 y T103LACG1.....	152
Figura IV.38. Análisis de secuencia de las proteínas similares a LodA señalando los residuos y dominios conservados en la secuencia peptídica de GoxA.	158
Figura IV.39. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA	161
Figura IV.40. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el subgrupo IA	163
Figura IV.41. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en los subgrupos IB, IC y ID	164
Figura IV.42. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo II	165
Figura IV.43. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo III	168
Figura IV.44. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo IV	169
Figura IV.45. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo V	170
Figura IV.46. Actividad GOX al inicio de la fase estacionaria en los sobrenadantes de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R, <i>N. denitrificans</i> y <i>T. salexigens</i> , cultivadas en medio 2216.....	172
Figura IV.47. Actividad GOX de <i>M. mediterranea</i> MMB-1R, <i>N. denitrificans</i> y <i>T. salexigens</i> cultivadas en los medios 2216 y Glc+YE en los sobrenadantes y extractos celulares al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.....	173
Figura IV.48. Extremo N-terminal de las proteínas GoxA, NdGoxA, TsGox1A y TsGox2A mostrando el péptido señal de las Twin-Argininas.	173
Figura IV.49. Expresión heteróloga de los plásmidos pETGOXAB11, pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211 en <i>E. coli</i> CD03.....	175
Figura IV.50. Actividad GOX medida a diferentes tiempos tras la preparación de los extractos celulares, en la expresión recombinante de <i>E. coli</i> CD03 transformada con los plásmidos pETGOXAB11 y pETTSGOX211 y con plásmidos que codifican chaperonas.....	178
Figura IV.51. SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes de los extractos de <i>E. coli</i> CD03 transformada con los plásmidos pETGOXAB11, pETTSGOX211 y pET11	179
Figura IV.52. Cálculo de los parámetros cinéticos de la glicina oxidasa de <i>T. salexigens</i> (TsGox2A) expresada recombinantemente.....	180
Figura IV.53. Sensibilidad de TsGox2A recombinante frente a inhibidores típicos de quinoproteínas a diferentes tiempos de incubación	182
Figura IV.54. Alineamiento de secuencia alrededor de los residuos implicados en la generación del cofactor CTQ en GoxA y TsGox2A, y modelo tridimensional de TsGox2A.....	183

V. DISCUSIÓN

Figura V.1. Comparación de los promotores <i>Pgox</i> , <i>Plod</i> , <i>PppoA</i> y <i>PppoB</i> de <i>M. mediterranea</i>	203
Figura V.2. Alineamiento de las regiones promotoras de los operones <i>gox</i> y <i>lod</i> mostrando las secuencias comunes entre ambos.	207
Figura V.3. Relación filogenética de las enzimas descritas con actividad aminoácido oxidasa	222

IX. APÉNDICES

Apéndice A.1. Tabla de L-aminoácido oxidasas (LAOs) de origen microbiano	285
Apéndice A.2. Actividad, expresada como % de actividad relativa respecto a la actividad sobre Gly, frente a los diferentes sustratos que se indican en el sobrenadante de la cepa LD de <i>M. mediterranea</i> , y en las proteínas GoxA y TsGox2A expresadas recombinantemente en <i>E. coli</i>	291
Apéndice A.3. Genes de la familia <i>lodA</i> depositados en la base de datos del IMG con fecha de Enero de 2014.	292
Apéndice A.4. Condiciones de cultivo ensayadas para el crecimiento de <i>N. denitrificans</i> y <i>T. salexigens</i>	299
Apéndice A.5. Tabla de L-aminoácido oxidasas características de organismos superiores.....	300
Apéndice A.6. Tabla de proteínas representativas con actividad D-aminoácido oxidasa (DAO).....	301
Apéndice A.7. Relación filogenética de las proteínas representativas de la familia LodA, D-aminoácido oxidasas y L-aspartato oxidasas (LASPOs).....	302
Apéndice A.8. Relación filogenética de L-aminoácido oxidasas representativas de vertebrados, gasterópodos y hongos.....	303

Índice de tablas:

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III.1. Cepas bacterianas empleadas en este estudio	45
Tabla III.2. Plásmidos utilizados en este trabajo	49
Tabla III.3. Cebadores empleados en esta memoria	70

IV. RESULTADOS

Tabla IV.1. Comparación de la Vmax relativa de distintas Gox frente a diferentes sustratos	107
Tabla IV.2. Análisis por MALDI-TOF de muestras de la glicina oxidasa recombinante purificada	133
Tabla IV.3. Parámetros cinéticos sobre la glicina de la Gox de <i>M. mediterranea</i> y de diferentes especies del género <i>Bacillus</i> expresadas recombinantemente	136
Tabla IV.4. Distribución de los genes similares a <i>lodA</i> en genomas bacterianos depositados en la base de datos del IMG en Enero de 2014	156
Tabla IV.5. Genomas microbianos con más de una copia de genes similares a <i>lodA</i> depositados en la base de datos del IMG en Enero de 2014	157
Tabla IV.6. Producto de los genes similares a <i>lodA</i> que muestran otros dominios Pfam conservados, aparte de los característicos de las proteínas de la familia LodA	159
Tabla IV.7. Porcentaje de GC de los genes que codifican proteínas pertenecientes al grupo II de la familia de proteínas similares a LodA en comparación con el porcentaje en GC de los genomas de los microorganismos que expresan dichas proteínas	166
Tabla IV.8. Condiciones ensayadas para la expresión recombinante de los plásmidos pETNDGOX11 y pETTSGOX111 en varias cepas de <i>E. coli</i>	176
Tabla IV.9. Comparación de la Vmax relativa de distintas glicinas oxidasas expresadas recombinantemente en <i>E. coli</i> frente a diferentes sustratos	181
Tabla IV.10. Actividad aminoácido oxidasa presente en diversos microorganismos que contienen proteínas similares a LodA en diferentes grupos filogenéticos	185

V. DISCUSIÓN

Tabla V.1. Análisis de las secuencias promotoras <i>Pgox</i> , <i>Plod</i> , <i>PppoA</i> y <i>PppoB</i> en comparación con el consenso de promotores del factor σ^{70} de <i>E. coli</i>	204

I. Introducción

I.1. Aminoácido oxidasas (AOs).

El metabolismo de aminoácidos es importante en la fisiología celular y hay diversos tipos de enzimas capaces de actuar sobre ellos. De forma genérica, las aminoácido oxidasas (AOs) son enzimas que oxidan aminoácidos generando amonio y peróxido de hidrógeno. Dentro de estas enzimas se distinguen varios grupos, algunos de los cuales se discutirán más adelante. El grupo más conocido es el de las L-aminoácido oxidasas (LAOs). Algunas LAOs son capaces de oxidar ciertos D-aminoácidos, aunque con una baja eficacia si los comparamos con sus respectivos L-aminoácidos que utilizan como sustratos. Este es el caso de la LAO de amplio espectro de *Bacillus carotarum* 2Pfa (Brearley *et al.*, 1994).

Por otro lado, las D-aminoácido oxidasas (DAOs o DAAOs; EC 1.4.3.3) no actúan sobre L-aminoácidos, sino que catalizan estereoespecíficamente la desaminación oxidativa de D-aminoácidos, produciendo el α -cetoácido correspondiente, amonio y H_2O_2 (Pollegioni *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2015; Umhau *et al.*, 2000). Las DAOs son importantes en la industria farmacéutica, como la DAO sintetizada por el hongo *Rhodotorula gracilis* (Khang *et al.*, 2003), en biomedicina (Errico *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015), en alimentación (Wcislo *et al.*, 2007), etc. Estas aplicaciones han estimulado la producción de una gran variedad de DAOs expresadas de forma recombinante (Pollegioni y Molla, 2011). Tanto LAOs como DAOs son flavoproteínas. Con anterioridad a este trabajo, la única aminoácido oxidasa descrita que no era una flavoproteína era la L-lisina ϵ -oxidasa de *Marinomonas mediterranea*, que posee cofactor quinónico como se describirá más adelante (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013).

Se han descrito otras enzimas, como las L-aminoácido desaminasas que, no siendo estrictamente AOs, catalizan reacciones parecidas. Se diferencian principalmente en que no generan peróxido de hidrógeno, ya que no utilizan oxígeno como aceptor final de electrones, sino otros compuestos (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013). Ejemplo de desaminasas son la de *Proteus myxofaciens*, que es de amplio espectro

(Pantaleone *et al.*, 2001), o las proteínas de membrana asociadas a la cadena de transporte electrónico de *Proteus rettgeri* (Duerre y Chakrabarty, 1975) y de *Proteus mirabilis* (Pelmont *et al.*, 1972).

I.1.1. Características generales de las L-aminoácido oxidasas (LAOs).

Las L-aminoácido oxidasas (LAOs o LAAOs; EC 1.4.3.2) catalizan la desaminación oxidativa de L-aminoácidos produciendo el α -cetoácido correspondiente, amonio y peróxido de hidrógeno (fig. I.1) (Macheroux *et al.*, 2011; Pollegioni *et al.*, 2013). El peróxido de hidrógeno generado proporciona a estas enzimas cierta capacidad antimicrobiana (Skarnes, 1970). Estas enzimas unen, de forma no covalente, flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor (fig. I.1). En el apartado I.1.1.1 se describirá de forma detallada este tipo de cofactor.

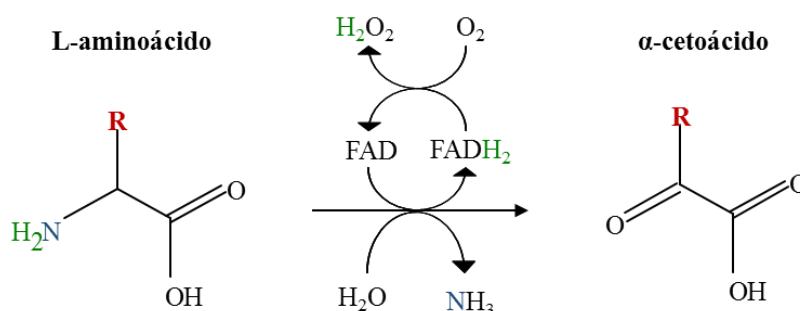


Figura I.1. Reacción catalizada por las L-aminoácido oxidasas (LAOs) (EC 1.4.3.2).

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). Poseen principalmente una conformación dimérica (Hossain *et al.*, 2014), aunque también se han descrito LAOs monoméricas (Yang *et al.*, 2012), triméricas (Sakuraba *et al.*, 2002), tetraméricas (Nishiya e Imanaka, 1998) y hexaméricas (Arima *et al.*, 2003). El estudio de las LAOs ha suscitado un gran interés para la comunidad científica debido a su implicación en importantes procesos biológicos como el metabolismo de aminoácidos y la producción de cetoácidos, así como por sus propiedades antitumorales y antimicrobianas que están asociadas a la

producción de peróxido de hidrógeno (Ehara *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013; Singh, 2014).

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la escala evolutiva, desde microorganismos hasta organismos superiores. En los siguientes apartados repasaremos las propiedades generales de las flavinas, así como la distribución y las posibles funciones biológicas atribuidas a las LAOs.

I.1.1.1. Las flavinas.

Su nombre viene del latín “flavus” (amarillo), ya que en su forma oxidada estos compuestos son amarillos, mientras que en su forma reducida son incoloros. Las flavinas son compuestos heterocíclicos derivados del compuesto 7,8-dimetil-isoaloxacina (Macheroux *et al.*, 2011). El anillo les otorga propiedades redox pudiendo transferir y aceptar electrones y/o protones, lo que permite que las flavoproteínas intervengan en numerosas reacciones de oxidación-reducción. Según las sustituciones en el nitrógeno de la posición 10 del anillo de isoaloxacina podemos distinguir la riboflavina (vitamina B2), el flavín mononucleótido (FMN) y el flavín adenín dinucleótido (FAD) (fig. I.2). FMN y FAD son los cofactores típicos presentes en las flavoproteínas y, aunque ambos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, el FAD es el más abundante (Macheroux *et al.*, 2011).

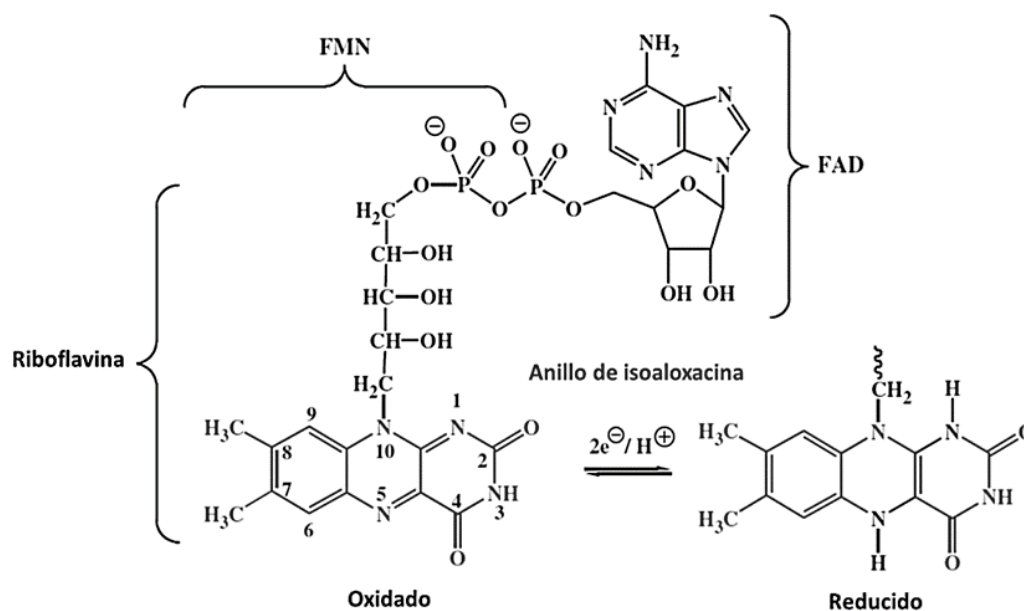


Figura I.2. Estructura química de la riboflavina, flavín mononucleótido (FMN) y flavín adenín dinucleótido (FAD). Se muestra el anillo de isoaloxacina en su estado oxidado (izquierda) y en su estado reducido por dos electrones (derecha). La numeración del anillo de isoaloxacina se indica en la estructura oxidada de la izquierda. Adaptado de (Macheroux et al., 2011).

La distinta distribución electrónica en el anillo de isoaloxacina hace que el espectro de absorción sea diferente para los distintos estados de oxidación de la flavina: el espectro de las flavinas oxidadas presenta dos máximos de absorción a longitudes de onda en torno a 370 y 450 nm, mientras que la flavina en su forma reducida por dos electrones, hidroquinona, pierde los dos picos de absorbancia del espectro UV visible causando el blanqueamiento del cromóforo (fig. I.3A). De hecho, las flavinas pueden adquirir los electrones de forma secuencial, por lo que el anillo de isoaloxacina puede encontrarse en tres estados redox diferentes que determinarán distintos espectros de absorción: la forma totalmente oxidada o quinona, la forma reducida por un único electrón o semiquinona (que puede estar protonada o no), y la forma reducida por dos electrones o hidroquinona (Müller, 1991). Los cambios observados en el espectro de absorción pueden proporcionar información sobre el mecanismo de reacción enzimática y el entorno proteico (Chapman y Reid, 1999).

Se pueden distinguir dos semirreacciones en el ciclo catalítico en el que intervienen las flavinas. La primera es una semirreacción de reducción, donde el sustrato orgánico es oxidado por la transferencia de electrones a la flavina que da como resultado la flavina

totalmente reducida (hidroquinona) (Fraaije y Mattevi, 2000). La segunda semirreacción es de oxidación y consiste en la regeneración del cofactor en forma oxidada, lo que permite volver a iniciar el ciclo (fig. I.3B). En este proceso se utiliza un aceptor de electrones. En el caso de que sea oxígeno, como ocurre con las oxidasas, se produce peróxido de hidrógeno (Weber y Schleicher, 2014).

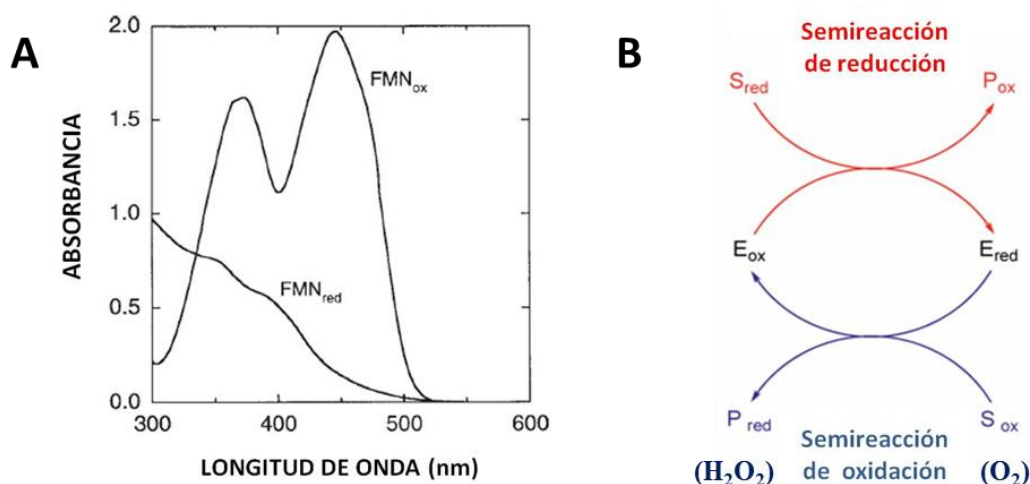


Figura I.3. **A**, espectro de absorción UV-visible del FMN en su forma oxidada y reducida. La reducción de la flavina por dos electrones provoca la pérdida de los picos de absorbancia típicos de flavinas. **B**, ciclo catalítico típico de flavoproteínas. S, sustrato; P, producto; E, enzima; red, reducido; ox, oxidado.

Las flavinas intervienen en un amplio rango de procesos fisiológicos tales como el metabolismo energético y secundario, la biosíntesis de metabolitos y antibióticos, fenómenos de señalización y fotorrecepción, etc. Desde un punto de vista biotecnológico, las enzimas que usan flavinas como cofactor pueden utilizarse como biosensores, en bioconversiones y en otros campos de aplicación (Chaiyen y Scrutton, 2015; Kara *et al.*, 2014).

I.1.1.2. Motivos de unión a flavinas.

Se han descrito varios motivos estructurales conservados en flavoproteínas con capacidad de unir nucleótidos. El mejor estudiado es el motivo de Rossmann, típicamente localizado en el extremo N-terminal de la flavoproteína. El motivo de Rossmann consiste en una estructura secundaria simétrica básica que contiene 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.4). El motivo de Rossmann posee una secuencia consenso $xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)_8hxhE(D)$ (donde x es cualquier residuo y h es un residuo hidrofóbico), de unión a fosfato conocida como motivo de unión a dinucleótidos (DBM, “Dinucleotide Binding Motif”) (Vallon, 2000). La disposición de los residuos conservados de glicina es importante en el desarrollo de la estructura terciaria de la proteína (Wierenga *et al.*, 1986).

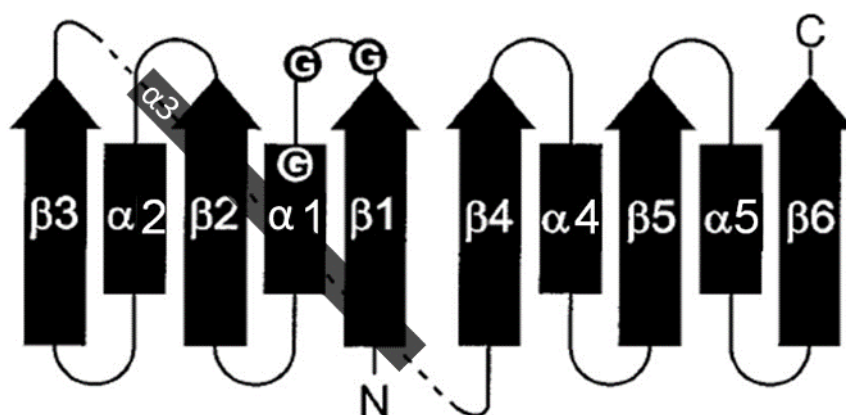


Figura I.4. Típica topología del motivo de Rossmann. Los rectángulos corresponden a las hélices α y las flechas a las láminas β . Los círculos representan los residuos de glicina conservados del motivo de unión a dinucleótidos (DBM). Adaptado de (Bottoms *et al.*, 2002).

Además del motivo de Rossmann, en flavoproteínas se pueden encontrar otros motivos conservados que participan en la unión del cofactor. Por ejemplo, en la cuarta hoja β a veces se puede encontrar la secuencia $oohhhATG$ (donde o es un residuo con carga y h es un residuo hidrofóbico), denominada motivo ATG, que es importante para la interacción con dinucleótidos (Vallon, 2000). Otro ejemplo sería el motivo GD que presenta la secuencia consenso $T(S)(X)_5F(Y)hhGD$ (Eggink *et al.*, 1990). Un motivo adicional 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). En flavoproteínas que poseen dos dominios de unión a nucleótidos se puede encontrar, tras el primer DBM, el motivo estructural GG ($RxGGxx(S/T)$), 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 (Ojha *et al.*, 2007; Vallon, 2000). No obstante, hay que tener en cuenta que no todas las flavoproteínas poseen todos los motivos conservados aquí descritos.

Respecto a su clasificación, las flavoproteínas constituyen un grupo amplio de proteínas con diversas actividades enzimáticas, en donde aproximadamente el 90 % de ellas son oxidorreductasas (incluyendo monooxigenasas, hidroxilasas y oxidasas), el 4,3 % son transferasas, y el resto incluye liasas, isomerasas y ligasas. Además de organizarse por la actividad enzimática que desempeñan, las flavoproteínas se pueden clasificar atendiendo a los motivos conservados que presentan (Dym y 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 (Dijkman *et al.*, 2013).

I.1.1.3. LAOs de organismos superiores.

La primera LAO descrita se detectó en el veneno de la víbora áspid (Zeller y Martiz, 1944). De hecho, las LAOs mejor estudiadas son las presentes en el veneno de serpientes, a las que se les atribuyen propiedades antiprotozoarias, bactericidas, antivirales y proapoptóticas (Zuliani *et al.*, 2009). Estas enzimas oxidan preferentemente aminoácidos hidrofóbicos como la L-leucina, L-fenilalanina, L-triptófano y L-tirosina (Du y Clemetson, 2002; Guo *et al.*, 2012; Mandal y Bhattacharyya, 2008). Además de en serpientes, también se han descrito LAOs en animales de diversos grupos (fig. I.5). En algunos insectos se han descrito LAOs con actividad citotóxica y antitumoral (Ahn *et al.*, 2000). Algunos moluscos marinos como las liebres de mar *Aplysia californica* y *Aplysia punctata* sintetizan LAOs que cumplen una función defensiva frente a depredadores. En estos animales, el sustrato y la enzima se encuentran en diferentes glándulas para evitar la autotoxicidad, siendo ambos componentes secretados al medio ante el ataque de un depredador, causando la huida del atacante (Butzke *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2005). En

otros moluscos, como el caracol gigante *Achatina fulica*, la actividad LAO descrita tiene una función antimicrobiana (Ehara *et al.*, 2002).

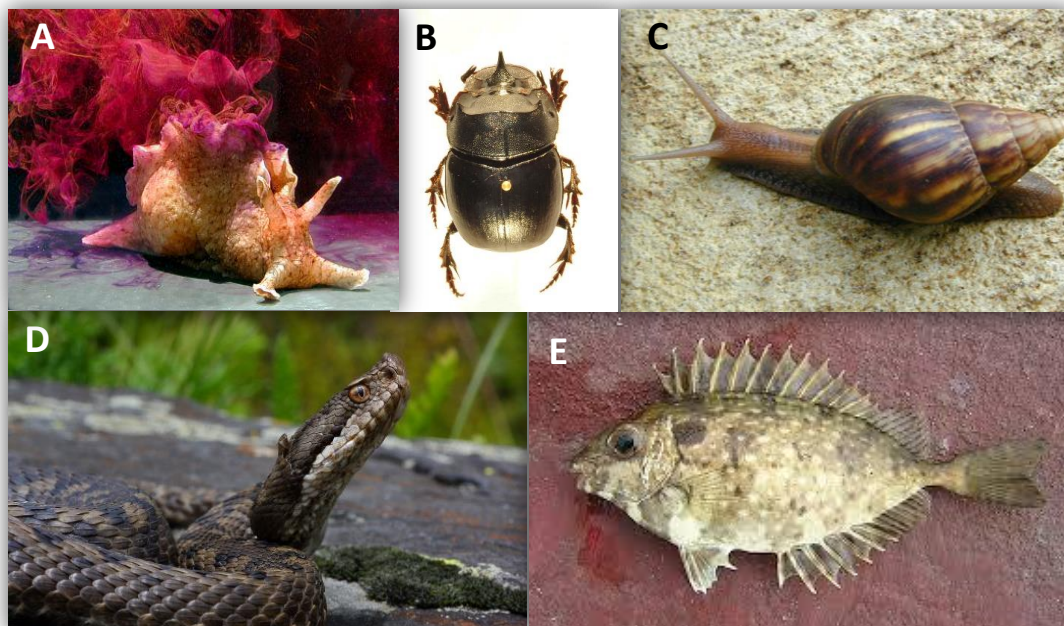


Figura 1.5. Algunos organismos productores de LAOs, como la liebre de mar *Aplysia californica* (A), el coleóptero *Catharsius molossus* (B), el caracol gigante *Achatina fulica* (C), la víbora áspid (*Vipera aspis*) (D) y el pez *Siganus oramin* (E).

En varios peces como *Myoxocephalus polyacanthocephalus* (Nagashima *et al.*, 2009), *Sebastes schlegeli* (Kitani *et al.*, 2007), *Siganus oramin* (Li y Li, 2014), *Platichthys stellatus* (platija estrellada) (Kasai *et al.*, 2015a) y *Gadus morhua* (bacalao común) (Kitani *et al.*, 2015), también se han descrito LAOs con actividad antimicrobiana relacionadas con la inmunidad innata de peces. Las LAOs también están presentes en macrófagos y células dendríticas de mamíferos donde podrían actuar en la respuesta inmune adaptativa (Puiffe *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descrito una LAO presente en esperma equino, y en esperma humano (IL4I1), que juegan un papel importante en la regulación del estado redox del esperma (Aitken *et al.*, 2015; Houston *et al.*, 2015).

I.1.1.4. LAOs de origen microbiano.

Las LAOs también son sintetizadas por numerosos microorganismos incluyendo bacterias, algas y hongos. Podemos distinguirlas según su especificidad de sustrato, masa molecular, localización celular e incluso por la función biológica que desempeñan en el microorganismo (apéndice A.1) (Hossain *et al.*, 2014). Esta gran diversidad sugiere que las LAOs poseen diferentes orígenes o bien han sufrido un amplio proceso evolutivo a partir de una supuesta proteína ancestral.

Respecto a su especificidad de sustrato, las LAOs pueden ser de amplio rango o más específicas (apéndice A.1). LAOs de amplio espectro han sido descritas en diversos microorganismos. La primera LAO microbiana purificada y caracterizada fue la sintetizada por *Bacillus carotarum* (Brearley *et al.*, 1994). La de *Rhodococcus opacus* DSM 43250 fue la primera LAO procariota expresada de forma recombinante (Geueke y Hummel, 2003; Geueke *et al.*, 2002). En la bacteria marina *Pseudoalteromonas luteoviolacea* también fue descrita una LAO de amplio espectro (Gómez *et al.*, 2008). Por otro lado, también se han descrito diversas LAOs que muestran un cierto grado de especificidad para un aminoácido concreto, como es el caso de la L-glutamato oxidasa de *Streptomyces endus* y *Streptomyces* sp. X-119-6 (Arima *et al.*, 2003; Bohmer *et al.*, 1989) y la L-lisina oxidasa de *Trichoderma viride* Y244-2 (Amano *et al.*, 2015; Kusakabe *et al.*, 1980; Lukasheva y Berezov, 2002).

Respecto a su localización celular, las LAOs de procariotas pueden localizarse intracelularmente, como la LAO producida por *Pseudomonas putida* (Hossain *et al.*, 2014), en el espacio periplásmico como la LAO descrita en *Synechococcus elongatus* (Gau *et al.*, 2007), asociadas a membrana como la sintetizada por *Neisseria meningitidis* (Yu y DeVoe, 1981), o secretadas al exterior como las de *Cellulomonas cellulans* AM8 (Braun *et al.*, 1992) y la de *Streptomyces* sp. X-119-6 (Kusakabe *et al.*, 1983). En general, las LAOs extracelulares de origen bacteriano son sintetizadas como proenzimas con péptido señal, que sufren modificaciones post-traduccionales como la proteólisis parcial para generar la enzima activa (Arima *et al.*, 2009; Ida *et al.*, 2008;

Sukhacheva y Zhuravleva, 2004). Esta activación proteolítica se produce durante la secreción de la enzima, con el fin de evitar la depleción de aminoácidos y la producción de H_2O_2 en el citoplasma que podría ser letal para la célula (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013).

Se han atribuido diversas funciones biológicas para las LAOs de origen bacteriano. Una de las principales es, sin duda, su papel antimicrobiano descrito en diversas bacterias marinas como *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Gómez *et al.*, 2008), *Pseudoalteromonas flavipulchra* C2 (Chen *et al.*, 2010a), *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1 (Yu *et al.*, 2012), *Rheinheimera aquatica* GR5 (Chen *et al.*, 2010b) y *Aquimarina* sp. antisso-27 (Chen *et al.*, 2011). Curiosamente, en ninguna de estas LAOs se ha demostrado la presencia de FAD como cofactor (apéndice A.1). Como se discutirá más adelante en el apartado I.1.2.2, se ha demostrado que la L-lisina ϵ -oxidasa con cofactor quinónico descrita en *M. mediterranea*, y la LAO de *Pseudoalteromonas tunicata* con la que guarda una gran similitud, ejercen un efecto antimicrobiano participando en la diferenciación de biopelículas microbianas (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Por otro lado, la LAO sintetizada por la bacteria cariogénica *Streptococcus oligofermentans*, recientemente reclasificada como una aminoacetona oxidasa (Molla *et al.*, 2014), parece ejercer un efecto citotóxico para poblaciones microbianas competidoras, debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Tong *et al.*, 2008). Sin embargo, posteriormente se ha propuesto que en el microorganismo productor, la actividad LAO cumple un papel protector frente al estrés oxidativo, ya que parece reducir las especies ROS in vivo (Zhou *et al.*, 2012).

Algunas LAOs intervienen en rutas del metabolismo secundario. Por ejemplo, la L-triptófano oxidasa de *Chromobacterium violaceum* está implicada en la biosíntesis de violaceína, pigmento al que se le atribuye actividad bactericida y antitumoral (Balibar y Walsh, 2006). Las L-triptófano oxidasas de *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243 y *Streptomyces* sp. TP-A0274 participan, respectivamente, en la biosíntesis de los antibióticos rebecamicina y estaurosporina (Kameya *et al.*, 2013; Nishizawa *et al.*, 2005). Por otra parte, las L-aspartato oxidasas descritas en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* etc., intervienen en la biosíntesis de la nicotinamida adenina

dinucleótido (NAD⁺) (Bossi *et al.*, 2002; Leese *et al.*, 2012; Marinoni *et al.*, 2008). Por último, la LAO presente en la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (previamente conocida como *Anacystis nidulans*) parece intervenir en la fotosíntesis, ya que está implicada en la transferencia de electrones en la membrana del tilacoide formando parte del fotosistema II (Pistorius y Voss, 1982).

En microorganismos eucariotas también se han descrito diversas LAOs, en donde su principal función fisiológica, la utilización de los aminoácidos como fuente de nitrógeno, parece estar relacionada con el amplio rango de sustratos que presentan dichas enzimas. Tal es el caso de la LAO secretada al medio descrita en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Vallon *et al.*, 1993). En los géneros *Pleurochrysis*, *Prymnesium* y *Amphidinium*, que forman parte del fitoplancton marino, también se han descrito LAOs en la superficie celular que les permiten utilizar gran variedad de aminoácidos libres como fuente de nitrógeno (Palenik y Morel, 1990). En algunos hongos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*, también se han descrito LAOS que intervienen en el catabolismo de aminoácidos y que se inducen bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Davis *et al.*, 2005; Sikora y Marzluf, 1982). Las LAOs presentes en los hongos *Laccaria bicolor* y *Hebeloma* sp. también intervienen en el catabolismo de aminoácidos y parecen cumplir una función ecológica participando en la mineralización del nitrógeno (Nuutinen y Timoneni, 2008). Otra LAO de amplio espectro, la sintetizada por *Aspergillus fumigatus*, presenta su V_{max} frente al sustrato L-tirosina (Singh *et al.*, 2009).

No todas las LAOs descritas en hongos cumplen una función metabólica y son de amplio rango de sustratos. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* produce una LAO específica de L-lisina (Akyilmaz *et al.*, 2007). Otra LAO altamente específica para la L-Lys es la L-lisina α -oxidasa de *Trichoderma viride* (LysOx). Recientemente se ha publicado su estructura cristalina, poniendo de manifiesto que LysOx guarda, de forma general, una gran similitud estructural con las LAOs descritas en el veneno de serpientes, aunque algunos residuos del canal de entrada al centro activo y otros residuos implicados en el reconocimiento del sustrato sean diferentes (Amano *et al.*, 2015). Más recientemente, se ha descrito en el hongo *Trichoderma harzianum* ETS

323, que es utilizado como agente de biocontrol, una LAO extracelular que muestra actividad antimicrobiana debido a la permeabilización de membranas y a la producción de especies ROS (Yang *et al.*, 2011a).

I.1.1.5. Glicina oxidasas.

La actividad glicina oxidasas (EC 1.4.3.19) supone la desaminación oxidativa de la glicina para generar glioxilato, amonio y peróxido de hidrógeno (fig. I.6). La proteína que cataliza dicha reacción, denominada glicina oxidasas (Gox) (número de acceso BSU11670), fue descrita por primera vez en *Bacillus subtilis* donde está codificada por el gen *yjbr* (*thiO*) (Nishiya e Imanaka, 1998). Se trata de una flavoproteína y en concordancia con esto, presenta en su extremo N-terminal la secuencia conservada GXGXXG típica del motivo de Rossmann de unión a FAD. Además de glicina, esta enzima es capaz de oxidar otras aminas de bajo peso molecular (sarcosina, N-etil-glicina, glicina-etil-éster), así como varios D-aminoácidos (D-Ala y D-Pro principalmente) (fig. I.6) (Job *et al.*, 2002a).

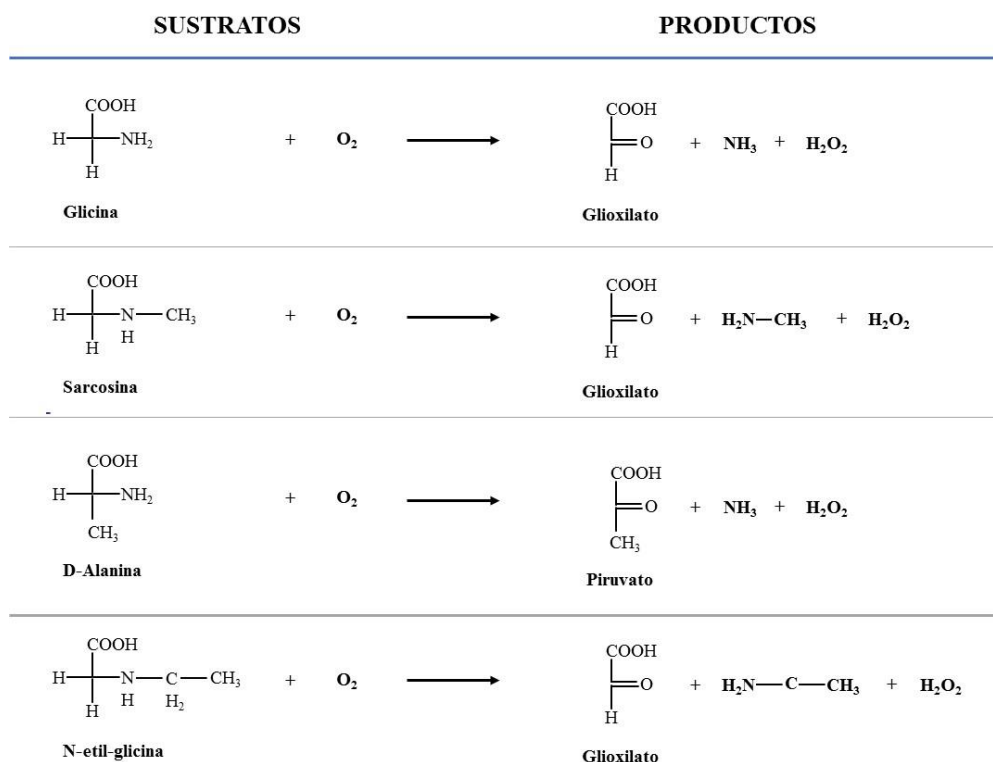


Figura I.6. Reacciones catalizadas por la glicina oxidasas de *B. subtilis* con los sustratos glicina, sarcosina, D-Ala y N-etil-glicina.

Gox comparte cierta similitud con otras flavoproteínas como las DAOs y las sarcosina oxidasas (SOX, EC 1.5.3.1) en cuanto a su rango de sustratos y a su estructura primaria y cuaternaria (Job *et al.*, 2002b; Mortl *et al.*, 2004). De hecho, Gox, DAOs y SOXs pueden incluirse dentro de una misma familia desde el punto de vista estructural (Fitzpatrick, 2010). Sin embargo, también se han descrito algunas diferencias con estas flavooxidasas en cuanto a su mecanismo catalítico y modo de unión del FAD a la proteína (Caldinelli *et al.*, 2009; Pedotti *et al.*, 2009a). Estas observaciones, y el hecho de que la glicina carezca de estereoisomería, han suscitado cierta controversia en la bibliografía con respecto a su inclusión o no dentro de la familia de las LAOs (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013).

La Gox de *B. subtilis* posee una estructura homotetramérica, compuesta por monómeros de 40,9 kDa, en la que cada subunidad une FAD como cofactor de manera no covalente (Job *et al.*, 2002a). La obtención de la estructura cristalina de la proteína (PDB: 1RYI) permitió abordar estudios de relación estructura-función (Mortl *et al.*, 2004; Settembre *et al.*, 2003).

En el microorganismo termófilo *Geobacillus kaustophilus* HTA426 se ha descrito otra proteína con actividad glicina oxidasa (GoxK, número de acceso BAD74908), codificada por el locus GK0623 (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). Se trata de una proteína termorresistente muy similar a Gox de *B. subtilis* en cuanto a su rango de sustratos. Oxida los sustratos típicos de la Gox de *B. subtilis* con ligeras diferencias, ya que posee valores de Km más bajos para todos ellos excepto para la sarcosina, cuyo valor es muy similar. En términos de Vmax, la D-prolina es el sustrato preferido de GoxK, mientras que para la Gox de *B. subtilis* es la sarcosina (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). Por otro lado, respecto a su estructura, se trata de una proteína tetramérica formada por monómeros de 43 kDa que unen FAD de manera no covalente. Aunque no hay grandes diferencias en cuanto a su estructura tridimensional con respecto a la de *B. subtilis*, se han propuesto algunos residuos que podrían justificar las diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato. También se han descrito otros residuos que deben de ser

esenciales interviniendo en la unión a FAD y en el mecanismo catalítico de estas glicina oxidasas (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b).

Recientemente se han clonado y caracterizado otras flavoproteínas con actividad glicina oxidasa que guardan similitud de secuencia con la Gox de *B. subtilis* (apéndice A.1). La Gox sintetizada por *Pseudomonas putida* KT2440 difiere ligeramente de la Gox de *B. subtilis* y *G. kaustophilus* en cuanto a su rango de sustratos y estructura cuaternaria (Equar *et al.*, 2015). Las sintetizadas por *Bacillus cereus* (Zhan *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2015) y *Bacillus licheniformis* (Zhang *et al.*, 2016) han sido sujetas a ingeniería genética con el fin de optimizar su actividad catalítica sobre el herbicida glifosato.

Respecto a su función biológica, se ha descrito que la glicina oxidasa de *B. subtilis* interviene en la formación del anillo de tiazol en la biosíntesis de tiamina (Settembre *et al.*, 2003). La misma función podría desempeñar GoxK en *G. kaustophilus*, ya que presenta una ruta de síntesis de tiamina similar a la de *B. subtilis* (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b).

I.1.2. L-lisina épsilon-oxidasa de *Marinomonas mediterranea* (LodA), una aminoácido oxidasa con cofactor quinónico.

Hasta el momento de elaboración de este trabajo, la L-lisina ϵ -oxidasa de *M. mediterranea* (LodA) es la única AO descrita que no presenta FAD, sino que posee cofactor quinónico (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). En los siguientes apartados se discutirán los cofactores quinónicos, así como LodA y sus características principales.

I.1.2.1. Características generales de cofactores quinónicos.

Este tipo de cofactores se generan mediante modificación post-traducciona en uno o más residuos proteicos, generando unas estructuras quinónicas en su centro activo que les permite actuar como enzimas redox (Davidson, 2011). Hasta el momento se han descrito cinco tipos de cofactores quinónicos: el cofactor dissociable PQQ y los cofactores no dissociables derivados de tirosina (TPQ y LTQ) (Mure, 2004) y de triptófano (TTQ y CTQ) (Davidson, 2005) (fig. I.7). Por su importancia en este trabajo, el cofactor CTQ será descrito con mayor detalle que el resto de los cofactores.

La pirroloquinolín quinona o PQQ es un cofactor dissociable que está presente típicamente en bacterias Gram-negativas como *Enterobacterium intermedium* (Kim *et al.*, 2003), *Klebsiella pneumoniae* (Meulenber *et al.*, 1992), *Methylobacterium extorquens* (Toyama *et al.*, 1997), *Acinetobacter calcoaceticus* (Olsthoorn y Duine, 1996) y *Gluconobacter oxydans* (Holscher *et al.*, 2007). Recientemente se ha descrito su presencia en hongos (Matsumura *et al.*, 2014). PQQ fue por primera vez descrito en la enzima metanol deshidrogenasa sintetizada por bacterias metilótrofas (Duine y Frank, 1979). También es el cofactor de la glucosa deshidrogenasa (Salisbury *et al.*, 1979). La biosíntesis de PQQ es un proceso complejo en el que participan varios genes que se encuentran organizados en un operón (Misra *et al.*, 2012). La síntesis de PQQ ha sido obtenida expresando recombinantemente en *E. coli* el operón de *G. oxydans*, que está formado por 7 genes (*pqqABCDEFG/G*) (Yang *et al.*, 2010). Los cofactores quinónicos derivados de tirosina son dos: la topaquinona (TPQ) (Janes *et al.*, 1990) y la lisina tirosilquinona (LTQ) (Wang *et al.*, 1996). Este tipo de cofactores no dissociables están presentes en amino oxidasas que contienen cobre y participan en diversas actividades biológicas (Davidson, 2011; Mure, 2004). El cofactor TPQ se origina mediante modificación post-traducciona donde 2 átomos de oxígeno se introducen en las posiciones 2 y 5 del anillo aromático de la tirosina (fig. I.7) (Davidson, 2011). Tanto los residuos y motivos conservados, como los mecanismos implicados en la generación de TPQ han sido bien caracterizados (Klema y Wilmot, 2012; Moore *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 1992).

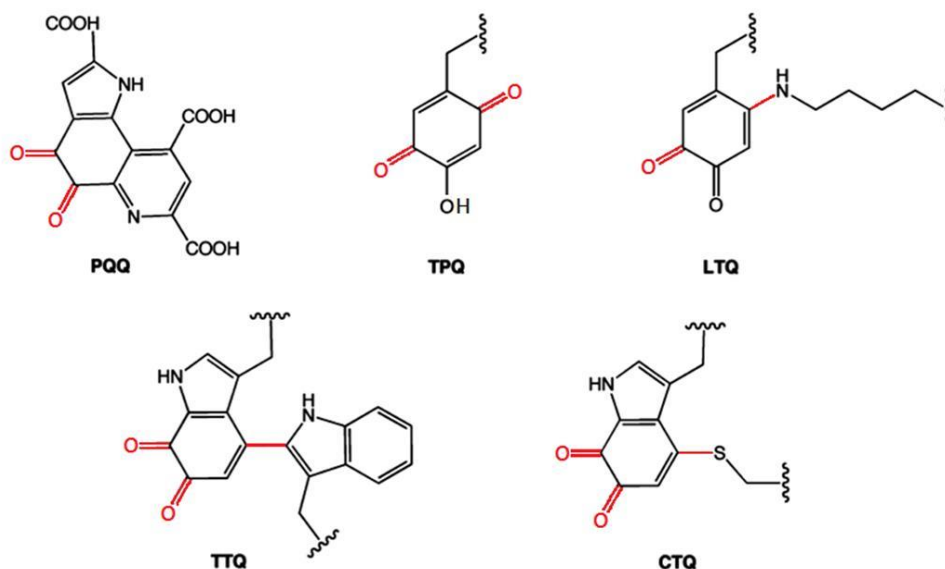


Figura I.7. Estructura química de los cofactores quinónicos conocidos. En rojo se muestran las modificaciones implicadas en cada caso para la generación del cofactor. PQQ: pirroloquinolín quinona. Cofactores derivados de tirosina: TPQ (topaquinona) y LTQ (lisina tirosilquinona). Cofactores derivados de triptófano: TTQ (triptófano triptofilquinona) y CTQ (cisteína triptofilquinona) (Klinman y Bonnot, 2014).

Por su parte, el cofactor LTQ, descrito en lisil-oxidasas (LOX), se genera por la unión covalente de un residuo de lisina de la proteína precursora con el anillo aromático de una tirosina modificada por incorporación de un oxígeno (fig. I.7) (Wang *et al.*, 1996). El proceso de formación de LTQ también ha sido caracterizado (Bollinger *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la generación de LTQ comparte algunas etapas iniciales con la de TPQ, en concreto las etapas autocatalíticas donde participa el cobre (Davidson, 2011; Moore *et al.*, 2007).

Los cofactores derivados de triptófano son el triptófano triptofilquinona (TTQ) y la cisteína triptofilquinona (CTQ). Al igual que los cofactores derivados de tirosina, son de tipo no dissociable. TTQ se genera por modificación post-traducciona en la que intervienen dos triptófanos de la propia proteína. En la formación de TTQ se genera un enlace covalente entre los anillos indólicos de ambos triptófanos, y además en uno de ellos, se deben de insertar dos oxígenos en las posiciones 6 y 7 del anillo indólico, formando una quinona (fig. I.7). TTQ se ha descrito en la amina aromática deshidrogenasa (AADH) de *Alcaligenes faecalis* (Chistoserdov, 2001; Govindaraj *et al.*, 1994), pero sin duda, el cofactor TTQ mejor estudiado es el de la metilamina

deshidrogenasa (MADH) de *Paracoccus denitrificans* (McIntire *et al.*, 1991; Wilmot y Davidson, 2009). MADH está implicada en la utilización de metilamina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Davidson, 2001; Davidson y Liu, 2012). En *P. denitrificans*, todos los genes que intervienen en la utilización de la metilamina se encuentran formando el operón *mau* que contiene un total de 11 genes (*mauRFBEDACJGMN*) (van der Palen *et al.*, 1997; van der Palen *et al.*, 1995). A diferencia de los cofactores derivados de tirosina, la formación de TTQ no es un proceso autocatalítico, ya que algunos de estos genes codifican proteínas que intervienen en la generación del cofactor en MADH (Davidson, 2011). Este es el caso de MauG, proteína de 42 kDa con dos grupos hemo (Wilmot y Yukl, 2013). MauG interviene en la formación de TTQ catalizando la etapa de formación del enlace covalente entre los dos Trp implicados, utilizando como sustrato un precursor de MADH monohidroxilado (preMADH) (Pearson *et al.*, 2004; Yukl *et al.*, 2013) (fig. I.8). Se ha propuesto que el proceso de generación de preMADH es un mecanismo autocatalítico (Davidson y Wilmot, 2013).

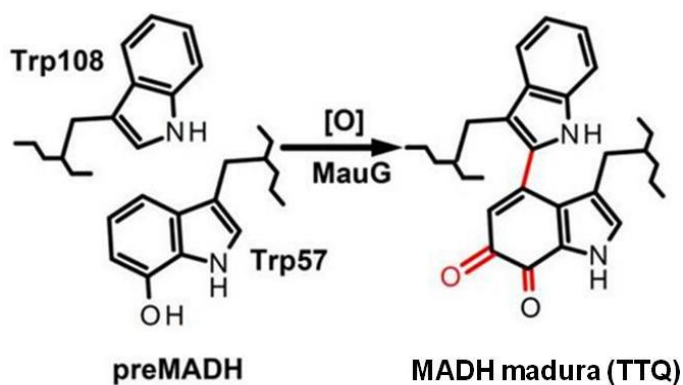


Figura I.8. Biosíntesis del cofactor TTQ. Se muestra la modificación llevada a cabo por MauG, que afecta a los Trp del precursor (preMADH), hasta MADH madura con cofactor TTQ (Davidson y Wilmot, 2013).

El mecanismo de oxidación llevado a cabo por MauG sobre preMADH tiene lugar mediante un novedoso mecanismo denominado “electron hopping”, en el cual intervienen algunos residuos de Trp en MauG que son oxidados de forma reversible (Tarboush *et al.*, 2011; Tarboush *et al.*, 2013a). Este mecanismo permite que los Trp que intervienen no tengan que estar en contacto directo con los grupos hemo de

MauG (Shin *et al.*, 2013; Tarboush *et al.*, 2011). Adicionalmente, se han determinado mediante estudios de mutagénesis varios residuos importantes en MauG relacionados con su actividad catalítica, con la unión de los grupos hemo y con la interacción con preMADH (Davidson y Wilmot, 2013; Shin *et al.*, 2014; Tarboush *et al.*, 2013a; Tarboush *et al.*, 2013b).

El cofactor cisteína triptofilquinona (CTQ) se ha descrito en la quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QHNDH) de *Paracoccus denitrificans* (Datta *et al.*, 2001) y de *Pseudomonas putida* (Vandenberghe *et al.*, 2001). QHNDH permite a las bacterias utilizar las aminas primarias alifáticas como fuente de energía, carbono y nitrógeno, ya que cataliza su desaminación oxidativa (Nakai *et al.*, 2014). Esta enzima es un heterotrímero $\alpha\beta\gamma$, donde el cofactor CTQ se localiza en la subunidad γ (Datta *et al.*, 2001). El mecanismo propuesto de generación de CTQ en QHNDH es un proceso complejo que requiere 8 etapas sucesivas (Nakai *et al.*, 2014). En resumen, las modificaciones post-traduccionales necesarias consisten en la incorporación de dos oxígenos al anillo indólico de uno de los Trp y posteriormente la formación de un enlace tioéter entre dicho Trp modificado y el grupo tiol de un residuo de cisteína de la propia proteína (Davidson, 2007). Al igual que en TTQ, los genes implicados en la generación de CTQ están localizados en un mismo locus (*qhpGADCBEFR*) (Nakai *et al.*, 2014; Ono *et al.*, 2006). Alguno de estos genes codifican proteínas esenciales para que se lleve a cabo la generación del cofactor en la subunidad γ (Nakai *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha detectado ningún gen que codifique ninguna proteína con homología a MauG (Ono *et al.*, 2006). Se ha propuesto que en CTQ el aceptor de electrones no es una cuproproteína exógena, sino los dos grupos hemo presentes en la subunidad α de QHNDH (Datta *et al.*, 2001).

I.1.2.2. Características bioquímicas y relevancia fisiológica de LodA.

LodA, descrita en la bacteria marina *M. mediterranea*, cataliza la desaminación oxidativa de la L-lisina para generar, en presencia de oxígeno, peróxido de hidrógeno, amonio y ácido 6-semialdehído-2-aminoadípico (Gómez *et al.*, 2006). Este último compuesto puede ciclarse a piperidina-6-carboxilato u oxidarse a ácido-2-

aminoadípico, dependiendo de la neutralización o no del H_2O_2 producto de la reacción (fig. I.9). Esta enzima es altamente específica de L-lisina y cataliza su oxidación en posición épsilon, actividad que no había sido descrita con anterioridad, por lo que recibió un nuevo número por la Comisión de Enzimas (EC 1.4.3.20).

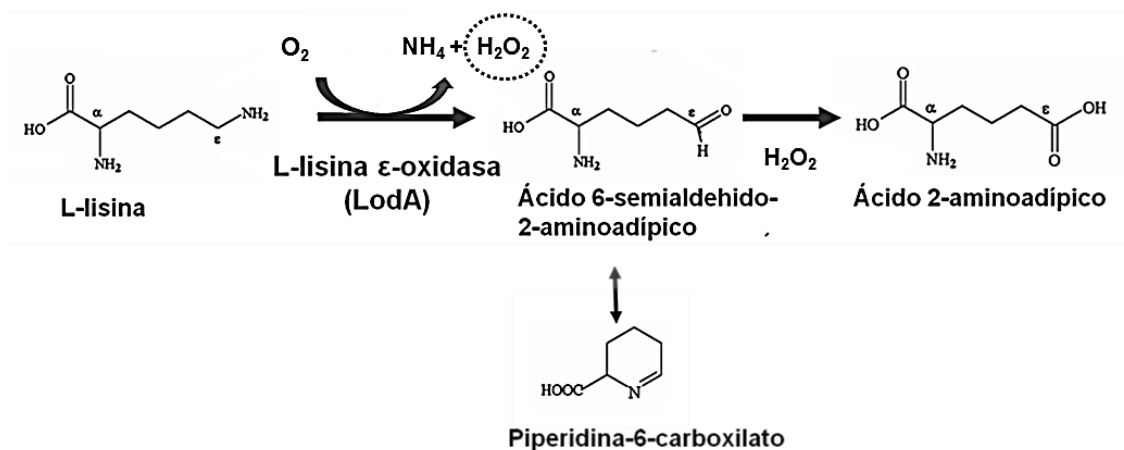


Figura I.9. Reacción catalizada por L-lisina épsilon-oxidasa (LodA) (EC 1.4.3.20), donde se señala el peróxido de hidrógeno producto de la reacción.

LodA se describió inicialmente en los sobrenadantes de *M. mediterranea* como una proteína con actividad bactericida de amplio espectro a la que se le denominó marinocina (Lucas-Elío *et al.*, 2005). Posteriormente se observó que la capacidad antimicrobiana de la marinocina se debía a la liberación de peróxido de hidrógeno generado en la reacción de oxidación de L-lisina (Lucas-Elío *et al.*, 2006) (fig. I.9).

A pesar de oxidar L-lisina, LodA no es una LAO convencional ya que no sólo oxida el grupo amino en posición épsilon, sino que presenta un cofactor de tipo quinónico y no flavínico (Gómez *et al.*, 2010). Recientemente se ha obtenido la estructura cristalina de la proteína donde se observa que LodA posee un cofactor quinónico de tipo CTQ (cisteína triptofilquinona) (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013), que se discutirá con mayor detalle en el apartado I.1.2.3.

LodA está codificada por el gen *lodA*, que junto con el gen *lodB* forman el operón *lod*. La delección del operón *lod* en el mutante LD supone la pérdida total de actividad lisina oxidasa (LOD) (Gómez *et al.*, 2010). LodB es una flavoproteína en cuya secuencia

peptídica podemos identificar el motivo de unión a dinucleótidos (DBM) y el motivo GD, motivos típicos de unión a cofactores flavínicos (Chacón-Verdú, 2015; Gómez, 2010). LodB está implicada en la generación de LodA activa por modificación post-traducciona (Chacón-Verdú, 2015).

LodA es una proteína extracelular, secretada en fase estacionaria de crecimiento, mientras que LodB es detectada en los extractos celulares (Gómez *et al.*, 2010). LodA posee una gran resistencia a elevadas temperaturas y a la acción de enzimas proteolíticas como la proteinasa K, y es además una proteína precipitable con etanol, sugiriendo que posee una estructura muy estable (Lucas-Elío *et al.*, 2005). Su comportamiento electroforético también resulta peculiar, ya que no pierde su actividad en presencia de SDS o β -mercaptoetanol (Lucas-Elío, 2003). Como se observa en la figura I.10 se ha propuesto un modelo para la síntesis y secreción de LodA en *M. mediterranea*. En el interior celular se sintetiza LodA activa con la participación de LodB. La enzima se detecta por SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes con una masa molecular aparente de 190 kDa. Al ser secretada al exterior, sufre algún tipo de modificación, puesto que se detecta con una masa aparente de 140 kDa. Cuando se aplica un tratamiento térmico de 95 °C (condiciones desnaturizantes) disociamos estos complejos activos y obtenemos monómeros de LodA con una masa molecular aparente 95 kDa en los geles SDS-PAGE (Lucas-Elío *et al.*, 2005) (fig. I.10)

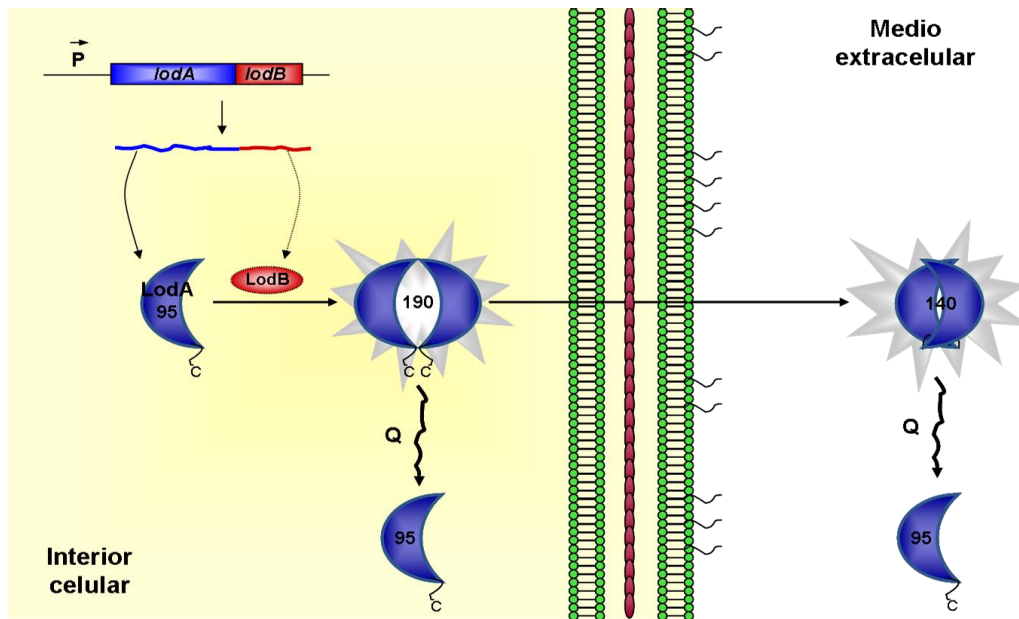


Figura I.10. Esquema propuesto para la expresión de la actividad LOD en *M. mediterranea* (Gómez, 2010).

LodA muestra similitud en su secuencia con AlpP, proteína autolítica sintetizada por *Pseudoalteromonas tunicata*, y con otras proteínas presentes en bases de datos (Lucas-Elío *et al.*, 2006). En cuanto a la función fisiológica de LodA y estas proteínas similares, se ha descrito que juegan un papel determinante en la arquitectura de las biopelículas formadas por los microorganismos productores. A medida que las colonias en la biopelícula van incrementando en tamaño, la acción autolítica de la L-lisina- ϵ -oxidasa causa la muerte de una subpoblación de células en el centro de las colonias, provocando la liberación al medio circundante de células microbianas que pueden colonizar nuevos ambientes (Mai-Prochnow *et al.*, 2008) (fig. I.11). Tal como se ha descrito para otras proteínas extracelulares de gran tamaño, 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 (Burchard y Sorongon, 1998). Ya que *M. mediterranea* forma parte de la microbiota de la planta marina *Posidonia oceanica* (apartado I.2.1), este proceso de dispersión microbiana podría jugar un papel primordial en su supervivencia (Espinosa *et al.*, 2010).

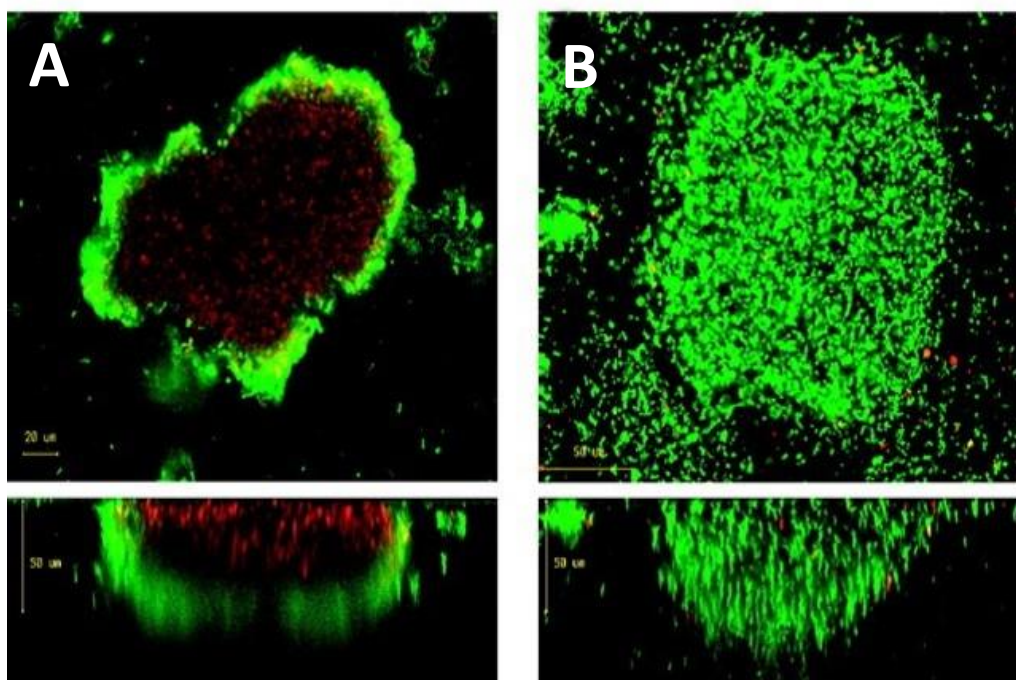


Figura I.11. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de biopelículas de *M. mediterranea* MMB-1R (A) y del mutante SB1 afectado en LodA (B). Se observa que la muerte celular ocurre durante el desarrollo de la biopelícula en la cepa MMB-1R pero no en el mutante SB1. Adaptado de (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

I.1.2.3. El cofactor CTQ de LodA.

LodA presenta un cofactor quinónico de tipo CTQ. Los residuos Cys-516 y Trp-581 de LodA son los que forman parte del cofactor, tal y como muestra la estructura cristalina de LodA obtenida tanto en el sistema nativo como en el recombinante (fig. I.12A) (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). Además, el espectro de absorción de LodA pura coincide con el patrón típico de quinoproteínas como el de QHNDH (fig. I.12B) (Datta *et al.*, 2001). Es de destacar que LodA es la primera quinoproteína con actividad oxidasas descrita, ya que, hasta la fecha, todas eran deshidrogenasas. Además, LodA es también la primera enzima con cofactor CTQ que se ha expresado de forma recombinante en *E. coli* (Chacón-Verdú *et al.*, 2014).

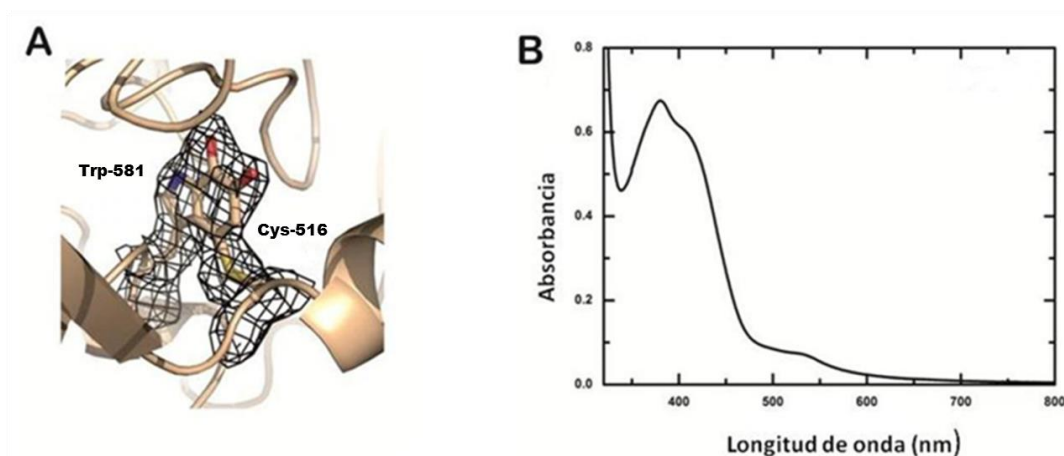


Figura I.12. A, mapa de densidad electrónica del cofactor CTQ en LodA formado por los residuos Cys-516 y Trp-581. B, espectro de absorción de LodA pura en el rango de cofactor quinónico (Chacón-Verdú, 2015).

Recientemente se ha puesto a punto por nuestro grupo de investigación un sistema de expresión recombinante de las proteínas LodA y/o LodB fusionadas a etiquetas, lo que ha facilitado su aislamiento y caracterización. Este sistema ha permitido detectar que LodB está implicada en la generación del cofactor de LodA por modificación post-traducciona, lo que ha llevado a proponer un modelo de generación de CTQ en LodA (Chacón-Verdú, 2015) (fig. I.13). Tras la síntesis de LodA, los residuos Cys-516 y Trp-581 se encuentran sin modificar. En una primera etapa, en un proceso independiente de LodB se produce una hidroxilación del Trp-581, generando un intermediario denominado PreLodA con un incremento de MM de +16. A continuación, LodB actuaría, de forma similar a MauG en la generación de MADH, sobre el intermediario monohidroxilado completando la síntesis del cofactor por oxidación del intermediario.

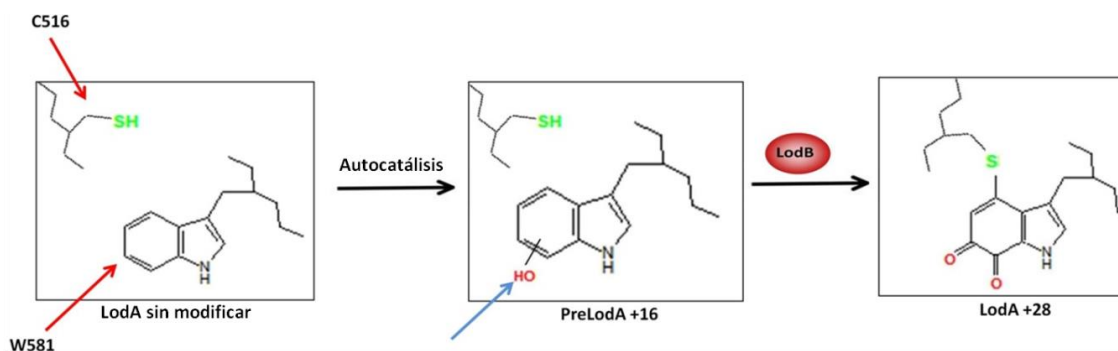


Figura I.13. Modelo de formación del cofactor CTQ en LodA de *M. mediterranea* (Chacón-Verdú, 2015).

La actividad enzimática concreta de LodB y su actuación sobre LodA todavía no ha sido caracterizada. 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 (Chacón-Verdú, 2015).

Estudios por mutagénesis dirigida en combinación con la disponibilidad de la estructura han permitido detectar una serie de residuos conservados necesarios para la formación de LodA activa. El Asp-512 interviene en las primeras etapas de generación del cofactor a nivel de la primera hidroxilación, es decir, en la formación de PreLodA. Este residuo se encuentra localizado en una posición similar a los residuos de Asp conservados en MADH y QHNDH (fig. I.14). Por su parte, la Tyr-211 y Glu-101, situados en el canal de acceso al centro activo, son necesarios para generar LodA activa pero no parecen estar implicados en la formación del cofactor (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Sehanobish *et al.*, 2015).

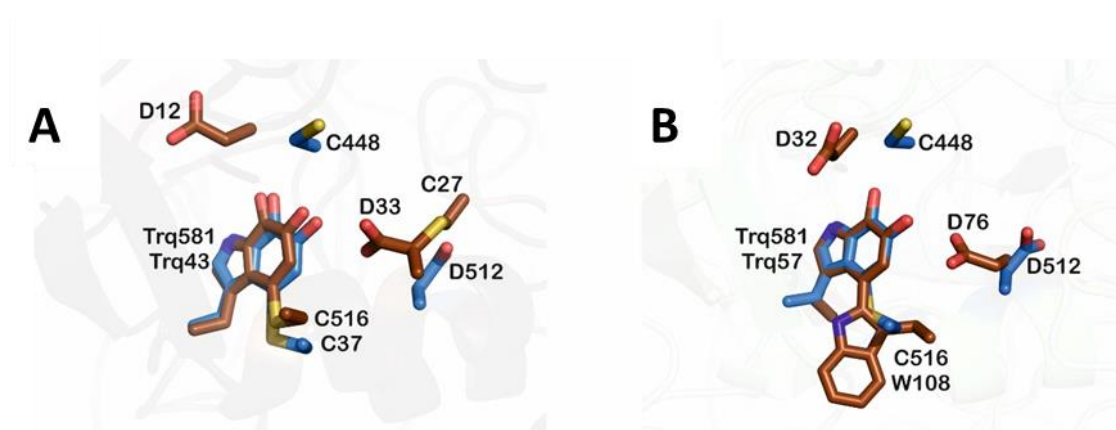


Figura I.14. Superposición de residuos en el entorno del centro activo de LodA con otras proteínas que poseen cofactores quinónicos derivados del Trp. El Trp modificado o quinona para generar el cofactor se denomina Trq. En LodA, CTQ se forma a partir de Trq-581 y Cys-516. Los residuos de LodA se muestran en azul, mientras que en naranja se muestran los residuos de QHNDH y MADH. **A**, superposición con QHNDH. Los residuos Trq-43 y Cys-37 forman el cofactor CTQ de QHNDH. Se muestran ambos cofactores CTQ y los residuos Cys-448 y Asp-512 de LodA con los residuos equivalentes Asp-12 y Asp-33 de la subunidad γ de QHNDH. **B**, superposición con MADH. Los residuos que forman el cofactor triptofilquinona (Trq-57 y Trq-581) fueron alineados manualmente. Después de esto, los residuos Asp-32 y Asp-76 de la subunidad β de MADH se localizan en posiciones similares a los residuos Cys-448 y Asp-512 de LodA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

I.1.3. Aplicaciones biotecnológicas de las LAOs.

Las LAOs tienen un gran interés biotecnológico y son aplicadas en diversos campos como la biomedicina, biotransformaciones, desarrollo de biosensores, etc. Respecto a este último ámbito, la alta especificidad que muestran algunas de estas LAOs ha permitido su desarrollo como biosensores. La rápida y precisa determinación de aminoácidos en tejidos y fluidos fisiológicos puede ser de gran utilidad para diagnosticar enfermedades y ciertos desórdenes (Singh, 2014). Un ejemplo de biosensor sería la L-lisina ϵ -oxidasa de *M. mediterranea* que se puede emplear para la determinación de L-lisina en plasma (Matsuda y Asano, 2010). En la industria alimentaria también se han desarrollado biosensores para la determinación de la calidad nutricional de los productos en cuanto a su contenido en aminoácidos (Varadi *et al.*, 1999). Por ejemplo, la L-lisina se puede detectar en alimentos utilizando la LAO secretada por el pescado de roca *Sebastes schlegeli* (Endo *et al.*, 2008). También como biosensores de L-lisina se ha descrito la utilización de las LAOs presentes en *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichoderma viride* (Akyilmaz *et al.*, 2007; Chauhan *et al.*, 2013). Por otro lado, la LAO purificada de riñón de cabra puede emplearse para la cuantificación de L-fenilalanina en zumo de frutas y bebidas alcohólicas (Lata y Pundir, 2013).

En el campo de la biomedicina, se ha estudiado particularmente las LAOs de serpientes por sus efectos biológicos (Guo *et al.*, 2012; Izidoro *et al.*, 2014). Entre sus propiedades se encuentra la inducción de la apoptosis (Ande *et al.*, 2008). Aunque los mecanismos por los que las LAOs inducen la apoptosis todavía no se conocen de forma precisa (Costa *et al.*, 2014), se ha propuesto que, además del peróxido de hidrógeno generado, otros factores, como la depleción de aminoácidos o la producción de compuestos intermediarios, están relacionados con su efecto citotóxico (Kasai *et al.*, 2015b). Otros efectos biológicos de las LAOs son la inducción de la agregación plaquetaria (More *et al.*, 2010) y los efectos antivirales, antimicrobianos y antiparasitarios (Fernández-

Gómez *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 2013). Adicionalmente, se han descrito propiedades anticancerígenas asociadas a LAOs. En este sentido, la L-lisina α -oxidasa del hongo *Trichoderma*, que posee actividad antitumoral in vitro (Lukasheva y Berezov, 2002), se ha ensayado in vivo frente al cáncer colorrectal con buenos resultados (Pokrovsky *et al.*, 2013; Treshalina *et al.*, 2000). También se ha visto un efecto apoptótico in vitro producido por la LAO del pez *Chub mackerel* cuando es infestado por *Anisakis simplex* (Jung *et al.*, 2000; Murakawa *et al.*, 2001). Además, existen estudios que avalan la eficacia de un pretratamiento con la LAO presente en el veneno de *Crotalus adamanteus*, en el empleo del fármaco para quimioterapia antineoplásica melphalan (Moynihan *et al.*, 1997).

Las LAOs también pueden ser usadas en biotransformaciones, por ejemplo en la separación de enantiómeros en mezclas racémicas de aminoácidos (Qi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011). La obtención pura del isómero L es de gran interés, ya que los L-aminoácidos se usan rutinariamente como aditivos en la industria alimentaria tanto animal como humana. Del mismo modo, la obtención de D-aminoácidos es importante en la industria alimentaria y farmacéutica (Gao *et al.*, 2015; Pollegioni *et al.*, 2013). La producción de precursores de antibióticos β -lactámicos es otro ejemplo de aplicación de las LAOs en la industria farmacéutica (Isobe *et al.*, 2008). Otra aplicación es la producción industrial de α -cetoglutarato a partir de L-glutámico (Liu *et al.*, 2013).

Por último, las LAOs pueden emplearse en otros campos. Por ejemplo, algunos microorganismos productores de LAOs se pueden utilizar en agricultura como biofertilizantes debido a su capacidad de liberar nitrógeno inorgánico a partir de L-aminoácidos (Hossain *et al.*, 2014; Nuutinen y Timoneni, 2008). Además, en panadería pueden ser aplicadas en el tratamiento enzimático de la masa con el fin de reducir la viscosidad y mejorar su maleabilidad (Christiansen y Budolfson, 2002). Para finalizar, también se ha estudiado la aplicación de LAOs en la industria textil y en la industria del papel, como agentes decolorantes debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Schneider *et al.*, 1998) y en el tratamiento de aguas residuales (Yu y Qiao, 2012).

En el contexto de este trabajo son de gran interés las posibles aplicaciones de las glicina oxidasas. La actividad catalizada por la glicina oxidasa supone una alternativa a las DAOs, las cuales han sido empleadas en multitud de procesos biotecnológicos como la resolución de L-aminoácidos a partir de mezclas racémicas, la producción de α -cetoácidos con interés farmacéutico, o la producción de intermediarios de antibióticos β -lactámicos (Khoronenkova y Tishkov, 2008; Pollegioni y Molla, 2011). Por ello, se han realizado numerosos estudios con el fin de optimizar la expresión de Gox en sistemas recombinantes, así como la creación, mediante mutagénesis dirigida, de proteínas con una mejor funcionabilidad y un mayor rango de sustratos (Martínez-Martínez *et al.*, 2007; Martínez-Martínez *et al.*, 2008a; Martínez-Martínez *et al.*, 2006).

Una de las aplicaciones de gran interés propuestas para las glicina oxidasas es la degradación de glifosato. El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida de amplio espectro que inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y ciertas bacterias. Mediante mutagénesis dirigida se han conseguido variantes de Gox capaces de degradar con mayor eficacia este herbicida que su propio sustrato fisiológico, la glicina. Por tanto, estas variantes podrían emplearse en cultivos transgénicos como alternativa o de forma adicional a los procesos de resistencia a glifosato comúnmente utilizados (Liu *et al.*, 2014; Nicolai *et al.*, 2014; Pedotti *et al.*, 2009b; Yao *et al.*, 2015). Por otro lado, la glicina es un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central que interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos. La alteración de sus niveles guarda relación con algunos desórdenes neurológicos y con otras patologías, que pueden provocar un aumento de la concentración de glicina. Por tanto, la determinación de glicina en muestras biológicas puede ser de gran interés. En este sentido, se ha descrito recientemente el empleo de Gox, modificada mediante diseño racional, como biosensor de glicina en muestras biológicas (Rosini *et al.*, 2014). Por último, es interesante señalar que se han desarrollado algunas patentes para la determinación de glicina mediante el uso de Gox modificadas (Kodama *et al.*, 2014; Wang, 2011).

I.2. El género *Marinomonas*.

El microorganismo modelo en este estudio ha sido la bacteria marina *Marinomonas mediterranea*, aislada de aguas del mar Mediterráneo (Solano *et al.*, 1997; Solano y Sánchez-Amat, 1999).

El género *Marinomonas* engloba a un conjunto de bacterias marinas Gram-negativas, aeróbicas, con un contenido en G+C del 41 al 50 mol %, que pertenecen a la familia *Oceanospirillales* (clase *Gammaproteobacteria*). Morfológicamente, este género incluye tanto bacilos como espirilos, rectos o curvos, con flagelación polar en uno o ambos extremos de la célula (fig. I.15). Además, en concordancia con su hábitat, todos los miembros de este género requieren Na^+ para crecer, y no acumulan PHB (Sánchez-Amat y Solano, 2005).

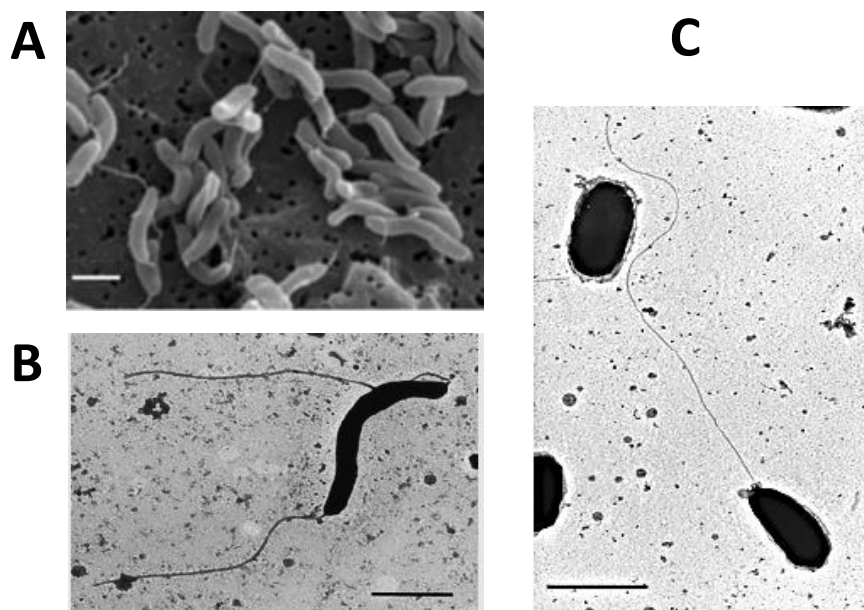


Figura I.15. Micrografías electrónicas de diferentes especies pertenecientes al género *Marinomonas*, mostrando diversas morfologías y tipos de flagelación. **A**, *M. posidonica* IVIA-Po-181 (Lucas-Elío *et al.*, 2012a). **B**, *M. aquiplantarum* (Espinosa, 2007). **C**, *M. baleárica* (Espinosa, 2007). Barras = 1 μm .

El número de especies pertenecientes al género *Marinomonas* ha aumentado desde su descripción inicial (van Landschoot y de Ley, 1983), debido al creciente interés científico por el estudio de microorganismos marinos. De este modo ha sido necesaria una modificación de la descripción del género para incluir las nuevas cepas aisladas (Espinosa *et al.*, 2010).

Hasta la fecha, el género *Marinomonas* comprende 23 especies diferentes que se han aislado principalmente de aguas marinas situadas en zonas geográficas y ambientes muy diversos. *M. mediterranea* y *M. aquimarina* han sido aisladas del mar Mediterráneo (Macian *et al.*, 2005; Solano *et al.*, 1997), *M. communis* y *M. vaga*, anteriormente denominadas *Alteromonas communis* y *A. vaga*, del Pacífico (Baumann *et al.*, 1972), *M. pontica* del mar Negro (Ivanova *et al.*, 2005), *M. dokdonensis* (Yoon *et al.*, 2005) y *M. primoryensis* (Romanenko *et al.*, 2003) del mar de Japón, y *M. hwangdonensis* del mar Amarillo (Jung *et al.*, 2012). Algunas especies proceden de regiones con bajas temperaturas tales como *M. ushuaiensis* (Prabakaran *et al.*, 2005), *M. polaris* (Gupta *et al.*, 2006) y *M. arctica* (Zhang *et al.*, 2008). Otras especies del género *Marinomonas* están asociadas a otros organismos, como es el caso de *M. ostreistagni* que está asociada a las ostras (Lau *et al.*, 2006), o *M. brasiliensis* asociada al coral *Mussismilia hispida* (Chimetto *et al.*, 2011), o *Marinomonas fungiae*, asociada al coral *Fungia echinata* y que ha sido aislada del mar de Andamán en el océano Índico (Kumari *et al.*, 2014). Otras especies se han aislado a partir de arenas y sedimentos marinos, como *M. arenicola* (Romanenko *et al.*, 2009) y *M. profundimaris* (Bai *et al.*, 2014). Finalmente, trabajos realizados por nuestro grupo de investigación sobre la microbiota asociada a la planta marina *Posidonia oceanica*, de gran relevancia ecológica en el mar Mediterráneo, han permitido la descripción de siete nuevas especies: *M. balearica*, *M. pollencensis* (Espinosa *et al.*, 2010), *M. alcarazii*, *M. rhizomae*, *M. foliarum*, *M. posidonica* y *M. aquiplantarum* (Lucas-Elío *et al.*, 2010), y la detección de *M. mediterranea*, que había sido previamente descrita asociada a dicha microflora (Espinosa *et al.*, 2010; Solano y Sánchez-Amat, 1999).

En la actualidad están publicados los genomas de varias especies del género *Marinomonas*. Recientemente se ha secuenciado el genoma de *M. ushuaiensis*

DSM15871 (número de acceso JAMB000000000), el de *M. fungiae* JCM 18476 (número de acceso IMG 2617270736) y el de *M. profundimaris* (número de acceso AYOZ000000000), antiguamente denominada *Marinomonas* sp. D104 (Bai *et al.*, 2014), que se aisló del océano Ártico en un enriquecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Dong *et al.*, 2014). Por otra parte, como se verá en el apartado I.2.1.3, nuestro grupo de investigación ha colaborado en la secuenciación de los genomas de *M. mediterranea* MMB-1 (Lucas-Elío *et al.*, 2012b) y de *M. posidonica* IVIA-Po-181 (Lucas-Elío *et al.*, 2012a).

Además de las cepas clasificadas a nivel de especie, hay otras cepas pertenecientes al género *Marinomonas*, cuyos genomas completos han sido secuenciados y están disponibles. *Marinomonas* sp. MWYL1 (número de acceso NC_009654) ha sido estudiada por su papel en la generación del gas sulfuro de dimetilo (DMS), relacionado con procesos de cambio climático (Todd *et al.*, 2007). Otras dos cepas cuyo genoma se ha secuenciado son *Marinomonas* sp. MED121 (número de acceso AANE010000000), que es una cepa aislada del noroeste del mar Mediterráneo, y *Marinomonas* sp. GOBB3-320 (número de acceso IMG 2504557017), aislada del norte del mar Báltico.

De todas las bacterias adscritas al género *Marinomonas*, *M. mediterranea* ha sido el principal objeto de estudio de nuestro grupo de investigación en los últimos años y, como se ha mencionado previamente, ha sido el modelo de estudio para el presente trabajo, por lo que a continuación se hará una descripción más detallada de sus principales características.

I.2.1. Características generales de *Marinomonas mediterranea*.

M. mediterranea MMB-1 (ATCC 700492^T y CECT 4803^T) fue aislada por nuestro grupo de investigación a partir de aguas procedentes de las costas murcianas del mar Mediterráneo. Se seleccionó por la producción de una inusual pigmentación oscura en medio complejo (Solano *et al.*, 1997). Esta pigmentación se debe a la producción de

melaninas que se localizan en las colonias a la vez que difunden al medio que las rodea (fig. I.16A). En cuanto su hábitat, *M. mediterranea* forma parte de la microbiota asociada a la planta marina *P. oceanica* (Espinosa *et al.*, 2010).

Morfológicamente es un bacilo recto Gram-negativo y móvil mediante un solo flagelo polar no envainado (fig. I.16B). Además, es una bacteria aerobia estricta, catalasa positiva y citocromo-c-oxidasa negativa. *M. mediterranea* es capaz de crecer a temperaturas comprendidas entre 8 y 30 °C y con concentraciones de NaCl entre 1 y 5 %, lo cual está en consonancia con el medio del que fue aislada (Solano *et al.*, 1997).

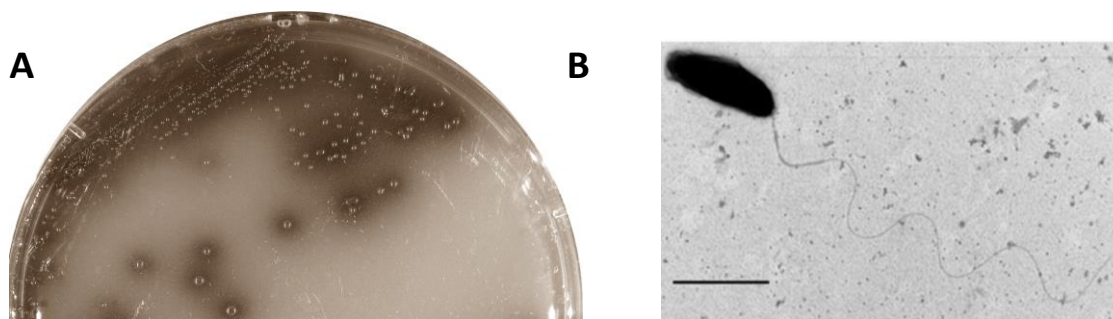


Figura I.16. *M. mediterranea*. **A**, cultivo en placa en medio rico MMC incubado durante 4 días a 25 °C. Se puede observar la pigmentación debida a la producción de melaninas, y como éstas difunden al medio. **B**, micrografía electrónica de *M. mediterranea* IVIA-Po-186, realizada mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico, donde se muestra su morfología y flagelación (Barra = 1μm).

M. mediterranea presenta un metabolismo quimioheterótrofo, siendo capaz de utilizar diversos compuestos como fuente de carbono y energía (Solano y Sánchez-Amat, 1999). Además es prototrofa, por lo que crece en medios definidos usando una única fuente de carbono y energía, aunque crece mejor usando fuentes orgánicas de nitrógeno como el glutamato o el extracto de levadura. Otra característica es que no acumula PHB, ni siquiera en cultivos con fuente de nitrógeno como factor limitante del crecimiento. Es capaz de llevar a cabo la reducción asimilatoria de nitratos a nitritos, aunque no es desnitrificante. Además, no posee las enzimas amilasa ni agarasa, aunque es gelatinasa y lipasa positiva (Solano *et al.*, 1997; Solano y Sánchez-Amat, 1999).

Una característica interesante de *M. mediterranea* es que es la primera bacteria marina en la que se ha descrito la presencia en su citoplasma de unas estructuras denominadas cuerpos R (Hernández-Romero *et al.*, 2003). Estas estructuras intracitoplasmáticas están formadas por capas enrolladas con una zona central granular (Sánchez-Amat, 2006) (fig. I.17). Los cuerpos R fueron descritos por primera vez en bacterias endosimbióticas obligadas de paramecios (Pond *et al.*, 1989). Los cuerpos R están codificados por los genes *reb* (*rebA*, *rebB* y *rebC*), ampliamente distribuidos en proteobacterias y parecen participar en interacciones de estos organismos con eucariotas (Heruth *et al.*, 1994). *M. mediterranea* es una de las bacterias con mayor contenido en su genoma de genes *reb*, los cuales se encuentran en dos loci diferentes (Raymann *et al.*, 2013).

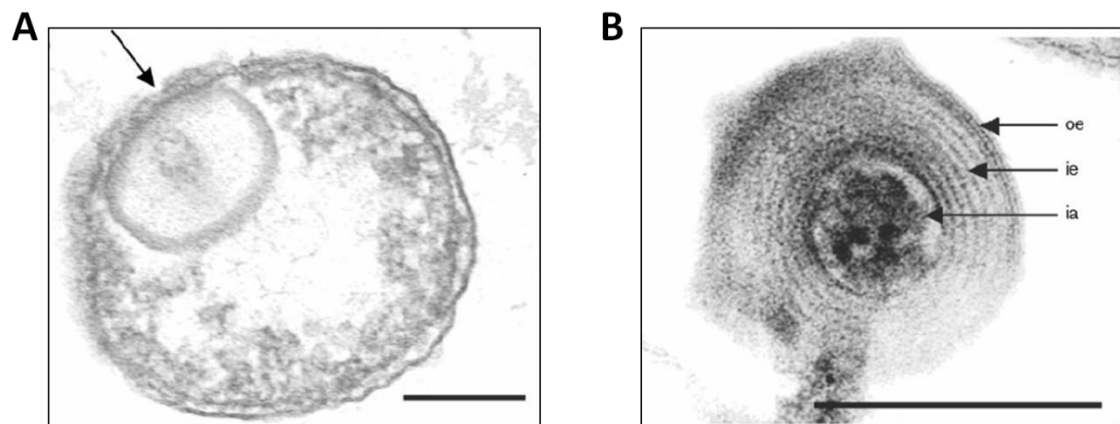


Figura I.17. Micrografías electrónicas de *M. mediterranea*. **A**, sección ultrafina de *M. mediterranea* en donde la flecha indica la estructura citoplasmática denominada cuerpo R en la parte superior. **B**, sección transversal de un cuerpo R. oe: envoltura externa; ie: envoltura interna; ia: área interna. Barra = 0,2 μm (Hernandez-Romero *et al.*, 2003).

M. mediterranea es un ejemplo de bacteria marina productora de varias enzimas relevantes desde el punto de vista biotecnológico. Como ya se ha descrito en el apartado I.1.2.2, la L-lisina ϵ -oxidasa sintetizada por *M. mediterranea* es una enzima novedosa con potenciales aplicaciones. Además, *M. mediterranea* presenta dos polifenol oxidasas que serán descritas a continuación.

I.2.1.1. Polifenol oxidasas sintetizadas por *Marinomonas mediterranea*.

Existen dos grandes grupos de polifenol oxidasas (Ppos): lacasas y tirosinasas. Las lacasas (EC 1.10.3.2) son cuproproteínas azules que pertenecen al grupo de las multicobre oxidasas (MCO). Unen varias moléculas de Cu en los denominados sitios Tipo I, II y III. Estas enzimas tienen baja especificidad de sustrato, oxidando fenoles metoxilados, aminofenoles, orto- y para- difenoles, e incluso iones de Fe y Mn, además de otros compuestos (fig. I.18). Su mecanismo enzimático implica cuatro transferencias monoelectrónicas sucesivas con la reducción de oxígeno a agua (Thurston, 1994).

A diferencia de las lacasas, las tirosinasas (EC 1.14.18.1) son cuproproteínas no azules que poseen en su centro activo una pareja de iones cobre tipo II unidos a seis residuos de histidina. Las tirosinasas oxidan monofenoles, por lo que también se las denomina cresolasas, monofenol monooxigenasas o tirosina hidroxilasas (TH). También muestran actividad catecol oxidasa (EC 1.10.3.1) (fig. I.18). Esta última actividad permite oxidar el difenol L-dopa por lo que también es denominada dopa oxidasa (DO) (García-Borrón y Solano, 2002).

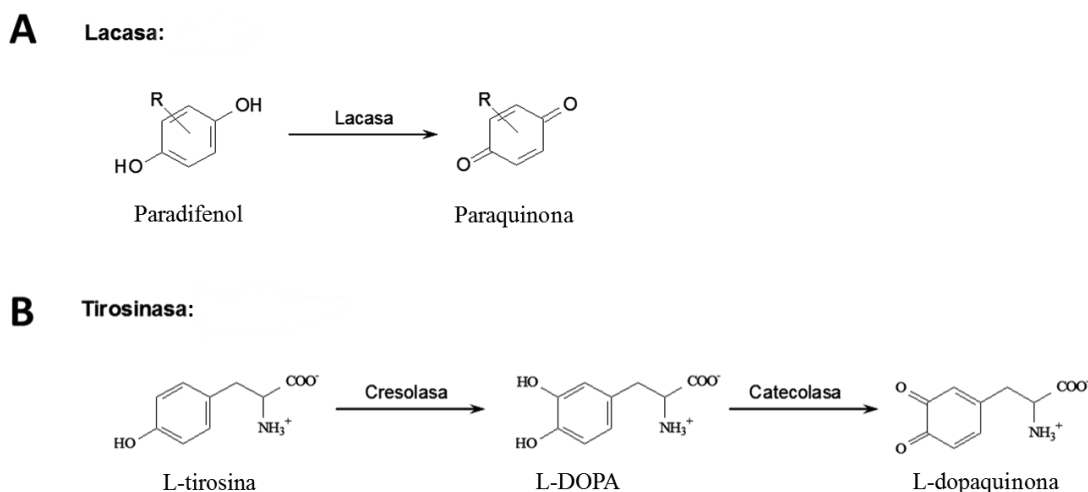


Figura I.18. Esquema de las reacciones típicas catalizadas por lacasas (A) y tirosinasas (B).

M. mediterranea fue la primera bacteria en la que se describió la presencia de dos cuproenzimas con actividad PPO. Una de ellas, PpoA fue la primera lacasa bacteriana clonada y secuenciada. Se trata de una multicobre oxidasa de membrana a la que se

denominó lacasa multipotente, ya que posee, además de actividad lacasa, actividad cresolasa y catecolasa, oxidando así un amplio rango de fenoles aromáticos característicos tanto de lacasas como de tirosinasas (Sánchez-Amat *et al.*, 2001).

De momento se desconoce la función biológica de PpoA. En *M. mediterranea* se ha demostrado que no participa en la melanogénesis, ya que los mutantes en esta enzima siguen siendo pigmentados (Solano *et al.*, 2000). Tampoco parece estar implicada en la resistencia a cobre, ya que, a diferencia de otras MCOs bacterianas, no se induce en presencia de este ion (Fernández *et al.*, 1999). PpoA puede que participe en la síntesis de metabolitos secundarios, en transferencias electrónicas (Fernández *et al.*, 1999), o en la resistencia a compuestos fenólicos, función que se ha observado en el caso de las Ppos de *Ralstonia solanacearum* (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

La otra polifenol oxidasa sintetizada por *M. mediterranea*, PpoB1, es una tirosinasa que presenta las actividades cresolasa y catecol oxidasa típicas de estas enzimas (fig. I.18) (López-Serrano *et al.*, 2002; Solano *et al.*, 1997). Del mismo modo que las tirosinasas de algunos anfibios y plantas (Moore y Flurkey, 1990; Wittenberg y Triplett, 1985), PpoB1 se activa in vitro por concentraciones de SDS por debajo de la concentración micelar crítica (Solano *et al.*, 1997). PpoB1 es la enzima de *M. mediterranea* implicada en la síntesis de melaninas, ya que los mutantes que poseen deletado el gen *ppoB1* resultan amelanogénicos (López-Serrano, 2005). El gen *ppoB1*, que codifica la tirosinasa PpoB1, se encuentra formando parte de un operón junto al gen *ppoB2* que codifica una chaperona que participa en la transferencia de cobre a PpoB1 (López-Serrano *et al.*, 2007; López-Serrano *et al.*, 2004).

I.2.1.2. Sistema PpoS/PpoR: regulación de la expresión génica en *M. mediterranea*.

En *M. mediterranea* se ha descrito un sistema de regulación mediado por las proteínas PpoS y PpoR que, al igual que otros sistemas similares de gammaproteobacterias como GacS/GacA (Lapouge *et al.*, 2008), controla diversos procesos celulares.

La proteína PpoS (por sensor de Ppo) es una histidín quinasa de membrana compuesta (HK compuesta), capaz de recibir la señal ambiental a través de un segmento que se encuentra orientado hacia el espacio periplásmico (Lucas-Elío *et al.*, 2002). PpoS es una proteína similar a otras histidín quinasa sensoras presentes en sistemas de fosfotransferencia de gammaproteobacterias, como GacS o BarA (Lapouge *et al.*, 2008).

La proteína PpoR (por regulador de Ppo) es una proteína reguladora de respuesta (RR) similar a otras RR, como GacA y UvrY, presentes en otras bacterias (Lapouge *et al.*, 2008). Este RR está codificado por el gen *ppoR*, que forma un operón junto a *Marme_2816*, que codifica una proteína similar a UvrC (Molina-Quintero, 2011). UvrC ha sido descrita formando parte de un sistema de reparación de DNA frente a diferentes tipos de estrés, como la luz UV (Crowley *et al.*, 2006). La similitud con las proteínas de otros sistemas de fosfotransferencia de otras bacterias, no sólo en cuanto a secuencia sino también en la organización del operón, sugieren que PpoR formaría parte de un sistema de fosfotransferencia encargado de regular las actividades oxidasa en *M. mediterranea* (Molina-Quintero, 2011).

PpoS y PpoR de *M. mediterranea* participan en el control de la expresión de la MCO PpoA, la tirosinasa PpoB, y de la proteína antimicrobiana LodA (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Sin embargo, mientras que la regulación de la actividad de LodA ocurre claramente a nivel transcripcional, en el caso de PpoA y, sobre todo, PpoB parecen intervenir también otros mecanismos post-transcripcionales. Además, PpoS y PpoR también participan en el control del crecimiento en medios limitados por nitrógeno y en la muerte celular en medios limitados por carbono (Molina-Quintero, 2011). La cepas de *M. mediterranea*, obtenidas mediante transposición, deficientes en PpoS y PpoR se han denominado mutante T103 (Lucas-Elío *et al.*, 2002) y mutante T102 (Lucas-Elío, 2003), respectivamente. Ambas cepas han sido empleadas en este trabajo.

I.2.1.3. Análisis genómico de *M. mediterranea*.

Nuestro grupo de investigación en colaboración con el “Joint Genome Institute” del Departamento de Energía de Estados Unidos, ha secuenciado los genomas de *M. mediterranea* MMB-1 (número de acceso CP002583) (Lucas-Elío *et al.*, 2012b) y de *M. posidonica* IVIA-Po-181 (número de acceso CP002771) (Lucas-Elío *et al.*, 2012a). Cabe destacar que la secuenciación del genoma de *M. mediterranea* MMB-1 ha sido de vital importancia para la consecución de este trabajo.

Mediante análisis bioinformáticos se han podido detectar en el genoma de *M. mediterranea* 2 genes similares a *lodA*, Marme_1655 y Marme_2396 (Lucas-Elío *et al.*, 2012b), ambos anotados como que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida. Esta fue una observación inesperada, ya que la delección de *lodA* en el mutante LD de *M. mediterranea* suponía la pérdida total de actividad lisina oxidasa (Gómez *et al.*, 2010). Puesto que LodA es la primera proteína de su grupo caracterizada, se consideró interesante estudiar si estos genes codificaban enzimas con una actividad diferente, lo que ha supuesto el punto de partida del presente trabajo.

II. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido la exploración de la actividad de enzimas codificadas por genes similares a *lodA*, tanto en *M. mediterranea* como en otros microorganismos. La hipótesis de partida es que codifican oxidasas, probablemente aminoácido oxidasas. Este objetivo general se puede desglosar en varios objetivos particulares:

1. Detección de nuevas aminoácido oxidasas en el mutante LD de *M. mediterranea*.
2. Caracterización de la glicina oxidasa detectada en *M. mediterranea* comparándola con otras enzimas similares descritas.
3. Detección del gen que codifica la glicina oxidasa y caracterización del operón que la contiene.
4. Expresión recombinante de Marme_1655 de *M. mediterranea* y caracterización de la proteína recombinante.
5. Estudio de la regulación del operón que codifica la nueva glicina oxidasa detectada en *M. mediterranea*.
6. Detección y análisis filogenético de genes que codifican proteínas similares a LodA/GoxA en genomas microbianos.
7. Identificación y caracterización de otras enzimas codificadas por genes similares a *lodA/goxA* en diversos microorganismos.

III. Materiales y Métodos

III.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Los microorganismos empleados en este trabajo están descritos en la tabla III.1. Para su conservación se prepararon stocks de los cultivos de dichos microorganismos en fase estacionaria, adicionando glicerol a una concentración final del 20 %, e inmediatamente se guardaron a -75 °C.

Tabla III.1. Cepas bacterianas empleadas en este estudio. Se indica el nombre de los microorganismos, sus características más significativas y su fuente de origen. En la columna central se indica en primer lugar la cepa a partir de la que deriva, seguidamente el genotipo y entre corchetes el fenotipo más relevante.

Cepas	Descripción y/o genotipo relevante	Fuente o referencia
<i>Marinomonas mediterranea</i>		
MMB-1 ^T	Cepa silvestre de <i>M. mediterranea</i> , Rif ^s , Gm ^s	(Solano <i>et al.</i> , 1997)
MMB-1R	MMB-1, Rif ^r espontánea	(Solano <i>et al.</i> , 2000)
LD	MMB-1R Δlod , [LOD ⁻]	(Molina-Quintero, 2011)
LGD	MMB-1R $\Delta lod \Delta gox$, [LOD ⁻], [GOX ⁻]	Este estudio
LGDAB	MMB-1R $\Delta lod \Delta gox \Omega$ mini-Tn10 Gm ^r <i>gox</i> , [LOD ⁻]	Este estudio
MMB-1RLAC0	MMB-1R Ω mini-Tn10 Gm ^r (<i>trp</i> '-' <i>lacZ</i>)	(Lucas-Elío <i>et al.</i> , 2002)
MMB-1RLACG1	MMB-1R Ω mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (207 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
MMB-1RLACG2	MMB-1R Ω mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (101 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
MMB-1RLACL1	MMB-1R Ω mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Plod</i> (252 pb)- <i>lacZ</i>)	(Molina-Quintero <i>et al.</i> , 2010)
T102	MMB-1R <i>ppoR</i> ::Tn10 Km ^r , [LOD ⁻ , GOX ⁻ , PPO ^{+/-} , MEL ^{+/-}]	(Lucas-Elío, 2003)
T102LAC0	T102 Ω mini-Tn10 Gm ^r (<i>trp</i> '-' <i>lacZ</i>)	(Lucas-Elío, 2003)
T102LACG1	T102 Ω mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (207 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
T103	MMB-1R <i>ppoS</i> ::Tn10 Km ^r , [LOD ⁻ , GOX ⁻ , PPO ^{+/-} , MEL ^{+/-}]	(Lucas-Elío <i>et al.</i> , 2002)
T103LAC0	T103 Ω mini-Tn10 Gm ^r (<i>trp</i> '-' <i>lacZ</i>)	(Lucas-Elío <i>et al.</i> , 2002)
T103LACG1	T103 Ω mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (207 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
PPOBDEL	MMB-1R, $\Delta ppoB$, [TIR ⁻ , MEL ⁻]	(Molina-Quintero, 2011)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\Phi 80$ <i>lacZ</i> $\Delta M5$) <i>hsdR17</i> <i>recA</i> <i>endA</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA</i>	(Hanahan, 1983)
UM202	<i>thi-1</i> HrfH <i>katG</i> ::Tn10', [Cat ^{+/-}]	(Loewen <i>et al.</i> , 1985)
S17-1(λ pir)	Km ^r ::Tn7 Tp ^r Sm ^r <i>recA</i> <i>ths</i> <i>hsdRM</i> ⁺ ; lisogenizada con el fago λ pir RP4::Mu::Km Tn7	(de Lorenzo y Timmis, 1994)
BL21(DE3)pRARE (Rosetta)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cm ^r)	Novagen
CD03	BL21(DE3) <i>katE12</i> ::Tn10 Km ^r , <i>katG</i> ::Tn5 Tc ^r , [Cat ^{+/-}]	(Kishishita <i>et al.</i> , 2003)

Otros microorganismos		
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	Cepa silvestre	(Todd <i>et al.</i> , 2007)
<i>Marinomonas</i> sp. MED121	Cepa silvestre	*
<i>Nisaea denitrificans</i> DSM 18348	Cepa silvestre	(Urios <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	Cepa silvestre	(Urios <i>et al.</i> , 2010)
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Cepa silvestre	(Brazilian National Genome Project Consortium, 2003)
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	Cepa silvestre	(Nierman <i>et al.</i> , 2001)
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	Cepa silvestre	(Ekborg <i>et al.</i> , 2005)

Abreviaturas utilizadas: *, proporcionada por el Dr. Jarone Pinhassi (Linnaeus University); Ω , se obtuvo por mutagénesis con el transposón que se indica a continuación; ::, el locus de inserción del transposón u otro elemento está bien caracterizado; Φ , fusión del fragmento del gen que se indica con el gen *lacZ*; Δ , delección del gen que se indica. En cuanto al fenotipo: GOX⁻, pérdida de la actividad glicina oxidasa.; LOD⁻, pérdida de la actividad lisina oxidasa.; TIR⁻, pérdida de la actividad tirosinasa; PPO⁻, pérdida de las actividades PPO; PPO^{+/-}, disminución de las actividades PPO; MEL⁻, amelanogénica; MEL^{+/-}, disminución de la síntesis de melaninas; Cat^{+/-}, disminución de la actividad catalasa.

III.1.1. Cepas de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo se describen en la tabla III.1. La cepa DH5 α fue usada para la construcción de los plásmidos. La cepa S17-1(λ *pir*) es lisogénica para un fago que expresa el gen *pir*, necesario para la replicación de plásmidos que contienen el origen de replicación *ori*-R6K, como es el caso del pBSL182 y sus derivados. Además contiene integradas en el cromosoma funciones RP4 de transferencia por conjugación que permiten la transferencia directa de dichos plásmidos a la cepa receptora. La cepa UM202, derivada de la cepa MP180 (Loewen y Triggs, 1984), tiene interrumpido el gen *katG* que codifica la catalasa HPI, por lo que se empleó en la realización de antibiogramas para la detección de actividad antimicrobiana debida a la liberación de peróxido de hidrógeno. Las cepas CD03(pRARE), y Rosetta, que es una BL21(DE3) conteniendo el plásmido pRARE, se emplearon rutinariamente para los ensayos de expresión recombinante. La CD03 es

una cepa BL21(DE3) que tiene interrumpidos los genes *katG* y *katE12*, que codifican catalasas, convirtiéndola en una cepa apropiada para la detección directa en extractos celulares de actividades enzimáticas que generan peróxido de hidrógeno.

Todas las cepas de *E. coli* se cultivaron normalmente, a partir del stock glicerol, en placas de medio LB a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las placas se conservaron a 4 °C durante un tiempo inferior a 7 días. Los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C con agitación orbital a 150 rpm. En los casos en que las cepas contenían vectores de clonación o transposones, los cultivos se suplementaron con los antibióticos correspondientes.

III.1.2. Cepas de *Marinomonas mediterranea* y otros microorganismos.

En este estudio se ha trabajado principalmente con la bacteria marina *M. mediterranea*, así como con algunos mutantes generados a partir de la misma. Las cepas empleadas derivan directa o indirectamente de la cepa MMB-1R, que es una variante espontánea resistente al antibiótico rifampicina (Rif^r) de MMB-1^T (CECT 4803), cepa silvestre aislada de aguas del mar Mediterráneo. La resistencia a rifampicina hace a MMB-1R especialmente útil en los experimentos de transferencia génica por conjugación como método de contraselección frente a *E. coli*.

Todas las cepas de *M. mediterranea* empleadas (tabla III.1) se sembraron a partir del stock glicerol en medio MMC o 2216 y se incubaron a 25 °C. Tras 2-3 días de crecimiento, las placas se conservaron a 15 °C siendo utilizadas para los experimentos durante un periodo siempre inferior a siete días. A partir de estas placas, las cepas se mantienen viables mediante transferencias en placas de medio MMC o 2216. Tras 2 o 3 resiembras, se volvía a utilizar los stocks de las cepas congeladas a -75 °C. Salvo que se indique expresamente otra cosa, los cultivos líquidos fueron incubados rutinariamente a 25 °C con agitación orbital (130 rpm).

En general, los cultivos en medio líquido se realizaron mediante inoculación de masa bacteriana procedente de un cultivo puro en placa, en un matraz de 100 mL con 10 mL de medio. Para cultivos a mayor escala se mantuvo esta proporción, por ejemplo utilizando matraces de un litro con 100 mL de medio. Con el fin de trabajar con cultivos homogéneos (en los que todas las células estuvieran en la misma fase de crecimiento) y mantener la reproducibilidad, el medio se inoculaba a partir de un precultivo en medio líquido y en fase estacionaria (16-24 h). Para ello, se recogían las células del precultivo mediante centrifugación, lavándolas 2 veces con SST y finalmente se resuspendían en un volumen 10 veces menor al del precultivo, siendo usada para la reinoculación de medio fresco a una DO_{600} inicial de 0,05. De esta forma se evita que cualquier producto secretado al medio en el precultivo sea inoculado en el cultivo a gran escala.

Los otros microorganismos empleados en este trabajo (tabla III.1) fueron cultivados, principalmente, con el fin de detectar nuevas actividades oxidasa. Las bacterias marinas *Marinomonas* sp. MWYL1 y MED121, *Nisaea denitrificans* DSM 18348, *Thalassobaculum salexigens* DSM 19539 y *Saccharophagus degradans* 2-40, fueron cultivadas generalmente en las mismas condiciones que *M. mediterranea*. Sin embargo, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12471 y *Caulobacter crescentus* CB15 fueron cultivadas a una temperatura ligeramente superior, 30 °C.

III.2. Plásmidos.

Los plásmidos empleados en este estudio se muestran en la tabla III.2, indicando la descripción y la fuente o referencia para cada vector.

Tabla III.2. Plásmidos utilizados en este trabajo. Se indica el nombre de los plásmidos, sus características más relevantes y su origen.

Plásmidos	Descripción y/o genotipo relevante	Fuente o referencia
Deleción e inserción del operón <i>gox</i>		
pEX18Gm	Gm ^r ; <i>oriT⁺sacB⁺</i> , vector para la deleción de genes. Contiene el MCS de pUC18.	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEX18GmGD	pEX18Gm conteniendo un fragmento de 818 pb aguas arriba (SacI-BamHI), y otro fragmento (BamHI-PstI) de 787 pb aguas abajo del operón <i>gox</i> .	Este estudio
pBLODAII	<i>oriR6K</i> , <i>mob</i> RP4, Amp ^R ; mini-Tn10 Km ^R , <i>lodA</i>	(Gómez, 2010)
pBGXAB	<i>oriR6K</i> , <i>mob</i> RP4, Amp ^R ; mini-Tn10 Km ^R , * <i>PgoxAB</i>	Este estudio
Expresión recombinante		
pET11b	<i>oriColE1</i> , Amp ^r , T7 promoter	Novagen
pETLODAB11	pET11b, <i>lodAB</i>	(Gómez <i>et al.</i> , 2010)
pETGOXB11	pET11b, <i>goxB</i>	(Chacón-Verdú <i>et al.</i> , 2015)
pETGOXAB11	pET11b, <i>goxAB</i>	Este estudio
pET15b	<i>oriColE1</i> , Amp ^r , T7 promoter	Novagen
pETLODAB15	pET15b, <i>lodAB</i>	(Chacón-Verdú <i>et al.</i> , 2014)
pETGOXAB15	pET15b, <i>goxAB</i>	Este estudio
pETNDGOX11	pET11b, <i>ndgox</i>	Este estudio
pETTSGOX111	pET11b, <i>tsgox1</i>	Este estudio
pETTSGOX211	pET11b, <i>tsgox2</i>	Este estudio
Fusiones LacZ		
pBGAL	pBSL182, mini-Tn10 Gm ^r (<i>trp^r-lacZ</i>)	(Lucas-Elío <i>et al.</i> , 2002)
pBPLOD1	pBSL182, mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Plod</i> (252 pb)- <i>lacZ</i>)	(Molina-Quintero <i>et al.</i> , 2010)
pBPGOX1	pBSL182, mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (207 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
pBPGOX2	pBSL182, mini-Tn10 Gm ^r Φ (<i>Pgox</i> (101 pb)- <i>lacZ</i>)	Este estudio
Otros plásmidos		
pRARE	Cm ^r , contiene genes para tRNAs que codifican codones poco frecuentes en <i>E. coli</i>	Novagen
pGro7	Cm ^r , expresa las chaperonas GroES-GroEL bajo el promotor <i>araB</i>	Takara
pG-KJE8	Cm ^r , expresa las chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE bajo el promotor <i>araB</i> y GroES-GroEL bajo el promotor <i>Pzt-1</i>	Takara
pG-Tf2	Cm ^r , expresa las chaperonas GroES-GroEL-Tig bajo el promotor <i>Pzt-1</i>	Takara

**PgoxAB*, hace referencia a los genes *goxA*, *goxB* y una zona de aproximadamente 200 pb aguas arriba de *goxA* que posiblemente contenga su región promotora; Φ, fusión del fragmento del gen que se indica con el gen *lacZ*.

III.3. Medios de cultivo.

A continuación se describen los medios de cultivo empleados en este trabajo. Para la preparación de medios sólidos, los medios de cultivo fueron suplementados con 13 g/L de agar (Difco). Cuando fue requerido, se adicionaron a los medios de cultivo antibióticos (Sigma) a una concentración adecuada. Para ajustar el pH de los medios se empleó ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH), según el caso.

III.3.1. Medios para *Marinomonas* y otras bacterias marinas.

- **2216:** Medio Marino (Pronadisa) o 2216 (Difco). Se trata de un medio complejo para el cultivo de bacterias heterótrofas marinas. Este medio se utilizó también para el cultivo de otras bacterias marinas como *Nisaea denitrificans*, *Thalassobaculum salexigens*, *Marinomonas* sp. MWYL1 y *Marinomonas* sp. MED121.
- **2216+Agar y 2216+Almidón:** Medio 2216 (Difco) al que se le adiciona agar o almidón estéril a una concentración final del 0,2 %. Estos medios se han utilizado para el crecimiento de *Saccharophagus degradans* 2-40.
- **MMC:** Medio Marino Complejo (Fernández *et al.*, 1999). Versión simplificada del medio 2216, siendo un medio rico apropiado para el cultivo de bacterias heterótrofas.

NaCl.....	20,0 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	7,00 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O.....	5,30 g/L
KCl.....	0,70 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	1,25 g/L
Peptona.....	5,00 g/L
Extracto de levadura.....	1,00 g/L
Citrato de hierro.....	0,10 g/L

K₂HPO₄..... 75,0 mg/L

El pH del medio se ajustó a 7,4 con NaOH

El citrato de hierro y el K₂HPO₄ se adicionaron al medio tras el autoclave a partir de una solución más concentrada, para evitar así su precipitación con otras sales.

➤ **MMCS:** Medio MMC al que se le adiciona sacarosa al 5 % tras el autoclavado.

➤ **SST:** Solución salina tamponada (Sánchez-Amat y Torrella, 1990) que reproduce las sales mayoritarias presentes en aguas marinas. Se utiliza como base para la preparación de medios mínimos. Composición:

NaCl..... 20,0 g/L

MgSO₄·7H₂O..... 7,00 g/L

MgCl₂·6H₂O..... 5,30 g/L

KCl..... 0,70 g/L

CaCl₂·2H₂O..... 1,25 g/L

Tris base..... 6,10 g/L

El pH del medio se ajustó a 7,4 con HCl

Esta solución también se preparó a 1,25X, para lo cual sus componentes se resuspendieron en un volumen final de 800 mL en lugar de 1 litro.

➤ **MGly:** Medio que contiene las sales de la SST y glicina como única fuente de carbono y nitrógeno. Se prepara adicionando a la SST autoclavada la cantidad indicada de los siguientes compuestos estériles:

FeSO₄·7H₂O..... 2,50 mg/L

K₂HPO₄..... 75,0 mg/L

Glicina..... 0,90 g/L

➤ **MNB:** Medio mínimo que contiene las sales de la SST y glucosa como fuente de carbono. Es un medio diseñado para estudiar el efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno. Se prepara adicionando a la SST autoclavada la cantidad indicada de los siguientes compuestos estériles:

FeSO₄·7H₂O..... 2,50 mg/L

K ₂ HPO ₄	75,0 mg/L
D-glucosa.....	5,40 g/L

Según la fuente de nitrógeno adicionada al MNB, se crearon los siguientes medios:

- **MNB+NH₄**: Medio mínimo MNB suplementado con 0,16 g/L de NH₄Cl.
 - **MNB+Lys**: Medio mínimo MNB suplementado con 0,55 g/L de L-lisina monoclóridato.
 - **MNB+Gly**: Medio mínimo MNB suplementado con 0,23 g/L de Glicina.
 - **Glc+YE**: Medio mínimo MNB suplementado con 0,10 g/L de extracto de levadura. El extracto de levadura induce la actividad GOX detectada en *M. mediterranea*, *N. denitrificans* y *T. salexigens*.
- **MNG**: Medio mínimo que contiene glucosa como principal fuente de carbono y L-glutamato como única fuente de nitrógeno (Molina-Quintero *et al.*, 2010) También denominado en este trabajo MNB+Glu. Se prepara adicionando a la SST autoclavada la cantidad indicada de los siguientes compuestos estériles:

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

Las modificaciones realizadas sobre este medio al añadir diferentes compuestos crearon los siguientes medios:

- **MNGL**: MNG suplementado con 0,55 g/L de L-lisina monoclóridato (Molina-Quintero *et al.*, 2010). La L-lisina adicionada a este medio induce las actividades GOX y LOD.
- **MNGLT**: MNG suplementado con 0,55 g/L de L-lisina monoclóridato y con 0,68 g/L de L- tirosina disódica (Molina-Quintero *et al.*, 2010). La L-tirosina adicionada a este medio reprime las actividades GOX y LOD.
- **MNGG**: MNG suplementado con 0,23 g/L de Glicina.

III.3.2. Medios de cultivo para *E. coli*, *C. violaceum* y *C. crescentus*.

- **LB:** Medio Luria-Bertani (Pronadisa) típico para el cultivo de *E. coli*. En este medio también se cultivó *C. violaceum*.

Triptona.....	10,0 g/L
Extracto de levadura.....	5,00 g/L
NaCl.....	10,0 g/L

- **LB 1 % de glucosa:** Medio LB suplementado con glucosa 1 %, usado con el fin de reducir los niveles de expresión basal de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión pET.

- **LB2216:** Se obtiene mezclando, tras autoclavar por separado, volúmenes iguales de LB con 15 g/L de NaCl, en vez de los 10 g/L habituales, y medio 2216. En este tipo de medio complejo son capaces de crecer tanto *E. coli* como *M. mediterranea*, por lo que ha sido utilizado en experimentos de conjugación. Para inducir la transposasa se adicionó además IPTG 0,5 mM (Sigma-Aldrich) (Solano *et al.*, 2000).

- **Medio MH:** El medio Mueller-Hinton (Oxoid) es un medio rico empleado en este trabajo para la realización de antibiogramas.

Infusión de carne.....	300 g/L
Hidrolizado de caseína.....	17,5 g/L
Almidón.....	0,58 g/L

- **Medio SOC:** Medio de recuperación de *E. coli* tras la electroporación (Hanahan *et al.*, 1991).

Triptona.....	20,0 g/L
Extracto de levadura.....	5,00 g/L
NaCl.....	0,58 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O.....	2,03 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	2,46 g/L
D-glucosa.....	3,60 g/L

- **M9:** Medio mínimo utilizado para la realización de antibiogramas frente a *E. coli* UM202 (Sambrock y Rusell, 2001) .

Na ₂ HPO ₄	6,00 g/L
KH ₂ PO ₄	3,00 g/L
NaCl.....	0,50 g/L
NH ₄ Cl.....	1,00 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,12 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O.....	5,00 mg/L
D-glucosa.....	2,00 g/L
Tiamina.....	10,0 mg/L

El pH del medio se ajusta a 7,4 con NaOH

Las 4 primeras sales se prepararon conjuntamente en una solución 5 veces concentrada con el pH ajustado a 7,4. A esta solución se le añaden el resto de componentes que se autoclavan por separado, excepto la tiamina que se esteriliza por filtración.

- **PYE:** Medio rico empleado para el cultivo de *C. crescentus* (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

Peptona.....	2,00 g/L
Extracto de levadura.....	1,00 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,20 g/L

III.4. Tampones utilizados.

III.4.1. Tampones para electroforesis de ADN. Geles de agarosa.

- **Tampón TAE (tris-acético-EDTA) (50X):** Tampón empleado para la electroforesis de ADN en agarosa. Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tris Base.....	242,28 g/L

Ácido acético glacial.....	57,0 mL/L
EDTA.....	14,6 g/L

- **Tampón de carga para electroforesis de ADN (10X):** Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Glicerol.....	5,00 mL
Azul de bromofenol.....	25,0 mg
Xileno cianol.....	25,0 mg
EDTA 20 mM pH 8,0.....	5,00 mL

Para electroforesis de plásmidos obtenidos por el método del STET, a este tampón se le añadió 37,5 µL de RNAsa (10 mg/mL) por cada mL de tampón de carga.

III.4.2. Tampones para electroforesis de proteínas. Geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

- **Tampón de recorrido (10X):** Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tris Base.....	30,0 g/L
Glicina.....	144 g/L
SDS.....	10,0 g/L

El pH del tampón tras disolver todos los componentes debe de ser de 8,3.

- **Tampón de carga para electroforesis de proteínas (3X):** Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tris-HCl 1,5 M pH 6,8.....	0,60 mL
Glicerol 75 %.....	1,00 mL
SDS 20 %.....	2,25 mL
Azul de bromofenol 20 %.....	37,5 µL
β-mercaptoetanol 14 M.....	1,11 mL

III.4.3. Tampones para purificación de proteínas en resina Ni-NTA agarosa.

- **Tampón de unión y lavado:** Empleado para la purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidinas.

NaH ₂ PO ₄	5,99 g/L
NaCl.....	29,2 g/L
Imidazol.....	1,36 g/L
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH	

- **Tampón de elución:** Empleado para la purificación de proteínas con etiqueta de poli-histidinas.

NaH ₂ PO ₄	5,99 g/L
NaCl.....	29,2 g/L
Imidazol.....	34,0 g/L
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH	

III.4.4. Otros tampones.

- **Tampón fosfato-NaCl:** utilizado para la medida de actividades oxidasa.

NaH ₂ PO ₄	5,99 g/L
NaCl.....	29,2 g/L
El pH se ajusta a 7,4 con NaOH	

- **Tampón Z:** empleado para medir actividad β-galactosidasa.

Na ₂ HPO ₄	5,99 g/L
KCl.....	0,75 g/L

MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,014 g/L
El pH se ajusta a 7,0 con NaOH	

- **STET:** Utilizado en las minipreparaciones de plásmidos mediante el método rápido del hervido (Holmes y Quigley, 1981).

Sacarosa.....	80,0 g/L
Triton X-100.....	5,00 mL/L
EDTA pH 8 500 mM.....	100 mL/L
Tris-HCl pH 8 1 M.....	50 mL/L

III.5. Obtención de la fracción celular y extracelular de cultivos de *M. mediterranea*.

Con el fin de realizar posteriores análisis, se obtuvo la fracción extracelular y la fracción celular de *M. mediterranea* tal y como se describe a continuación. Para la obtención del sobrenadante y la fracción celular de otros microorganismos empleados en este trabajo (tabla III.1) se procedió, si no se especifica lo contrario, tal y como se describe para *M. mediterranea*.

III.5.1. Fracción extracelular (sobrenadante).

Para la obtención de los sobrenadantes, los cultivos líquidos de *M. mediterranea*, tras el tiempo de incubación correspondiente, fueron centrifugados a 4000 xg durante 10 min en una centrífuga Hettich Universal 32R. El sobrenadante se consideró la fracción extracelular que contiene las proteínas secretadas por la bacteria.

III.5.2. Fracción celular (extractos).

Para la obtención de los extractos, el sedimento recogido tras la centrifugación de los cultivos para obtener la fracción extracelular descrito en el apartado anterior, podía ser guardado a -20 °C para su uso posterior o podía ser procesado inmediatamente. En ambos casos, dicho sedimento se resuspendió en tampón fosfato-NaCl y se sonicó con un sonicador Braun Labsonic U con una potencia relativa de 0,5 durante 4 min en ciclos de conexión/desconexión de 0,7/0,3 segundos. Durante todo el proceso de sonicación, los tubos se mantuvieron sumergidos en hielo con el fin de evitar el calentamiento de las proteínas y su desnaturalización. A continuación, las muestras se centrifugaron a 16000 $\times g$ durante 2 min a 4 °C con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido es el extracto celular y en él 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, ya que la presencia de catalasas en los extractos interfiere con nuestro sistema de medida en el fluorímetro.

III.6. Precipitación etanólica de las aminoácido oxidasas.

Puesto que nuestro sistema rutinario de medida de actividad oxidasa está basado en la detección del peróxido de hidrógeno generado en la reacción, las catalasas endógenas presentes en las muestras intracelulares de los microorganismos empleados pueden interferir en dichas medidas. Por ello, en la preparación de los extractos celulares se procedió a una precipitación con etanol de las enzimas de interés en todos los casos, excepto cuando se empleó la cepa CD03 de *E. coli*, que tiene disminuida su actividad catalasa (tabla III.1). Con este fin, a los extractos celulares se les adicionó dos volúmenes de etanol absoluto. La precipitación fue llevada a cabo a -20 °C durante 16 h. Después, las muestras fueron centrifugadas a 16000 $\times g$ durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet resultante se secó durante media hora aproximadamente para eliminar el etanol residual. Una vez seco, el pellet fue

resuspendido en un volumen menor de tampón fosfato-NaCl, óptimo para las medidas aminoácido oxidasa, concentrando normalmente los extractos unas 10 veces.

Aunque este procedimiento se siguió de forma rutinaria para la obtención de actividad en los extractos, ocasionalmente también se empleó el mismo protocolo con el fin de concentrar y purificar la actividad aminoácido oxidasa presente en los sobrenadantes de cultivos.

III.7. 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 del 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 como el Biuret, Lowry o el del ácido 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 llevaron a cabo en placas transparentes de fondo plano tipo ELISA de 96 pocillos (Nunc) en un volumen final de 200 μ L. Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente, tras los cuales se procedió a la lectura, en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific), de la absorbancia del color azul desarrollado a 595 nm.

III.8. Diálisis.

La diálisis es un procedimiento que se utiliza para eliminar sales y cambiar la composición del disolvente en una disolución. Cuando fue necesario este

procedimiento, se utilizaron las membranas Spectra/Por Biotech CE (de éster de celulosa) de medida de exclusión de 20 kDa, fabricadas por la casa Spectrum Lab. Antes de comenzar la diálisis de la muestra, las membranas se incubaron en agua destilada durante 30 min para eliminar la azida sódica en la que están conservadas.

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 h a temperatura ambiente haciendo un cambio de tampón a los 30 min. El tampón de diálisis utilizado fue generalmente el fosfato-NaCl.

III.9. Determinación de actividades aminoácido oxidasa.

Para detectar y determinar actividades aminoácido oxidasa, en este trabajo se han empleado fundamentalmente dos aproximaciones diferentes: ensayos de actividad enzimática y antibiogramas en placa.

III.9.1. Ensayos de actividad enzimática.

En este estudio hemos empleado un método enzimático acoplado a la producción de peróxido de hidrógeno o de amonio, con el fin de cuantificar la actividad aminoácido oxidasa presente en las muestras.

III.9.1.1. Determinación fluorimétrica de peróxido de hidrógeno.

Para determinar la presencia de actividad aminoácido oxidasa en las muestras se utilizó rutinariamente el ensayo fluorimétrico de detección de peróxido de hidrógeno

del “Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay” (Invitrogen) (Lucas-Elío *et al.*, 2006), en presencia de diferentes sustratos. Este método está basado en la determinación del peróxido de hidrógeno generado por la oxidasa (fig. III.1). La peroxidasa de rábano (HRP, peroxidasa de rábano) utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar con una estequiometría 1:1 el compuesto reducido Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), generando la resorufina, compuesto rojo fluorescente que tiene una excitación y una emisión máxima de fluorescencia a aproximadamente 571 y 585 nm respectivamente. La sensibilidad de este ensayo permite detectar hasta 10 picomoles de peróxido de hidrógeno en 100 μ L (100 nM de H_2O_2).

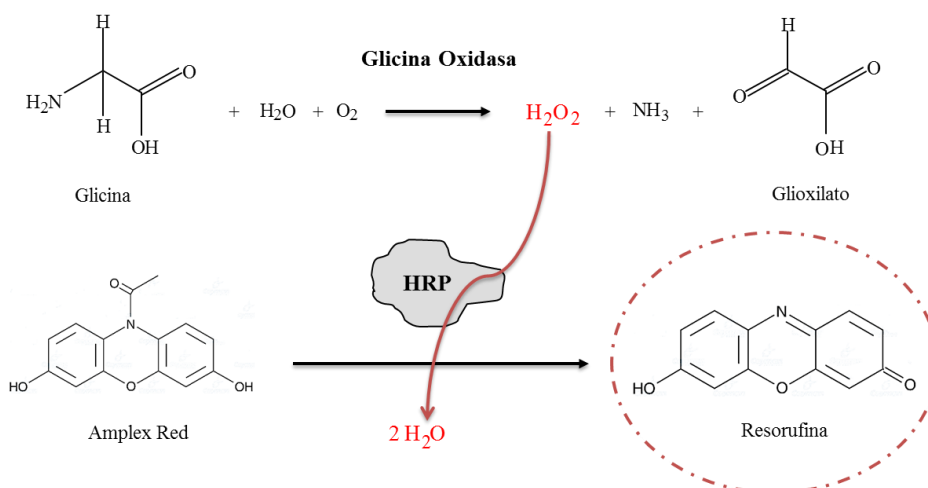


Figura III.1. Reacción acoplada de oxidación del Amplex Red por la peroxidasa de rábano (HRP) en presencia del peróxido de hidrógeno generado por la actividad GOX. Se destaca la resorufina detectada en el ensayo fluorimétrico.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas oscuras para fluorescencia tipo ELISA de 96 pocillos (Nunc) en volúmenes finales de 100 μ L. La mezcla de reacción contenía rutinariamente 20 mM de glicina (u otros sustratos) en tampón fosfato-NaCl, 0,05 mM de Amplex Red, 0,1 U/mL de HRP y 10 μ L de muestra. Con el fin de cuantificar la producción del H_2O_2 generado por la actividad GOX, se construyó una recta patrón usando concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. Para la caracterización enzimática de la glicina oxidasa de *M. mediterranea* y de *T. salexigens* se emplearon concentraciones variables del sustrato glicina, así como de otros posibles sustratos o inhibidores, según el objetivo.

Las reacciones se desarrollaron a 37 °C durante 15 min en un fluorímetro FLUOstar (BMG Labtech). La oxidación del Amplex Red se midió 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 de glicina u otros sustratos, se sustrajo para cada ensayo realizando los controles apropiados. Las actividades detectadas se expresaron en unidades relativas de fluorescencia por minuto de reacción (URF/min) y se normalizaron en función de los mg de proteína presentes en cada ensayo o en función de la DO_{600} del cultivo usada para la obtención de los extractos ensayados. De esta forma, y teniendo en cuenta que la ganancia del fluorímetro se mantuvo constante en 1500 unidades, fue posible comparar la actividad en diferentes condiciones de cultivo, expresándola como $URF \times \text{min}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$ o como $URF \times \text{min}^{-1} \times DO_{600}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$. En algunos casos, para evitar la saturación en la medida de fluorescencia, fue necesario diluir la muestra, lo cual fue tenido en cuenta a la hora de realizar los cálculos de actividad.

Para determinar la sensibilidad de la glicina oxidasa a los inhibidores típicos de quinoproteínas, las muestras se incubaron a diferentes tiempos con semicarbazida (1 mM), β -aminopropionitrilo (50 μM), hidroxilamina (100 μM), fenilhidrazina (100 μM) y metilhidrazina (100 μM). A diferencia de los otros inhibidores, la fenilhidrazina y la metilhidrazina requirieron una diálisis posterior a la incubación con la enzima, tal y como se describe en el apartado III.8, ya que la peroxidasa utilizada en el ensayo del Amplex Red se inhibe en presencia de estos compuestos. Puesto que este protocolo no consiguió la eliminación total de la fenilhidrazina y de la metilhidrazina en las mezclas de ensayo, se tuvo en cuenta la inhibición ejercida sobre la peroxidasa de rábano (HRP) realizando una medida de actividad añadiendo H_2O_2 10 μM . La actividad relativa de cada ensayo en presencia de los inhibidores está referida al mismo ensayo en su ausencia.

III.9.1.2. Determinación colorimétrica de peróxido de hidrógeno.

El ensayo del Amplex Red descrito en el apartado anterior y usado rutinariamente en las medidas fluorimétricas, también puede emplearse para seguir

espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 570 nm, longitud de onda donde absorbe la resorufina generada por la HRP. Las reacciones se llevaron a cabo en placas transparentes de fondo plano tipo ELISA de 96 pocillos (Nunc), siguiendo el incremento de absorbancia (ΔAbs) a 570 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). La mezcla de reacción y las condiciones utilizadas en este ensayo son idénticas a las descritas en el apartado anterior para el ensayo fluorimétrico. Las actividades detectadas se pueden expresar como incremento de absorbancia por minuto de reacción ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$).

Utilizando este método, podemos cuantificar la producción de H_2O_2 debida a la actividad GOX utilizando la ecuación de Lambert-Beer. Para ello, hay que tener en cuenta que la resorufina, producto de la oxidación del Amplex Red, posee un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $58,000 \pm 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

III.9.1.3. Determinación colorimétrica de la producción de amonio.

La generación de amonio, producto de la actividad GOX en la oxidación de la glicina, fue detectada a través de un ensayo espectrofotométrico mediante una reacción acoplada con la glutamato deshidrogenasa. Este método se basa en la detección de NH_3 siguiendo la pérdida de absorbancia a 340 nm que se produce por la oxidación del cofactor NADH (Job *et al.*, 2002a). La reacción es reversible, y está catalizada por la glutamato deshidrogenasa (fig. III.2).

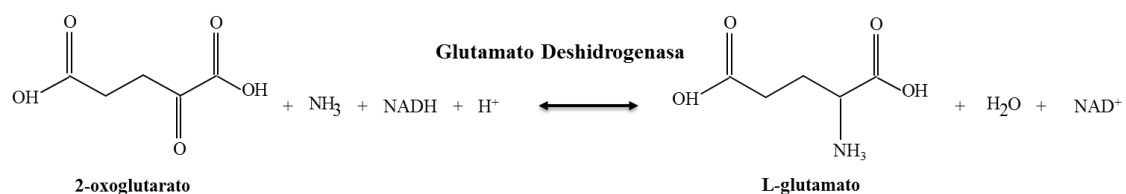


Figura III.2. Reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa para determinar la producción de amonio generado por la actividad GOX.

Las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 384 pocillos aptas para medidas en el rango UV (“384- well Corning, flat bottom plate”, Corning) y en volúmenes finales de 100 μL . La mezcla de reacción contenía rutinariamente 5 mM de 2-oxoglutarato, NADH

0,25 mM, 20 U/mL de glutamato deshidrogenasa de hígado bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM de glicina y 10 μ L de muestra, en tampón fosfato-NaCl. Mediante el uso de estándares de cloruro de amonio se realizó una recta patrón para cuantificar la producción de amonio.

Las reacciones se midieron siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm, durante 15 min, a 37 °C en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). La pérdida de absorbancia debida a la autooxidación espontánea del NADH se sustrajo para cada ensayo realizando los controles pertinentes. Las actividades detectadas se pueden expresar como incremento de absorbancia por minuto de reacción (Δ Abs/min). Cuantificamos la producción de NH_3 debida a la actividad GOX de dos formas distintas. Por un lado, podemos comparar el Δ Abs/min de la muestra con el de una recta patrón de NH_4Cl , pero también, mediante la ley de Lambert-Beer y conociendo que el coeficiente de extinción molar (ϵ) para el NADH es de $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, podemos calcular los moles de NADH que se utilizan en la reacción por minuto, que son los mismos que los de NH_3 ya que estamos hablando de una reacción equimolecular.

III.9.1.4. Definición de una Unidad de glicina oxidasa y comparación entre los diferentes métodos de medida.

Teniendo en cuenta que una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto a 37 °C, podemos definir que una unidad de Gox cataliza la oxidación de glicina para formar 1 μ mol de peróxido de hidrógeno, amonio o glioxilato, en un minuto a 37 °C.

III.9.2. Antibiógramas.

Mediante la realización de antibiógramas se detectó la actividad antimicrobiana de la glicina oxidasa. El microorganismo empleado como cepa test en los antibiógramas fue *E. coli* UM202. Esta cepa está mutada en el gen que codifica la catalasa HPI, siendo más sensible al peróxido de hidrógeno que la cepa silvestre (Loewen *et al.*, 1985).

Para los ensayos se preparaba una suspensión de UM202 en NaCl 0,85 % ajustando la DO₆₀₀ a 0,2 a partir de un cultivo en placa de LB. A partir de esta suspensión y con ayuda de un hisopo de algodón hidrófilo se sembraba el césped sobre el que se realizaba el antibiógrama, generalmente en medio MH. Para la realización de los antibiógramas, en ocasiones se utilizaron fragmentos de SDS-PAGE con el fin de determinar el tamaño aproximado de las fracciones proteicas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, generalmente se utilizaban discos de papel para analizar muestras líquidas. Los discos de celulosa en blanco (de 6 mm de diámetro), que se cargaban con 20 µL de las muestras objeto de estudio se obtenían a partir de láminas de Filter Paper Backing (BioRad). Tras depositar sobre ellos la alícuota a analizar, los discos cargados se dejaban secar completamente antes de depositarlos sobre las placas, no dejando nunca transcurrir más de 15 min entre la siembra de la placa y la deposición de dichos discos. Transcurridos 2 días de incubación de las placas a 25 °C, se procedía a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición.

III.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato 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 de migración en

función de su masa molecular, favoreciendo así la separación de las proteínas. Para el desarrollo de estas electroforesis se utilizó una cubeta Mini Protean II y una fuente de alimentación PowerPac Basic, ambos 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 rutinariamente 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.4.2.

Las muestras a ensayar se diluían previamente en proporción 2:1 (v/v) con tampón de carga (apartado III.4.2), 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 desnaturalizantes (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 desnaturalización de las proteínas, según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las electroforesis no desnaturalizantes (no inactivantes), sin tratamiento térmico, se utilizaron cuando era necesario mantener la forma activa de las proteínas para su localización y detección. En este caso se continuó utilizando el mismo tampón de carga, ya que ninguno de sus componentes altera aparentemente la actividad de las oxidasas objeto de estudio, tal como se comprobó mediante la realización de antibiogramas, sino que permite una mejor definición de las bandas proteicas (Lucas-Elío, 2003).

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

III.10.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie en geles SDS-PAGE.

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 entre 2 h a toda la noche, según la cantidad de proteína aplicada 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 min y guardados en agua destilada a 4 °C.

III.10.2. Ensayos de actividad a partir de geles SDS-PAGE en el fluorímetro y mediante la realización de antibiogramas.

Para revelar la actividad oxidasa o antimicrobiana cargada en los geles de acrilamida, una vez terminada la electroforesis realizada en las condiciones no desnaturalizantes descritas anteriormente, el gel se fijó durante 2 h mediante un tratamiento con una solución de 10 % de ácido acético y 20 % de isopropanol (Bhunja *et al.*, 1987). Posteriormente el gel se lavó 2 h con agua destilada, cambiando el agua varias veces para eliminar los restos de la solución de fijación. Tras este proceso, el gel se cortaba en fragmentos iguales para realizar ensayos en el fluorímetro o antibiogramas con el fin de detectar el tamaño aproximado de las proteínas con actividad. En el ensayo fluorimétrico de detección de H₂O₂ se procedió tal y como se describe en el apartado III.9.1.1, pero sustituyendo los 10 µL de muestra por los fragmentos de gel y ajustando a 200 µL el volumen final en el pocillo. Para realizar los antibiogramas, los fragmentos de gel se depositaban sobre una placa de MH sembrada con un césped de la cepa UM202 como se indica en el apartado III.9.2. A continuación se comparaban los fragmentos con actividad detectados en el fluorímetro, o con actividad inhibitoria del

crecimiento en las placas de antibiograma, con las bandas teñidas con azul Coomassie de calles paralelas del mismo gel, para poder correlacionar fracciones proteicas específicas con la actividad enzimática.

III.11. Concentración de GoxA.

En el apartado III.6 hemos descrito la precipitación etanólica como procedimiento usado en ocasiones para concentrar y purificar la actividad GOX. Con el fin de mejorar el rendimiento obtenido con esta técnica, se ensayaron algunas alternativas usando sobrenadantes de cultivos de *M. mediterranea* LD. Primero se intentó la técnica “salting out” o precipitación con sulfato de amonio. Más tarde, se ensayó la precipitación con disolventes orgánicos, por lo que se probó además del etanol, la acetona. En ambos casos se ensayaron diferentes relaciones de sobrenadante:agente precipitante (Roe, 2006), aunque con ninguno de estos métodos se obtuvo un buen rendimiento. Por último se probó la concentración de la actividad con filtros de membrana Amicon de tamaño de poro controlado de hasta 30 kDa (Millipore), obteniéndose mejores resultados que los dos métodos anteriores. Por ello, finalmente se adoptó este método cuando fue necesario obtener muestras concentradas con mayor actividad GOX. Para ello, los sobrenadante se concentraron hasta el volumen deseado mediante centrifugación a 4 °C siguiendo las recomendaciones dadas por la casa comercial.

III.12. Manipulación del ADN.

III.12.1. Aislamiento de muestras de ADN.

Para aislar el ADN genómico de las cepas bacterianas se empleó el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). Siguiendo las recomendaciones ofrecidas por la

casa comercial, se obtienen 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 rehidratación del ADN bacteriano.

Cuando era necesario obtener ADN plasmídico para experimentos de clonación o para secuenciación, la extracción se realizó empleando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las recomendaciones dadas por la casa comercial. Para confirmar las construcciones, generalmente se realizó la purificación de ADN por el método rápido del hervido STET (Holmes y Quigley, 1981), siguiendo el protocolo de obtención de minipreparaciones de plásmidos con pequeñas modificaciones.

III.12.2. Amplificación del ADN por PCR.

La amplificación del ADN mediante PCR se realizó con las enzimas KOD Hot Start Master Mix (Novagen) o con la Taq polimerasa (Biotools). 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, la polimerasa usada 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, 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 μM de cada cebador. El primer paso fue siempre una desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min y luego se realizó un número variable de ciclos (30-35) cada uno con un paso de desnaturalización (20 segundos a 95 $^{\circ}\text{C}$), hibridación (10 segundos a la temperatura de fusión de los cebadores) y extensión (a 70 $^{\circ}\text{C}$ 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 °C durante 1 min.

Los cebadores empleados en las distintas amplificaciones se muestran en la tabla III.3.

Tabla III.3. Cebadores empleados en este trabajo. Se muestra el nombre de los oligonucleótidos con sus respectivas secuencias indicando si son directos (d) o reversos (r). En minúsculas se indican aquellas bases que no hibridan, generalmente introducidas para crear sitios de restricción. El sitio de reconocimiento por enzimas de restricción aparece subrayado.

Cebador	Secuencia
Deleción, inserción y expresión recombinante del operón <i>gox</i>	
GoxDIRSac (d)	5'- ACGCTTTGgAGCTCATACTACTG -3'
GoxREVBam (r)	5'- CGTCCTATCTggATCCATTAATATGAAA -3'
GoxDIRBam (d)	5'- CGCACAAGGaTCcCTAACGGTTTC -3'
GoxREVPst (r)	5'- TATAGGGAGAActGCAGGGGAAAAC -3'
pGODIRKpn (d)	5'- TACACTTCaggTACCTTCCTTATACAAC -3'
GOREVPst1 (r)	5'- CATTATCCGTTTTGACCTgCagAGTGG -3'
GOSEC1 (d)	5'- GAAATCCCACCGTTTACAAC -3'
GoREVSEC2 (r)	5'- CCTCGGAGTTTGGACGTTG -3'
GODIRNdeI (d)	5'- GATAGGACGATcatATGCAAAATGACGG -3'
GOREVSma1 (r)	5'- GTTTTGACCTACACccgGGTTAATTGATG -3'
Determinación del operón <i>gox</i>	
1655REV2 (r)	5'-TCAGAATCATCAAGAGATTTCG-3'
1654REV2 (r)	5'-CAGCGGCATCTCCAATTGC-3'
1653REV2 (r)	5'-CGTGTTATCGTTGATGATGAG-3'
1656DIR1 (d)	5'-GCATTCTAATTTGAGAGCCG-3'
1655DIR1 (d)	5'-GAAATCCCACCGTTTACAAC-3'
1655REV1 (r)	5'-AACTGGTACTGCTGATGCGG-3'
1654DIR1 (d) (GOXBDirEco)	5'-atcgaattCAAAATGGAATCGATCGAATACAAAG-3'
1654REV1 (r)	5'-CCTCGGAGTTTGGACGTTG-3'
1653REV1 (r)	5'-GACGGCTCAATGTTTTCAGC-3'
5'-RACE <i>gox</i>	
GSP1GOXRev (r)	5'-GTTTGACGGTTTCTTCATTCC-3'
GSP2GOXRev (r)	5'-TCAAACGCATAAATTCGAAAGC-3'
GSPNestedGOXRev (r)	5'-CGCCTACACGACAGATTCC-3'
AAP (d)	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGIIIG-3'
AUAP (d)	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
Fusiones del promotor <i>gox</i> con el gen <i>lacZ</i>	
pGODIREco1 (d)	5'- CCGAGACAAgAATtCACTTCATATACC-3'
pGODIREco2 (d)	5'- CCTTGgaATTcCTATACTCTGATATTAAG-3'
GoxREVBam (r)	5'- CGTCCTATCTggATCCATTAATATGAAA-3'
Expresión recombinante de los operones <i>ndgox</i>, <i>tsgox1</i> y <i>tsgox2</i>	
NisGoxDIRNde (d)	5'- ACGGGGAGAAccataTGGGACGGAAATTTT-3'
NisGoxREVBamH (r)	5'- CAGGCAAGGGATCCGGGTGAAAG-3'
Th1GoxDIRNde (d)	5'- GAGGAGCGcatATGGGCGACGGAAG-3'
Th1GoxREVBamH (r)	5'- GGAGACGGATcCGGGGGATTG-3'
Th2GoxDIRNde (d)	5'-GCATGGGGATTcatATGCCAGACAAGACAG-3'
Th2GoxREVBpu2(r)	5'-TGAAATCTTGctcAGCTTCATGTCATCC-3'

Por otra parte, en las reacciones de amplificación de fragmentos de ADN para comprobar las construcciones, se utilizó la Taq polimerasa. La mezcla de reacción contenía 0,25 μ M de cada cebador y 0,2 mM de cada desoxinucleótido. El inicio de la reacción consistió siempre en un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 min. Posteriormente, se realizaron 25-35 ciclos en los que había un paso de desnaturalización (1 min a 94 °C), hibridación (1 min a la temperatura de fusión de los cebadores) y extensión (a 72 °C durante un tiempo variable según el tamaño de ADN a amplificar, teniendo en cuenta la recomendación de 1 min por cada Kpb a amplificar). Tras el último ciclo, se aplicó un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min.

Tras la amplificación, en caso de que el producto fuera a ser utilizado para digestión y clonación, los fragmentos obtenidos mediante PCR se purificaron utilizando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche), que elimina los productos pequeños remanentes de la PCR, entre los que se encuentran los cebadores y los nucleótidos excedentarios.

III.12.3. Tratamiento enzimático del ADN.

Los tratamientos enzimáticos del ADN utilizados se describen a continuación.

➤ 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 y 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 de la enzima.

➤ **Desfosforilación.**

En algunas ocasiones, para evitar la autoligación de los vectores, los extremos 5' del ADN digerido se desfosforilaron utilizando la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche). Para llevar a cabo dicho procedimiento, primero, las enzimas de restricción deben de inactivarse mediante 15 min a 65 °C. Después, aproximadamente 50 ng de plásmido digerido se trató con 1 µL de fosfatasa alcalina y se incubó durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, para inactivar la fosfatasa, la muestra se incubó 15 min a 65 °C.

➤ **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 molecular de vector:inserto de 1:3.

III.12.4. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos.

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.4.1). Tras teñir con el colorante de ácidos nucleicos GelRed (Biotium) entre 15-30 min, se observaron las bandas con radiación UV utilizando el transiluminador microDOC (Vilber Lourmat). El tamaño de los fragmentos obtenidos se comparó con el patrón 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, la bandas separadas se visualizaron con radiación UV a una baja intensidad (70 %) y se cortaron las de interés (Sambrock y Rusell, 2001). Para

extraer el ADN de la agarosa se utilizó el kit comercial QIAquick de extracción de ADN (Qiagen).

III.12.5. Secuenciación del ADN.

Generalmente, 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 DNA Purification System (Promega) eluyéndolos en agua, y se enviaron a secuenciar. En otras ocasiones, el ADN amplificado tras la PCR fue tratado con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche), para limpiar los oligos y productos de amplificación no deseados, y fue mandado directamente a secuenciar. Cuando fue necesaria una mayor concentración y/o pureza de los plásmidos o fragmentos a secuenciar, se utilizó el kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research). La secuenciación fue realizada por la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

III.12.6. 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). En esta técnica es necesario la preparación de células de *E. coli* electrocompetentes. Las cepas de *E. coli* utilizadas están descritas en la tabla III.1.

Para la preparación de células electrocompetentes se partió de un cultivo de 16 h de la cepa correspondiente 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 las siguientes proporciones (v:v): 1:1, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:500. Finalmente,

las células resuspendidas del último lavado se distribuyeron en tubos en alícuotas de 40 μ L e inmediatamente se guardaron a -75 °C, quedando listas para su uso posterior.

Una vez preparadas, las células electrocompetentes fueron transformadas con ADN procedente de una ligación o de una minipreparación plasmídica. A estas células se les añadió 1-2 μ L 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 μ F y 400 Ω . Tras el choque eléctrico, las células se recuperaron durante 1 h en 1 mL de medio SOC (apartado III.3.2). A continuación se sembraron en placas de LB con el antibiótico correspondiente para su selección y se incubaron o/n a 37 °C.

III.12.7. Mutagénesis por transposición y conjugación en *M. mediterranea*.

La mutagénesis con transposones en *M. mediterranea* se llevó a cabo mediante vectores plasmídicos movilizables de amplio rango de hospedadores (Solano *et al.*, 2000). Los vectores utilizados, derivados del pBSL182 (Alexeyev y Shokolenko, 1995), contienen el origen de replicación R6K, de manera que se replican únicamente en cepas bacterianas que sintetizan la proteína π , codificada por el gen *pir*, como S17-1(λ *pir*) (Miller y Mekalanos, 1988). En *M. mediterranea*, que no sintetiza la proteína π , los vectores anteriores se comportan como plásmidos suicidas, lo cual puede ser aprovechado para generar mutantes por transposición. Los vectores utilizados contienen un transposón con un marcador de selección que sólo se mantiene en la cepa receptora de *M. mediterranea* si tras la conjugación tiene lugar el proceso de transposición, generando de esta forma una mutación en la cepa receptora. Los transposones usados son de la serie mini-Tn10, que dan en *M. mediterranea* una inserción única y al azar (Solano *et al.*, 2000).

Para realizar la conjugación, se partió de cultivos de 16 h 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, las cepas se reinocularon en los mismos medios líquidos pero sin la adición de antibióticos, dejándolos crecer hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 4 h). 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 y Timmis, 1994). Asimismo, la agitación de los cultivos de *E. coli* debe ser suave (50 rpm) para no romper los pili que median la transferencia del material génico. A continuación se depositaron 40 μ L del cultivo de *M. mediterranea* en una placa de medio LB2216 (apartado III.3.2). Cuando la gota anterior se absorbió por el medio (1 h aproximadamente), se depositaron otros 40 μ L del cultivo de *E. coli* con el plásmido a transferir en el mismo punto de la placa. Como control, ambas cepas se sembraron también por separado en medio LB2216. Una vez secas, las placas se incubaron a 25 °C durante 24 h. 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 transposón en cada conjugación. De esta manera sólo crecen los mutantes de *M. mediterranea* en los que haya tenido lugar la inserción del transposón. *E. coli* no crece en estos medios por ser Rif^S.

III.13. Delección e inserción del operón *gox* en *M. mediterranea*.

El primer paso para delecionar el operón *gox* en *M. mediterranea* fue la clonación, en el plásmido pEX18Gm (Hoang *et al.*, 1998), de sendas secuencias aguas arriba y abajo del operón, denominadas fragmento α y β respectivamente. El vector pEX18Gm es un plásmido suicida en *M. mediterranea* que codifica resistencia a Gm y que contiene el MCS de pUC18, el marcador de contraselección *sacB* y un *oriT* que media su transferencia mediante conjugación (Gay *et al.*, 1983; Hoang *et al.*, 1998). A partir de la cepa LD se generó el mutante, con la delección del operón *gox*, LGD (delección de la lisina y glicina oxidasa). Para ello, se realizó la construcción pEX18GmGD (fig. III.3A)

como se describe a continuación. Primero, se clonó, en los sitios de restricción SacI y BamHI, el fragmento α de 818 pb aguas arriba del operón *gox*, generado mediante PCR con los cebadores GoxDIRSac-GoxREVBam (tabla III.3). Esta construcción con el fragmento α se utilizó para clonar, en los sitios de restricción BamHI y PstI, el fragmento β de 787 pb aguas abajo del operón obtenido mediante PCR con los cebadores GoxDIRBam-GoxREVPst (tabla III.3).

Una vez construido el vector pEX18GmGD, éste fue introducido en la cepa S17-1(λ pir) de *E. coli* mediante electroporación tal y como se describe el apartado III.12.6. Posteriormente se llevó a cabo la conjugación (apartado III.12.7) entre esta cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido y la cepa LD de *M. mediterranea*, que es resistente a Rif lo que le permitió contraseleccionar *E. coli* (Solano *et al.*, 2000). Los transconjugantes que integraron el plásmido en el cromosoma por recombinación homóloga entre los fragmentos de DNA en el cromosoma y en el plásmido se seleccionaron en placas de MMC con Rif y Gm. Posteriormente, algunas de estas colonias se cultivaron en medio líquido MMC, a 25 °C durante 16 h con agitación a 130 rpm y en ausencia del antibiótico para seleccionar la recombinación necesaria para la escisión del plásmido que conlleva la pérdida del operón. Una vez crecido el cultivo líquido, se realizaron varias diluciones y posteriormente se sembraron en placas de medio MMC con sacarosa (MMCS, apartado III.3.1), que fueron incubadas a 25 °C durante 2 días. El plásmido pEX18GmGD contiene el gen *sacB* que codifica la enzima levanosacarasa y que es letal cuando la bacteria crece en presencia de sacarosa (Gay *et al.*, 1983). Por ello, aquellas colonias que lograron crecer en placas de MMCS, podían ser el resultado de la pérdida del plásmido mediante un proceso de recombinación homóloga, que implicaba la pérdida del marcador *sacB* y del marcador de resistencia a la Gm. En un primer muestreo de los mutantes obtenidos, éstos se cultivaban en MMCS con Gm para comprobar la ausencia de crecimiento para aquellos en los que había tenido lugar la segunda recombinación.

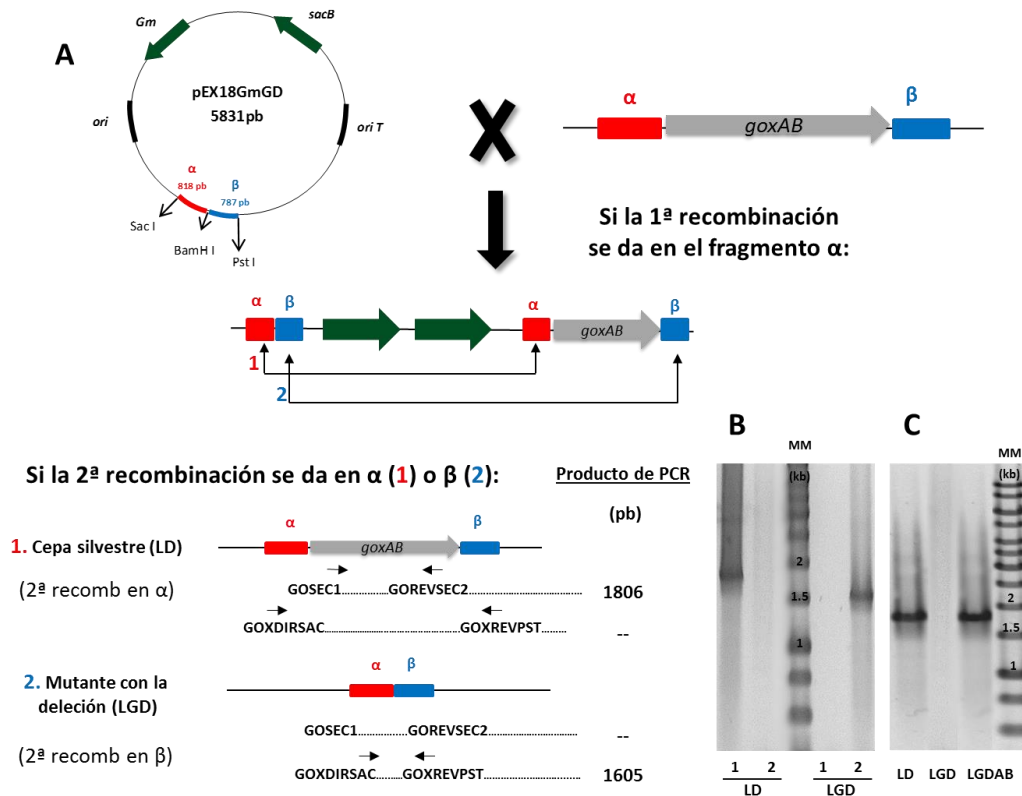


Figura III.3. Esquema del proceso para la obtención de la cepa con la deleción en el operón *gox* (LGD). **A**, esquema mostrando el resultado si la primera recombinación homóloga fuera en el fragmento α , y la segunda recombinación se diera entre los fragmentos α (1) o β (2), originando el genotipo de la cepa silvestre o el mutante con la deleción LGD, respectivamente. Se indica la región aguas arriba (α , en rojo) y aguas abajo (β , en azul) utilizadas para generar la deleción, así como los primers y el tamaño de los productos de PCR esperados en cada caso. **B**, confirmación por PCR de la deleción de *goxAB*. 1, PCR con cebadores internos (GOSEC1-GOREVSEC2). 2, PCR con cebadores externos (GOXDIRSAC-GOXREVPST) donde no se observa producto de PCR en la cepa LD debido a las condiciones de la PCR. **C**, confirmación por PCR con cebadores internos (GOSEC1-GOREVSEC2) de la reintroducción de *goxAB* en la cepa LGD.

Dependiendo del sitio donde tenga lugar la segunda recombinación se puede regenerar una cepa con el fenotipo silvestre, o se puede obtener una cepa con la deleción de interés (fig. III.3A). Para distinguir entre ambas posibilidades se realizaron 2 PCRs. En la primera de ellas se utilizaron cebadores internos del operón, GOSEC1 y GOREVSEC2 (tabla III.3) y por tanto sólo podían dar un producto en el caso de que se regenerara el genotipo silvestre. En la segunda PCR de comprobación de la deleción, se utilizaron cebadores externos, GoxDIRSac y GoxREVPst (tabla III.3), en unas condiciones en las que el tiempo de extensión determinaba que sólo se detectara una banda cuando dichos cebadores están próximos como consecuencia de la deleción (fig.

III.14. Expresión heteróloga de proteínas en *E. coli*.

III.14.1. Construcción de plásmidos para la expresión recombinante de los operones *gox*, *ndgox*, *tsgox1* y *tsgox2*.

Para expresar recombinantemente los operones *gox* (de *M. mediterranea*), *ndgox* (de *Nisaea denitrificans*), *tsgox1* y *tsgox2* (ambos de *Thalassobaculum salexigens*) se empleó el vector de expresión pET11b (Novagen). Este vector (Amp^r) contiene un promotor dependiente de la polimerasa de RNA del fago T7, situado aguas arriba del operador *lac*. La localización del operador *lac* entre el promotor y el inicio de la transcripción bloquea la expresión del gen. Dicha expresión se induce mediante la adición al medio de análogos de la lactosa (como el IPTG).

Para construir el plásmido pETGOXAB11 (fig. III.5), se partió del pETGOXB11 (Chacón-Verdú *et al.*, 2015) que contiene clonado el gen *goxB*, el cual posee un sitio de restricción *SacI* en medio de su secuencia. A partir de genómico de la cepa MMB-1R de *M. mediterranea* se amplificó el operón *gox* completo, que contiene los genes *goxA* y *goxB*, usando los cebadores GODIRNdeI y GOREVSmaI. Este fragmento amplificado fue digerido con NdeI y *SacI*, y clonado en el pETGOXB11, sustituyendo en el vector el fragmento de *goxB* cortado con estas enzimas.

Con el fin de purificar la glicina oxidasa de *M. mediterranea*, el operón *gox* se clonó en el vector de expresión pET15b generando el plásmido pETGOXAB15 (fig. III.5). En este vector, GoxA queda unida a una cola de poli-histidinas en su extremo N-terminal que permite la purificación de la proteína mediante una matriz de afinidad con níquel (ver más adelante, apartado III.14.4). En esta construcción se utilizó el vector de expresión pETLODAB15 (Chacón-Verdú *et al.*, 2014), sustituyendo su inserto *lodAB* por *goxAB* (operón *gox*), presente en la construcción pETGOXAB11, mediante digestión con NdeI-

EcoRI. De esta forma se intercambia también la zona que queda aguas abajo del operón, desde BamHI hasta el sitio EcoRI, que es idéntica en el pET11 y en el pET15.

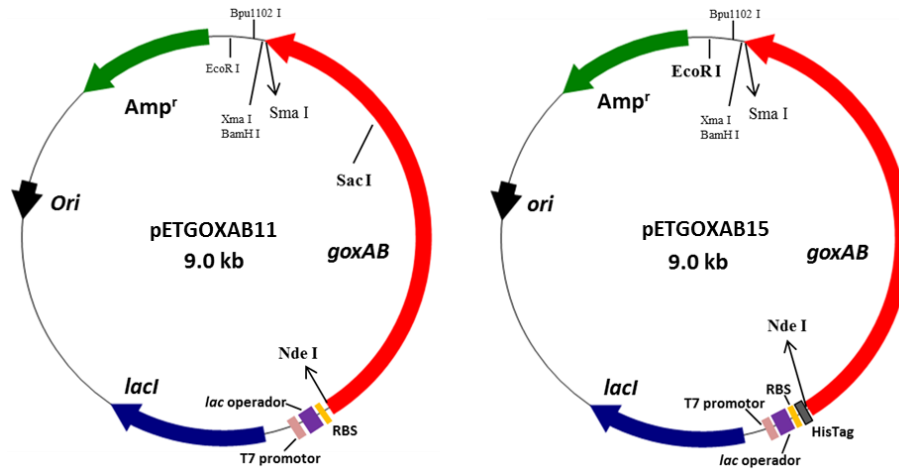


Figura III.5. Esquema de los plásmidos empleados para la expresión heteróloga de la glicina oxidasa de *M. mediterranea*. En el plásmido pETGOXAB15, GoxA queda unida a una cola de poli-His en su extremo N-terminal que facilita su purificación posterior.

Para clonar los operones *ndgox*, *tsgox1* y *tsgox2*, se utilizó el vector pET11b directamente. *ndgox* se amplificó mediante PCR con los cebadores NisGoxDIRNde y NisGoxREVBamH a partir de genómico de *N. denitrificans* DSM 18348, mientras que para amplificar *tsgox1* se emplearon los cebadores Th1GoxDIRNde y Th1GoxREVBamH y genómico de *T. salexigens* DSM 19539. Estos fragmentos fueron introducidos en los sitios de restricción NdeI y BamHI del pET11b, generando los plásmidos pETNDGOX11 y pETTSGOX111 (fig. III.6). Dado que el operón *tsgox2* contiene un sitio BamHI en su secuencia, se tuvo que emplear otra enzima de restricción para su clonación. Tras amplificar dicho operón con los cebadores Th2GoxDIRNde y Th2GoxREVBpu2 a partir de genómico de *T. salexigens* DSM 19539, este fragmento fue clonado en los sitios de restricción NdeI y Bpu1102I del pET11b, originando el vector de expresión pETTSGOX211 (fig. III.6).

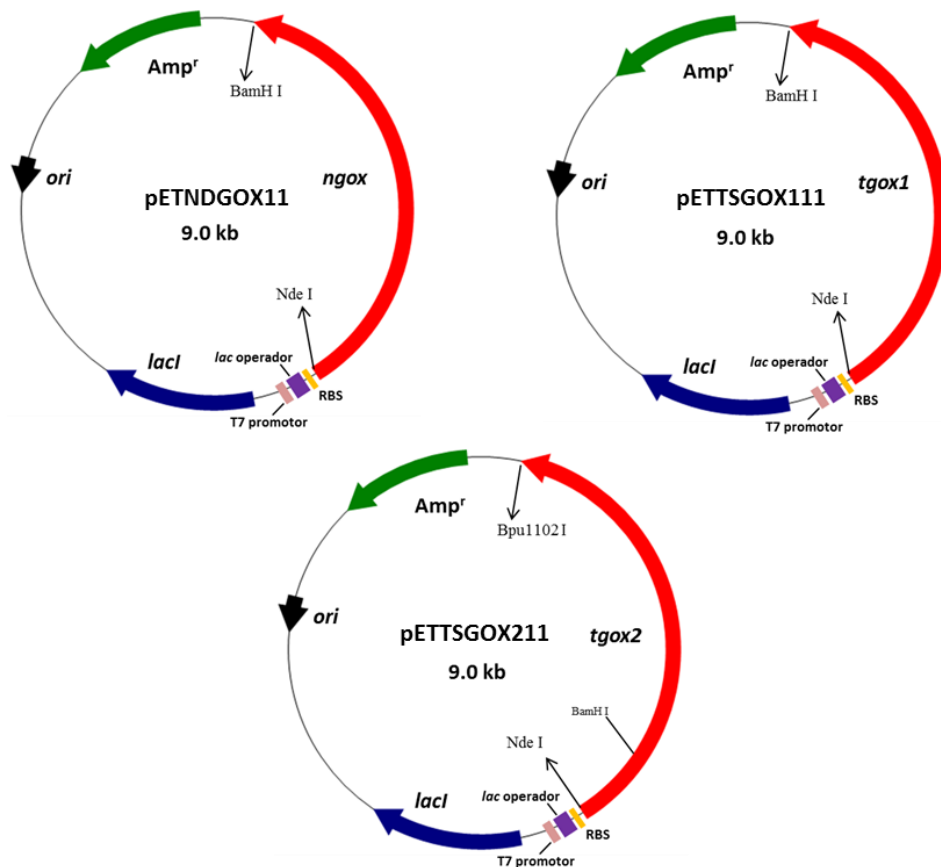


Figura III.6. Esquema de los plásmidos pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211 empleados para expresar recombinantemente los operones *ndgox*, *tsgox1* y *tsgox2*, respectivamente.

III.14.2. Crecimiento e inducción de la expresión.

Para inducir la expresión de proteínas en *E. coli* BL21(DE3)pRARE o en *E. coli* CD03, colonias recién transformadas con los vectores que contienen los operones *gox*, *ndgox*, *tsgox1* y *tsgox2*, descritos en el apartado anterior y en la tabla III.2, se inocularon en medio LB líquido (suplementado con Amp 100 µg/ml y con glucosa al 1 %) y se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Alcanzada dicha densidad óptica, a partir de estos precultivos se inocularon en el mismo medio cultivos con una DO₆₀₀ inicial de 0,015 aproximadamente (3 ml de los cultivos anteriores 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 tiempos, diferentes temperaturas o diferentes concentraciones de IPTG, por lo que las condiciones se especificarán en el apartado de resultados para cada caso concreto.

En los experimentos de coexpresión con plásmidos que codifican chaperonas (tabla III.2), el medio inoculado a partir de los precultivos debía contener, además de Cm 20 µg/ml (marcador de selección en estos plásmidos), el agente inductor de dichas chaperonas ya que, como indica el protocolo de la casa comercial, las chaperonas deben de expresarse antes de inducir las proteínas recombinantes. Estos inductores fueron: arabinosa (Ara) 0.5 mg/mL en el caso del plásmido pGro7, tetraciclina (Tc) 5 ng/mL para pG-Tf2 y ambos, Ara y Tc, cuando se usaba el plásmido pG-KJE8. Con el plásmido pRARE (tabla III.2) sólo fue necesaria la adición de Cm 20 µg/ml.

III.14.3. Aislamiento de fracciones celulares del sistema recombinante.

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

➤ **Fracción soluble (FS) o extractos celulares.**

La fracción soluble comprende las proteínas que se encuentran de forma soluble 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 16000 xg durante 2 min. El sedimento se resuspendió en tampón fosfato-NaCl y se le adicionó el cocktail inhibidor de proteasas para extractos celulares bacterianos de Sigma-Aldrich, tal como indica la casa comercial. Tras sonicar en hielo durante 4 min (con una potencia relativa de 0,5 con ciclos de conexión/desconexión de 0,7/0,3), las muestras se volvieron a centrifugar a 16000 xg durante 2 min a 4 °C para descartar los restos celulares y las proteínas en los cuerpos de inclusión. El sobrenadante obtenido (también denominado extractos celulares)

contiene las proteínas solubles y a no ser que se especifique lo contrario, fue incubado 4 h a 25 °C tras la etapa de sonicado, ya que de esta forma aumentan los niveles de actividad GOX (apartado IV.2.2.2). Cuando se utilizó la cepa Rosetta, antes de realizar los ensayos de actividad en el fluorímetro y debido a la interferencia de las catalasas con nuestro sistema de medida, la FS incubada 4 h a 25 °C se precipitó con etanol tal como se describe en el apartado III.6 para *M. mediterranea*. Esta etapa no fue necesaria cuando empleamos la cepa CD03, que tiene disminuida su actividad catalasa.

En ocasiones, antes de cargar las muestras en los geles SDS-PAGE, éstas se incubaron a 95 °C durante 5 min con el fin de desnaturalizar las proteínas (Laemmli, 1970), obteniendo así la fracción soluble en condiciones desnaturalizantes (FSd).

➤ **Fracción de los cuerpos de inclusión o fracción insoluble (FI).**

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 16000 *xg* para eliminar los restos no solubilizados, el sobrenadante se analizó mediante SDS-PAGE.

III.14.4. Purificación de proteínas recombinantes en matriz de afinidad por níquel.

Para la purificación de GoxA recombinante que lleva fusionada una etiqueta de poli-His, se empleó una matriz de alta afinidad con Ni²⁺ (Ni-NTA agarosa de la casa comercial Qiagen) en una columna cromatográfica, dejando pasar la muestra por gravedad. Si no se especifica lo contrario, se partió de cultivos de *E. coli* inducidos durante 16 h de los que se obtuvo la fracción soluble tal y como se indica en el apartado anterior. A las columnas de cromatografía se les adicionó el mismo volumen de resina que de muestra a purificar. La resina se equilibró usando 5 volúmenes de tampón de unión y lavado (apartado III.4.3). 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 unión y 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.4.3) con 500 mM de imidazol.

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

III.15. Obtención del ARN total y generación de cDNA.

Partiendo de un cultivo de *M. mediterranea* en medio líquido MNGL creciendo en fase exponencial (DO_{600} de aproximadamente 0,4), se procedió con el aislamiento del ARN total. En esta técnica, el pellet procedente de 50 mL de dicho cultivo fue resuspendido y estabilizado con 1 mL del reactivo RNA Protect Bacterial Reagent (Qiagen), siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. A continuación, el precipitado celular obtenido por centrifugación a 5000 $\times g$ se resuspendió en 2 mL de lisozima (1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La extracción y purificación del ARN a partir de este punto se realizó empleando el RNeasy Midi Kit (Qiagen). Tras este protocolo, para eliminar cualquier contaminación de ADN, se trató la muestra obtenida con 2 U de DNasa I libre de RNasa (Fermentas) durante 2 h a 37 °C. Posteriormente se realizó una incubación de la muestra con 2,4 U de proteinasa K (Fermentas) a la misma temperatura durante 90 min. Los restos de ADN se eliminaron en las fases orgánicas de 3 extracciones consecutivas con fenol ácido-cloroformo, seguidas de una última extracción con éter. El ARN fue finalmente concentrado

mediante precipitación con etanol absoluto y resuspendido en agua libre de RNasa, guardándose la muestra a -80 °C hasta su posterior uso.

La estimación de la concentración de ARN en las muestras se realizó por duplicado, midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). La pureza de la muestra se revisó midiendo la relación A_{260}/A_{280} (Sambrock y Russell, 2001), estando en todos los casos este valor siempre cercano a 2.

A partir del ARN obtenido se generaron distintos cDNAs, según el oligonucleótido empleado, utilizando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen). Para cada reacción, se partió de aproximadamente 500 ng de ARN total. El ARN se incubó a 65 °C durante 5 min en presencia de 0,5 µM del oligonucleótido correspondiente y 0,5 mM de dNTPs, seguido de un enfriamiento rápido en un baño de hielo. A continuación se añadió a la mezcla el tampón de la enzima suministrado por la casa comercial, que contiene 10 mM de ditioneitol (DTT), 1 µL del reactivo RNase Out (Invitrogen) y se incubó 2 min a 42 °C. Posteriormente, se añadieron 200 U de la retrotranscriptasa SuperScript II y se procedió a la retrotranscripción mediante incubación a 42 °C durante 50 min, seguida de una inactivación de la enzima a 70 °C durante 15 min. Finalmente, para eliminar los restos de RNA, la muestra se trató con 2 U de RNase H incubando a 37 °C durante 20 min.

III.16. Determinación mediante RT-PCR de la unidad transcripcional que contiene el operón *gox*.

Para determinar qué genes están presentes en la misma unidad transcripcional que *goxA* se realizó la técnica de la RT-PCR. Para la obtención del ARN y la generación de los diferentes cDNAs se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior. Se realizaron 3 retrotranscripciones diferentes, usando los siguientes cebadores: 1655REV2 que hibrida con *goxA* (Marme_1655), 1654REV2 que hibrida con *goxB* (Marme_1654) y 1653REV2 que hibrida con Marme_1653, que codifica una proteína

hipotética. Así, se obtuvieron tres cDNAs diferentes identificados con el número del gen a partir del cual se sintetizó el cDNA: cDNA 1655, cDNA 1654 y cDNA 1653 (fig. IV.7A).

Finalmente, la presencia de diferentes genes en una misma unidad transcripcional se llevó a cabo mediante PCR con los cDNAs obtenidos usando diferentes combinaciones de los cebadores 1656DIR1, 1655DIR1, 1655REV1, 1654DIR1, 1654REV1 y 1653REV1 (tabla III.3) (fig. IV.7A).

III.17. Localización del inicio de la transcripción del operón *gox* mediante la técnica 5'-RACE.

La localización del inicio de la transcripción del operón *gox* se llevó a cabo mediante amplificación del extremo 5' del cDNA por la técnica "Rapid Amplification of cDNA Ends" (5'-RACE) (fig. III.7). A partir de unos 500 ng de mRNA total extraído de un cultivo de *M. mediterranea*, se obtuvo cDNA mediante retrotranscripción usando el cebador GSP1GOXRev y siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.15.

El cDNA obtenido fue modificado añadiéndole una cola de dCTP al extremo 3'-OH usando 30 U de desoxinucleotidil transferasa terminal (Fermentas) según las recomendaciones de la casa comercial. La amplificación del extremo del cDNA con la cola de poli-dC, se llevó a cabo mediante dos PCRs consecutivas, tal y como se indica en el protocolo "5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen), usando primero los cebadores GSP2GOXRev y AAP (abridged anchor primer) y, a continuación, GSPNestedGOXRev y AUAP (abridged universal amplification primer) (tabla III.3). El inicio de la transcripción del operón *gox* fue determinado mediante secuenciación directa del fragmento obtenido en la segunda PCR (apartado III.12.5), usando el cebador GSPNestedGOXRev.

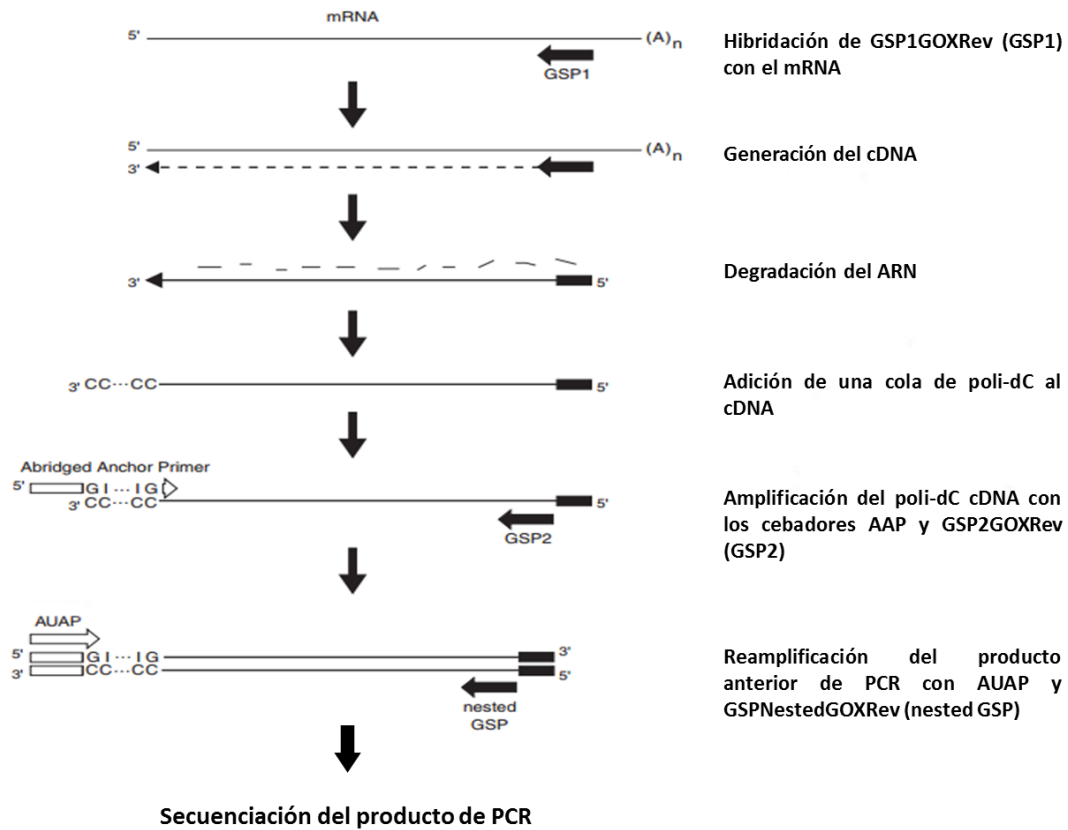


Figura III.7. Esquema seguido para determinar el inicio de la transcripción del operón *gox* mediante la técnica 5'-RACE. Adaptado del manual "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" (Invitrogen).

III.18. Fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*.

III.18.1. Construcción de plásmidos y cepas que contienen las fusiones con *lacZ*.

Con el fin de estudiar la regulación transcripcional de la expresión del operón *gox*, se crearon fusiones transcripcionales del promotor de la glicina oxidasa (*Pgox*) con el gen *lacZ*. Para ello se utilizó como base el plásmido pBPLOD1 (tabla III.2), que contiene una fusión transcripcional del promotor *Plod* con el gen *lacZ* dentro del transposón mini-Tn10 (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Éste es un plásmido derivado del pBFU8 que puede ser movilizado por conjugación a *M. mediterranea*, en cuyo cromosoma se integrará al azar el transposón que contiene la fusión transcripcional (Lucas-Elío *et al.*,

2002). Esta técnica tiene la ventaja de que permite el análisis de la actividad promotora con la presencia de una sola copia de la construcción, a diferencia de lo que ocurriría si se introdujese la construcción en un plásmido. La inserción del transposón en el genoma de *M. mediterranea* determina que el mutante resultante sea resistente a Gm, ya que el transposón contiene también el gen de resistencia a este antibiótico.

Para la creación de las fusiones transcripcionales del *Pgox* con el gen *lacZ* se utilizaron dos versiones de diferente tamaño del promotor amplificadas por PCR mediante el uso de cebadores específicos que contenían los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Para la versión larga del promotor (*Pgox1*) se utilizó la pareja de primers pGODIREco1-GoxREVBam, generando un fragmento de 207 pb, mientras que para la versión más corta del promotor (*Pgox2*) se utilizaron los cebadores pGODIREco2-GoxREVBam, obteniendo un fragmento de unas 101 pb. Se construyeron dos versiones diferentes de *Pgox* con el fin de estudiar si las secuencias adicionales presentes en la versión más larga, entre las que se incluyen algunas secuencias palindrómicas (fig. IV.22), podrían ejercer algún papel regulador en la expresión del operón *gox*. Los fragmentos *Pgox1* y *Pgox2* amplificados, se clonaron en el vector pBPLOD1, sustituyendo el inserto que contenía el promotor *lod*. Los plásmidos obtenidos fueron llamados pBPGOX1, para el que contenía la versión larga del promotor (*Pgox1*), y pBPGOX2, para el que contenía la versión corta (*Pgox2*) (fig. III.8).

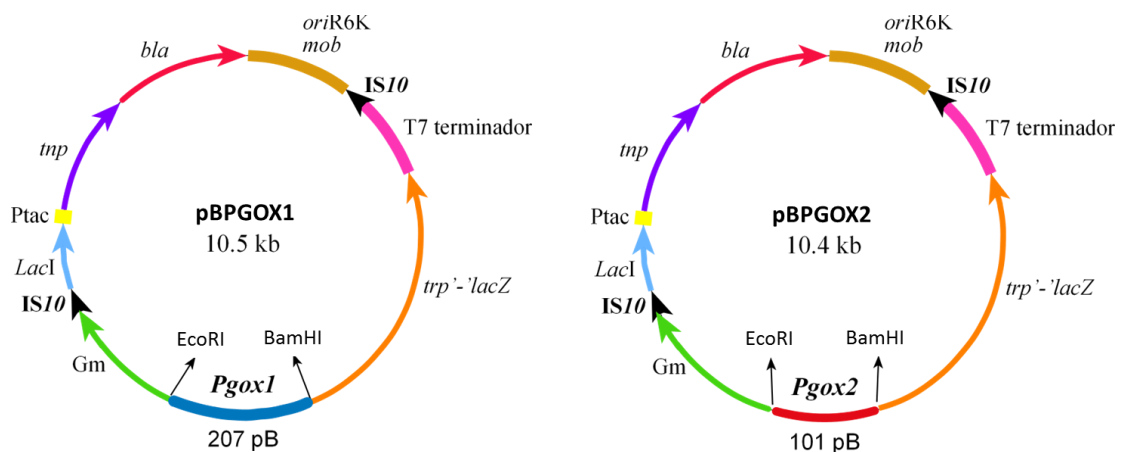


Figura III.8. Esquema de los plásmidos pBPGOX1y pBPGOX2 que contienen el transposón mini-Tn10 con una fusión transcripcional entre dos versiones diferentes del promotor *gox* (*Pgox1* o *Pgox2*) y el gen *lacZ*.

Estos plásmidos fueron transferidos por electroporación a *E. coli* S17-1(λ pir) y posteriormente se introdujeron mediante conjugación en la cepa silvestre MMB-1R, obteniendo diversos clones que contenían el transposón con dichas fusiones. Se escogieron varios clones a los que se les realizó medidas de actividad β -galactosidasa, tras 16 h de incubación en medio MMC, seleccionando un mutante para cada construcción con valor medio de actividad β -galactosidasa (fig. III.9). Mediante la selección de cepas cuyo valor de actividad β -galactosidasa represente el valor medio de todas las analizadas, buscamos descartar aquellos mutantes en los que el transposón se haya insertado en el cromosoma de *M. mediterranea* próximo a elementos regulatorios de la expresión que puedan interferir, y que, por lo tanto, puedan dar como resultado valores anormales de actividad β -galactosidasa. No obstante, como podemos apreciar en la figura III.9, los valores de actividad obtenidos son muy similares en todas las cepas analizadas, indicando que el sitio de inserción no suele afectar al nivel de expresión. Las cepas seleccionadas se denominaron MMB-1RLACG1, la que contiene la fusión con *Pgox1*, y MMB-1RLACG2, la que contiene la fusión con *Pgox2*. Como control negativo de la expresión del gen *lacZ* se utilizó la cepa MMB-1RLAC0 que contiene el plásmido pBGAL donde el transposón posee el gen *lacZ* sin ninguna fusión (Lucas-Elío *et al.*, 2002).

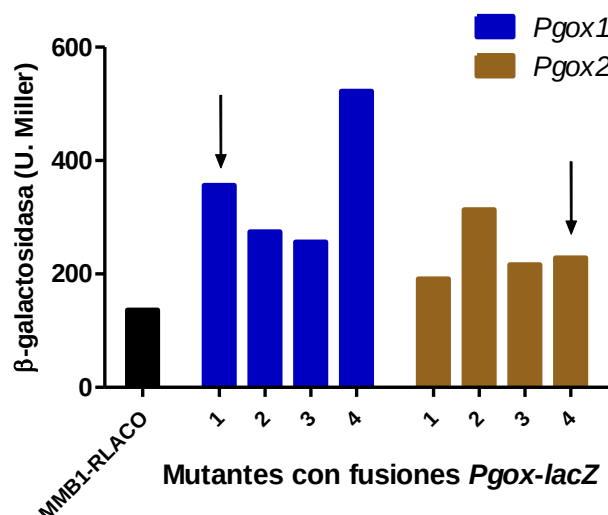


Figura III.9. Actividad β -galactosidasa tras 16 h de cultivo en medio MMC de las cepas de MMB-1R conteniendo las fusiones del promotor *gox* y el gen *lacZ*. Las flechas señalan los mutantes escogidos para cada una de las fusiones.

Con el fin de estudiar el efecto regulatorio de las proteínas PpoS y PpoR sobre la transcripción del operón *gox*, el plásmido pBPGOX1 se introdujo también mediante conjugación en las cepas T102 y T103 de *M. mediterranea*. Al igual que antes, tras aislar diferentes cepas que contenían el transposón, se les midió la actividad β -galactosidasa para seleccionar los mutantes con un valor medio de actividad (fig. III.10). Como control negativo de la expresión del gen *lacZ* se utilizaron las cepas T102LAC0 y T103LAC0 que contienen el plásmido pBGAL donde el transposón posee el gen *lacZ* sin ninguna fusión (Lucas-Elío *et al.*, 2002). Los mutantes seleccionados en la figura III.10 se denominaron T102LACG1 y T103LACG1.

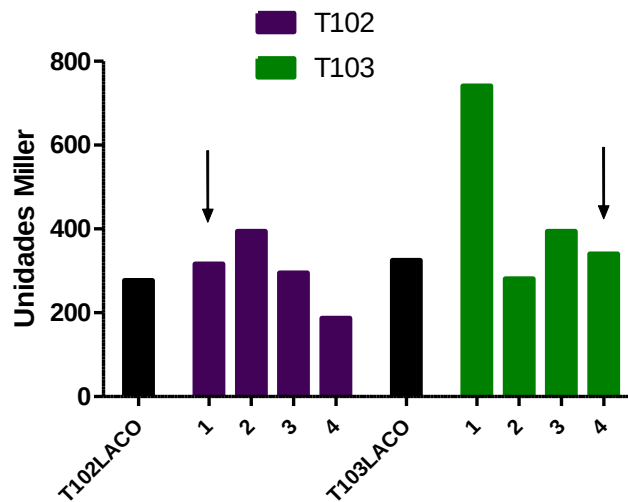


Figura III.10. Actividad β -galactosidasa tras 16 h de cultivo en medio MMC de las cepas T102 y T103 que contienen la fusión *Pgox1* con el gen *lacZ*. Las flechas señalan los mutantes seleccionados.

III.18.2. Determinación de la actividad β -galactosidasa.

Para medir la actividad β -galactosidasa de las diferentes cepas de *M. mediterranea* descritas en el apartado anterior, que poseen inserciones del gen *lacZ* bajo el control de distintos promotores, se siguió el protocolo propuesto por Miller (Miller, 1992). Las cepas se cultivaron en medio líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. Cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica deseada, se tomó una muestra de 1 mL que se centrifugó a 16000 $\times g$ durante 5 min y se resuspendió en el mismo volumen

de tampón Z (apartado III.4.4), con el fin de evitar la interferencia de las sales del medio con la reacción. A continuación, las células se lisaron mediante la adición de 40 μ L de cloroformo y 20 μ L de SDS 0,1 %. Las medidas de actividad se realizaron mezclando 60 μ L de la muestra lisada con 140 μ L de tampón Z y 50 μ L del sustrato ONPG al 0,4 %. A estas medidas de actividad se le restaron los controles y blancos pertinentes en cada ensayo. La reacción colorimétrica de las muestras se midió mediante la absorbancia a 420 nm durante 30 min a 37 °C en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). Los valores obtenidos ($\Delta A_{420}/\text{min}$) se expresaron como Unidades Miller según la fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{10^3 \times (\Delta A_{420}/\text{min}) \times 1.67^*}{V_{\text{muestra}} (\text{ml}) \times A_{600}}$$

*El valor 1,67 corrige, por una parte, la menor absorbancia al no detener la reacción con CaCO_3 en el protocolo aquí detallado a diferencia del método clásico (Miller, 1992) y por otra, corrige el paso de la luz a través de los pocillos en la placa ELISA en lugar de una cubeta de 1 cm de paso óptico.

III.19. Espectrometría de masas (MS).

Los ensayos de espectrometría de masas (MS) se realizaron en la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

III.19.1. Digestión de proteínas para el análisis por MS.

Para la digestión de las proteínas presentes en las muestras se utilizaron diferentes enzimas. Previo a la digestión enzimática, las muestras fueron reducidas en cada tampón de digestión por adición de 20 mM DTT a 56 °C durante 20 min. Luego, las

muestras fueron modificadas por el agente alquilante iodoacetamida 100 mM durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad.

Para la digestión con tripsina se adicionó 50-100 μ L de tampón bicarbonato amónico 50 mM pH 8 y ProteaseMax (Promega) al 0,01 %. Este surfactante favorece la digestión con tripsina. La digestión se realizó adicionando entre 0,5-1 gramos de Trypsin Gold Proteomics Grade (Promega) (aproximadamente 1:100 p/p) durante 1 h a 50 °C. La reacción se paró con ácido fórmico al 0,1 %. Para las muestras digeridas con quimiotripsina se utilizaron 50-100 μ L 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 gramo de Chymotrypsin Sequencing Grade (Promega) e incubando durante 18 h a 25 °C. La reacción se detuvo con ácido fórmico al 0,5 %. En el caso de la digestión con pepsina, las muestras fueron resuspendidas en 50-100 μ L 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 gramos de pepsina (Promega) e incubando durante 18 h 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 μ m y secadas usando un Vacuum Concentrator 5301 (Eppendorf).

III.19.2. Análisis por HPLC-MS/MS.

La separación y el análisis de las muestras de proteínas digeridas fue realizada con un sistema HPLC-MS, que consistía 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 desecadas tras las digestiones en solución o en gel fueron resuspendidas en 10 μ L 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 μ m, 150 x 0,5 mm, Agilent Technologies), que se encontraba a una temperatura de 40 °C, con una tasa de flujo de 10 μ L/min. Tras la inyección, la columna fue lavada con tampón A durante 30 minutos y los péptidos digeridos fueron eluidos usando un gradiente lineal de 0-80 % durante 120 min 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 tampón A durante 30 min. 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 realizó a una tasa de flujo de 5 L/min a una temperatura de 350 °C. El voltaje del spray capilar fue establecido en 3500 V, mientras que la velocidad de escaneo fue establecida a 8100 (m/z)/s de 200 a 2200 m/z, con una masa objetivo de 1000 m/z y una media de tres espectros. La determinación de iones rápidos se fijó en 150000, mientras el tiempo de acumulación máximo fue de 50 ms. Los datos MS/MS fueron recogidos en modo automático dependiente de datos (AutoMSn mode). Los tres iones más intensos fueron secuencialmente fragmentados usando la disociación inducida por colisión con helio (CID) con un ancho de aislamiento de 2 y una energía relativa de colisión del 35 %. El mismo ion fue descartado después de dos escaneos consecutivos.

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

La búsqueda MS/MS frente a secuencias proteicas de interés fue realizada siguiendo los siguiente criterios: modo búsqueda de identidad, digestión trípica con 3 escisiones perdidas como máximo; cisteínas carbamidometiladas; carga del péptido de +1, +2, +3; tolerancia de masa del péptido precursor de 2,5 Da; tolerancia de masa del ion de masa producido de 0,7 amu; instrumento de trampa de iones ESI; mínima intensidad de pico coincidente 50 %.

III.19.3. Análisis por ionización láser asistida por matriz (MALDI) presión atmosférica (AP).

Las muestras de péptido digeridas fueron disueltas en 5 μ L de TFA 0,1 % (v/v), y mezcladas con un volumen igual de solución matriz saturada, ácido α -ciano-4-ácido hidroxicinámico al 0,1 % TFA en H₂O/ACN (1:1). Estas muestras se aplicaron a la placa AP-MALDI en gotas de 2 μ L que se dejaron 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 para identificar las fórmulas moleculares basadas en medidas de masas en modo positivo en el rango de 100-10000 m/z. Los principales parámetros TOF-MS fueron los siguientes: temperatura capilar de 350 °C; voltaje capilar 3500 V; voltaje de fragmentación, 215 V; voltaje skimmer, 60 V; voltaje octopolo DC1 y DC2, 34,4 y 34,2 V respectivamente, 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). Los datos fueron recogidos y procesados con el software de análisis cualitativo Workstation Agilent MassHunter para la obtención de 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 del péptido fue establecida a 50 ppm.

III.20. Herramientas y análisis bioinformáticos de secuencias.

Las herramientas y programas bioinformáticos empleados en este trabajo han sido de vital importancia para la consecución del mismo. Entre otros aspectos, han permitido el análisis de genomas de microorganismos, la búsqueda y alineamiento de secuencias, el análisis filogenético de proteínas, la predicción de estructura de proteínas, etc.

III.20.1. Herramientas bioinformáticas empleadas para el tratamiento de secuencias.

Para la comprobación de los fragmentos de ADN clonados en plásmidos y secuenciados por el SAI, se usó el servicio “MultAlin” (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) de la página del Institut National de la Recherche Agronomic, 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 web http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html (Stothard, 2000). Para la búsqueda en secuencias de ADN de sitios de restricción se usó la herramienta “NEBcutter V2.0” (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze *et al.*, 2003).

El contenido G+C de secuencias génicas fue obtenido a través del portal <http://www.endmemo.com/bio/gc.php>. Para el estudio y caracterización de las regiones promotoras se utilizó la herramienta “BPPROM - Prediction of bacterial promoters” (Solovyev y Salamov, 2011) y la aplicación web “Palindromic Sequences Finder” (http://www.biophp.org/minitools/find_palindromes/demo.php). Con el fin de identificar ribointerruptores (riboswitches) en las secuencias de ARNm se usaron las

herramientas webs "Riboswitch Scanner" (<http://service.iiserkol.ac.in/~riboscan/>) (Mukherjee y Sengupta, 2015) y "RiboSW" (<http://ribosw.mbc.nctu.edu.tw/>) (Chang *et al.*, 2009).

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. El portal de herramientas bioinformáticas ExPASy (<http://www.expasy.org/>) (Gasteiger *et al.*, 2003) fue utilizado para diversos fines, principalmente para realizar la transformación de las secuencias de ADN 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 este mismo 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/).

Para la comparación de secuencias peptídicas, con el fin de obtener valores de identidad y similitud entre dos proteínas se utilizó la herramienta "EMBOSS pairwise alignment tool" (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) (McWilliam *et al.*, 2013).

Para predecir el modelo tridimensional de una proteína a partir de su secuencia peptídica se utilizó el programa "SWISS-MODEL" (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006). El alineamiento entre el modelo de GoxA y la estructura de LodA fue llevado a cabo mediante el programa "RCSB Pairwise Structure Alignment" (<http://www.rcsb.org/pdb/workbench/workbench.do>) (Ye y Godzik, 2003). La herramienta "JPred4" (<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 (Drozdetskiy *et al.*, 2015). Para detectar la presencia de péptido señal en proteínas se utilizó la herramienta "SignalP 4.1 Server"

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011). Para la búsqueda de sistemas de secreción no clásicos se empleó “SecretomeP 2.0 Server” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) (Bendtsen *et al.*, 2005a). “CELLO v.2.5: subCELLular LOcalization predictor” (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu *et al.*, 2004) para estimar la localización subcelular de proteínas, y por último, para identificar el péptido señal de las Twin-Argininas, se usó la herramienta “TatP 1.0” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) (Bendtsen *et al.*, 2005b).

III.20.2. Detección de proteínas similares a GoxA/LodA y su análisis filogenético.

La detección de genes similares a *goxA* y *lodA* 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 con la secuencia peptídica de GoxA y LodA frente a las secuencias de genomas microbianos depositados en la base de datos IMG a fecha del 8 de enero de 2014, con un límite de corte E-value de 1e-10. Los alineamientos de secuencias peptídicas se realizaron usando el programa “Clustal Omega” (Sievers *et al.*, 2011) 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 su posterior manejo y análisis.

Los análisis filogenéticos de las proteínas similares a GoxA y LodA se realizaron por los métodos del “Vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) y “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood, ML). En el método NJ, la distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance) y la exactitud de cada nodo en el árbol construido fue estimada usando un análisis estadístico de probabilidad con 500 réplicas. En el análisis con el método ML para seleccionar el modelo de sustitución más adecuado en la construcción del árbol, se empleó la herramienta “Find Best DNA/Protein Mode” que posee el programa MEGA (Hall, 2013). En base a estos

análisis, las proteínas similares a GoxA y LodA han sido organizadas en cinco grupos cuyos miembros poseen una similitud estadísticamente relevante cifrada en valores de probabilidad mayores al 70 % obtenidos tanto en NJ como en ML. Según este criterio, algunas de las proteínas analizadas no se pudieron asociar a ninguno de los cinco grupos taxonómicos propuestos.

IV. Resultados

CAPÍTULO 1

IV.1. Identificación y caracterización en *M. mediterranea* de una nueva glicina oxidasa.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito una novedosa L-aminoácido oxidasa (LAO) específica de L-lisina, sintetizada por *Marinomonas mediterranea*, que posee actividad antimicrobiana (Lucas-Elío *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006). Dicha actividad antimicrobiana es debida a la generación de peróxido de hidrógeno como producto de la oxidación en el grupo ϵ -amino de la L-lisina (Gómez *et al.*, 2006; Lucas-Elío *et al.*, 2006). Esta lisina oxidasa (LodA) no es una LAO convencional ya que posee un cofactor de tipo quinónico y no flavínico (Gómez *et al.*, 2010). La proteína LodA está codificada por el gen *lodA*, que junto con un segundo gen, *lodB*, forma parte del operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010). La construcción del mutante LD con una delección del operón *lod* supone la pérdida total de la actividad lisina oxidasa (Gómez *et al.*, 2010).

Debido a su interés y potencial biotecnológico, el genoma de *Marinomonas mediterranea* MMB-1 fue secuenciado en un proyecto en colaboración con el "Joint Genome Institute" del Departamento de Energía de los Estados Unidos (Lucas-Elío *et al.*, 2012b), lo que permitió identificar dos genes similares a *lodA* en su genoma, Marme_1655 y Marme_2396 (fig. IV.1). El objetivo de este capítulo ha sido la exploración de la posible actividad enzimática que codifican los genes similares a *lodA* detectados en el genoma de este microorganismo.

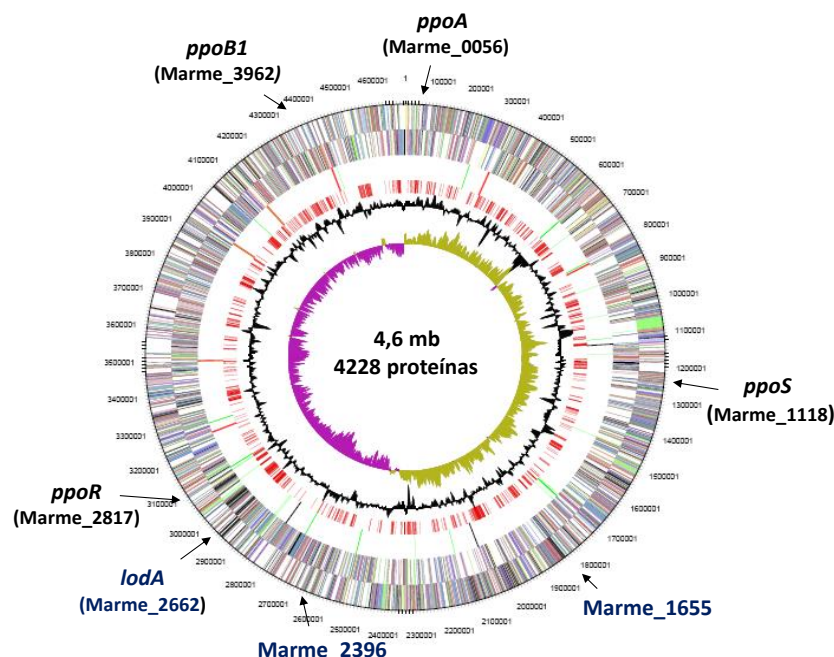


Figura IV.1. Mapa genómico de *Marinomonas mediterranea* MMB-1 mostrando los genes similares a *lodA* (Marme_1655 y Marme_2396). En el mapa también se indican los genes que codifican una lacasa (PpoA) (Sánchez-Amat *et al.*, 2001) y una tirosinasa (PpoB1) (López-Serrano *et al.*, 2004), así como los genes *ppoR* y *ppoS*, que codifican proteínas reguladoras de estas oxidasas (Molina-Quintero, 2011).

IV.1.1. Identificación en el mutante LD de actividad antimicrobiana en presencia de glicina.

En una serie de ensayos preliminares exploratorios se observó en los sobrenadantes concentrados mediante precipitación con etanol de los cultivos de la cepa LD crecida en medio MNGL, una débil actividad antimicrobiana (fig. IV.2A). Dicho efecto antimicrobiano era inhibido en presencia de catalasa (fig. IV.2B), lo que sugiere la presencia de una enzima con actividad oxidasa, con peróxido de hidrógeno como producto de reacción, en los sobrenadantes de la cepa LD. Esta observación nos llevó a pensar que los genes similares a *lodA* detectados en el genoma de *M. mediterranea* podrían codificar nuevas oxidasas responsables de tal efecto antimicrobiano.

Para explorar los posibles sustratos de esta actividad, se realizaron antibiogramas en medio definido M9 (Sambrook y Rusell, 2001) en donde no se detectó halo (fig. IV.2C,

parte superior). Por el contrario, cuando junto al disco del sobrenadante de la cepa LD se depositó otro disco conteniendo casaminoácidos, fue posible detectar un pequeño halo de inhibición (fig. IV.2C, entre los discos). Este resultado sugiere que el sustrato de la hipotética oxidasa podría ser un aminoácido. Para profundizar en esta posibilidad, se realizaron medidas de detección de peróxido mediante ensayo fluorimétrico con los sobrenadantes de la cepa LD usando como posibles sustratos todos los aminoácidos proteicos. Los resultados mostraron que la glicina fue el único aminoácido que permitió la generación de peróxido de hidrógeno (fig. IV.2D).

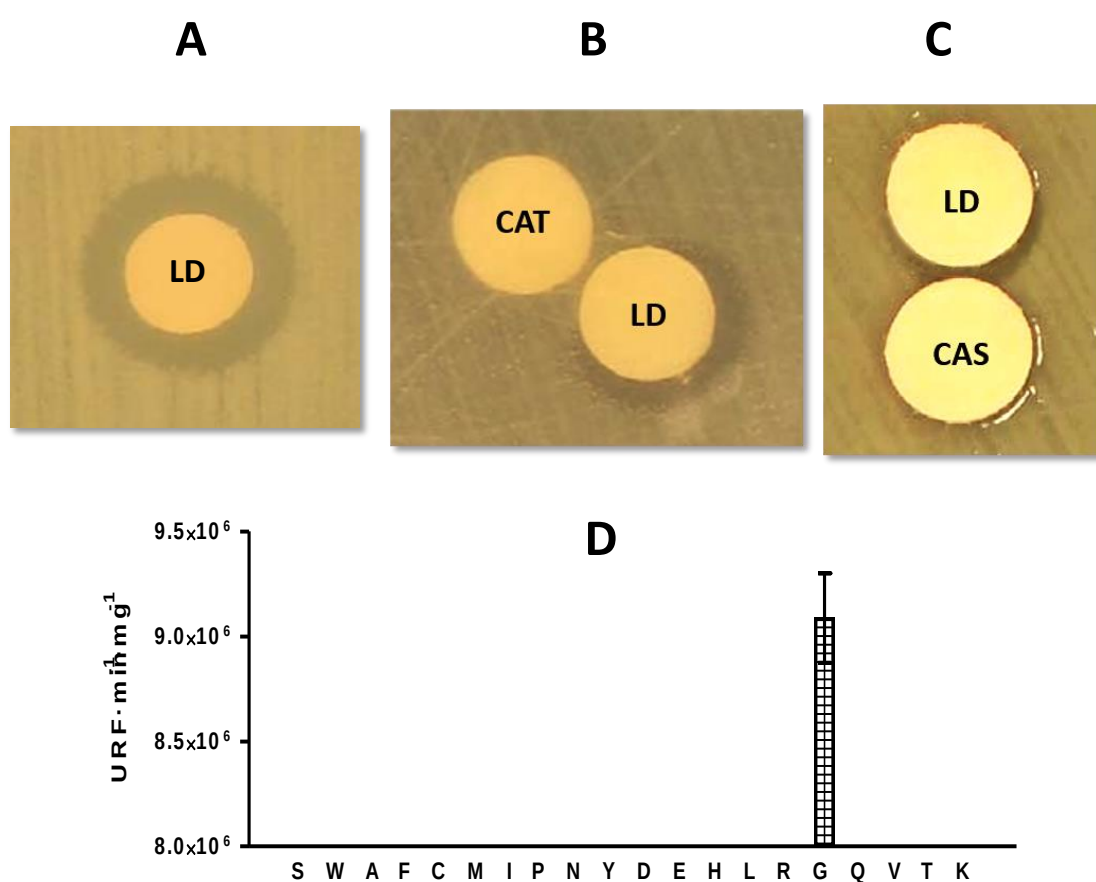


Figura IV.2. Actividad antimicrobiana y oxidasa en los sobrenadantes de la cepa LD. Los antibiogramas fueron incubados durante 24 h a 25 °C frente a *E. coli* UM202 en medio MH (A y B) o en medio M9 (C). LD, disco cargado con 20 μ L de sobrenadante de la cepa LD concentrado 15 veces con EtOH; CAT, disco cargado con 20 μ L de catalasa 10 mg/mL; CAS, disco cargado con 20 μ L de casaminoácidos al 10 %. D, ensayo fluorimétrico de detección de peróxido de hidrógeno usando como sustrato todos los aminoácidos proteicos a una concentración de 2 mM.

Estos resultados parecen indicar que *M. mediterranea* sintetiza una AO específica de glicina, denominada en este trabajo glicina oxidasa (Gox). En otras flavoproteínas descritas previamente con actividad glicina oxidasa (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b; Nishiya e Imanaka, 1998), la reacción catalizada supone la desaminación oxidativa de la glicina para generar, de forma equimolecular, glioxilato, amonio y peróxido de hidrogeno, responsable de la actividad antimicrobiana (fig. IV.3).

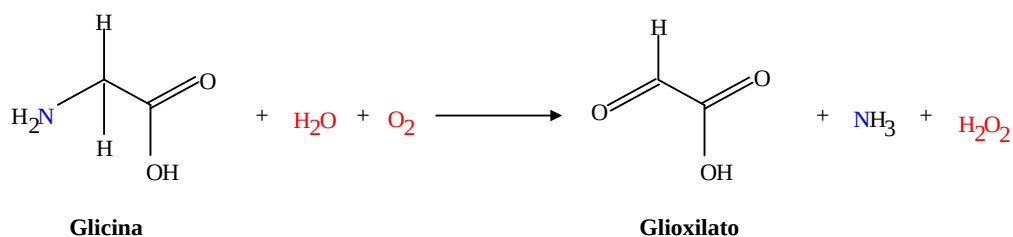


Figura IV.3. Reacción catalizada por las glicina oxidasas de *Bacillus subtilis* (Nishiya e Imanaka, 1998) y *Geobacillus kaustophilus* (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b).

Para estudiar si la enzima detectada en *M. mediterranea* tiene un mecanismo de actuación similar, se estudió la generación de amonio en esta reacción. Este producto fue detectado a través de un ensayo espectrofotométrico mediante una reacción acoplada con la glutamato deshidrogenasa (Job *et al.*, 2002a) (apartado III.9.1.3). Con este método conseguimos detectar en los sobrenadantes de la cepa LD cultivada 48 h en medio MNGL una actividad específica de $63,12 \pm 7,30$ mUGox/mL.

El Amplex Red usado rutinariamente en el ensayo fluorimétrico de detección de peróxido de hidrógeno también puede utilizarse espectrofotométricamente para calcular las Unidades Internacionales de actividad enzimática (apartado III.9.1.2). Cuando se utilizó este método en el mismo tipo de muestras que las descritas anteriormente, se detectaron $52,06 \pm 6,20$ mUGox/mL, un valor similar al obtenido cuando calculamos la producción de amonio. Estos resultados indican que la glicina oxidasa detectada en *M. mediterranea* posee un mecanismo de actuación similar a las glicina oxidasas descritas en la literatura.

IV.1.2. Caracterización de la glicina oxidasa de *M. mediterranea* en comparación con otras glicina oxidasas descritas.

En la bibliografía se han descrito enzimas con actividad glicina oxidasa (EC 1.4.3.19) como la de *Bacillus subtilis* (Nishiya e Imanaka, 1998) y la de *Geobacillus kaustophilus* (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). Estas enzimas poseen un cofactor de tipo flavínico y comparten similitud en términos de secuencia y rango de sustratos con otras flavoproteínas como las D-aminoácido oxidasas (DAO o DAAO, EC 1.4.3.3) y las sarcosina oxidasas (SOX, EC 1.5.3.1). Estas últimas no son capaces de oxidar glicina, mientras que las DAOs poseen actividad muy baja sobre ella (Molla *et al.*, 2003). Con el fin de comprobar si la actividad glicina oxidasa de *M. mediterranea* podía ser debida a alguna glicina oxidasa de este tipo, se realizó un BLAST con la secuencia peptídica de la glicina oxidasa de *B. subtilis* (número de acceso BSU11670) frente al genoma de *M. mediterranea* MMB-1. La proteína con mayor similitud, con un 24,9 % de identidad y un 39,5 % de similitud, es el producto de Marme_2428 (número de acceso ADZ91660.1). Sin embargo, esta última proteína guarda mayor identidad (43,3 %) y similitud (58,8 %) con la subunidad β de la SOX tetramérica de *Corynebacterium* sp. U-96 (número de acceso BAD97816.1). Además, la idea de que la proteína Marme_2428 forme parte de una SOX se ve apoyada por su pertenencia a un cluster de genes, desde Marme_2425 a Marme_2429, que guardan similitud con las subunidades α , β , δ , γ y ϵ que forman el complejo tetramérico con actividad SOX en otros organismos. También se realizaron BLAST frente al genoma de *M. mediterranea* MMB-1 usando como secuencia la SOX monomérica de *Bacillus* (número de acceso P40859) y la DAO de *Rhodotorula gracilis* (número de acceso P80324), pero no se obtuvo ningún hit con un E-value menor a $1e-5$.

Resumiendo, los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticos sugieren que *M. mediterranea* no posee ningún gen similar a los que codifican las actividades glicina oxidasa descritas hasta la fecha que pueda justificar la actividad encontrada en sus cultivos. Por tanto, *M. mediterranea* debe de expresar una glicina oxidasa distinta, al menos en términos de secuencia, a las típicas glicina oxidasas descritas hasta ahora.

Por ello, los próximos experimentos fueron encaminados a caracterizar bioquímicamente y a comparar la glicina oxidasa de *M. mediterranea* con las glicina oxidasas de *B. subtilis* y *G. kaustophilus*.

IV.1.2.1 Parámetros cinéticos.

Como parte de la caracterización enzimática de la actividad GOX, se calcularon sus parámetros cinéticos usando el sobrenadante de la cepa LD cultivada en medio MNGL y la glicina como sustrato. Para calcular la velocidad máxima de la reacción (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_m), se determinó la velocidad de reacción (URF/min) con diferentes concentraciones de sustrato (fig. IV.4A). Mediante la representación doble recíproca de Lineweaver-Burk se obtiene una línea recta con los datos obtenidos (fig. IV.4B) a partir de la cual se dedujo una V_{max} de $8,27 \times 10^3$ URF/min y una K_m para la glicina de 8,33 mM. Esta K_m es superior a la descrita para la glicina oxidasa de *B. subtilis* ($K_m = 0,99$ mM) (Nishiya e Imanaka, 1998) y de *G. kaustophilus* ($K_m = 0,25$ mM) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b) con este sustrato. Como se discutirá más adelante en el apartado IV.2.5 de esta memoria, el valor de K_m para la Gly obtenido en el sistema nativo difiere del obtenido para la Gox expresada de forma recombinante, que se asemeja más al descrito para la Gox de *B. subtilis* y de *G. kaustophilus*.

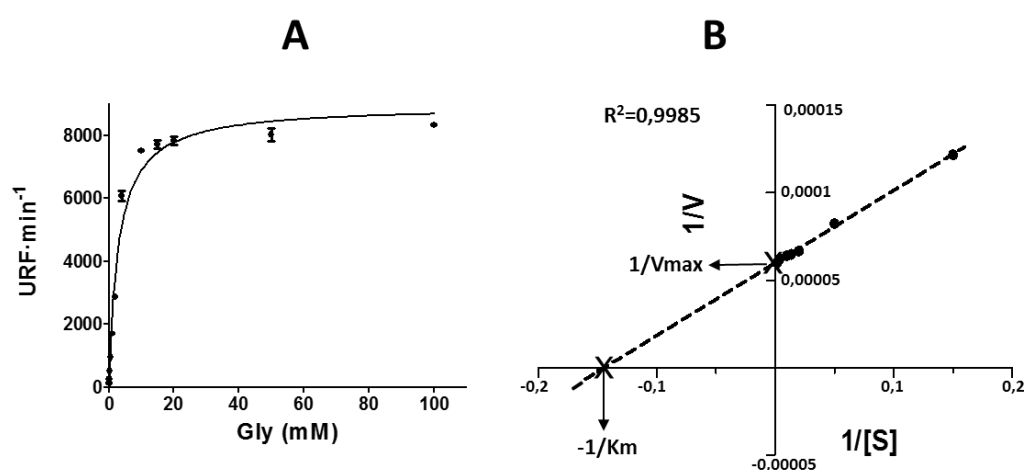


Figura IV.4. **A**, representación de la actividad enzimática de la Gox en función de la concentración de sustrato en la reacción. **B**, representación doble recíproca de Lineweaver-Burk para el cálculo de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de la actividad GOX. V, velocidad de la reacción medida como URF/min; S, concentración de glicina (mM).

IV.1.2.2. Especificidad de sustrato.

Con el fin de determinar el rango de sustratos para la Gox de *M. mediterranea*, se ensayó la actividad de los sobrenadantes de la cepa LD frente a todos los aminoácidos proteicos y frente a otros compuestos con estructura química parecida a la glicina (apéndice A.2). Los resultados muestran que la Gox de *M. mediterranea* es una enzima muy específica de glicina, al contrario que las glicina oxidasas descritas en la bibliografía (tabla IV.1). De hecho, el mejor sustrato para la glicina oxidasa de *B. subtilis* es la sarcosina, y para la de *G. kaustophilus* es la D-prolina, mientras que la Gox de *M. mediterranea* presenta solo un 0,1 % y 0,3 % de actividad relativa, respectivamente, frente a estos sustratos (tabla IV.1). Esta característica indica que nos encontramos ante una enzima con posibles propiedades novedosas y gran especificidad de sustrato.

Tabla IV.1. Comparación de la Vmax relativa de distintas glicinas oxidasas frente a diferentes sustratos. La actividad se expresa como % de actividad relativa frente al mejor sustrato para cada enzima.

<u>Glicina oxidasas</u>	Gly	Sarcosina	Gly-etil-éster	N-Etil-Gly	D-HPG	D-Ala	D-Pro	D-Glu	D-Lys
¹ <i>M. mediterranea</i>	100	0.1	30,7	0.3	0.6	0.2	0.3	0.2	0.2
² <i>B. subtilis</i>	77.4	100	NE	85.3	NE	7.4	15.1	ND	ND
³ <i>G. kaustophilus</i>	69	36	22.3	22.9	NE	28	100	NE	NE

¹, actividad en los sobrenadantes de la cepa LD cultivada en medio MNGL frente a diferentes sustratos a una concentración de 20mM; ², datos de (Nishiya e Imanaka, 1998); ³, datos de (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b); NE, no ensayado; ND, no detectado; D-HPG, D-p-hidroxifenilglicina.

IV.1.2.3. Sensibilidad frente a inhibidores típicos de quinoproteínas.

La mayoría de las AOs descritas hasta la fecha, incluyendo las glicina oxidasas, son flavoenzimas (Job *et al.*, 2002a; Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). Sin embargo, se ha descrito que la LAO específica de L-lisina en *M. mediterranea* (LodA) es una quinoproteína (Gómez *et al.*, 2010; Okazaki *et al.*, 2013). Con el fin de determinar la

naturaleza del cofactor de la Gox de *M. mediterranea*, se comparó su respuesta a inhibidores de quinoproteínas con la de LodA y con la de la lisina- α -oxidasa de *Trichoderma viride* (L α O), que es una flavoproteína (Kusakabe *et al.*, 1980). La incubación de las muestras con semicarbazida e hidroxilamina mostró una inhibición tiempo-dependiente de la Gox, aunque menos acentuada que en LodA, mientras que la L α O no se vio afectada (fig. IV.5). La fenilhidrazina y la metilhidrazina requirieron una diálisis posterior a la incubación con la enzima, ya que estos compuestos también inhiben a la peroxidasa utilizada en el ensayo del Amplex Red (apartado III.9.1.1). Al igual que con los otros dos inhibidores, de nuevo con estos compuestos se observó que mientras que la L α O no se ve inhibida en su presencia, la Gox y, en mayor medida, LodA, sí que son inhibidas (fig. IV.5). Por tanto, los datos obtenidos parecen indicar que la Gox sintetizada por *M. mediterranea* presenta un cofactor de naturaleza quinónica y no flavínica como se había descrito para otras glicina oxidasas.

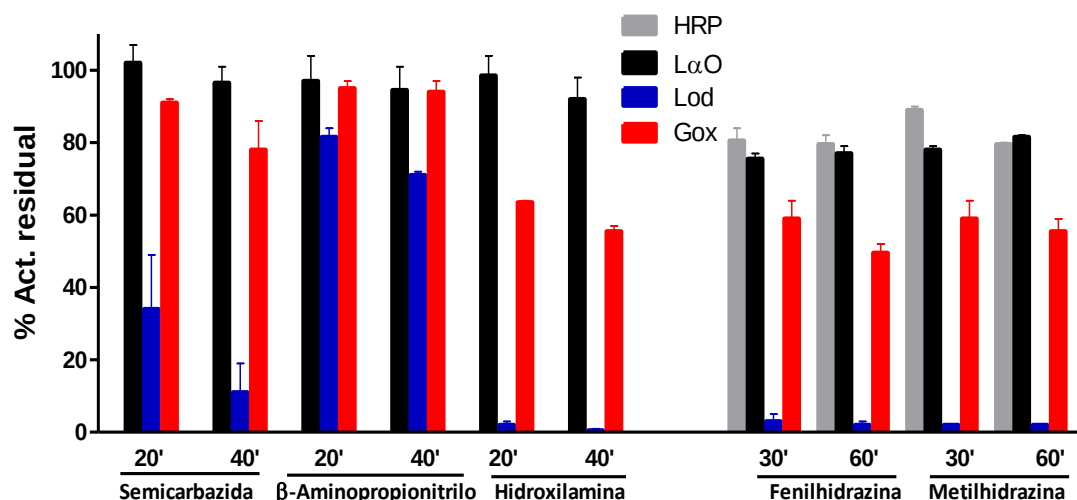


Figura IV.5. Sensibilidad de la Gox de *M. mediterranea* frente a inhibidores típicos de quinoproteínas. Como controles se empleó la lisina- α -oxidasa de *Trichoderma viride* (L α O), que es una flavoproteína, y la quinoproteína L-lisina ϵ -oxidasa de *M. mediterranea* (LodA). La actividad residual se midió tras la incubación de estas enzimas con los inhibidores semicarbazida (1 mM), β -aminopropionitrilo (50 μ M), hidroxilamina (100 μ M), fenilhidrazina (100 μ M) y metilhidrazina (100 μ M). El efecto de la fenilhidrazina y metilhidrazina residuales en la inhibición de la peroxidasa de rábano (HRP) de la reacción fluorimétrica se muestra en un ensayo con H₂O₂ 10 μ M.

En resumen, los resultados obtenidos en el apartado IV.1.2 muestran grandes diferencias entre la Gox de *M. mediterranea* y las glicina oxidasas convencionales,

indicando que no estamos frente a una típica flavoproteína con actividad aminoácido oxidasa, sino frente a una quinoproteína capaz de oxidar muy específicamente la glicina, un tipo de enzima no descrita previamente.

Los siguientes experimentos estuvieron encaminados a determinar el gen que codifica la actividad GOX en *M. mediterranea*, contemplando la posibilidad de que dicho gen sea uno de los similares a *lodA* detectados en su genoma.

IV.1.3. Identificación del gen que codifica la proteína con actividad GOX.

Para identificar el gen que codifica la proteína con actividad GOX, primero se realizaron geles SDS-PAGE en condiciones en las que no se inactiva la enzima, a partir de sobrenadantes concentrados 100 veces con filtros Millipore de la cepa LD cultivada en medio MNGL (fig. IV.6A). La comparación de la tinción del gel de proteínas con el antibiograma realizado a partir de dicho gel (fig. IV.6B) indica que la enzima con actividad GOX se encuentra en el fragmento 3 del gel, donde también se observan dos bandas proteicas de masa molecular aparente aproximada entre 170 y 130 kDa (fig. IV.6A), aunque no es posible definir si alguna de estas bandas podría corresponder realmente a la enzima. De forma adicional, una calle paralela del mismo gel fue utilizada para realizar el ensayo fluorimétrico de detección de peróxido de hidrógeno, confirmándose que la actividad GOX se encuentra únicamente en el fragmento 3 (datos no mostrados).

Una vez localizada en los geles la posición aproximada de la enzima con actividad GOX, tratamos de identificarla mediante digestión triptica acoplada a espectrometría de masas (MS) (apartado III.19), análisis llevado a cabo por el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los péptidos obtenidos mediante esta técnica fueron analizados frente al genoma de *M. mediterranea* MMB-1. De esta manera se pudieron identificar diversos péptidos. Nueve de estos péptidos cubrían el 36,6 % de la proteína codificada por el locus Marme_1655 (fig. IV.6C), una de las dos

proteínas similares a LodA codificadas en el genoma de *M. mediterranea* (Lucas-Elío *et al.*, 2012b), lo que sugirió que éste podía codificar la enzima con actividad GOX.

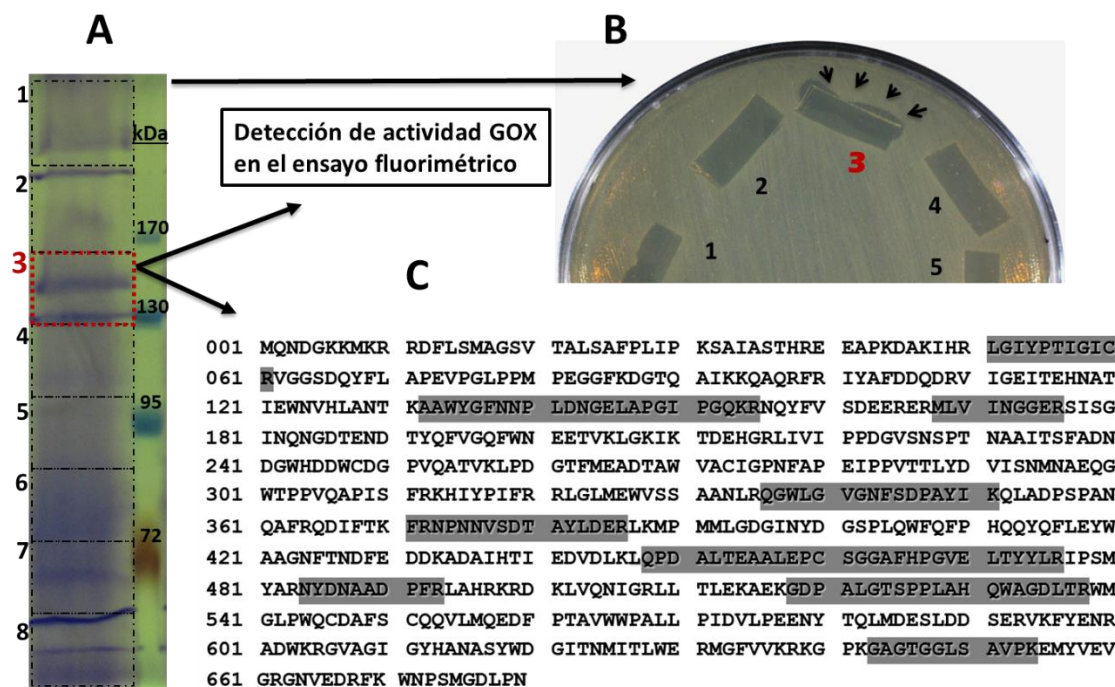


Figura IV.6. Identificación de Marme_1655 como el gen que codifica la Gox en *M. mediterranea*. **A**, SDS-PAGE de los sobrenadantes de la cepa LD, cultivada en MNGL, concentrada 100 veces mediante filtros Millipore. En él se indican los 8 fragmentos cortados para realizar el antibiograma observado en B. Se indica que en el fragmento 3 se detectó actividad GOX en el ensayo fluorimétrico (datos no mostrados). **B**, antibiograma en MH frente a *E. coli* UM202 realizado con los trozos de gel que se indican en A. Las flechas muestran el halo de inhibición del crecimiento. **C**, secuencia peptídica de Marme_1655 donde se destacan en gris los 9 péptidos encontrados en el análisis tras la MS del fragmento 3 del gel en A.

IV.1.4. Determinación del operón *gox* e identificación del inicio de la transcripción.

La disponibilidad del genoma secuenciado de *M. mediterranea* (Lucas-Elío *et al.*, 2012b) nos permitió identificar las regiones adyacentes a Marme_1655 (fig. IV.7). Inmediatamente aguas abajo en la misma orientación y sin espacio intergénico entre ellos se encuentra el gen Marme_1654. Este gen codifica una proteína que presenta un 26.2 % de identidad y un 43.8 % de similitud con LodB, la proteína codificada por el gen

lodB que forma junto a *lodA* el operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010). De este modo, por la similitud con el operón *lod* y por el hecho de que los genes adyacentes estén orientados en sentido contrario, pensamos que Marme_1655 y Marme_1654 podrían formar parte de una misma unidad transcripcional.

Para comprobar si Marme_1655 y Marme_1654 forman un operón, se aplicó la técnica RT-PCR (apartado III.15 y III.16). En primer lugar, se obtuvo mRNA de la cepa MMB-1R cultivada en medio MNGL. Mediante el uso de diferentes cebadores específicos se generaron distintos cDNAs, determinando los genes que forman parte de un mismo cDNA mediante la realización de PCRs con diferentes oligonucleótidos (fig. IV.7).

Usando el cDNA 1654, el análisis mediante PCR reveló la presencia de Marme_1655 y de Marme_1654 en la misma unidad transcripcional. Tal como se muestra en la figura IV.7, las PCRs realizadas para amplificar cada uno de estos *loci* por separado y la que utiliza dos cebadores que se unen a los dos genes, generaron un producto del tamaño esperado. Por otra parte, la ausencia de bandas en las PCRs con la pareja de cebadores 1656DIR1-1655REV1 a partir del cDNA 1655 y en la PCR con la pareja 1654DIR1-1653REV1 a partir del cDNA 1653, sugieren que Marme_1656 y Marme_1653 no forman parte de la misma unidad transcripcional que Marme_1655 y Marme_1654.

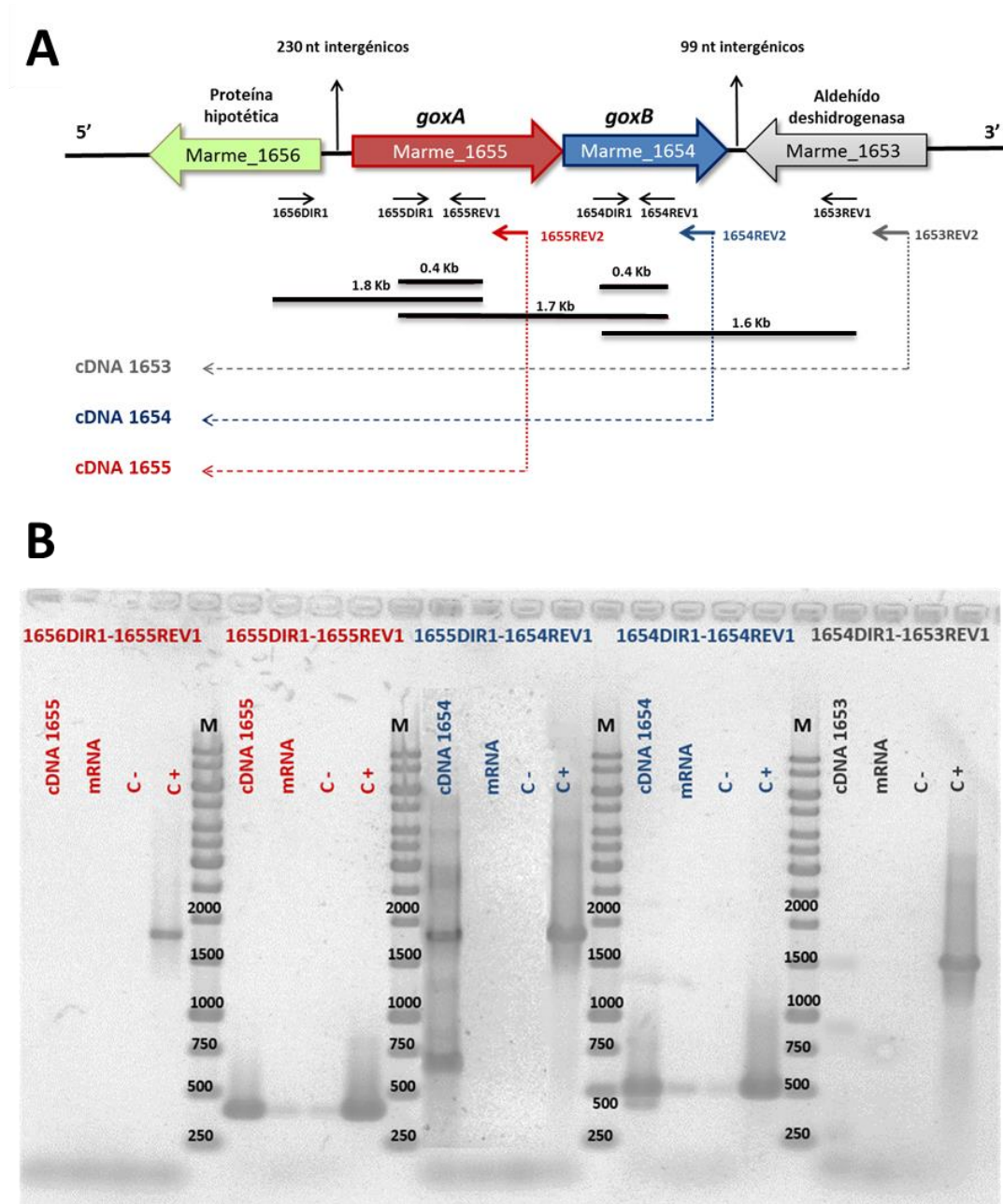


Figura IV.7. Determinación mediante RT-PCR de la unidad transcripcional que contiene Marme_1655. **A**, esquema ilustrativo de los oligonucleótidos y reacciones llevadas a cabo para determinar mediante RT-PCR la unidad transcripcional que contiene el operón *gox*. En el esquema se muestra la región genómica en el entorno del gen *goxA* (Marme_1655). Se muestran los distintos cDNAs generados (líneas discontinuas) usando los cebadores indicados. También se representa el lugar de hibridación de los oligonucleótidos específicos empleados en las distintas PCRs a partir de cada cDNA, así como el tamaño de los productos esperados de estas PCRs. **B**, electroforesis en gel de agarosa con los productos de las PCRs realizadas sobre los distintos cDNAs. En la calle de los marcadores (M) se indica el tamaño de las bandas en pb. mRNA, control de contaminación por DNA del mRNA de partida; C-, control de la PCR sin cDNA; C+, control positivo de la PCR con DNA genómico de MMB-1R.

Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos mediante la técnica RT-PCR podemos proponer que Marme_1655 y Marme_1654 constituyen un operón, no habiéndose encontrado evidencias de que ningún otro gen cercano forme parte del mismo. Este operón es muy similar al operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010), ya que ambos solo contienen dos genes, el que codifica la oxidasa y otro que codifica una flavoproteína hipotética. Por la similitud con el operón *lod*, dicho operón ha sido denominado operón *gox*, ya que codifica la glicina oxidasa, y los genes Marme_1655 y Marme_1654 como *goxA* y *goxB* respectivamente.

Por otra parte, con el objetivo de identificar la región promotora del operón *gox* se aplicó la técnica 5'RACE (apartado III.17). Como resultado, se obtuvo una banda de aproximadamente 300 pb que fue secuenciada por el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. El cromatograma indica que la transcripción se inicia en la adenina situada 41 pb aguas arriba del codón ATG de inicio de la traducción, o bien en la guanina inmediatamente anterior, situada 42 pb aguas arriba del ATG (fig. IV.8). Con el protocolo utilizado no es posible precisar con exactitud cuál de las dos bases es el inicio de la transcripción, ya que en el cromatograma, la cola de poli-G se dispone justo después de la A situada a -41 pb, siendo factible que la primera G no pertenezca a dicha cola de poli-G sino que fuese en realidad la G 42 pb aguas arriba del ATG donde se inicia la transcripción. En este contexto, hay que tener en cuenta que el inicio de la transcripción para otras dos de las oxidasas descritas en *M. mediterranea*, PpoA y PpoB, es una guanina, mientras que el inicio de la transcripción para el gen que codifica LodA es una cisteína (Molina-Quintero, 2011).

Teniendo en cuenta el lugar de inicio de la transcripción obtenido, proponemos como región -10 la secuencia TAATTT, así como la secuencia ATGTGA para la región -35. Además, se pudo identificar la secuencia de unión al ribosoma o de Shine-Dalgarno (AGGACG) a 5 nt del codón de inicio de la traducción (fig. IV.8).

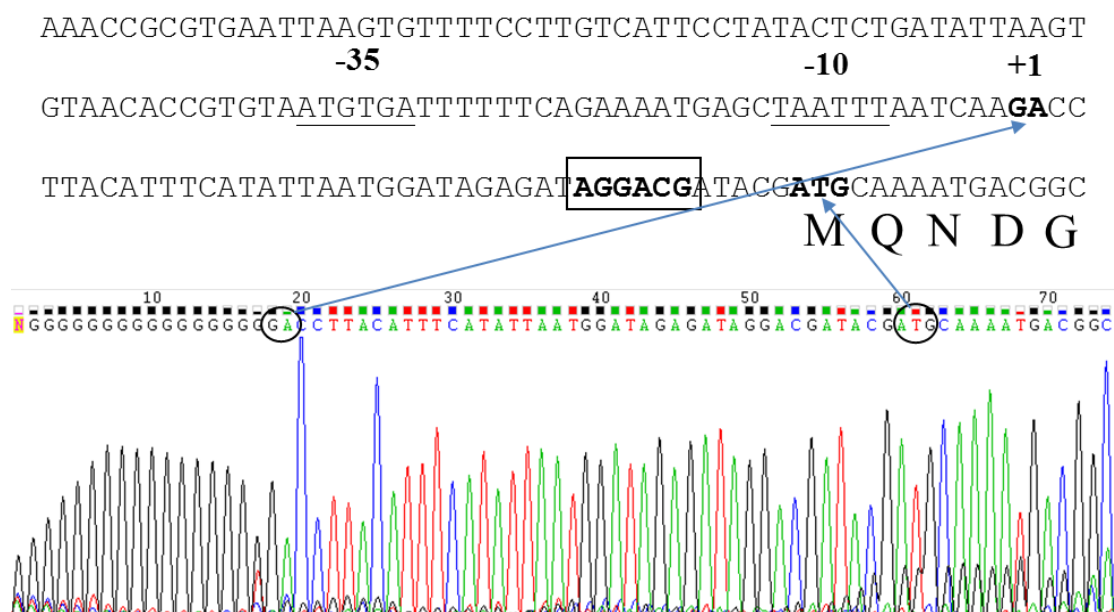


Figura IV.8. Extremo 5' y zona promotora del operón *gox* analizada por la técnica 5'-RACE. El lugar de inicio de la transcripción es la guanina o la adenina que se señalan en negrita con un +1. Las regiones -10 y -35 propuestas para el promotor aparecen subrayadas. La secuencia de Shine-Dalgarno o de unión al ribosoma está enmarcada en un rectángulo. En la parte inferior se muestra el cromatograma obtenido en la secuenciación del producto de la 5'-RACE. En él se rodean los residuos de guanina y adenina como nucleótidos de inicio de la transcripción, así como el codón ATG de inicio de la traducción. También se indican en la figura los 5 primeros residuos en la secuencia peptídica de GoxA (M Q N D G).

IV.1.5. Estudio comparativo de la secuencia de GoxA y de GoxB.

IV.1.5.1. Análisis de secuencia de GoxA.

El gen *goxA* (Marme_1655) tiene un tamaño de 2043 pb y codifica la proteína GoxA (número de acceso ADZ90918) de 680 aa con una masa molecular teórica de 76,3 kDa y un punto isoeléctrico de 5,05 (http://web.expasy.org/compute_pi/). Como ya hemos comentado anteriormente, GoxA es una de las dos proteínas similares a LodA codificadas en el genoma de *M. mediterranea*. Al hacer un BLAST con la secuencia peptídica de GoxA frente a la base de datos no redundante del NCBI observamos que las proteínas con mayor similitud están anotadas como proteínas hipotéticas de función desconocida. Además, estas proteínas similares pertenecen a microorganismos de la clase *Alphaproteobacteria*, como *Nisaea denitrificans*, *Thalassobaculum*

salexigens o *Fodinicurvata sediminis*. En cuanto a proteínas conocidas, GoxA guarda un 22,8 % de identidad y un 34,6 % de similitud con LodA. Aunque estos valores de similitud no sean muy altos, es importante señalar que podemos detectar los motivos conservados propuestos para LodA y proteínas similares (Lucas-Elío *et al.*, 2006) en la secuencia peptídica de GoxA (fig. IV.9). Este hecho sugiere que ambas proteínas pertenecen a una misma familia, aunque posean diferente actividad enzimática.

```

001  mqndgkkmkR  Rdflsmagsv  talsafflip  ksaiasthre  eapkdakihr  lgiyptigic
061  rvggsdqyfl  apevpglppm  peggfkdgtq  aikkqaqrfr  iyafddqdrv  igeitehnat
121  iewnvhlant  kaawygfnnp  ldngelapgi  pgqkrnqyfv  sdeerermlv  inggersisg
181  inqngdtend  tyqfvgqfwn  eetvklgkik  tdehgrlivi  ppdgvsnspt  naaitsfadn
241  dgwhddwcdg  pvqatvklpd  gtfmeadtaw  vacigpnfap  eippvttlyd  visnmnaeqg
301  wtpvpqapis  frkhiypifr  rlglmewvss  aanlrqgwlg  vgnfsdpayi  kqladpspan
361  qafrqdiftk  frnpnnvsdt  aylderlkmp  mmlgdginyd  gsplqwfqfp  hqqyqfleyw
421  aagnfndfe  ddkadaihti  edvdlklqpd  alteaalepc  sggafhpgve  lttylripsm
481  yarnydnaad  pfrlahrkrd  klvqnigrll  tlekaekgdp  algtspplah  qwagdltrwm
541  glpwqcdafs  Cqqvlmqedf  ptavwlpall  pidvlpeeny  tqlmdesldd  servkfyenr
601  adwkrgvagi  gyhanasywd  gitnmitlwe  rmgfvvkrkg  pkgagtgggls  avpkemyvev
661  grgnvedrfk  wnpsmgdlpn

```

Figura IV.9. Secuencia peptídica de GoxA destacando en gris las regiones conservadas propuestas para las proteínas similares a LodA. En negrita se indican los residuos conservados en LodA y GoxA según el alineamiento con la herramienta “Clustal Omega” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). En mayúsculas y subrayado aparecen los residuos conservados implicados en la generación del cofactor CTQ de LodA, que también están conservados en GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). En subrayado se indica el péptido señal del sistema de secreción TAT detectado por el programa “TatP 1.0” (Bendtsen *et al.*, 2005b). El par de argininas se resaltan en negrita, mayúscula y cursiva.

Por otro lado, a diferencia de LodA, GoxA presenta en su extremo N-terminal una región con homología al motivo típico de secreción TAT (Twin Arginine Translocation) que contiene la pareja de argininas, que le da nombre al sistema, formando parte de la secuencia consenso “SRRXFLK” (Lee *et al.*, 2006) (fig. IV.9). Este sistema es capaz de translocar proteínas completamente plegadas, que ya han adquirido su conformación oligomérica y cofactor, en el caso que lo requieran, antes de ser transportadas al exterior (Frobel *et al.*, 2012). En el genoma de *M. mediterranea* se ha detectado un operón formado por los genes Marme_3474, Marme_3475 y Marme_3476, que codifican proteínas que guardan homología con, respectivamente, TatA, TatB y TatC,

proteínas que forman el complejo translocasa en *E. coli* (Lee *et al.*, 2006). Por tanto, estas tres proteínas en *M. mediterranea* podrían formar el complejo translocasa del sistema TAT por el que GoxA, completamente plegada, sería secretada. El punto de corte del péptido señal se situaría entre la Ala-35 y la Ser-36, según la herramienta “TatP 1.0” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) (Bendtsen *et al.*, 2005b). La presencia de este motivo TAT en GoxA podría justificar la detección de la actividad GOX en los sobrenadante de los cultivos.

IV.1.5.2. Análisis del cofactor y modelo tridimensional de GoxA.

La sensibilidad de GoxA a los inhibidores de quinoproteínas expuesta en el apartado IV.1.2.3, indica la presencia de un cofactor de tipo quinónico en GoxA. Además, su homología con la secuencia de LodA (fig. IV.9) sugiere que el cofactor quinónico en GoxA sea también de tipo CTQ. Según el alineamiento con LodA, los residuos de GoxA que intervendrían en la generación de CTQ serían la Cys-551 y el Trp-566 (fig. IV.10A). Además, el Asp que interviene de forma esencial en la generación de CTQ en LodA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015) está también conservado en GoxA, correspondiendo al Asp-547 (fig. IV.10A). Mediante programas bioinformáticos se realizó un modelo estructural de GoxA (fig. IV.10B) y de su centro activo (fig. IV.10C), en el que intervienen los residuos mencionados, Cys-551, Trp-566 y Asp-547, y que se puede superponer al centro activo propuesto para LodA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

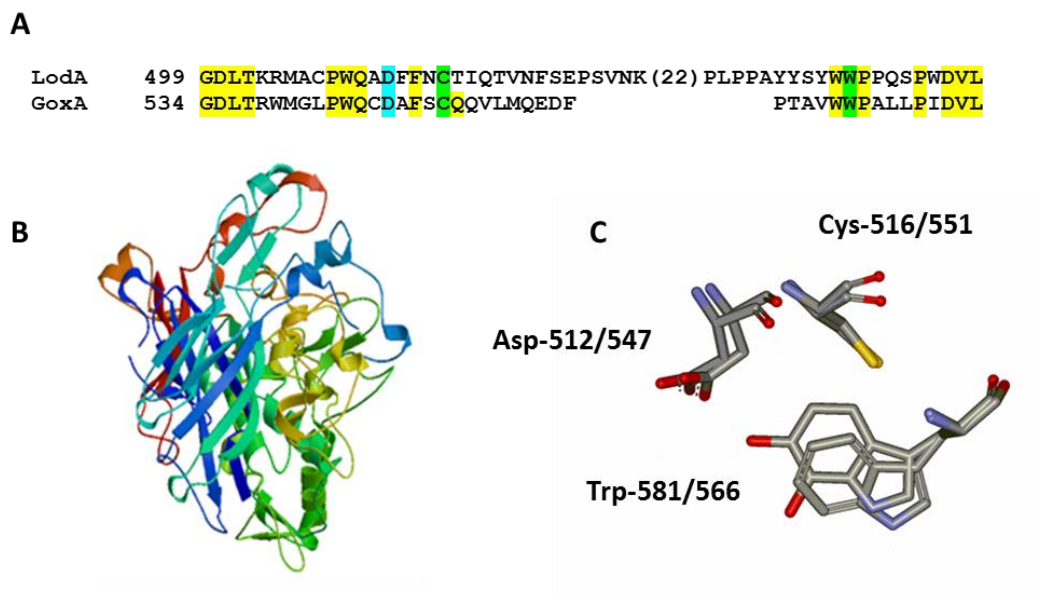


Figura IV.10. Comparación entre las secuencias peptídicas de LodA y GoxA que intervienen en la formación del cofactor CTQ y modelo tridimensional de GoxA. **A**, alineamiento de secuencia alrededor de los residuos implicados en la generación del cofactor. En amarillo se destacan los residuos conservados en ambas proteínas, en verde, los residuos que forman el cofactor y en azul, el aspártico conservado en las mediaciones del centro activo. **B**, modelo tridimensional de GoxA proporcionado por el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) teniendo en cuenta la secuencia peptídica de GoxA y la estructura de LodA (PDB ID 2YMW). **C**, figura que muestra la superposición de los cofactores CTQ en las estructuras de LodA (formado por la Cys-516 y Trp-581) y GoxA (formado por la Cys-551 y Trp-566), incluyendo los aspárticos conservados implicados en la generación del cofactor (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). El alineamiento entre el modelo de GoxA y la estructura de LodA fue llevado a cabo mediante el programa “RCSB Pairwise Structure Alignment” (<http://www.rcsb.org/pdb/workbench/workbench.do>) (Ye y Godzik, 2003).

Las observaciones expuestas en los apartados IV.1.5.1 y IV.1.5.2 sugieren que las proteínas similares a LodA podrían constituir un grupo de proteínas con actividad oxidasa que contienen cofactor quinónico. El estudio de las proteínas similares a LodA y GoxA en genomas microbianos y su relación filogenética se abordará en el apartado IV de esta memoria.

IV.1.5.3. Análisis de secuencia de GoxB.

Además de GoxA, la otra proteína codificada por el operón *gox* es la flavoproteína hipotética GoxB (número de acceso ADZ90917), que tiene un tamaño de 379 aa, una masa molecular teórica de 41,9 kDa, un punto isoeléctrico de 5,96 (http://web.expasy.org/compute_pi/) y está codificada por Marme_1654 (*goxB*) de

unas 1140 pb. Se analizó, mediante herramientas bioinformáticas la existencia de péptido señal en la secuencia peptídica de GoxB y su posible localización, llegando a la conclusión de que se trata de una proteína citoplasmática. Adicionalmente, se analizó la estructura secundaria de GoxB mediante la herramienta “JPred4” (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) (Drozdetskiy *et al.*, 2015). El análisis predice una estructura secundaria de GoxB con un 30,9 % de dominio alfa hélice, un 23,2 % de hoja beta y un 45,9 % de estructura desordenada (fig. IV.11A), una estructura secundaria muy similar a la que presenta LodB, con un 30,1 % de hélice alfa, 23 % de hoja beta, y 46,9 % de estructura desordenada (Chacón-Verdú, 2015).



Figura IV.11. Análisis de secuencia de GoxB. **A**, predicción de la estructura secundaria de GoxB mediante la herramienta “JPred 4”. **H**, hélice alfa; **E**, hoja beta; **-**, estructura desordenada. **B**, alineamiento del dominio DBM entre GoxB y LodB en el que se indica en azul la disposición de las glicinas conservadas en la primera mitad del dominio de Rossmann (Vallon, 2000).

GoxB muestra un 26 % de identidad y un 42,8 % de similitud con LodB, proteína requerida para la correcta expresión de LodA y que forma parte del operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010). LodB presenta en su secuencia varios motivos típicos de flavoproteínas, como el motivo conservado de unión a dinucleótidos (DBM) (Chacón-Verdú, 2015), que presenta la secuencia consenso xhxhGxGxxGxxxhxxh(x)₈hxE. En la secuencia de GoxB podemos identificar en su región N-terminal la secuencia VAIVGGGLAGAAVIALKQSGFSIVWIRPKME, que encaja con el motivo conservado DBM.

Además, al analizar la predicción de la estructura secundaria de GoxB, se observa claramente en esta región una estructura $\beta 1\alpha 1\beta 2$ en la que la disposición de las glicinas coincide con la disposición característica del motivo de Rossmann (Bottoms *et al.*, 2002) (fig. IV.11B), siendo éste un motivo típico de proteínas que unen FAD como cofactor (Dym y Eisenberg, 2001).

IV.1.6. Comprobación de que el operón *gox* codifica la glicina oxidasa de *M. mediterranea*.

Para confirmar que Marme_1655 codifica la enzima con actividad GOX en *M. mediterranea* se delecionó el operón *gox* (Marme_1655 y Marme_1654), en la cepa LD que ya tiene delecionado el operón *lod*. La construcción de este mutante se basa en un proceso de doble recombinación y contraselección con sacarosa (apartado III.13).

El mutante obtenido, al que se le llamó LGD (delección en la lisina y glicina oxidasa), se cultivó en medio MNGL y se realizaron medidas de actividad GOX en el sobrenadante a las 48 h de cultivo. Los resultados mostraron que la delección del operón *gox* producía la pérdida de actividad glicina oxidasa (fig. IV.12). Posteriormente, con el fin de confirmar la implicación del operón en la expresión de la actividad GOX, se realizaron experimentos de complementación con los genes delecionados (apartado III.13). Así, se obtuvo un mutante de la cepa LGD que poseía una inserción en el genoma de los genes Marme_1655 y Marme_1654, así como una zona de aproximadamente 200 pb aguas arriba de Marme_1655 que posiblemente contenga su región promotora. A la cepa así construida se le denominó LGDAB. Esta cepa fue cultivada en medio MNGL y se realizaron medidas de actividad a las 48 h de cultivo en los sobrenadantes, observándose que se recuperaba la actividad GOX perdida (fig. IV.12). En conclusión, los resultados descritos en este apartado, junto con los del apartado IV.1.3, demuestran que la glicina oxidasa de *M. mediterranea* está codificada por el gen *goxA* (Marme_1655).

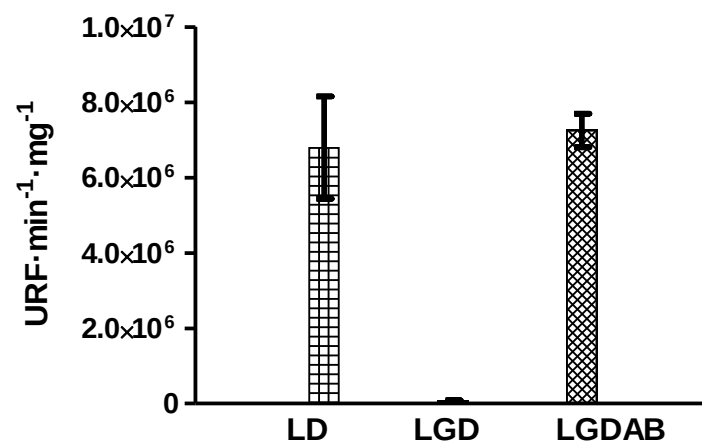


Figura IV.12. Actividad GOX en los sobrenadantes de las cepas de *M. mediterranea* LD, LGD (Δgox) y del mutante LGDAB (LGD complementado con el operón *gox* junto a su región promotora), cultivadas 48 h en medio MNGL.

CAPÍTULO 2

IV.2. Expresión recombinante del operón *gox*.

Los datos expuestos en el apartado IV.1 demuestran que la glicina oxidasa de *M. mediterranea* está codificada por el operón *gox*, formado por los genes *goxA* (Marme_1655) y *goxB* (Marme_1654). Con el fin de continuar con el estudio de la actividad GOX, se procedió a la expresión heteróloga del operón en *E. coli*.

IV.2.1. Detección de actividad glicina oxidasa en cultivos inducidos de *E. coli* Rosetta que expresan el operón *gox*.

Trabajos previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que la presencia de la proteína LodB es esencial para la generación de la forma activa de LodA, estando ambas proteínas codificadas por el operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010). Por ello, para expresar de forma recombinante la glicina oxidasa de *M. mediterranea* se construyó, tal y como se describe en el apartado III.14.1, el plásmido pETGOXAB11 que contiene los dos genes, *goxA* y *goxB*. Dicho plásmido se transformó mediante electroporación en la cepa Rosetta [BL21(DE3)pRARE] de *E. coli*. El plásmido pRARE (Novagen) codifica ciertos tRNAs para codones usados con baja frecuencia por *E. coli*. El empleo de este plásmido está justificado puesto que *M. mediterranea* y *E. coli* K12, de acuerdo al Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon>), muestran diferencias en el uso de diversos codones que pueden afectar en la expresión recombinante. De hecho, el empleo de este vector fue necesario para expresar LodA correctamente en *E. coli* (Gómez, 2010). Como control positivo en el experimento de inducción se empleó la cepa Rosetta transformada con el plásmido pETLODAB11, que expresa la actividad LOD,

y como control negativo la cepa Rosetta transformada con pET11, que no posee ningún inserto.

En un ensayo preliminar se utilizaron las condiciones de inducción que mejor funcionan en la expresión recombinante del operón *lod*, esto es, una temperatura de inducción de 15 °C y una concentración de IPTG de 1mM (Gómez, 2010). Además, se adicionó glucosa al 1 %, ya que reduce los niveles de expresión basal de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión pET (Grossman *et al.*, 1998). Tras incubar las muestras o/n con el inductor, se recogieron alícuotas y se procesaron para obtener la fracción activa soluble (también denominada extractos celulares) (apartado III.14.3) y se precipitaron con EtOH para eliminar las catalasas codificadas por *E. coli* Rosetta (apartado III.6). Las muestras así obtenidas fueron sometidas a electroforesis de proteínas y medidas de actividad en el fluorímetro.

Los resultados mostraron que la coexpresión de *goxA* y *goxB* en este sistema permite detectar la actividad GOX (fig. IV.13A), confirmando la hipótesis de que el operón *gox* codifica la glicina oxidasa en *M. mediterranea*. El análisis electroforético permitió a su vez detectar las proteínas GoxA y GoxB en la fracción soluble, con un tamaño aproximado similar al teórico según sus secuencias peptídicas (76 kDa para GoxA y 42 kDa para GoxB) (fig. IV.13B). La presencia de una banda justo debajo de GoxA, con una menor intensidad, podría ser GoxA sin el péptido señal de las Twin-Argininas, que daría una masa molecular de 72,5 kDa aproximadamente, u otro tipo de procesamiento proteolítico inespecífico.

En la figura IV.13B podemos apreciar el multímero formado por LodA, que posee actividad LOD (Gómez *et al.*, 2010). Sin embargo, en las condiciones ensayadas no se detecta una conformación oligomérica similar para GoxA, con un tamaño que pudiera corresponder a la forma con actividad que ha sido observada en los antibiogramas en el sistema nativo (fig. IV.6B). De hecho, al comparar el patrón de bandas entre las muestras desnaturalizadas y las no desnaturalizadas, no se aprecia ninguna diferencia relevante que pudiera sugerir la disociación de un posible multímero de GoxA. Por el contrario, esta desnaturalización del complejo queda reflejada en el caso de LodA (fig.

IV.13B). Como es de esperar, al desnaturalizar las muestras no se detecta actividad GOX ni LOD (datos no mostrados).

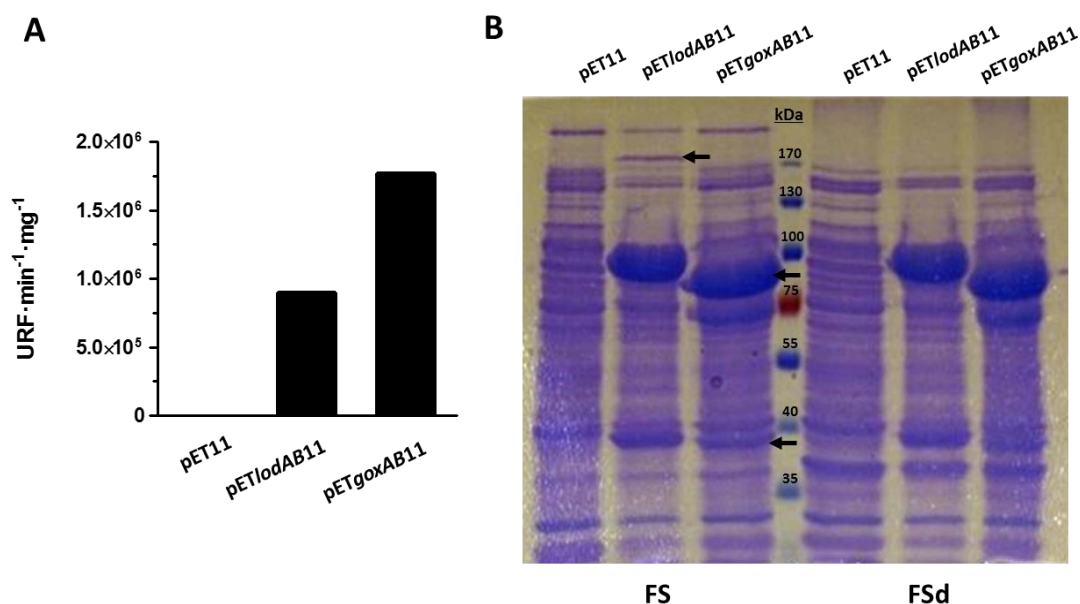


Figura IV.13. Expresión heteróloga del pETGOXAB11 en *E. coli* Rosetta. Como controles se emplearon los plásmidos pET11 y pETLODAB11. Los cultivos fueron inducidos a 15 °C durante 16 h con 1 mM IPTG y 1 % de glucosa. **A**, actividad GOX en los extractos de cultivos inducidos (actividad LOD en el caso del pETLODAB11). **B**, SDS-PAGE de la fracción soluble en condiciones no desnaturalizantes (FS) y desnaturalizantes (FSd). Las flechas indican GoxA (76 kDa aproximadamente) y GoxB (42 kDa aproximadamente), así como el multímero de LodA (190 kDa aproximadamente).

IV.2.2. Optimización de la expresión recombinante del operón *gox*.

Dado que los niveles de actividad GOX obtenidos por el sistema recombinante eran bajos en comparación con los del sistema nativo, se estudiaron diversos métodos con el fin de lograr mayores niveles de actividad.

IV.2.2.1. Expresión del operón *gox* en *E. coli* CD03.

Con el fin de evitar la etapa de precipitación con EtOH al expresar el operón *gox* en la estirpe Rosetta, se decidió utilizar la cepa CD03, que es una estirpe de *E. coli* que tiene

afectada su actividad catalasa (Kishishita *et al.*, 2003). Esto la convierte, a priori, en una cepa apropiada para la detección directa en extractos celulares de actividades enzimáticas que liberan peróxido de hidrógeno, evitando así la etapa de precipitación con EtOH. Entonces, se repitió el experimento descrito en el apartado anterior empleando, además de la estirpe Rosetta, la cepa CD03 con el plásmido pRARE. Se utilizaron las mismas condiciones de inducción (muestras incubadas o/n, con IPTG 1mM y glucosa 1 %, a 15 °C) y las mismas construcciones (pET11 sin inserto, pETLODAB11, y pETGOXAB11). Tras la obtención de la fracción soluble, con precipitación etanólica en el caso de la cepa Rosetta, se realizaron medidas de actividad y electroforesis de proteínas (fig. IV.14).

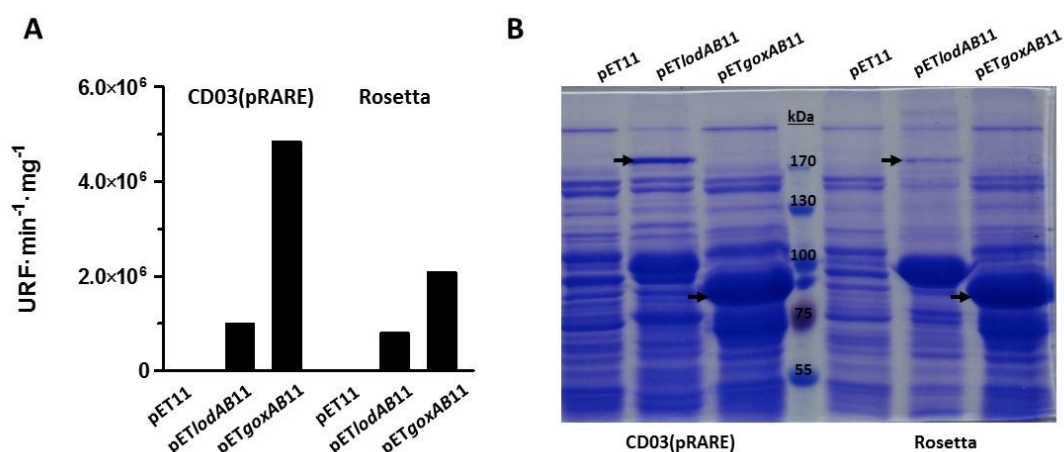


Figura IV.14. Medidas de actividad (A) y SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes (B) de la fracción soluble de las cepas de *E. coli* CD03(pRARE) y Rosetta, que fueron transformadas con el plásmido pETGOXAB11, y con el pETLODAB11 y pET11 como controles. Las condiciones de inducción fueron 15 °C, con 1 mM IPTG durante 16 h y 1 % de glucosa. Las flechas señalan a GoxA (76 kDa aproximadamente) y a la forma multimérica de LodA (190 kDa aproximadamente).

Los resultados mostraron que la cepa CD03 es capaz de expresar correctamente la glicina oxidasa, obteniéndose mayores niveles de actividad (fig. IV.14A), y ligeramente, una mayor expresión de proteínas (fig. IV.14B) que cuando empleamos la cepa Rosetta. Por ello en futuros experimentos se utilizó preferiblemente la cepa CD03(pRARE) que, adicionalmente, permite la detección de la actividad GOX directamente en los extractos.

Como se puede apreciar en el SDS-PAGE de la fig. IV.14, no fue posible identificar ningún complejo activo de alto peso molecular formado por GoxA, que sí se observa en el caso de LodA. La ausencia en los geles de proteínas del posible complejo formado por GoxA podría deberse a que las condiciones de inducción ensayadas no fueran las óptimas para la formación del complejo y/o porque éste se disocie en nuestras condiciones de electroforesis.

IV.2.2.2. Incubación de los extractos celulares a 25 °C.

En los experimentos de inducción se observó que el tiempo transcurrido desde la preparación de los extractos celulares (fracción soluble) parecía favorecer la detección de la actividad GOX. Para confirmar dicha observación, la cepa CD03(pRARE) fue transformada con los plásmidos pETGOXAB11, pET11 sin inserto y pETLODAB11. Se recogieron muestras inducidas 16 h a 15 °C, con IPTG 1mM y glucosa 1 %. Tras la sonicación y posterior centrifugación para eliminar los restos celulares, los extractos celulares se incubaron a 25 °C. Se midió la actividad GOX a diferentes tiempos (fig. IV.15A) y se realizaron SDS-PAGE para ver posibles cambios en el patrón de bandas (fig. IV.15B).

Los resultados muestran que, cuando los extractos celulares son incubados a 25 °C tras la sonicación, la actividad GOX va aumentando a lo largo del tiempo hasta alcanzar un máximo en incubaciones o/n. Este aumento de actividad no se aprecia en el caso de la actividad LOD, en donde la primera media hora sí que parece aumentar un poco la actividad, pero a partir de este punto la actividad se mantiene (fig. IV.15A). Este incremento en la actividad no está acompañado por modificaciones proteicas detectables por SDS-PAGE en los extractos a lo largo del periodo de incubación (fig. IV.15B). En función de estos resultados, a partir de este momento los extractos fueron incubados a temperatura ambiente durante 4 horas antes de realizar los ensayos de actividad.

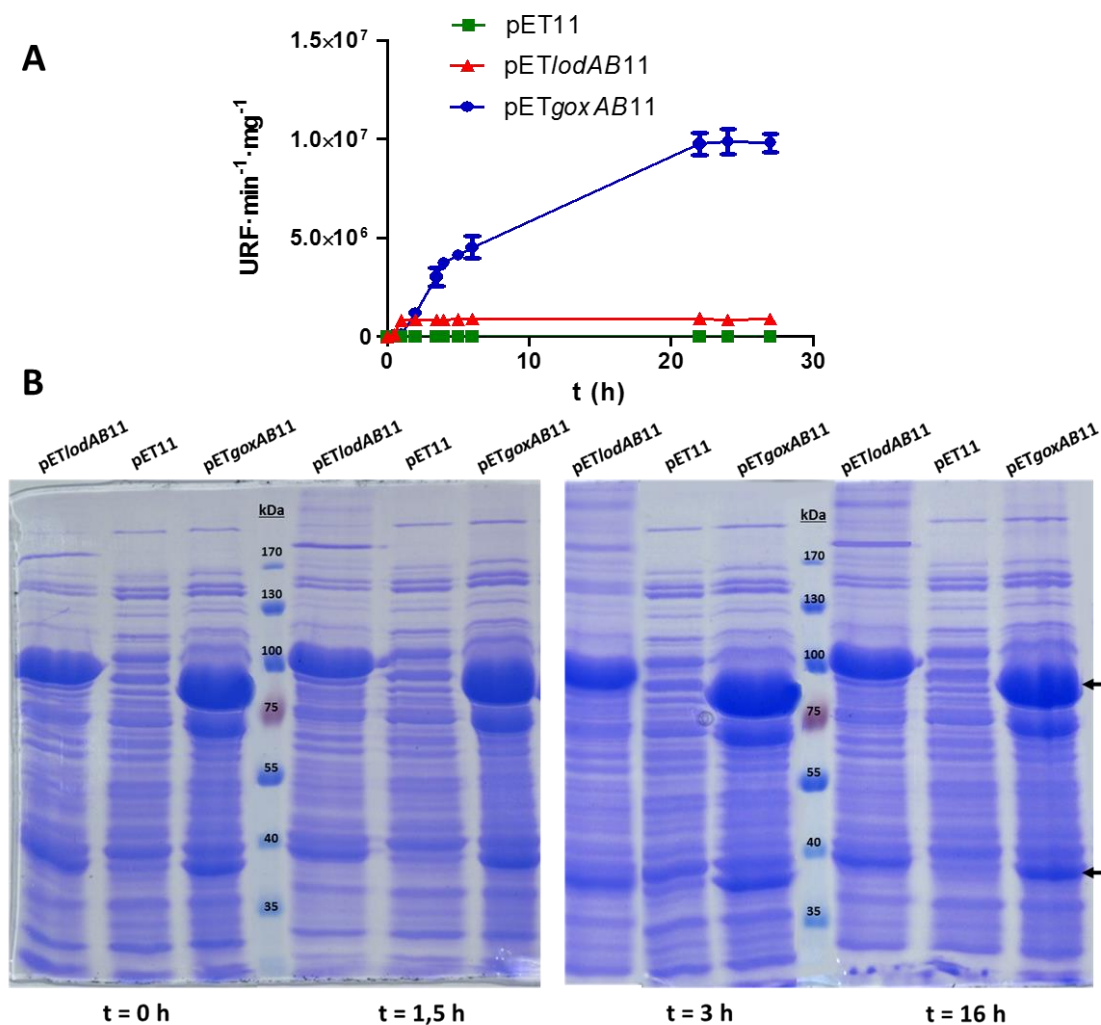


Figura IV.15. Incremento de la actividad GOX al incubar los extractos celulares a 25 °C. Como controles se utilizaron los plásmidos pET11 y pETLODAB11. Los cultivos de *E. coli* CD03(pRARE) fueron inducidos a 15 °C durante 16 h con 1 mM IPTG y 1 % de glucosa y los extractos incubados a 25 °C durante diferentes tiempos. **A**, actividad GOX. **B**, SDS-PAGE de la fracción soluble en condiciones no desnaturantes. Las flechas indican GoxA (76 kDa aproximadamente) y GoxB (42 kDa aproximadamente).

IV.2.2.3. Inducción a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones de IPTG.

En los experimentos descritos anteriormente el operón *gox* se expresó siempre en las mismas condiciones de inducción: muestras inducidas durante 16 h, con IPTG 1mM y 1 % de glucosa a 15 °C. Con el fin de optimizar la obtención de Gox recombinante, a continuación se ensayaron distintas temperaturas y tiempos de inducción, así como diferentes concentraciones de IPTG. Para ello, se transformó la cepa CD03(pRARE) con el plásmido pETGOXAB11 y con el pET11 sin inserto como control.

En primer lugar, nos propusimos estudiar el efecto del tiempo de inducción así como la cantidad de agente inductor, por lo que en el siguiente experimento se ensayaron, a la temperatura de 15 °C que sabemos que permite la correcta expresión del operón, dos concentraciones de IPTG, 0,5 y 1 mM, y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos de inducción (1, 2 y 16 h). Éstas se procesaron para obtener la fracción soluble con el fin de comparar los niveles de actividad GOX y la expresión de proteínas en las diferentes condiciones ensayadas (fig. IV.16).

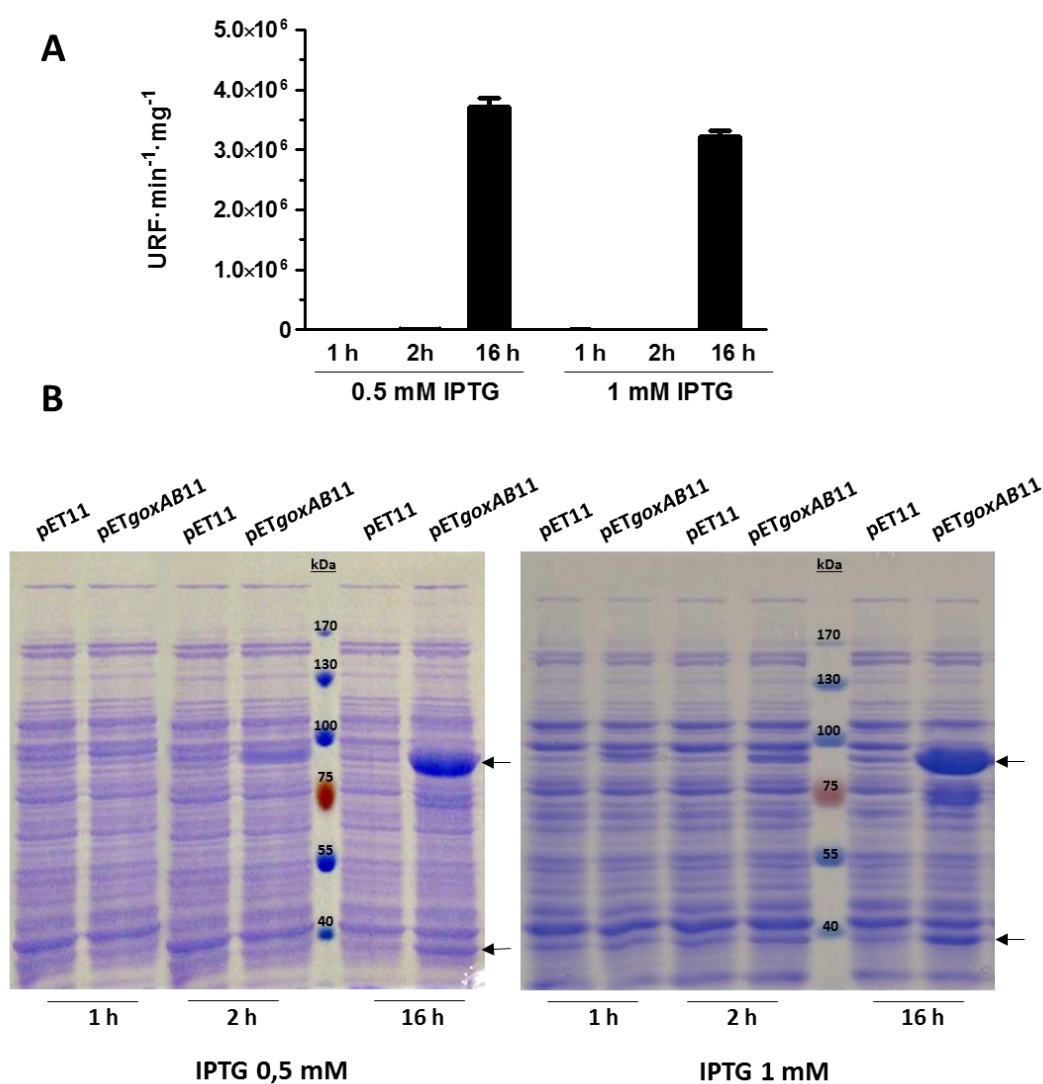


Figura IV.16. Expresión heteróloga del operón *gox* usando el plásmido pETGOXAB11 en *E. coli* CD03(pRARE) a diferentes tiempos de inducción y distintas concentraciones de IPTG. Los cultivos fueron inducidos 1, 2 o 16 h a 15 °C con 0,5 o 1 mM de IPTG y 1 % de glucosa. **A**, actividad GOX. **B**, SDS-PAGE en condiciones no desnaturalizantes. Las flechas señalan a GoxA (76 kDa aproximadamente) y GoxB (42 kDa aproximadamente).

Por un lado, los resultados indican que no hay diferencias relevantes entre una concentración de 0,5 o 1mM de IPTG, ni en los niveles de actividad GOX (fig. IV.16A), ni en la expresión de proteínas (fig. IV.16B). Por otro lado, el tiempo de incubación con el agente inductor sí que parece influir de manera determinante en la expresión de la actividad GOX, ya que sólo detectamos actividad GOX a las 16 h (fig. IV.16A). Además, los geles SDS-PAGE muestran mayores niveles de GoxA y GoxB a las 16 h que a 1 o 2 h de incubación con IPTG (fig. IV.16B).

Más tarde, se estudió el posible efecto de la temperatura de inducción sobre la actividad GOX y la expresión de GoxA y GoxB. Se realizó la inducción a 25 y a 30 °C, dejando incubar 2 y 16 h las muestras con 0,5 mM de IPTG (fig. IV.17).

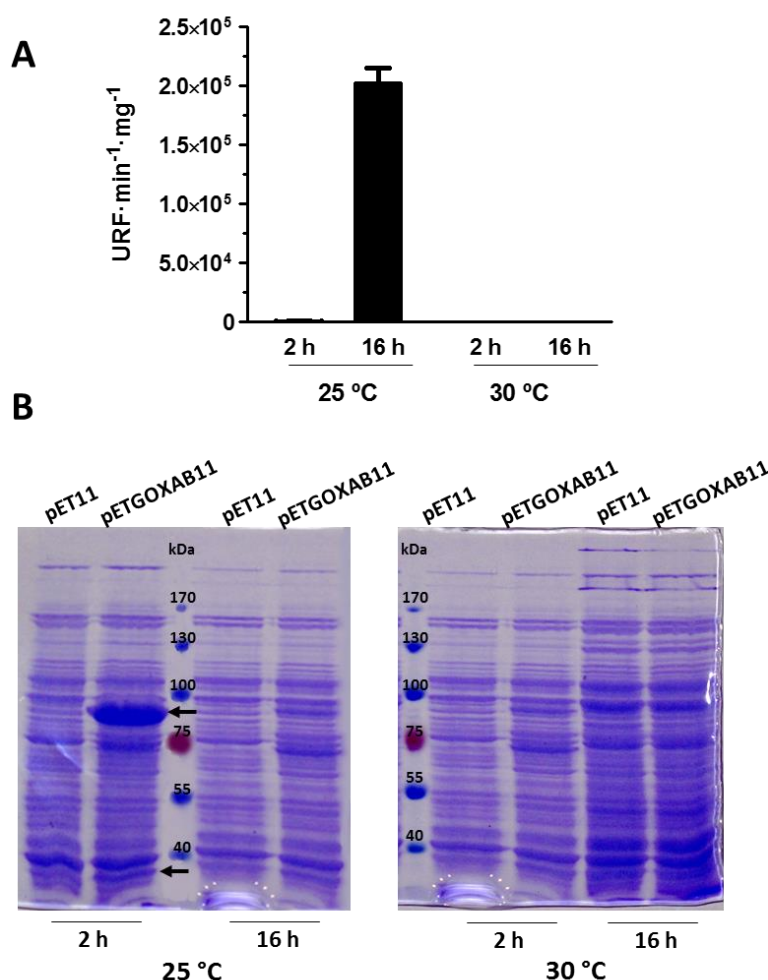


Figura IV.17. Expresión recombinante del operón *gox* utilizando el pETGOXAB11 en *E. coli* CD03(pRARE) a diferentes temperaturas y tiempos de inducción. Los cultivos fueron inducidos, a la temperatura indicada, 2 o 16 h con 0,5 mM de IPTG y 1 % de glucosa. **A**, actividad GOX. **B**, SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Las flechas señalan a GoxA (76 kDa aproximadamente) y GoxB (42 kDa aproximadamente).

Los datos muestran que la temperatura de inducción afecta a la expresión de la actividad GOX. En concreto, la inducción a 30 °C supone la pérdida total de la actividad, mientras que a 25 °C, la actividad, que sólo se observa en las muestras incubadas 16 h, es muy baja en comparación a la de 15 °C (fig. IV.16A y IV 16B). Cuando la inducción fue a 25 °C, a tiempos cortos se detectaron mayores niveles de GoxA y GoxB que a tiempos largos (fig. IV.17B). A pesar de la síntesis de GoxA, la actividad no se detectó, lo que podría deberse a diferentes causas, como por ejemplo que no se haya sintetizado el cofactor.

En conclusión, se ha determinado que las condiciones óptimas de inducción para obtener los mayores niveles de actividad GOX son la inducción durante 16 h con IPTG 0,5 mM y 1 % de glucosa, a una temperatura de 15 °C y una incubación a 25 °C de los extractos celulares durante 4 horas (fig. IV.16A). Estas condiciones estándar de inducción han sido utilizadas en el resto de experimentos descritos a lo largo de esta memoria.

IV.2.3. Purificación de GoxA recombinante y tamaño aproximado de la forma activa.

Con el fin purificar GoxA se construyó el plásmido pETGOXAB15 (apartado III.14.1). En esta construcción la proteína GoxA posee una cola de poli-histidinas en su extremo N-terminal que permite su purificación mediante una matriz de afinidad con níquel. La cepa CD03(pRARE) fue transformada con este plásmido y se emplearon las condiciones óptimas de inducción descritas anteriormente para la expresión de GoxA. Tras la purificación de la fracción soluble de las muestras con la resina Ni-NTA (apartado III.14.4) se procedió a realizar medidas de actividad GOX y electroforesis de proteínas.

La fusión de la cola de poli-His en el extremo N-terminal de GoxA no pareció afectar a su actividad (fig. IV.18A). En los geles se observó la co-purificación de GoxA junto a una

banda con un peso molecular compatible con GoxB (figura IV.18B), lo que sugiere la existencia de una interacción molecular entre GoxA y GoxB formando algún tipo de complejo. Este complejo se rompería en el proceso de SDS-PAGE incluso en las condiciones definidas en este estudio como no desnaturizantes. Esta observación concuerda con la hipótesis de que la presencia de GoxB intervenga en la generación de GoxA activa, del mismo modo que LodB es necesaria para generar LodA activa (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

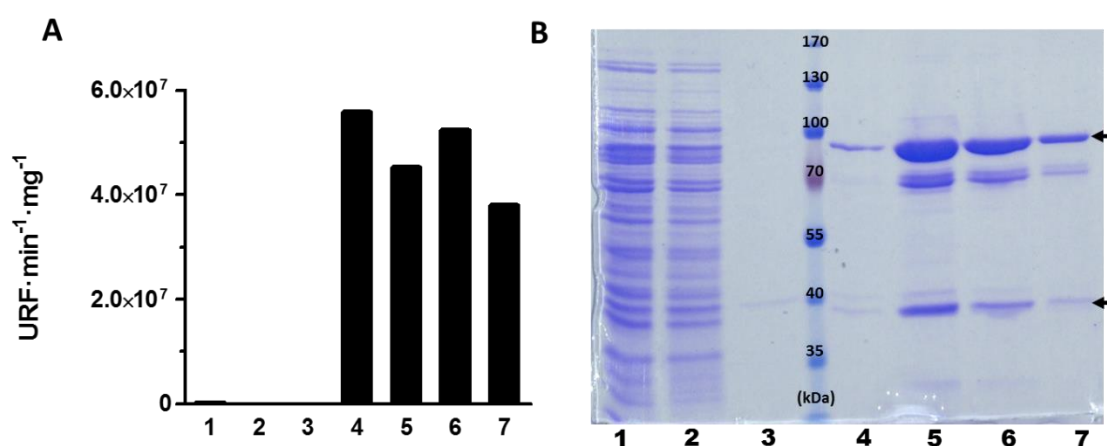


Figura IV.18. Purificación de GoxA recombinante con resina Ni-NTA. Los cultivos de *E. coli* CD03(pRARE) conteniendo el pETGOXAB15 fueron inducidos durante 16 h a 15 °C con 0,5 mM de IPTG y 1 % de glucosa. **A**, actividad GOX; **B**, SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. 1, fracción no retenida por la resina; 2, primer lavado de la resina; 3, décimo lavado de la resina; 4, 1ª elución; 5, 2ª elución; 6, 3ª elución; 7, 4ª elución. Las flechas señalan a GoxA (76 kDa aproximadamente) y GoxB (42 kDa aproximadamente).

Posteriormente, con el fin de determinar en el sistema recombinante el tamaño aproximado de la forma activa de GoxA, se llevó a cabo un SDS-PAGE que se utilizó para realizar antibiogramas y medidas de actividad enzimática de forma paralela (fig. IV.19). Para ello se utilizó una muestra con actividad GOX perteneciente a la fracción soluble purificada de la segunda elución descrita anteriormente.

Tras la electroforesis se pudo observar que la actividad antimicrobiana se detectaba en el fragmento 2 del gel (figura IV.19B). Esta localización coincide asimismo con las medidas de actividad GOX detectadas en ese fragmento del gel (fig. IV.19C), por lo que podemos decir que la forma activa de GoxA posee una masa molecular aparente entre 170 y 130 kDa (fig. IV.19A), tamaño similar al propuesto para la forma activa en el

sistema nativo (fig. IV.6B) y que correspondería al de un dímero. De forma similar, en el caso de LodA la forma con actividad no es la proteína en su conformación monomérica, sino que la forma activa es un tetrámero de alto peso molecular (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010).

En estudios recientes se ha demostrado mediante cromatografía de exclusión molecular que la forma activa de GoxA corresponde a un dímero (Sehanobish *et al.*, 2016). En dichos estudios también se ha demostrado que GoxA se puede encontrar formando un complejo con GoxB. La no detección del dímero o del complejo en los geles SDS-PAGE puede deberse a su baja concentración o a las condiciones usadas en la electroforesis.

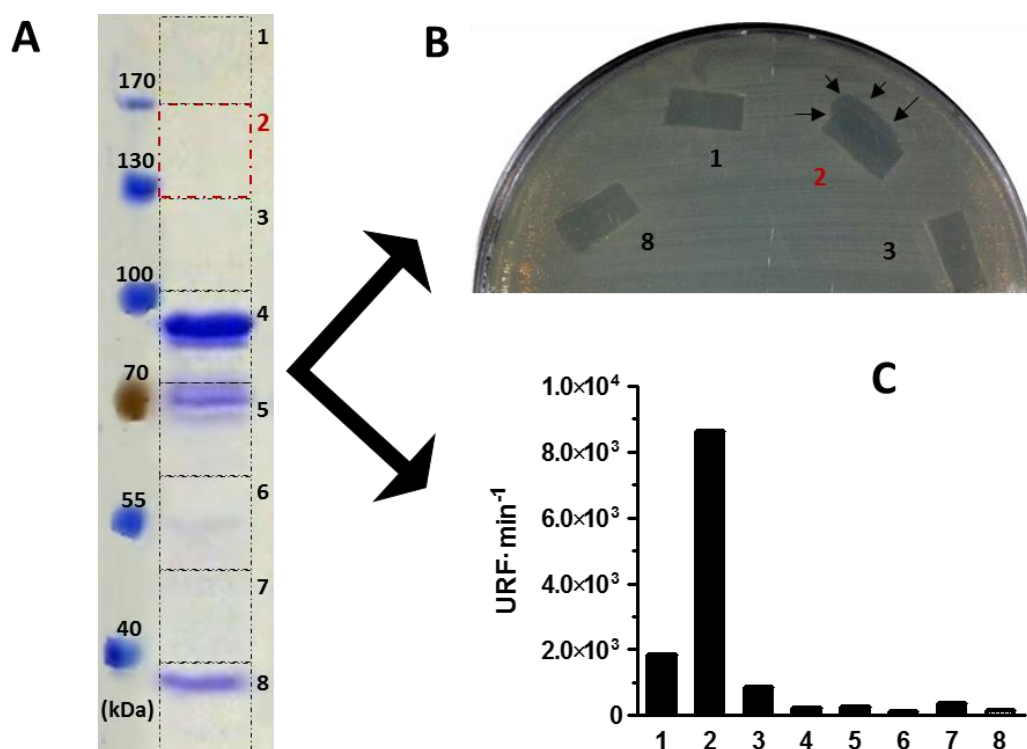


Figura IV.19. Localización de la actividad glicina oxidasa expresada recombinantemente en geles SDS-PAGE. La muestra corresponde al producto de purificación de la expresión recombinante *E. coli* CD03(pRARE) con el plásmido pETGOXAB15 inducida con 0.5 mM de IPTG y 1% de glucosa e incubada 16 h a 15 °C. **A**, SDS-PAGE en el que se indican los 8 fragmentos cortados para realizar el antibiograma y el ensayo de actividad GOX. **B**, antibiograma en MH frente a *E. coli* UM202 realizado con los trozos de gel que se indican en A. Las flechas muestran el halo de inhibición del crecimiento. **C**, ensayo de actividad GOX a partir de los fragmentos de gel indicados en A.

IV.2.4. Análisis mediante espectrometría de masas de GoxA y GoxB recombinantes.

Por similitud con LodA y en función de los resultados con inhibidores se propone que GoxA es una quinoproteína. Con el fin de estudiar las posibles modificaciones post-traduccionales de GoxA y las proteínas presentes en las muestras de expresión recombinante purificadas, éstas se analizaron mediante digestión con tripsina y posterior análisis por MALDI-TOF. Para ello se tomaron muestras de la fracción soluble de la cepa CD03(pRARE) conteniendo el plásmido pETGOXAB15, purificadas por una segunda elución de la resina Ni-NTA y procesadas tal y como se describe en el apartado III.14.3. Los resultados obtenidos muestran la presencia de péptidos pertenecientes tanto a GoxA como a GoxB (tabla IV.2), confirmando que GoxB se co-purifica junto con GoxA. Con esta técnica se consiguieron detectar 22 péptidos pertenecientes a GoxA que cubren el 51 % de la proteína total, mientras que de GoxB se detectaron 7 péptidos que cubren el 28 % de la proteína (tabla IV.2).

Adicionalmente se detectaron en el análisis un par de picos que podrían corresponder a dos péptidos de diferente tamaño, compatibles con la generación del cofactor CTQ. En estos péptidos se observan las modificaciones en la Cys-551 y el Trp-566, que implican la unión covalente de estos residuos, dando un incremento de MM de +28 (tabla IV.2). Este resultado apoya la idea propuesta en el apartado IV.1.5.2, de que la glicina oxidasa de *M. mediterranea* posee un cofactor quinónico de tipo CTQ.

En resumen, el análisis por espectrometría de masas reveló que las bandas observadas en la fig. IV.18B corresponden a GoxA activa con el cofactor quinónico CTQ y a GoxB. El complejo formado por GoxA y GoxB posiblemente esté relacionado con la generación de GoxA activa (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

Tabla IV.2. Análisis por MALDI-TOF de muestras de la glicina oxidasas recombinante purificada. Se muestran los péptidos detectados pertenecientes a GoxA y GoxB tras digestión con tripsina y posterior análisis por MALDI-TOF. En verde se destacan los residuos que forman parte del cofactor. En gris se indica la cisteína detectada con una modificación mediante carbamidometilación, que supone un incremento de +57.

Proteína	Secuencia	m/z experimental
GoxA	(R)QDIFTK(F)	751,40
GoxA	(K)HIYPIFR(R)	945,53
GoxA	(R)MLVINGGER(S)	988,52
GoxA	(K)GAGTGGLSAVPK(E)	1014,56
GoxA	(R)NYDNAADPFR(L)	1182,52
GoxA	(R)ERMLVINGGER(S)	1273,67
GoxA	(R)NQYFVSDEER(E)	1286,57
GoxA	(K)QLADPSPANQAFR(Q)	1414,71
GoxA	(R)LGLMEWVSSAANLR(Q)	1546,81
GoxA	(R)NYDNAADPFRLAHR(K)	1659,80
GoxA	(R)QGWLGVGNFSDPAYIK(Q)	1751,88
GoxA	(R)NPNNVSDTAYLDERLK(M)	1848,81
GoxA	(R)DFLSMAGSVTALSAPFLIPK(S)	2065,10
GoxA	(R)RDFLSMAGSVTALSAPFLIPK(S)	2221,20
GoxA	(K)AAWYGFNNPLDNGELAPGIPGQK(R)	2429,19
GoxA	(K)AEKGDPALGTSPPLAHQWAGDLTR(W)	2488,26
GoxA	(K)AAWYGFNNPLDNGELAPGIPGQKR(N)	2585,29
GoxA	(K)LQPDALTEAALEP C SGGAFFHPGVELTYLR(I)	3275,604
GoxA	(R)VGGSDQYFLAPEVPGLPPMPEGGFKDGTQAIK(K)	3302,64
GoxA	(R)SISGINQNGDTENDTYQFVGQFWNEETVK(L)	3320,50
GoxA	WMGLPWQCDAFS C QQVLMQEDFPTAVW C WPALLPIDVLPENYTLMDLDDSER	6513,94 (+28)*
GoxA	AEKGDPALGTSPPLAHQWAGDLTRWMGLPWQCDAFS C QQVLMQEDFPTAVW C WPALLPIDVLPENYTLMDLDDSER	8983,195 (+28)*
Proteína	Secuencia	m/z experimental
GoxB	(K)YTDVAVKK(G)	824,45
GoxB	(R)WLTPAAGIAK(K)	1027,59
GoxB	(R)GVTNELDVVR(A)	1188,60
GoxB	(K)IVASYLANDYSALQK(Y)	1655,86
GoxB	(R)SSNTTFSAWGQEALVER(N)	1882,89
GoxB	(K)QRPNSEVLATPATLIESTK(N)	2055,11
GoxB	(K)VGESLAPAANPILAEGLSYLLDTPEHR(S)	2946,56

*, péptidos detectados con un incremento de MM de +28, compatible con la presencia del cofactor quinónico CTQ.

IV.2.5. Rango de sustratos y parámetros cinéticos de la GoxA recombinante.

En los apartados IV.1.2.1 y IV.1.2.2 comparamos la K_m y el rango de sustratos de la glicina oxidasa de *M. mediterranea* obtenida a partir de muestras en el sistema nativo con otras glicina oxidasas descritas. Ahora nos proponemos comparar las propiedades bioquímicas, incluyendo el rango de sustratos y los parámetros cinéticos, de la proteína expresada recombinantemente. Para ello se utilizó, como en anteriores experimentos, una muestra purificada de la segunda elución de cultivos inducidos en las condiciones óptimas para la expresión de GoxA.

Primero se realizó el ensayo de actividad frente a todos los aminoácidos proteicos y otros sustratos estructuralmente parecidos a la Gly. Como cabría esperar, se obtuvo un rango de sustratos para la proteína recombinante sin diferencias significativas al obtenido para la proteína nativa, siendo sólo activa frente a Gly y glicina-etil-éster (apéndice A.2).

A continuación, se calculó la constante de Michaelis-Menten (K_m) de la GoxA recombinante para la Gly, obteniendo un valor de 0,77 mM (fig. IV.20). Este resultado de K_m para la Gly es inferior al obtenido para la glicina oxidasa de *M. mediterranea* en el sistema nativo (K_m = 8,33 mM, apartado IV.1.2.1), pero similar al obtenido para las glicina oxidasas expresadas recombinantemente de *Bacillus* (tabla IV.3) y *Geobacillus kaustophilus* (K_m =0,25 mM) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b).

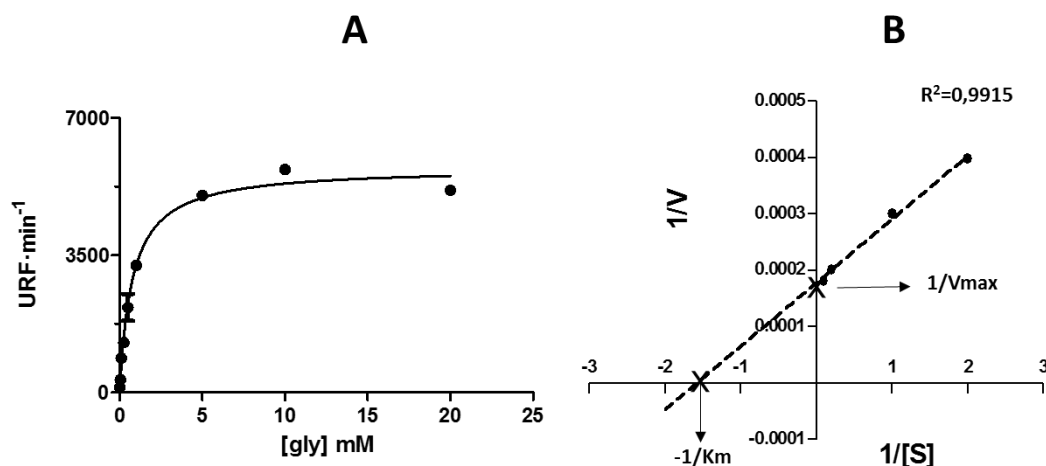


Figura IV.20. A, representación de la actividad enzimática de GoxA recombinante purificada en función de la concentración de sustrato en la reacción. B, representación doble recíproca de Lineweaver-Burk para el cálculo de la K_m . V, velocidad de la reacción medida como URF/min; S, concentración de glicina en mM.

Posteriormente, para calcular las unidades enzimáticas (U) presentes en esta muestra, se procedió al ensayo colorimétrico descrito en el apartado III.9.1.2. Mediante la ley de Lambert-Beer y considerando que 1 unidad de Gox cataliza la oxidación de glicina para formar 1 μmol de peróxido de hidrógeno (amonio o glioxilato) en 1 min a 37 °C, obtuvimos como resultado 0,117 UGox/mL. Al conocer la concentración de proteínas presentes en la muestra (0,06513 mg/ml) podemos expresar la actividad específica (Ae) por mg de proteínas, obteniendo un valor de 0.1797 UGox/mg. No obstante, hay que señalar que la presencia de GoxB supone una dificultad en este cálculo.

A modo comparativo con las otras glicinas oxidasas descritas, se calculó de forma aproximada la constante catalítica y de especificidad de la Gox de *M. mediterranea* para la glicina. Teniendo en cuenta que la masa molecular (MM) de GoxA es de 76284,80 Da, según la herramienta http://web.expasy.org/compute_pi/, se calculó su constante catalítica (K_{cat}), dando como resultado una K_{cat} de 0,2284 s⁻¹. De esta forma, se obtiene una constante de especificidad (K_{cat}/K_m) para la Gly de 0,2966 s⁻¹ mM⁻¹. Estos valores son inferiores a los de la Gox recombinante de *B. subtilis* para el mismo sustrato, pero similares a los de la Gox de *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformis* (tabla IV.3).

Tabla IV.3. Parámetros cinéticos sobre la Gly de las glicina oxidasas de *M. mediterranea* y de diferentes especies del género *Bacillus* expresadas recombinantemente.

Glicina oxidasas:	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (s ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>M. mediterranea</i>	0,77	0,23	0,30
<i>B. subtilis</i>¹	0,99	1,30	1,31
<i>B. cereus</i>²	1,04	0,14	0,13
<i>B. licheniformis</i>³	0,90	0,31	0,34

¹, datos de (Nishiya e Imanaka, 1998); ², datos de (Zhan *et al.*, 2013); ³, datos de (Zhang *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 3

IV.3. Regulación del operón *gox*.

En el presente capítulo nos proponemos estudiar la regulación de la síntesis de GoxA relacionándola con la de las otras oxidasas sintetizadas por *M. mediterranea*. El conocimiento de los elementos y mecanismos que intervienen en la regulación de estas enzimas puede ofrecer información relevante sobre el papel fisiológico que desempeñan en *M. mediterranea*. En concreto, se estudiará el efecto de diferentes condiciones de cultivo que intervienen en la expresión de la actividad GOX y en su regulación transcripcional, así como la regulación de dicha expresión por las proteínas reguladoras PpoS y PpoR.

IV.3.1. Expresión del operón *gox* en diferentes condiciones de cultivo.

IV.3.1.1. Efecto regulatorio de la glicina y de la L-lisina.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito que la adición de algunos compuestos, entre ellos L-lisina, a medios que contienen otra fuente de carbono y de nitrógeno, ejerce un efecto inductor sobre la actividad LOD en *M. mediterranea* (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Con el fin de estudiar si dicha regulación se produce también sobre la actividad GOX, se cultivó la cepa LD de *M. mediterranea* en los medios MNG, MNGL (medio MNG con L-lisina 3 mM) y MNGG (medio MNG con glicina 3 mM). El medio mínimo MNG contiene una concentración de sales equivalente al medio marino, glucosa como fuente de carbono principal y glutámico como fuente de carbono y nitrógeno (apartado III.3.1).

Tal como muestra la figura IV.21, la actividad GOX aparece en los sobrenadantes al inicio de la fase estacionaria de crecimiento y continúa excretándose a lo largo de esta fase. Los resultados también muestran que la actividad fue más alta cuando *M. mediterranea* fue cultivada en los medios MNGL y MNGG respecto al medio MNG (fig. IV.21). Concretamente la L-lisina parece inducir la actividad en mayor medida que el propio sustrato de la enzima, la glicina.

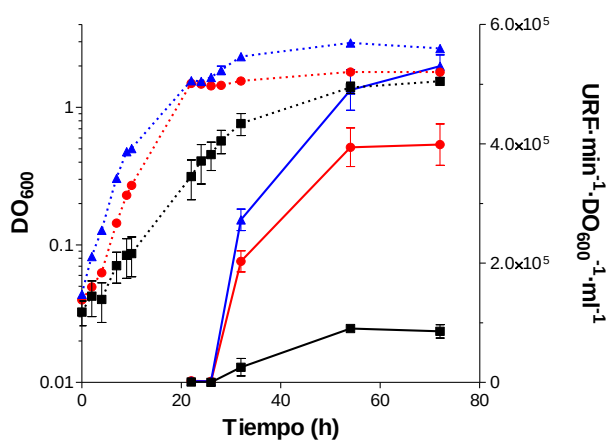


Figura IV.21. Actividad GOX en los sobrenadantes de la cepa *M. mediterranea* LD a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNG (■), MNGL (▲), y MNGG (●). Las líneas discontinuas muestran el crecimiento medido a DO₆₀₀ y las líneas continuas la actividad GOX.

IV.3.1.1.1. Regulación transcripcional. Construcción de fusiones transcripcionales entre *Pgox* y el gen *lacZ*.

Una vez caracterizado el operón *gox* y su región promotora (apartado IV.1.4), con el fin de estudiar la regulación transcripcional de su expresión, se crearon fusiones transcripcionales del promotor *Pgox* con el gen *lacZ* tal como se detalla en el apartado III.18.1.

Para la creación de las fusiones transcripcionales del *Pgox* con el gen *lacZ* se utilizaron dos versiones de diferente tamaño del promotor con el fin de estudiar si las secuencias adicionales presentes en la versión más larga, entre las que se incluyen algunas secuencias palindrómicas (fig. IV.22), podrían ejercer algún papel regulador. Estas

fusiones se clonaron en transposones localizados en los plásmidos pBPGOX1 y pBPGOX2 (fig. III.8).

Pgox1 (207 pb)

...gAATtCACTTCATATACCTTCCTTATACAACATGTTTCACAACGCGACTTTCAAGCGC
GCTCTCAAAACACGACGTTAAAACCGCGTGAATTAAGTGTTTTTCTTGTCATTTCCTATA
 CTCTGATATTAAGTGTAACACCGTGTAATGTGATTTTTTTCAGAAAATGAGCTAATTTAA
 TCAAGACCTTACATTTTCATATTAATGGATcc

Pgox2 (101 pb)

...gaATTCCTATA
 CTCTGATATTAAGTGTAACACCGTGTAATGTGATTTTTTTCAGAAAATGAGCTAATTTAA
 TCAAGACCTTACATTTTCATATTAATGGATcc

Figura IV.22. Secuencia de las dos versiones del promotor *gox* utilizadas para construir fusiones transcripcionales. Los hexámeros de las posibles regiones -35 y -10 están subrayados. Las secuencias con doble subrayado indican zonas palindrómicas. El inicio de la transcripción de GoxA se indica en negrita. Las bases en minúscula difieren de la secuencia original ya que fueron modificadas para generar los sitios de corte EcoRI (al principio de cada secuencia) y BamHI (al final de cada secuencia) necesarios para la clonación de los fragmentos.

A continuación, estos plásmidos fueron transformados en *E. coli* S17-1(λ pir) y posteriormente se introdujeron mediante conjugación en *M. mediterranea* MMB-1R, originando las cepas MMB-1LACG1, que contienen el transposón con la fusión *Pgox1*, y MMB-1RLACG2, que contiene la fusión con *Pgox2* (apartados III.12.6 y III.12.7).

Las cepas MMB-1LACG1 y MMB-1RLACG2 fueron cultivadas en medio MNGL y se midió la actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento. Como control también se cultivó la cepa MMB-1LAC0, que tiene el gen *lacZ* sin ninguna fusión (Lucas-Elío *et al.*, 2002). La actividad observada con la versión corta del promotor (*Pgox2*) fue muy baja (fig. IV.23). Este resultado indica que *Pgox2* probablemente carece de algún elemento regulatorio necesario para la expresión del gen. Por lo tanto, descartamos la cepa MMB-1RLACG2 y seleccionamos MMB-1LACG1 para futuros experimentos.

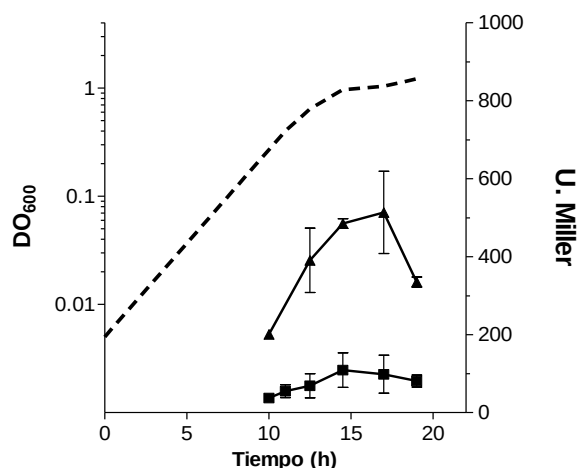


Figura IV.23. Actividad β -galactosidasa, una vez restados los valores de MMB-1LAC0, a lo largo de la curva de crecimiento de *M. mediterranea* MMB-1LACG1 (▲) y MMB-1RLACG2 (■) cultivadas en medio MNGL. La línea discontinua representa el crecimiento medido como DO₆₀₀, que es muy similar para ambas cepas.

A continuación, se analizó el efecto de la adición de L-lisina sobre la transcripción del operón *gox*. Para ello, la cepa MMB-1LACG1 fue cultivada en los medios MNG y MNGL, midiéndose la actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento. Tal como se muestra en la figura IV.24, no se observaron diferencias significativas entre ambos medios en la transcripción del operón *gox*. Este resultado indica que los mayores niveles de actividad GOX observados en MNGL respecto a MNG (fig. IV.21) no se deben a una regulación a nivel transcripcional. Este efecto ya había sido descrito para la regulación de la actividad LOD por L-lisina (Molina-Quintero *et al.*, 2010), por lo que se puede proponer que la regulación de las actividades GOX y LOD por L-lisina tiene lugar a nivel post-transcripcional.

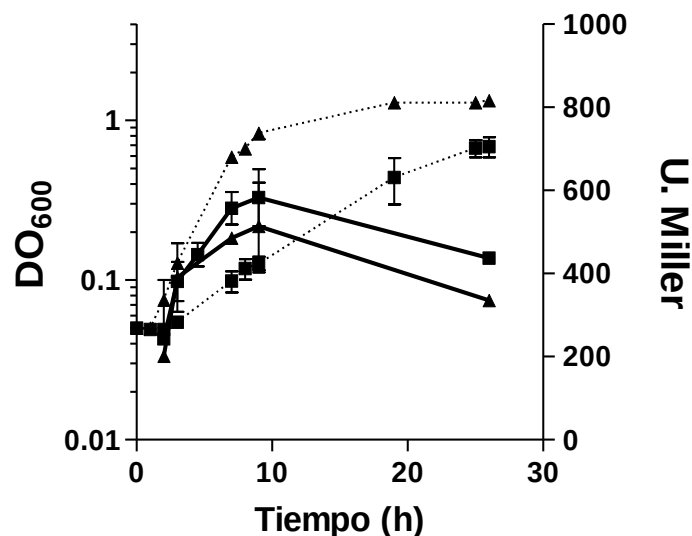


Figura IV.24. Actividad β-galactosidasa, una vez restados los valores de MMB-1LAC0, durante la curva de crecimiento de la cepa MMB-1LACG1 cultivada en los medios MNG (■) y MNGL (▲). La línea discontinua representa el crecimiento medido como DO₆₀₀.

Con el fin de comparar la regulación de GoxA con la regulación por fase de crecimiento a nivel transcripcional descrita para LodA (Molina-Quintero *et al.*, 2010), se cultivaron las cepas MMB-1LACG1 y MMB-1RLACL1 (que posee el gen *lacZ* bajo el control del promotor *Plod*) en el medio MNGL, midiendo la actividad β-galactosidasa a diferentes tiempos (fig. IV.25).

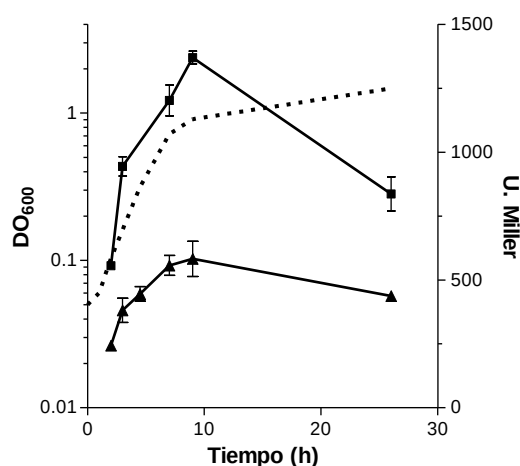


Figura IV.25. Actividad β-galactosidasa, una vez restados los valores de MMB-1LAC0, durante la curva de crecimiento de las cepas de *M. mediterranea* MMB-1LACG1 (▲) y MMB-1RLACL1 (■) cultivadas en medio MNGL. La línea discontinua representa el crecimiento medido como DO₆₀₀, que es muy similar para ambas cepas.

Los datos de actividad β -galactosidasa muestran que el promotor *Pgox*, al igual que el promotor *Plod* aunque los niveles de actividad sean menores, también va incrementando su actividad durante la fase exponencial de crecimiento, alcanzando un máximo al inicio de la fase estacionaria. Esto podría explicar la regulación de la expresión de la actividad GOX por fase de crecimiento (fig. IV.21).

IV.3.1.2. Posible relación de la glicina oxidasa con la fuente de nitrógeno en el medio.

Como se ha descrito en el apartado IV.3.1.1, la presencia de glicina y lisina en el medio de cultivo induce la actividad GOX. Con el objetivo de estudiar la posible relación entre la actividad glicina oxidasa y el metabolismo de la glicina, se midió la actividad GOX en el medio base MNB que contiene glucosa como fuente de carbono, adicionando a éste diferentes fuentes de nitrógeno: amonio (MNB+NH₄), L-glutámico (MNB+Glu o MNG), L-lisina (MNB+Lys) y glicina (MNB+Gly), todos ellos a una concentración 3mM (apartado III.3.1). *M. mediterranea* MMB-1R fue cultivada en dichos medios, midiendo a diferentes tiempos las actividades GOX y LOD (fig. IV.26).

Los resultados mostraron que tanto la glicina como la L-lisina pueden ser utilizadas como fuente de nitrógeno puesto que MMB-1R crece en medio que contiene estos aminoácidos como única fuente de este elemento. No obstante, el crecimiento es más lento que cuando la fuente de nitrógeno es L-glutámico (fig. IV.26). Los resultados también mostraron que las actividades GOX (fig. IV.26A) y LOD (fig. IV.26B) se regulan de forma muy similar en las condiciones ensayadas. Las dos actividades sólo se indujeron en el medio que posee como única fuente de nitrógeno L-lisina cuando el microorganismo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

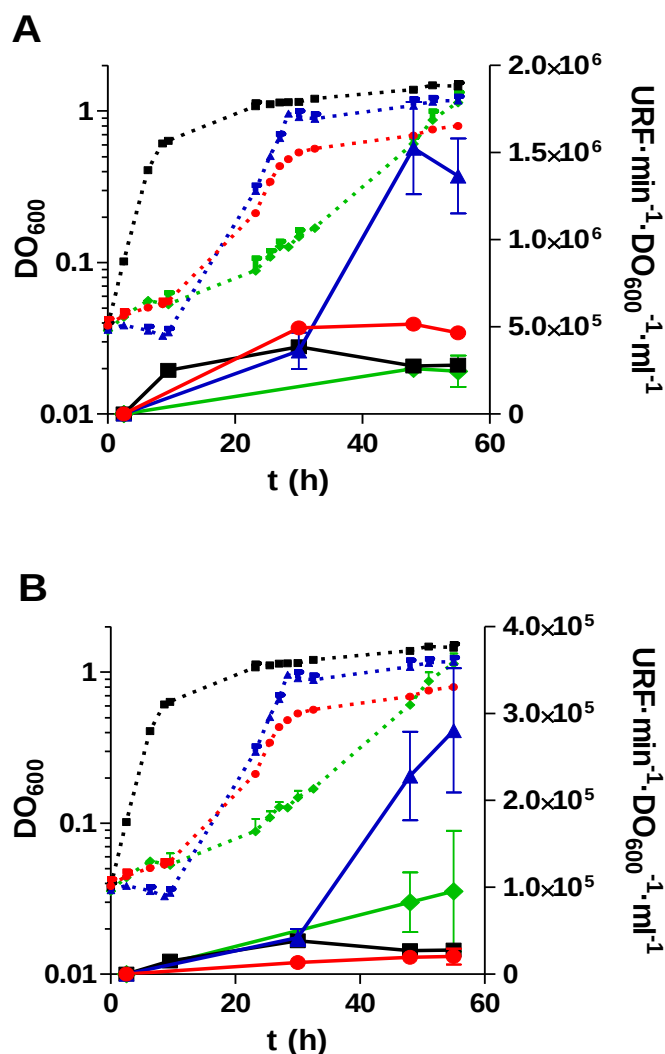


Figura IV.26. Actividad GOX (A) y LOD (B) en los sobrenadantes de *M. mediterranea* MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH₄ (♦), MNB+Glu (MNG) (■), MNB+Lys (▲) y MNB+Gly (●). Las líneas discontinuas muestran el crecimiento como DO₆₀₀, y las líneas continuas los niveles de actividad.

Las medidas anteriores de actividad se realizaron en los sobrenadantes de los cultivos. Si GoxA y LodA tienen un papel en el metabolismo cabría esperar una variación en los niveles citoplasmáticos de dichas enzimas. Para estudiar esta posibilidad, se prepararon extractos celulares tal y como se explica en el apartado III.5.2. En el caso de GoxA se observó un ligero incremento de la actividad al final de la fase exponencial en todos los medios. Sin embargo, no se observaron diferencias según el medio (fig. IV.27A). En el caso de LodA, a nivel intracelular los mayores niveles de actividad se detectaron en el medio MNG. Estos datos contrastan con la observación de que a nivel

extracelular la presencia de lisina en el medio supone un incremento notable, tanto de la actividad LOD como GOX, al llegar a la fase estacionaria de crecimiento (fig. IV.26).

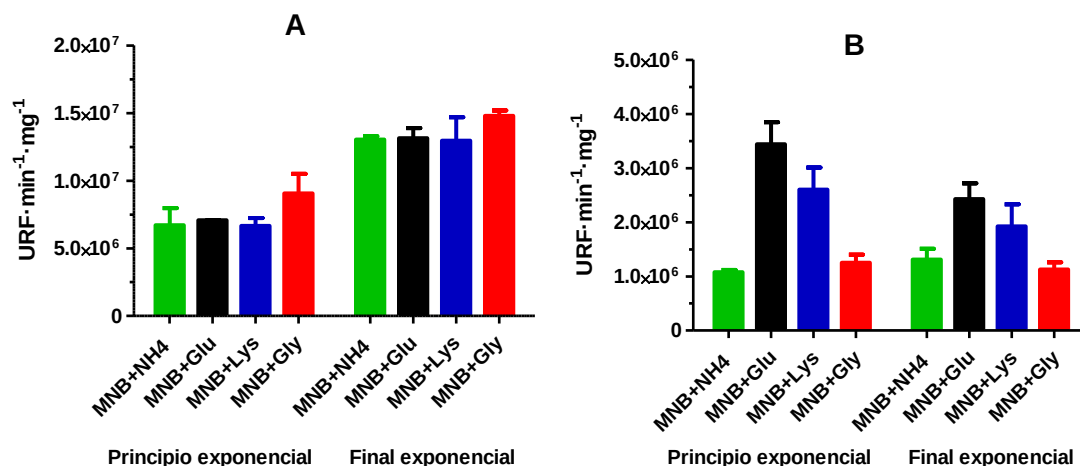


Figura IV.27. Actividad GOX (A) y LOD (B) normalizada por mg de proteína en los extractos de *M. mediterranea* MMB-1R al principio y al final de la fase exponencial en los medios MNB+NH₄, MNB+Glu (MNG), MNB+Lys, y MNB+Gly.

Para estudiar la secreción proteica se midió el nivel global de proteínas en los sobrenadantes. Se pudo observar claramente un incremento en la concentración de proteínas presentes en el medio con L-lisina en comparación al efecto de las otras fuentes de nitrógeno utilizadas (fig. IV.28).

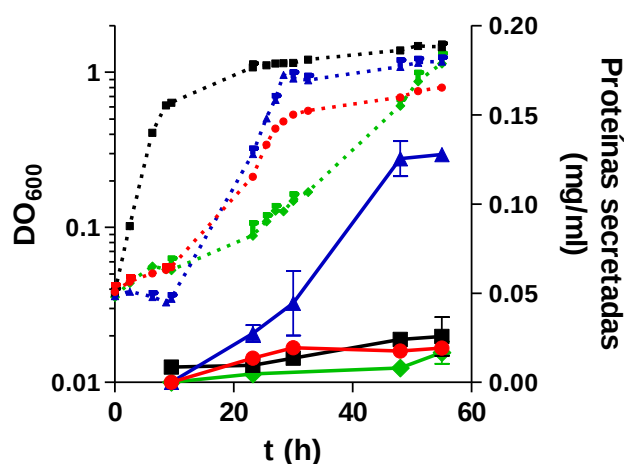


Figura IV.28. Proteínas secretadas a los sobrenadantes de *M. mediterranea* MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH₄ (♦), MNB+Glu (MNG) (■), MNB+Lys (▲) y MNB+Gly (●). Las líneas discontinuas muestran el crecimiento como DO₆₀₀, y las líneas continuas indican la concentración de proteínas.

Normalizando las actividades LOD y GOX por cantidad de proteínas presentes en las muestras se observa que el efecto inductor de la L-lisina respecto al resto de compuestos que actúan como fuente de nitrógeno desaparece (fig. IV.29). Estos resultados indican que la L-lisina en los medios de cultivo induce, en *M. mediterranea*,

un incremento global de la secreción a los sobrenadantes de proteínas entre las que se encuentran tanto la glicina como la lisina oxidasa, pero no hay un incremento en los porcentajes de estas dos proteínas respecto a las demás.

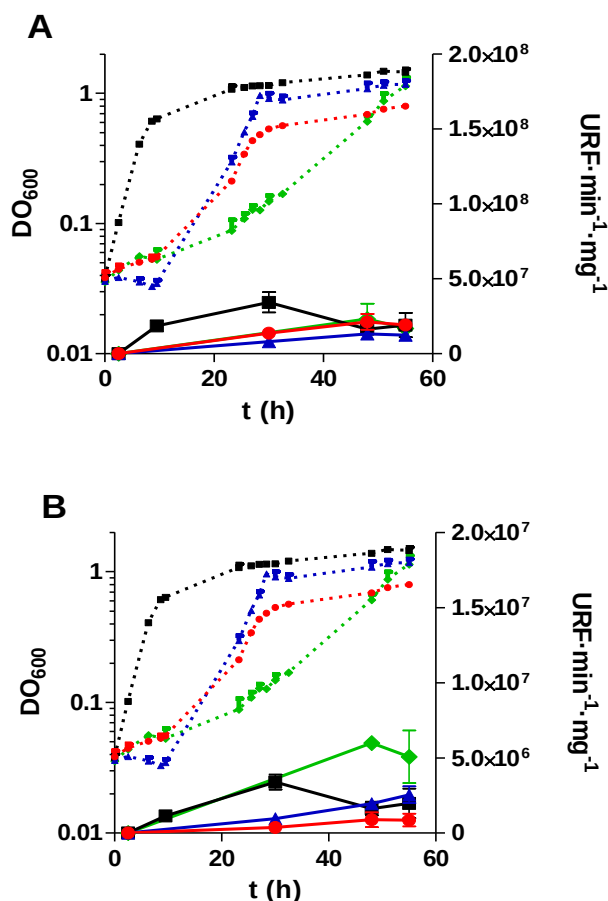


Figura IV.29. Actividad GOX (A) y LOD (B) normalizada por mg de proteína en los sobrenadantes de *M. mediterranea* MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento en los medios MNB+NH₄ (◆), MNB+Glu (MNG) (■), MNB+Lys (▲) y MNB+Gly (●). Las líneas discontinuas muestran el crecimiento como DO₆₀₀, y las líneas continuas los niveles de actividad.

Con el fin de complementar el estudio del efecto de la Gox sobre el metabolismo de la glicina, se comparó el crecimiento de la cepa silvestre de *M. mediterranea* y la cepa LGD (mutante con la delección del operón *gox*) (apartado IV.1.6) en dos medios mínimos diferentes que contenían glicina: el medio MGly, que contiene glicina como única fuente de carbono y nitrógeno, y el MNB+Gly, medio que contiene además de glicina, glucosa como fuente de carbono (fig. IV.30). El crecimiento observado en medio MNB+Gly fue muy similar en la cepa silvestre y en la cepa con la delección de *gox*, indicando que la glicina oxidasa no es requerida en el metabolismo de la glicina,

en concordancia con la no inducción de la actividad por este aminoácido. La figura IV.30 también muestra que *M. mediterranea* no puede utilizar la glicina como única fuente de carbono.

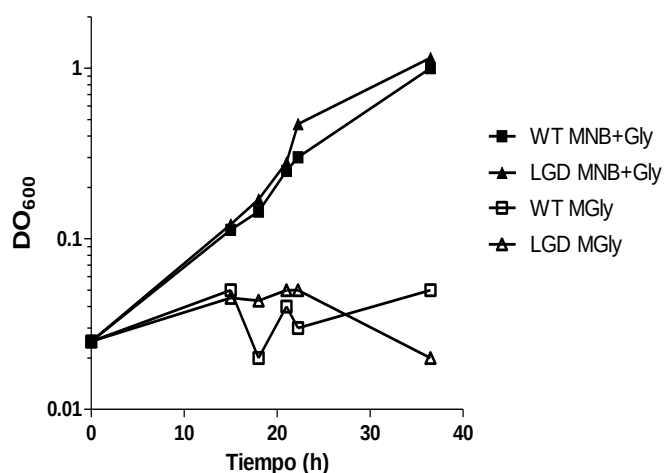


Figura IV.30. Crecimiento en los medios MNB+Gly y MGly de la cepa silvestre de *M. mediterranea* (WT) y del mutante con la delección en la glicina oxidasa (LGD).

IV.3.1.3. Regulación de la glicina oxidasa por L-tirosina.

La expresión de la actividad lisina oxidasa se ve reprimida cuando *M. mediterranea* es cultivada en medios complejos ricos en nutrientes, en comparación a cuando es cultivada en medios mínimos (Lucas-Elío *et al.*, 2005; Molina-Quintero, 2011). En la figura IV.31 podemos apreciar que, al igual que la actividad LOD, la expresión de la actividad GOX en los sobrenadantes también se encuentra reprimida en los medios complejos 2216 y MMC, respecto al medio mínimo MNG.

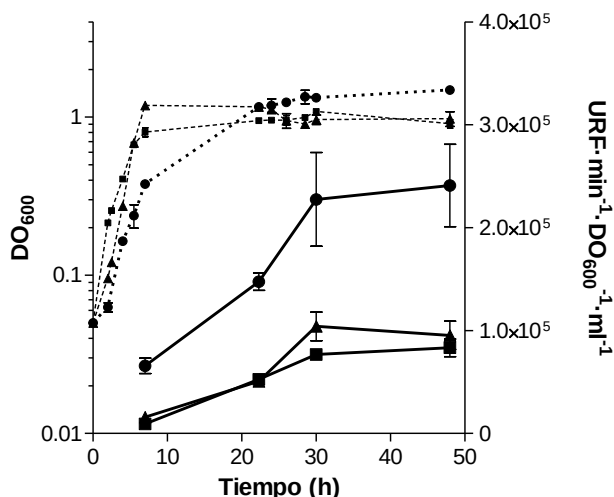


Figura IV.31. Actividad GOX en los sobrenadantes de *M. mediterranea* MMB-1R a lo largo de la curva de crecimiento cultivada en los medios 2216 (▲), MMC (■) y MNG (●). Las líneas discontinuas representan el crecimiento medido como DO₆₀₀, mientras que las líneas continuas representan la actividad GOX.

El hecho de que las actividades lisina y glicina oxidasa se inhiban en medio rico puede estar relacionado con la presencia en estos medios de algún compuesto represor de dichas actividades. En anteriores trabajos se había puesto de manifiesto que en *M. mediterranea* las actividades oxidasa, entre ellas la actividad LOD, se ven reprimidas en medios que contienen L-tirosina (Molina-Quintero, 2011). Para ensayar el efecto de la L-Tyr sobre la actividad GOX, la cepa silvestre MMB-1R fue cultivada hasta el inicio de la fase estacionaria de crecimiento, en los medios MNGL y en MNGLT (medio MNGL suplementado con L-tirosina 3 mM). Se observó que tanto la actividad GOX como LOD se ven reprimidas en el medio de cultivo con L-Tyr (fig. IV.32). Para estudiar si la presencia de melaninas en el medio con tirosina podría afectar a la expresión o detección de GoxA, se repitió el experimento utilizando el mutante amelanogénico PPOBDEL, que tiene delecionada la tirosinasa (Molina-Quintero, 2011). No se observaron diferencias significativas con la cepa silvestre, indicando que la represión de la actividad GOX por L-Tyr no está relacionada con la síntesis de melaninas en el medio con L-tirosina (fig. IV.32).

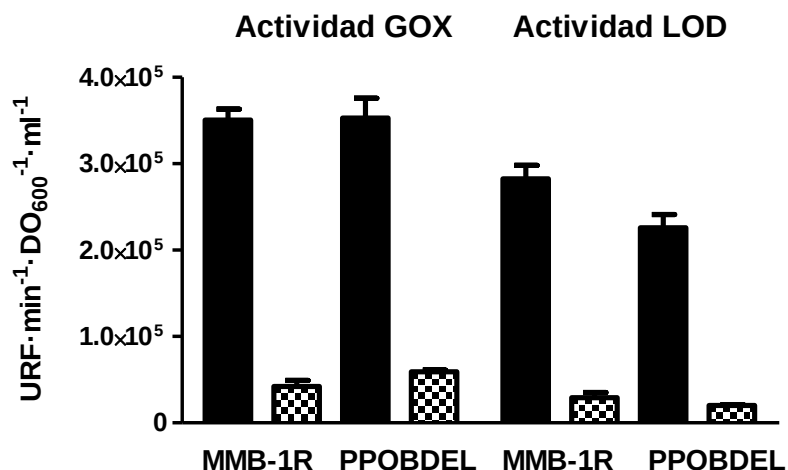


Figura IV.32. Actividad GOX y LOD en los sobrenadantes de la cepas MMB-1R y PPOBDEL al inicio de la fase estacionaria de crecimiento en los medios MNGL (barras rellenas) y MNGLT (barras a cuadros) (MNGL + L-Tyr 3 mM).

Por otra parte, hay que señalar que a diferencia del efecto de la L-lisina, la represión por L-Tyr no se debe a una variación en los niveles de secreción proteica, ya que los niveles de proteínas en los sobrenadantes del medio MNGLT son similares, o ligeramente superiores, a los del medio MNGL (datos no mostrados).

El regulón TyrR ha sido descrito en la cepa *E. coli* K12 como un sistema de regulación a nivel transcripcional dependiente de L-tirosina y otros aminoácidos aromáticos, donde la proteína TyrR puede unirse específicamente a zonas en la región promotora de diferentes genes para activar o inhibir su expresión (Pittard *et al.*, 2005). Las regiones en el ADN reconocidas por la proteína TyrR poseen una secuencia consenso TGTAAN₆TTTACA y son denominadas como “cajas TyrR”, distinguiéndose entre cajas fuertes o débiles. Las cajas fuertes son aquellas en las que, para que se una la proteína TyrR no necesitan ningún aminoácido aromático y, además, difieren menos del consenso que las cajas débiles, las cuales necesitan generalmente tirosina, o menos frecuentemente fenilalanina, para que la proteína TyrR pueda unirse a estas secuencias del ADN. Cabe destacar que en *M. mediterranea* se ha encontrado un homólogo a la proteína TyrR de *E. coli* K12, Marme_2488, con un 29,7 % de identidad y un 50,2 % de similitud.

El análisis de las regiones promotoras de *gox* y *lod* muestra que ambos promotores poseen motivos similares a las cajas TyrR (fig. IV.33), lo cual podría justificar la disminución en las actividades LOD y GOX en presencia de L-tirosina en los medios de cultivo. Asimismo, la presencia de estas cajas TyrR en la versión *Pgox1* de las fusiones transcripcionales, y no en la *Pgox2* (fig. IV.22), podría justificar los mayores niveles transcripcionales de la cepa MMB-1RLACG1 respecto a MMB-1RLACG2 (fig. IV.23), al poseer la primera elementos regulatorios esenciales, en este caso supuestamente activadores de la expresión.

gox

...GAAGATATCCGAGACAAAAATACACTTCATATACCTTCCTTATACAACATGTTTCACA
ACGCGACTTTCAAGCGCGCTCTCAAAACACGACGTTAAACCGCGTGAATTAAGTGT
TCCTTGTCATTCCCTATACTCTGATATTAAGTGTAACACCGTGTAATGTGATTTTTCAG
AAAATGAGCTAA~~TTTAAT~~CAAGACCTTACATTTTCATATTAATGGATAGAGATAGGACG
ATACGATG

lod

...ATTGGAGTTAGATAAATGAGGGTTCTATTGTGAACAGAGATTAAAGACGAATCAAATT
ACGCGATCTAATTTAGATCGCGAATTTAACGTTGGGTCTTTCAGAGAAACAGCCTCCC
TTGTCAAGAGGGATTAACTGATACTGAACTGATACTGCCGTACCTGCATTGCTCTGCTT
AACTGAAAGA~~C~~CATTCGTATAAAACGGTTTATGGATTTTAGTTATCAACAAAGGAGT
AAGTTATG

Figura IV.33. Región promotora del operón *gox* y *lod* hasta el codón de inicio ATG. Las posibles cajas TyrR aparecen señaladas, destacando los residuos conservados en amarillo, en gris los 6 nt intermedios, y en azul los que difieren del consenso. Los hexámeros de las posibles regiones -10 y -35 están subrayados, el inicio de la transcripción se indica en rojo y las secuencias de unión al ribosoma en negrita.

Para determinar si la represión de la actividad GOX por L-Tyr se produce a nivel transcripcional y, por tanto, pudiera estar justificada por la presencia de estas cajas TyrR en el promotor, se cultivó en los medios MNGL y MNGLT la cepa MMB-1RLACG1, y se midió la actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento (fig. IV.34B). Adicionalmente, se midió la actividad GOX para poder comparar ambas actividades. Los resultados obtenidos sugieren que la L-Tyr ejerce una cierta represión a nivel transcripcional de la actividad GOX, pero probablemente actúan otros mecanismos regulatorios post-transcripcionales reprimiendo la expresión, ya que las pequeñas diferencias en los niveles de actividad β -galactosidasa parece que no pueden

justificar totalmente las diferencias observadas en los niveles de actividad GOX cuando llegan los cultivos a fase estacionaria (fig. IV.34A y B).

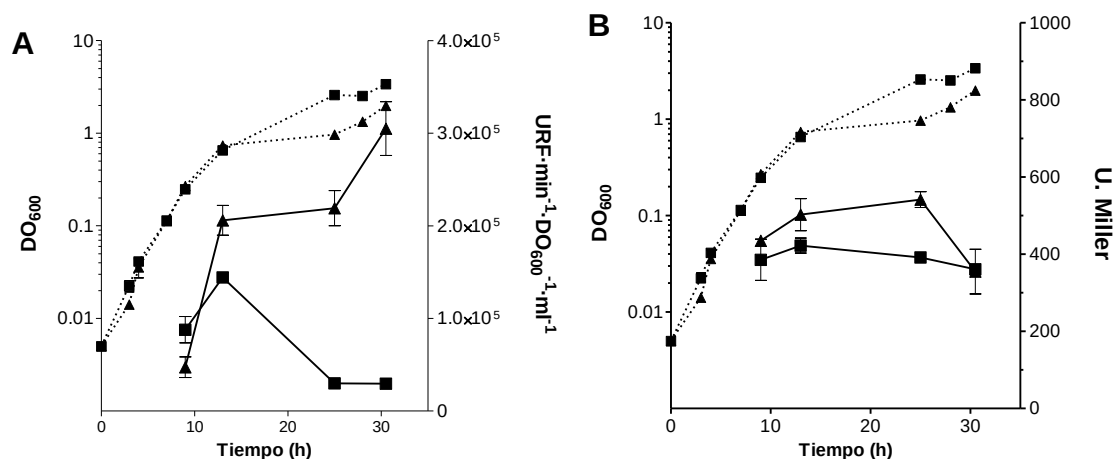


Figura IV.34. Actividad GOX en los sobrenadantes (A) y actividad β-galactosidasa (B) durante la curva de crecimiento de *M. mediterranea* MMB-1RLACG1 en los medios MNGL (▲) y MNGLT (■). Las líneas discontinuas representan el crecimiento medido como DO_{600} . Se muestran los valores de actividad β-galactosidasa una vez restado los valores de MMB-1RLAC0.

Si comparamos la represión a nivel transcripcional que ejerce la L-Tyr sobre de los promotores *lod* y *gox*, observamos que dicho efecto represor es mayor para el promotor de la lisina oxidasa (fig. IV.35).

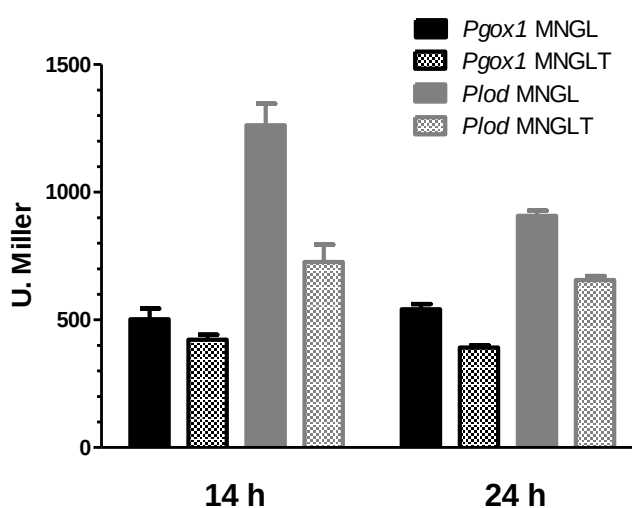


Figura IV.35. Actividad β-galactosidasa de las cepas de *M. mediterranea* MMB-1RLACG1 y MMB-1RLACL1 una vez restados los valores de MMB-1LAC0, en los medios MNGL y MNGLT al principio de la fase estacionaria (14 h) y en fase estacionaria tardía (24 h).

IV.3.2. Regulación de la actividad glicina oxidasa por PpoS y PpoR.

Las cepas de *M. mediterranea* T102 (PpoR⁻) y T103 (PpoS⁻) son dos mutantes regulatorios afectados en proteínas que forman parte de sistemas de dos componentes que controlan diversos mecanismos celulares (Molina-Quintero, 2011). PpoR es un regulador de respuesta, mientras que PpoS es una histidín quinasa sensora de membrana. Estas dos proteínas regulan las actividades oxidasa, entre ellas la actividad LOD, por lo que los mutantes afectados en estas proteínas no expresan dicha actividad (Lucas-Elío *et al.*, 2006; Lucas-Elío *et al.*, 2002).

La cepa silvestre, MMB-1R, y los mutantes T102 y T103, fueron cultivados en medio MNGL con el objetivo de comprobar si PpoR y PpoS también intervienen en la regulación de la actividad GOX. Los resultados mostraron que los mutantes T102 y T103 no son capaces de expresar la actividad GOX en las condiciones ensayadas (fig. IV.36). Por tanto, PpoS y PpoR parecen intervenir de forma importante en la regulación de la glicina oxidasa.

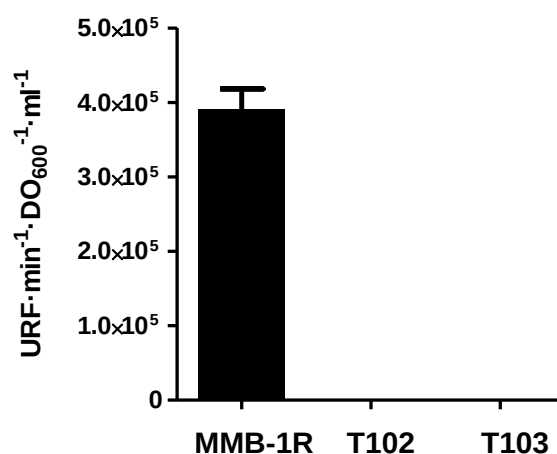


Figura IV.36. Actividad GOX en los sobrenadantes de *M. mediterranea* MMB-1R, T102 y T103 al inicio de la fase estacionaria de crecimiento en medio MNGL.

Con el fin de estudiar si PpoS y PpoR regulan la glicina oxidasa a nivel transcripcional, se transformaron las cepas T102 y T103 de *M. mediterranea* con el plásmido pBPGOX1, obteniendo las cepas T102LACG1 y T103LACG1 (apartado III.18.1). Estas cepas, junto a MMB-1RLACG1, se cultivaron en el medio MNGL y se midió la actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento (fig. IV.37). Se observó claramente que el promotor *gox* no se induce en los mutantes T102 y T103, lo que parece indicar que la regulación de la actividad GOX por PpoS y PpoR se produce a nivel transcripcional. Este efecto es similar al descrito en la regulación de la lisina oxidasa por PpoS y PpoR (Molina-Quintero, 2011).

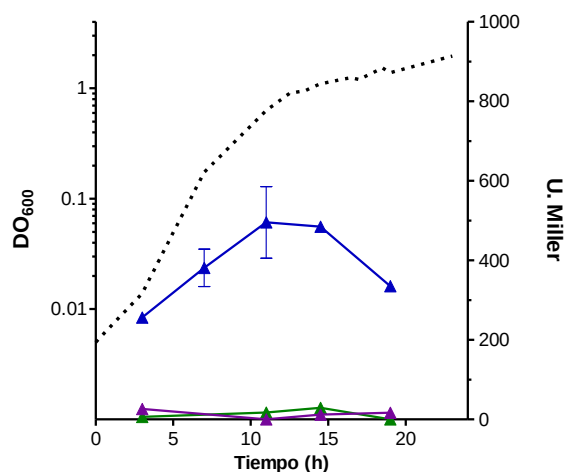


Figura IV.37. Actividad β -galactosidasa en medio MNGL durante las curvas de crecimiento de las cepas de *M. mediterranea* MMB-1RLACG1 (▲), T102LACG1 (▲) y T103LACG1 (▲), una vez restados los valores de MMB-1LAC0, T102LAC0 y T103LAC0 respectivamente.

CAPÍTULO 4

IV.4. Descripción de una nueva familia de quinoproteínas similares a LodA.

De forma adicional a la descripción y caracterización de la glicina oxidasa de *M. mediterranea*, uno de los principales objetivos de esta memoria ha sido la búsqueda de otras aminoácido oxidasas no descritas hasta la fecha. En anteriores trabajos se había descrito que LodA y proteínas similares a ella intervienen en el desarrollo y dispersión de biopelículas bacterianas al generar peróxido de hidrógeno. Así, para la proteína AlpP de *Pseudoalteromonas tunicata* también se ha descrito actividad lisina oxidasa, mientras que en otros casos, como las proteínas similares a LodA en *Chromobacterium violaceum* y *Caulobacter crescentus*, la producción de peróxido de hidrógeno todavía no ha sido asociada a ninguna actividad enzimática concreta (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

La secuenciación del genoma de *Marinomonas mediterranea* MMB-1 (Lucas-Elío *et al.*, 2012b) ha permitido identificar la presencia de dos genes similares a *lodA* en su genoma. Uno de estos genes, Marme_1655, es el gen *goxA* que codifica la proteína con actividad glicina oxidasa, que, como se ha visto en este trabajo, posee propiedades diferentes a otras glicinas oxidasas descritas anteriormente (apartado IV.1.2). Estas observaciones sugieren que los genes similares a *lodA* presentes en diferentes genomas bacterianos pueden constituir un reservorio de genes que codifiquen proteínas con actividad aminoácido oxidasa novedosas. El objetivo de este apartado ha sido estudiar la distribución en genomas microbianos de genes que codifican proteínas similares a LodA y GoxA y realizar un análisis filogenético de las mismas.

IV.4.1. Identificación de genes similares a *lodA* y *goxA* en genomas microbianos.

Tal y como se describe el en apartado III.20.2, para la identificación de genes similares a *lodA* y *goxA* se realizó un BLASTP frente a las secuencias de genomas microbianos depositados en la base de datos del IMG (Integrated Microbial Genomes) a fecha del 8 de enero de 2014. Las proteínas usadas para realizar la búsqueda fueron LodA (número de acceso: ADZ91893) (Gómez *et al.*, 2006) y GoxA (número de acceso: ADZ90918). Usando como punto de corte un E-value de 1e-10, con GoxA como proteína problema se detectaron 170 genes que codificaban proteínas similares. Dentro de estos 170 genes se incluían todos los genes obtenidos como resultado en el análisis de LodA como problema, por lo que se seleccionaron estos 170 genes para realizar posteriores estudios. Dos de los genes seleccionados no fueron incluidos en el análisis final porque las proteínas codificadas por ellos estaban truncadas. Esto proporcionó una selección final de 168 genes llamados en este estudio genes similares a *lodA* o pertenecientes a la familia *lodA* (apéndice A.3). Las 168 proteínas detectadas están presentes en 144 genomas distintos, ya que algunos microorganismos poseen más de una copia de genes similares a *lodA*. Estos 144 genomas representan el 0,91 % de todos los genomas depositados en la base de datos del IMG en el momento del análisis.

En los operones *lod* y *gox*, tras el gen similar a *lodA*, aparece un segundo gen que codifica una flavoproteína. De forma similar, se han detectado en todos los operones menos en uno, tras el gen similar a *lodA* o cerca de él en el genoma, genes similares a *lodB* que presentan el dominio conservado COG0644 típico de flavoproteínas. Esta observación indica la importancia de la asociación entre el gen similar a *lodA* y su respectivo gen similar a *lodB*. Además, resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado que cada proteína similar a LodB está relacionada específicamente con las modificaciones post-transcripcionales de la proteína similar a LodA codificada en el mismo operón (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010).

En relación con la distribución de las proteínas de la familia LodA en los genomas microbianos, es importante destacar que el número de genomas microbianos secuenciados muestra una distribución irregular, con algunos grupos microbianos más representados que otros. Por esta razón, el número de genomas con genes de la familia *lodA* está generalmente expresado en este trabajo como el porcentaje respecto al total de genomas microbianos secuenciados en el taxón considerado (tabla IV.4).

Cabe destacar el hecho de que en el dominio *Archaea* no se detectó ningún gen similar a *lodA* (602 genomas secuenciados en el momento del análisis). La mayoría de los genes que codifican proteínas similares a LodA se encuentran en *Bacteria*, estando presentes en aproximadamente el 0,94 % de los genomas secuenciados. En la mayoría de los grupos bacterianos el porcentaje de los genes similares a *lodA* está en torno al 1-3 % con alguna excepción, como es el caso de *Firmicutes*, donde hay un solo genoma detectado (*Paenibacillus pinihumii*) de 3658 (0,03 %), y de *Spirochaeta* y *Tenericutes*, dos grupos de microorganismos con un alto número de genomas secuenciados (414 y 146 genomas respectivamente) pero sin genes similares a *lodA*. La mayoría de los genes de la familia *lodA* han sido detectados en *Proteobacteria* (123 de los 168), aunque esto parece ser el resultado de un alto número de genomas secuenciados en este grupo, ya que el porcentaje de *Proteobacteria* con genes similares a *lodA* (1,4 %) se encuentra dentro de la media. Dentro de *Proteobacteria*, son más abundantes en *Alpha* y *Betaproteobacteria* (3 y 2,4 % respectivamente), mientras que en *Gammaproteobacteria* el porcentaje es del 0,94 % y en *Epsilonproteobacteria* no se han encontrado estos genes (0 de 469 genomas secuenciados). Por último, en *Eukarya* han sido detectados genes de la familia *lodA* en solo 4 cepas, de las que una de ellas, *Gymnopus luxurians*, contiene dos copias (tabla IV.5). Aunque el número de cepas que contienen genes similares a *lodA* en *Eukarya* sea bajo, en términos de porcentaje, representan el 1,97 % del número total de eucariotas secuenciados y el 26,6 % de basidiomicetos.

Tabla IV.4. Distribución de los genes similares a *lodA* en genomas microbianos depositados en la base de datos del IMG en Enero de 2014. Entre paréntesis se indica el número de genomas secuenciados para cada taxón. Los números delante de cada taxón representan el Dominio para 01, Phylum para 02, Clase para 03 y Orden para 04.

Taxón	Genomas con genes similares a <i>lodA</i>	Porcentaje
01 Archaea (602)	0	< 0,16
01 Bacteria (14983)¹	140	0,94
02 <i>Acidobacteria</i> (34)	1	2,94
02 <i>Actinobacteria</i> (1401)	13	0,93
02 <i>Bacteroidetes</i> (598)	10	1,67
02 <i>Chloroflexi</i> (90)	2	2,22
02 <i>Cyanobacteria</i> (313)	9	2,88
02 <i>Firmicutes</i> (3658)	1	0,03
03 <i>Bacilli</i> (2695)	1	0,04
04 <i>Bacillales</i> (1103)	1	0,09
04 <i>Lactobacillales</i> (1592)	0	< 0,06
03 <i>Clostridia</i> (799)	0	<0,13
03 <i>Erysipelotrichi</i> (28)	0	<3,57
03 <i>Erysipelotrichia</i> (5)	0	<20,00
03 <i>Negativicutes</i> (86)	0	<1,16
03 no clasificados (45)	0	<2,22
02 <i>Planctomycetes</i> (40)	3	7,5
02 <i>Proteobacteria</i> (7187)	101	1,4
03 <i>Alphaproteobacteria</i> (1233)	37	3
03 <i>Betaproteobacteria</i> (774)	19	2,45
03 <i>Deltaproteobacteria</i> (183)	3	1,64
03 <i>Epsilonproteobacteria</i> (469)	0	< 0,2
03 <i>Gammaproteobacteria</i> (4466)	42	0,94
03 <i>Zetaproteobacteria</i> (19)	0	<5,26
03 no clasificados (43)	0	<2,33
01 Eukarya (203)²	4	1,97
02 <i>Basidiomycota</i> (15)	4	26,66

¹Phyla dentro de *Bacteria* sin genes similares a *lodA*: *Aquificae* (22), *Armatimonadetes* (9), *Atribacteria* (1), *Caldiserica* (2), *Candidatus Saccharibacteria* (5), *Chlamydiae* (100), *Chlorobi* (17), *Chrysiogenetes* (2), *Deferribacteres* (7), *Deinococcus-Thermus* (43), *Dictyoglomi* (2), *Elusimicrobia* (3), *Fibrobacteres* (9), *Fusobacteria* (47), *Gemmatimonadetes* (8), *Ignavibacteria* (8), *Lentisphaerae* (3), *Nitrospinae* (1), *Nitrospirae* (19), *Poribacteria* (11), *Spirochaetes* (414), *Synergistetes* (20), *Tenericutes* (146), *Thermodesulfobacteria* (6), *Thermotogae* (40), *Verrucomicrobia* (34), candidate division CD12 (1), candidate division EM 3 (2), no clasificados (680).

²Phyla dentro de *Eukarya* sin genes similares a *lodA*: *Apicomplexa* (12), *Ascomycota* (77), *Bacillariophyta* (2), *Blastocladiomycota* (1), *Chlorophyta* (8), *Chytridiomycota* (2), *Microsporidia* (5), *Neocallimastigomycota* (4), no clasificados (26).

Como se ha mencionado anteriormente, los 168 genes seleccionados se encuentran distribuidos en 144 genomas microbianos diferentes ya que algunos microorganismos contienen más de una copia (tabla IV.5). Solamente poseen tres copias de estos genes dos gammaproteobacterias, *Marinomonas mediterranea* MMB-1, orden *Oceanospirillales*, y *Pseudoalteromonas citrea*, orden *Alteromonadales*. De hecho, los genes de la familia *lodA* son abundantes en ambos géneros, ya que en el género *Marinomonas*, cuatro de los cinco genomas secuenciados en el momento de redactar esta memoria contienen este tipo de genes, aunque sólo *M. mediterranea* contiene más de una copia. En el género *Pseudoalteromonas*, en torno al 50 % de las cepas secuenciadas muestran genes de la familia *lodA*. Seis de los ocho genomas de *Pseudoalteromonas* con genes de la familia *lodA* poseen dos o más copias (tabla IV.5).

Tabla IV.5. Genomas microbianos con más de una copia de genes similares a *lodA* depositados en la base de datos del IMG en Enero de 2014. Grupo filogenético, hace referencia al grupo asignado a las proteínas similares a *LodA* en este trabajo; Ninguno, se refiere a que la proteína no se asocia con ningún grupo filogenético descrito.

Nombre del genoma	Phylum	Clase	Grupo filogenético de proteínas similares a <i>LodA</i>	
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	II	IIIA
<i>Kordia algicida</i> OT-1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	II	IVB
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	IIB	IIB
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38 y USDA 6	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	ID	IVA
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	ID	Ninguno
<i>Xanthobacter</i> sp. 126	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	IB	Ninguno
<i>Citricella</i> sp. SE45	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	IB	IIIB
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	III	Ninguno
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	ID	III
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IB	III
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	IIB III
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IB	III
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	II IIIA
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	IB
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IB	IIIA
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6 y JG1	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	IIIA
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057 y JCM 20779	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	IIIA
<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	IA	IIIA
<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	<i>Basidiomycota</i>	<i>Agaricomycetes</i>	V	V

IV.4.2. Análisis de las secuencias de las proteínas similares a LodA.

En un primer paso para su análisis, las secuencias de las 168 proteínas similares a LodA fueron alineadas usando el programa “Clustal Omega” (Sievers *et al.*, 2011). En términos de similitud de secuencia, el alineamiento revela que las proteínas de la familia LodA muestran un gran número de residuos y dominios conservados (fig. IV.38).

```

001 MQNDGKKMKR RDFLSMAGSV TALSAFPLIP KSAIASTHRE EAPKDAKIHR LGIYPTIGIC
061 RVGGSDQYFL APEVPGLPPM PEGGFKDGTQ AIKKQAQRFR IYAFDDQDRV IGEITEHNAT
121 IEWNVHLANT KAAWYGFNNP LDNGELAPGI PGQKRNQYFV SDEERERMLV INGGERSSISG
181 INQNGDTEND TYQFVGQFWN EETVKLGKIK TDEHGRLLIVI PPDGVSNSPT NAAITSFADN
241 DGWHDDWCDG PVQATVKLPD GTFMEADTAW VACIGPNFAP EIPPVTTLYD VISNMNAEQG
301 WTPPVQAPIS FRKHIYPIFR RLGLMEWVSS AANLRQGWLG VGNFSDPAYI KQLADPSPAN
361 QAFRQDIFTK FRNPNNVSDT AYLDERLKMP MMLGDGINYD GSPLQWFQFP HQQYQFLEYW
421 AAGNFTNDFE DDKADAIHTI EDVDLKLQPD ALTEAALEPC SGGAFHPGVE LTYYLRIPSM
481 YARNYDNAAD PFRLAHRKRD KLVQNIGRLL TLEKAEKGDP ALGTSPPLAH QWAGDLTRWM
541 GLPWQCDAFS COQVLMQEDF PTAVWPALL PIDVLPEENY TQLMDESDD SERVIFYENR
601 ADWKRGVAGI GYHANASYWD GITNMITLWE RMGFVVKRKG PKGAGTGGLS AVPKEMYVEV
661 GRGNVEDRFK WNPSMGDLFN

```

Figura IV.38. Análisis de las secuencias de las proteínas similares a LodA señalando los residuos y dominios conservados en la secuencia peptídica de GoxA. En gris y negrita aparecen destacados los residuos conservados en el 100 % de las proteínas. En negrita se muestran otros residuos conservados en más del 90 % de las proteínas seleccionadas en el análisis. Los rectángulos indican los dos residuos que forman parte del cofactor. En subrayado aparecen algunos dominios conservados propuestos para estas proteínas.

Hay que destacar que los residuos Cys-551 y Trp-566 de GoxA, que forman parte del cofactor quinónico CTQ (cisteína triptofilquinona) (apartado IV.1.5.2), alinean con la Cys-516 y el Trp-581 que forman el cofactor CTQ de LodA (Okazaki *et al.*, 2013) y con los residuos de Cys y Trp en todas las proteínas similares a LodA (fig. IV.38). Estos datos sugieren que estas proteínas contienen el mismo tipo de cofactor. Los otros residuos conservados podrían intervenir en un proceso común en todas estas proteínas, por ejemplo, participando en la generación del cofactor quinónico o en la actividad catalítica de estas enzimas.

La mayoría de proteínas de la familia LodA muestran un tamaño aproximado de 700 aminoácidos (apéndice A.3). De hecho, el tamaño medio es de 738 aminoácidos,

similar a los 726 aminoácidos de LodA. Sin embargo, existe un abanico desde proteínas que sólo poseen 481 aminoácidos, tales como A3CEDRAFT_0690 de *Amycolatopsis balhimycina* DSM 44591, a otras con un tamaño mayor como YY3DRAFT_04971 de *Rhizobium* sp. STM6155 con 1413 aminoácidos. Las proteínas con tamaños mayores parecen ser resultado de una fusión de genes, ya que además de los dominios característicos de la familia LodA, muestran dominios conservados descritos en otras proteínas (tabla IV.6).

Tabla IV.6. Producto de los genes similares a *lodA* que muestran otros dominios Pfam conservados (Finn *et al.*, 2014), aparte de los característicos de las proteínas de la familia LodA.

Genoma	Referencia IMG	Locus	Longitud (aa)	Pfams
<i>Actinoplanes globisporus</i> DSM 43857	2515244410	A3CQDRAFT_07977	985	pfam14518
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	2536908549	PMI06_03990	1409	pfam14518
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7103	2507474092	Cal7103DRAFT_00009910	1049	pfam14518
<i>Paenibacillus pinihi</i> DSM 23905	2524187775	H583DRAFT_01923	1099	pfam14518
<i>Rhizobium</i> sp. STM6155	2513599306	YY3DRAFT_04971	1413	pfam14518
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> MTCC 11365	2546621803	L293_0743	1008	pfam00199
<i>Acinetobacter</i> sp. NBRC 100985	2533901541		1008	pfam00199
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM 14971	2518262899	C502DRAFT_01575	1006	pfam00199
<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	2512035869	AZOLI_p50417	999	pfam00199
<i>Azospirillum</i> sp. B510	646556648	AZL_e04100	1004	pfam00199
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	2563064361	PMI06_008734	963	pfam00199
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	2514031881	A3A5DRAFT_06866	1025	pfam00199
<i>Flavobacterium soli</i> DSM 19725	2523123554	G508DRAFT_03147	1072	pfam00199
<i>Massilia timonae</i> CCUG 45783	2532942463	HMPREF9710_03282	979	pfam00199
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701	2535024168		990	pfam00199
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166	2524095414	H579DRAFT_00201	973	pfam00199
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	2541428757	PRUB_24676	1039	pfam00199
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20495	2540458794		1000	pfam00199
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Bsw20308	2540452162	D172_1358	1000	pfam00199
<i>Ralstonia solanacearum</i> MolK2	2541798314		1000	pfam00199
<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82	651230827	RSPO_m00447	999	pfam00199
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 128C53	2515651856	B062DRAFT_04548	1004	pfam00199
<i>Sphingomonas</i> sp. S17	651582060	SUS17_588	986	pfam00199
<i>Streptomyces afghaniensis</i> 772	2546772914	STAFG_1983	999	pfam00199
<i>Streptomyces purpureus</i> KA281 y ATCC 21405	2516519010	StrpuDRAFT_3616	993	pfam00199
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	2523672835	H518DRAFT_02976	1061	pfam00199
<i>Amycolatopsis vancoremycina</i> DSM 44592	2546378692	H480_25957	1114	pfam13519
<i>Cryptosporangium arzum</i> YU 629-21 y DSM 44712	2510402938	CryarDRAFT_3973	1026	pfam13519

Algunas de las proteínas de mayor tamaño contienen en la región N-terminal secuencias con similitud al dominio conservado característico de catalasas pfam00199. Otras poseen el dominio conservado CD08152 descrito en familias de proteínas relacionadas con la proteína no caracterizada y4iL de *Rhizobium* sp. NGR234, con un dominio catalasa y unen hemo, pero no necesariamente tienen actividad catalasa (Marchler-Bauer *et al.*, 2013). Otras cinco proteínas muestran en su región N-terminal secuencias con similitud al dominio pfam14518, descrito en enzimas redox que contienen hierro. Finalmente, dos proteínas de las actinobacterias *Amycolatopsis vancoresmycina* y *Cryptosporangium arvum* muestran el dominio del factor von Willebrand tipo A (vWA) (pfam13519). Este dominio fue primero descrito en el factor de von Willebrand (vWF) que participa en la coagulación de la sangre, pero también ha sido descrito en otras proteínas participando en diferentes procesos celulares involucrados en la interacción con superficies mediada por la adhesión dependiente de metales denominado "motivo MIDAS" (Whittaker y Hynes, 2002).

IV.4.3. Análisis filogenético de las proteínas similares a LodA.

Una vez alineadas, las proteínas similares a LodA se analizaron filogenéticamente mediante los métodos del "Vecino más cercano" (Neighbor-Joining, NJ) y "Máxima verosimilitud" (Maximum Likelihood, ML) disponibles en el programa "MEGA" (Tamura *et al.*, 2013). En base a este análisis, la familia de proteínas similares a LodA ha sido organizada en cinco grupos cuyos miembros poseen una similitud estadísticamente relevante cifrada en valores de probabilidad mayores al 70 % obtenidos tanto en NJ como en ML (apartado III.20.2). Según este criterio, algunas de las proteínas analizadas no se pudieron asociar a ningún grupo taxonómico concreto de los propuestos (fig. IV.39). A continuación se describen las características más relevantes de cada grupo.

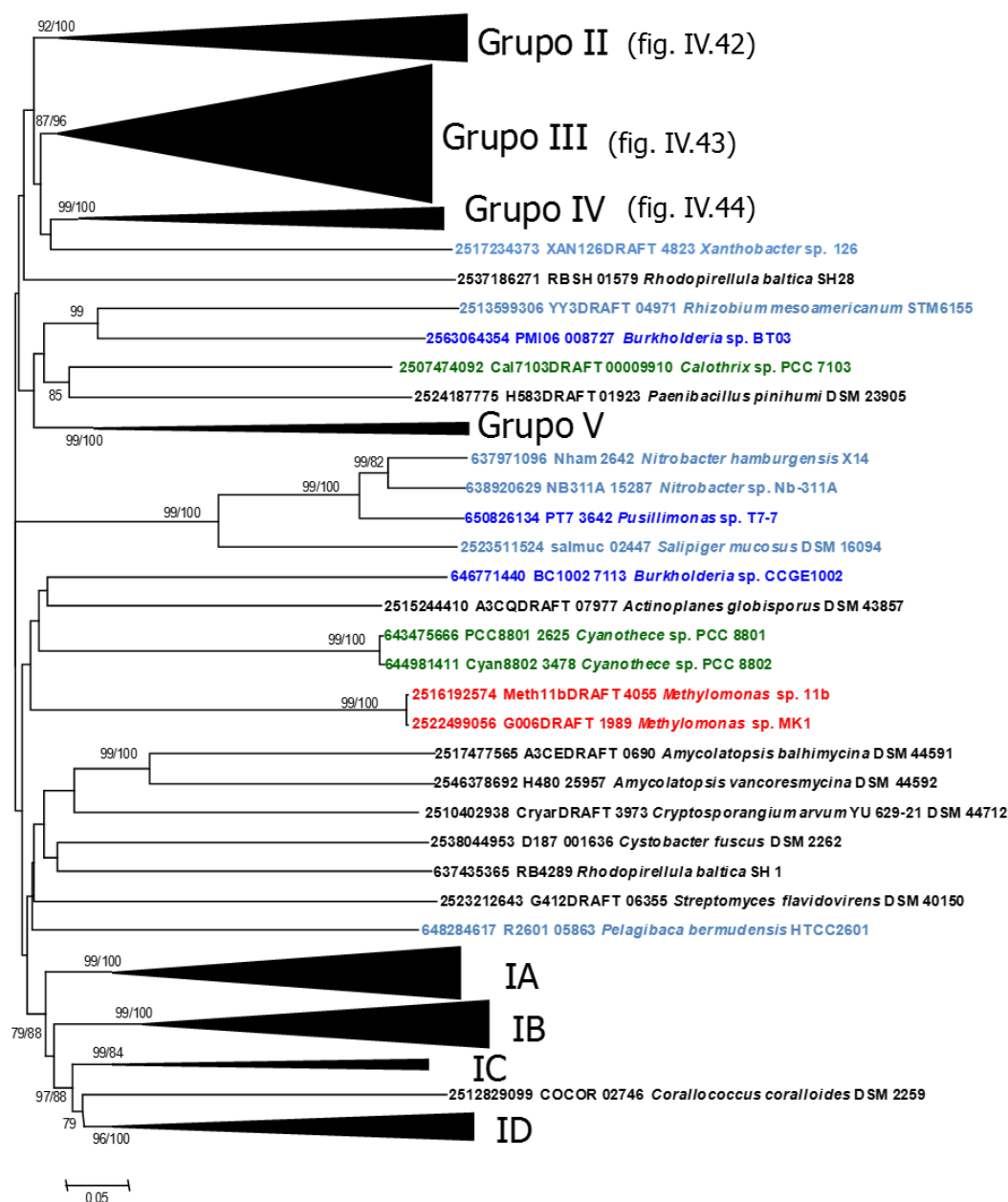


Figura IV.39. Relación filogenética de las proteínas similares a LdaA. El árbol fue construido usando el método del “Vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) con el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood, ML). Las proteínas de microorganismos pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* que no pertenecen a ningún grupo filogenético se indican en rojo, *Alphaproteobacteria* en azul claro, *Betaproteobacteria* en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

IV.4.3.1. Grupo I.

El grupo I contiene un total de 56 proteínas que pueden dividirse a su vez en cuatro subgrupos (IA, IB, IC y ID), a excepción de la proteína presente en la deltaproteobacteria *Corallococcus coralloides*, que está separada filogenéticamente de cualquiera de estos grupos (fig. IV.39). En términos de distribución taxonómica, el taxón más representado en este grupo es el de *Gammaproteobacteria*. Las gammaproteobacterias constituyen el 71,4 % (15/21) de los microorganismos en el subgrupo IA (fig. IV.40) y el 68,4 % (13/19) en el subgrupo IB (fig. IV.41A). En el total de los microorganismos con genes de la familia *lodA* representan el 28,4 % (41/144). El subgrupo IC incluye microorganismos que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos (fig. IV.41B). Curiosamente las alfa proteobacterias son abundantes en el subgrupo ID (7/10) (fig. IV.41B), mientras que sólo hay dos en el subgrupo IB y ninguna en el subgrupo IA.

El subgrupo IA contiene, entre otras, a LodA de *M. mediterranea* y a AlpP de *P. tunicata*, proteínas con actividad lisina- ϵ -oxidasa y con propiedades antimicrobianas (fig. IV.40). Otra proteína de este subgrupo con actividad antimicrobiana es PfaP (UY7DRAFT_03653) de *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1, aunque su actividad enzimática aún no se ha determinado (Yu *et al.*, 2012). Como se discutirá en el apartado V.4, también se ha descrito actividad antimicrobiana para ciertos microorganismos relacionados filogenéticamente con algunos de los que codifican proteínas pertenecientes a este grupo, como es el caso de *Pseudoalteromonas luteoviolacea* CPMOR-1 (Gómez *et al.*, 2008) y de *Rheinheimera aquatica* GR5 (Chen *et al.*, 2010b). La atribución de la actividad antimicrobiana observada a las proteínas similares a LodA deberá de ser demostrada en futuros experimentos.

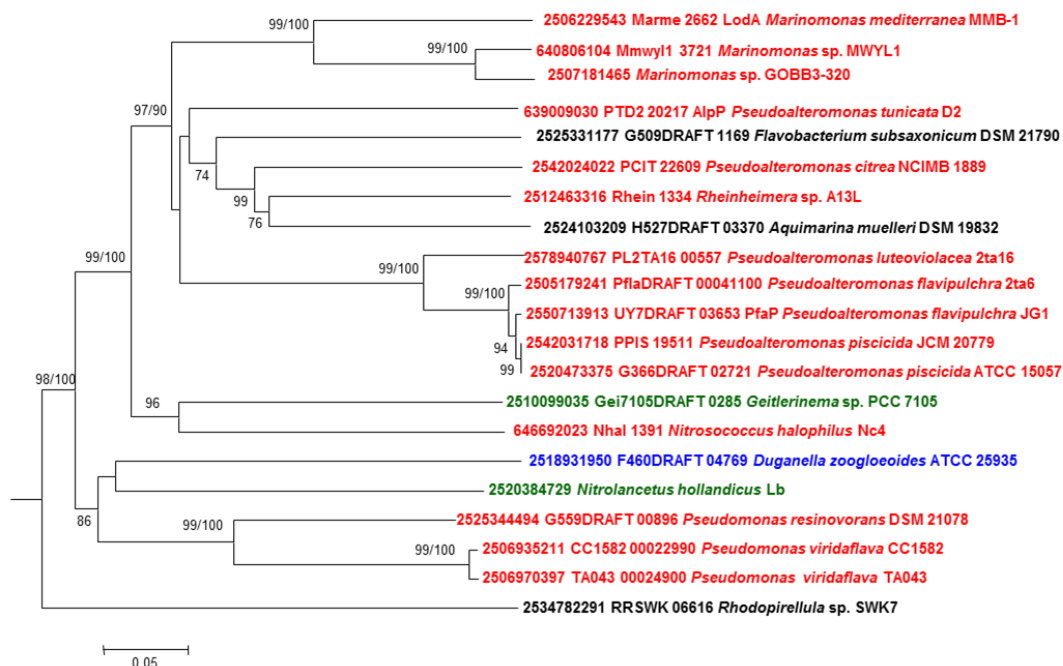


Figura IV.40. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el subgrupo IA. El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, las betaproteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

Por otro lado, no se ha propuesto ninguna actividad enzimática para las proteínas del subgrupo IB, IC y ID hasta la fecha (fig. IV.41). Sin embargo, sí que se ha descrito que la proteína de *Caulabacter crescentus* (subgrupo IB) y la de *Chromobacterium violaceum* (IC) están implicadas en la generación de peróxido de hidrógeno (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). En este trabajo se han llevado a cabo ensayos de actividad oxidasa, frente a una solución de casaminoácidos que contiene todos los aa proteicos excepto el triptófano, con cultivos de estos dos microorganismos, así como con cultivos de *Marinomonas* sp. MED121 (IB) y *Saccharophagus degradans* 2-40 (ID). Los datos mostraron que no se ha conseguido detectar la producción de peróxido de hidrógeno en las condiciones ensayadas. Una posible explicación a este resultado es que estas enzimas podrían oxidar algún sustrato, todavía sin identificar, diferente a aminoácidos.

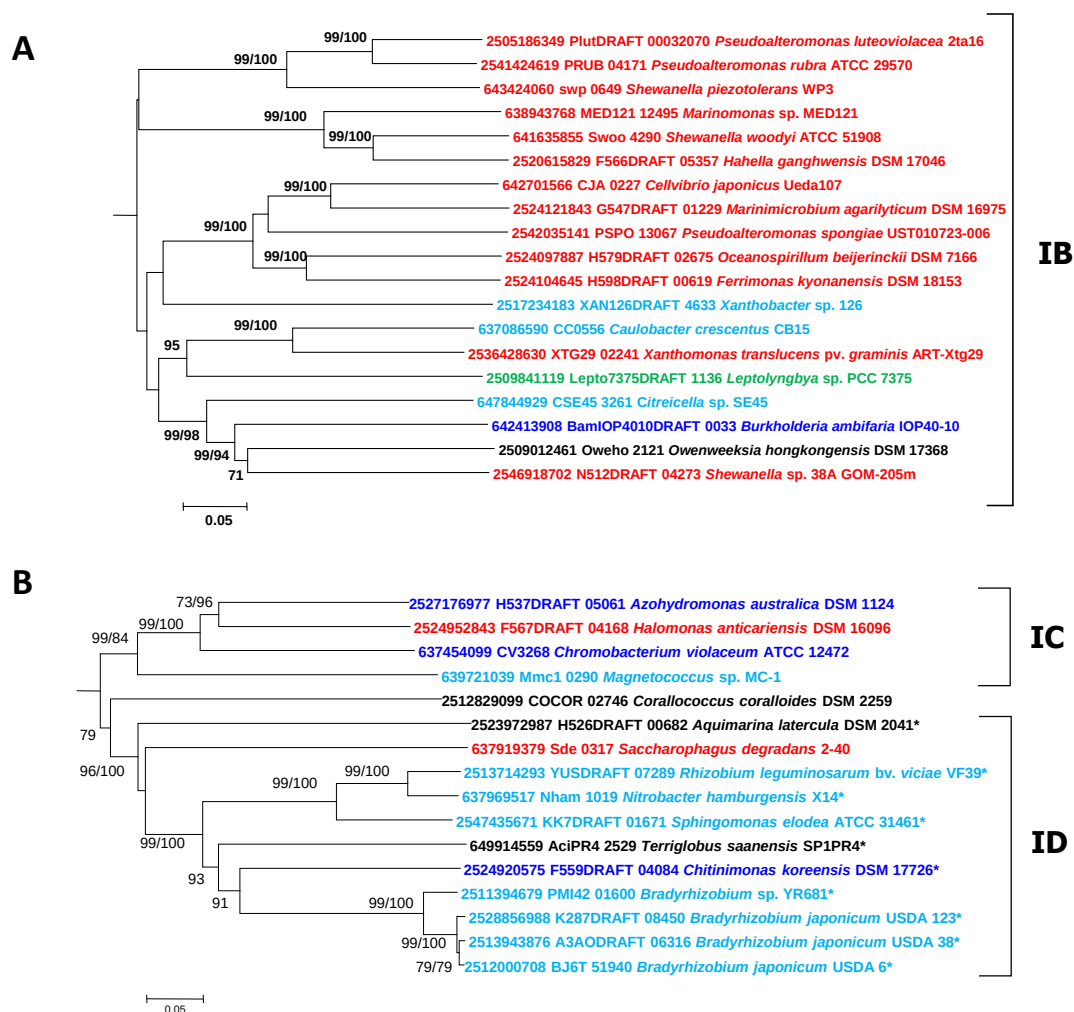


Figura IV.41. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el subgrupo IB (A) y en los subgrupos IC y ID (B). El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, alfa proteobacterias en azul claro, beta proteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

IV.4.3.2. Grupo II.

El grupo II reviste especial interés en el contexto de este trabajo, ya que al mismo pertenece la proteína GoxA sintetizada por *M. mediterranea*. Todas las proteínas de este grupo, excepto las de *Kordia algicida*, *Tenacibaculum ovolyticum* y *Pseudoalteromonas citrea*, pueden dividirse a su vez en los subgrupos IIA y IIB (fig. IV.42). A excepción de las proteínas de estos 3 microorganismos, en términos de secuencia es importante señalar que las proteínas del grupo II presentan en su extremo N-terminal un motivo típico de secreción TAT (Bendtsen *et al.*, 2005b).

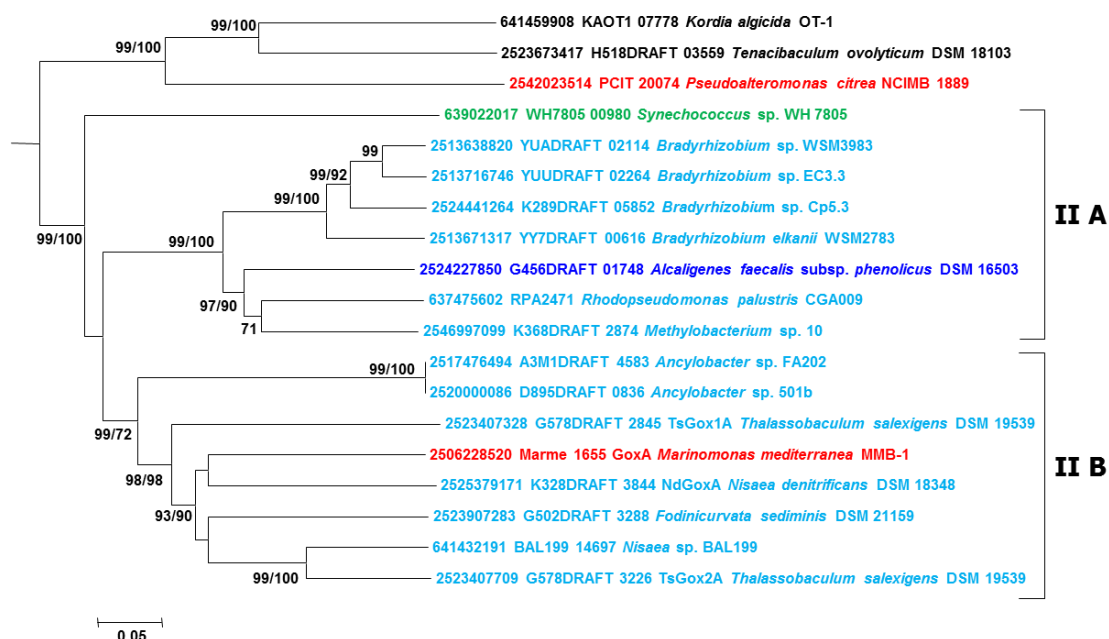


Figura IV.42. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo II indicando los subgrupos IIA y IIB. El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, alfavproteobacterias en azul claro, betaproteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

La mayoría de los genes en los subgrupos IIA y IIB se detectan en alfavproteobacterias (13/15). Los únicos microorganismos que no pertenecen a esta Clase son la betaproteobacteria *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* y la gammaproteobacteria *Marinomonas mediterranea*. Según la herramienta “EMBOSS-Needle” (McWilliam *et al.*, 2013), al comparar las secuencias de GoxA y LodA obtenemos valores de 22,8 % de identidad y 34,6 % de similitud. Sin embargo, al comparar las secuencias de GoxA y la proteína similar presente en el subgrupo IIB de *Nisaea denitrificans*, una alfavproteobacteria, obtenemos un 64,5 % de identidad y un 76,4 % de similitud. Estos datos sugieren que *M. mediterranea* pudo haber adquirido el gen *goxA* mediante un proceso de transferencia horizontal de genes a partir de una alfavproteobacteria en vez de que haya ocurrido un proceso de duplicación a partir del gen *lodA*. Se han propuesto una gran variedad de métodos que detectan la transferencia horizontal de genes, basados principalmente por una parte en el análisis filogenético y por otra en la detección de desviaciones en la composición del ADN del microorganismo. Con el fin

de estudiar la posible transferencia horizontal de *goxA* a partir de una alfa-proteobacteria, se valoró el porcentaje de GC para cada gen codificante de proteínas del grupo II y se comparó con el porcentaje en GC del genoma de los microorganismos que expresan dichas proteínas (tabla IV.7). Este análisis muestra que a pesar de que la proteína GoxA de *Marinomonas mediterranea* se encuentra filogenéticamente muy cercana a otras proteínas en alfa-proteobacterias, el % GC de GoxA es similar al del conjunto de su genoma y cercano a los otros dos miembros de la familia LodA presentes en *Marinomonas mediterranea*. No obstante, esta observación no anula la hipótesis de la adquisición de GoxA mediante transferencia horizontal, sino que podría estar justificado si fuera un acontecimiento que tuvo lugar hace mucho tiempo en escala evolutiva, puesto que un fragmento de DNA exógeno sufre modificaciones en el microorganismo receptor de forma que finalmente resulta indistinguible, en cuanto a su composición, como extraño (Brown, 2003).

Tabla IV.7. Porcentaje de GC de los genes que codifican proteínas pertenecientes al grupo II de la familia de proteínas similares a LodA en comparación con el porcentaje en GC de los genomas de los microorganismos que expresan dichas proteínas. Se incluyen también a modo comparativo las otras dos proteínas de *Marinomonas mediterranea*, locus Marme_2662 y Marme_2396, pertenecientes a los grupos IA y IIIB respectivamente.

Locus	Genoma	Phylum	Clase	% GC del gen	% GC del genoma	Variación en el % GC entre el genoma y el gen
G456DRAFT_01748	<i>Alcaligenes faecalis phenolicus</i> DSM 16503	Proteobacteria	Betaproteobacteria	59,49	56,4	3,09
A3M1DRAFT_4583	<i>Ancylobacter</i> sp. FA202	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	68,57	67,31	1,26
D895DRAFT_0836	<i>Ancylobacter</i> sp. 501b*	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	60,48	67,37	-6,89
YY7DRAFT_00616	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM2783	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	61,58	62,35	-0,77
K289DRAFT_05852	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Cp5,3	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	63,51	63,39	0,12
YUUDRAFT_02264	<i>Bradyrhizobium</i> sp. EC3.3	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	66,26	62,63	3,63
YUADRAFT_02114	<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM3983	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	66,31	62,94	3,37
G502DRAFT_3288	<i>Fodinicurvata sediminis</i> DSM 21159	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	64,55	60,63	3,92
KAOT1_07778	<i>Kordia algicida</i> OT-1	Bacteroidetes	Flavobacteria	37,68	34,26	3,42
Marme_1655 (<i>goxA</i>)	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	48,02	44,13	3,89
K368DRAFT_2874	<i>Methylobacterium</i> sp. 10	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	67,74	66,55	1,19
K328DRAFT_3844	<i>Nisaea denitrificans</i> DSM 18348	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	61,85	60,5	1,35
BAL199_14697	<i>Nisaea</i> sp BAL199	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	64,36	65,02	-0,66
PCIT_20074	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	44,57	41,12	3,45
RPA2471	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	67,12	65,03	2,09
WH7805_00980	<i>Synechococcus</i> sp. WH7805	Cyanobacteria	Sin clasificar	45,42	57,63	-12,21
H518DRAFT_03559	<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	Bacteroidetes	Flavobacteria	32,1	29,53	2,57
G578DRAFT_2845	<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	68,24	67,36	0,88
G578DRAFT_3226	<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	65,04	67,36	-2,32
Marme_2662 (<i>lodA</i>)	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	46,17	44,13	2,04
Marme_2396 (<i>xoA</i>)	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	48,76	44,13	4,63

Por otro lado, *Thalassobaculum salexigens* posee dos proteínas similares a LodA que parecen haber sido generadas por un proceso de duplicación, ya que tienen un 54,8 % de identidad y un 66,5 % de similitud entre ellas, apareciendo muy próximas en el árbol filogenético, ambas en el grupo IIB (fig. IV.42). Precisamente son aquellos genes que están sujetos a procesos de duplicación o pérdida los que más se identifican como producto de una transferencia horizontal entre microorganismos (Grilli *et al.*, 2014). Esta observación sería compatible con la idea de adquisición por transferencia horizontal de *goxA*.

IV.4.3.3. Grupo III.

El grupo III incluye un amplio rango de proteínas detectadas en diferentes grupos microbianos (fig. IV.43), lo que sugiere un origen evolutivo antiguo. Este grupo se puede dividir a su vez en diferentes subgrupos. El IIIA incluye muchas proteínas codificadas por gammaproteobacterias, mientras que el subgrupo IIIC solo contiene proteínas del phylum *Actinobacteria*. Todas las proteínas que poseen una fusión con el dominio pfam00199 (dominio catalasa; tabla IV.6) están presentes en este grupo III, aunque no están específicamente relacionadas con ningún subgrupo.

Es interesante destacar que en la mayoría de los microorganismos que tienen más de una copia de genes similares a *lodA*, uno de esos genes pertenece al grupo III (tabla IV.5). Por ejemplo, este es el caso de *Pseudoalteromonas citrea* y *M. mediterranea*, únicos microorganismos que contienen tres copias y que curiosamente se encuentran distribuidas, en ambos casos, en los grupos I, II y III. Esto puede indicar que las proteínas codificadas por estos genes estén cumpliendo funciones complementarias, quizás actuando sobre diferentes sustratos.

Hasta la fecha, ninguna proteína del grupo III ha sido caracterizada. Dentro del grupo III está el producto de Marme_2396, denominado XoA, el tercer gen de la familia *lodA* presente en *M. mediterranea*.

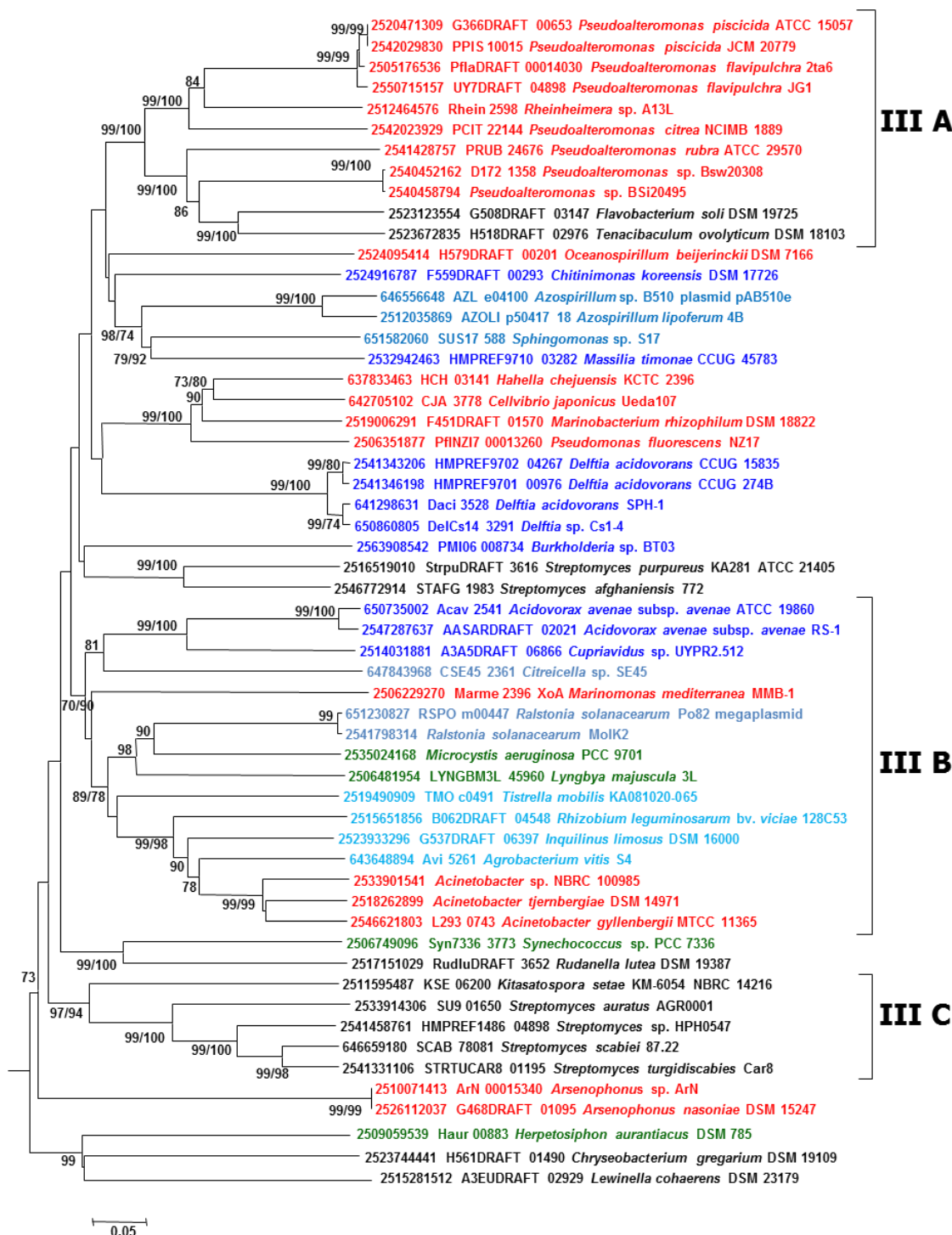


Figura IV.43. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo III, indicando los subgrupos IIIA, IIIB y IIIC. El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML. Las gammaproteobacterias están indicadas en rojo, alphaproteobacterias en azul claro, betaproteobacterias en azul oscuro y los microorganismos fotosintéticos en verde.

IV.4.3.4. Grupo IV.

El grupo IV contiene solo 9 miembros (fig. IV.44). En él se pueden reconocer dos subgrupos, el IVA, que sólo contiene alfaproteobacterias del orden *Rhizobiales*, y el subgrupo IVB, en el que se incluyen proteínas de diferentes clases bacterianas como *Flavobacteria*, *Deltaproteobacteria* y *Actinobacteria*. Al igual que para el grupo III, ninguna proteína en este grupo ha sido caracterizada hasta el momento.

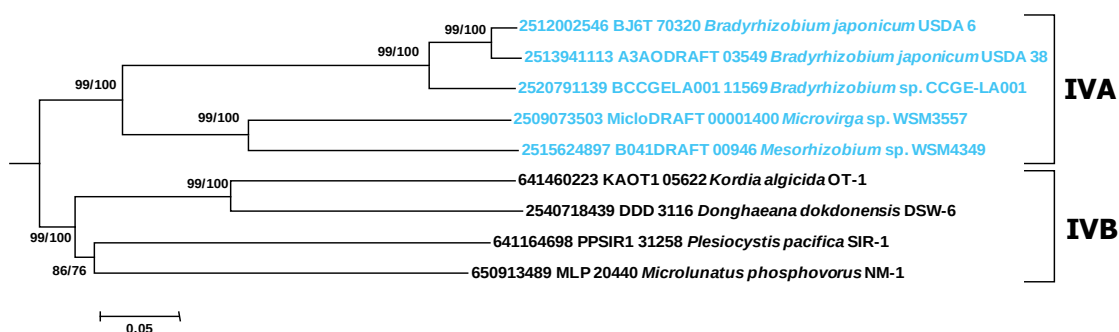


Figura IV.44. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo IV, indicando los subgrupos IVA y IVB. El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML. Las alfaproteobacterias se indican en azul claro.

IV.4.3.5. Grupo V.

Por último, el grupo V es un pequeño grupo que contiene los cinco genes detectados en hongos, incluyendo las dos copias presentes en *Gymnopus luxurians* (fig. IV.45). Estos dos genes son muy similares entre sí (60,2 % de identidad y 70,5 % similitud) y están localizados muy próximos en el genoma, lo que parece indicar que proceden de un evento de duplicación génica.

Los operones detectados en hongos poseen la peculiaridad de tener el gen similar a *lodB* normalmente orientado en posición contraria al gen *lodA*. En términos de secuencia, las proteínas similares a LodA del grupo V no poseen ninguna característica especial que las distinga del resto de proteínas descritas en bacterias.

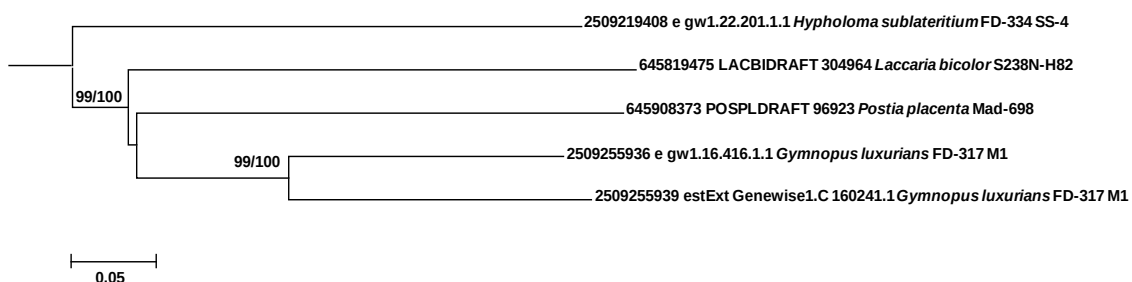


Figura IV.45. Relación filogenética de las proteínas similares a LodA en el grupo V. El árbol fue construido por el método NJ en el programa MEGA. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y ML.

IV.4.4. Exploración de nuevas oxidasas pertenecientes a la familia LodA.

Una vez detectada la presencia de numerosas proteínas similares a LodA y GoxA, nuestro siguiente objetivo fue explorar la posible actividad enzimática de dichas proteínas. Teniendo en cuenta el análisis filogenético realizado, donde LodA y GoxA, que poseen actividades diferentes, se encuentran en diferentes clusters, una posibilidad es que los grupos filogenéticos propuestos estén relacionados con la actividad enzimática de las proteínas que contienen.

IV.4.4.1 Detección de actividad glicina oxidasa en microorganismos que codifican proteínas similares a LodA del grupo II.

Como hemos comentado anteriormente, dentro del grupo II de proteínas de la familia LodA se encuentra GoxA, la proteína con actividad glicina oxidasa de *M. mediterranea*. Las proteínas que guardan mayor similitud con GoxA, también presentes en el subgrupo IIB, pertenecen a los microorganismos *Ancylobacter* sp. FA202, *Ancylobacter* sp. 501b, *Fodinicurvata sediminis* DSM 21159, *Nisaea* sp. BAL199, *Nisaea denitrificans* DSM 18348 y *Thalassobaculum salexigens* DSM 19539 (fig. IV.42). Estos dos últimos microorganismos fueron descritos por primera vez en el laboratorio del Dr. Marcelino Suzuki, en el Observatorio Oceanográfico de Banyuls sur Mer (Francia), lugar donde

realicé una estancia de 3 meses. El objetivo de esta estancia fue intentar detectar la actividad glicina oxidasa en dichos microorganismos.

El análisis de secuencia de las proteínas similares a GoxA en *Nisaea denitrificans* DSM 18348 y *Thalassobaculum salexigens* DSM 19539 reveló que la proteína similar a GoxA en *N. denitrificans*, denominada en este trabajo NdGoxA (K328DRAFT_3844, número de acceso WP_028466584), guarda un 64,6 % de identidad y un 76,5 % de similitud con GoxA, con una masa molecular esperada de 76,2 kDa. Por otra parte, *T. salexigens* codifica dos proteínas similares a GoxA. Una de ellas, a la que hemos llamado TsGox1A (G578DRAFT_2845, número de acceso WP_028795512), con una masa molecular teórica de 77,6 kDa, tiene un 57,3 % de identidad y un 69 % de similitud con GoxA, mientras que la denominada en este trabajo TsGox2A (G578DRAFT_3226, número de acceso WP_028795812), posee un 60,9 % de identidad y un 74,8 % de similitud con GoxA y una masa molecular esperada de 74,9 kDa. Estos datos revelan una gran similitud en términos de secuencia entre estas tres proteínas y GoxA de *M. mediterranea*. Adicionalmente, el análisis de la región adyacente a los genes que codifican las proteínas similares a GoxA en *N. denitrificans* y *T. salexigens*, reveló la presencia, justo detrás dichos genes y sin espacio intergénico entre ellos, de un segundo gen que codifica una proteína con similitud a GoxB. Estas proteínas son K328DRAFT_3845, en *N. denitrificans*, y en *T. salexigens* son G578DRAFT_2846 y G578DRAFT_3227, que tienen una masa molecular esperada de 40,4, 39,4 y 41,9 kDa, respectivamente.

IV.4.4.1.1. Detección de actividad glicina oxidasa en el sistema nativo.

En una primera aproximación, se intentó detectar la actividad GOX en el sistema nativo, y con este fin se obtuvieron los sobrenadantes de *N. denitrificans* y *T. salexigens* cultivadas en medio rico 2216. Los resultados mostraron que tanto *N. denitrificans* como *T. salexigens* expresaban la actividad, aunque ésta era aproximadamente un orden de magnitud más baja que la observada para *M. mediterranea* en las mismas condiciones (fig. IV.46).

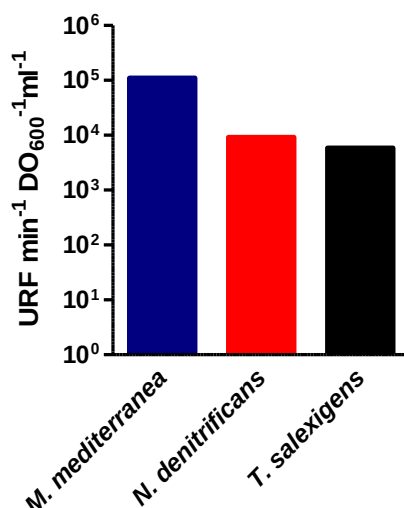


Figura IV.46. Actividad GOX al inicio de la fase estacionaria en los sobrenadantes de los microorganismos que se indican cultivados en medio 2216.

A continuación, partiendo de la base de que la actividad GOX en *M. mediterranea* es mucho mayor en medio mínimo que en medio rico (fig. IV.31), se ensayaron diferentes condiciones de cultivo con el fin de encontrar un medio mínimo definido para el cultivo de *N. denitrificans* y *T. salexigens*. Se probaron diferentes azúcares como fuente de carbono y distintos aminoácidos como fuente de carbono y/o nitrógeno (apéndice A.4). No se consiguió observar crecimiento para las dos cepas en ningún medio definido, aunque la adición de extracto de levadura al 0,01 % a un medio con glucosa 30 mM (medio Glc+YE), condujo al crecimiento de ambas cepas. Los niveles de actividad GOX en este medio fueron mayores que los obtenidos en medio rico 2216, tanto en los sobrenadantes como en los extractos de las 3 cepas ensayadas (fig. IV.47). Por otra parte, los niveles de actividad detectados en los sobrenadantes, tanto en *N. denitrificans* como en *T. salexigens*, son menores que los de *M. mediterranea* en las mismas condiciones de cultivo (fig. IV.47A). Curiosamente, *T. salexigens* es el microorganismo que presentó mayor actividad GOX en los extractos, tanto en medio 2216 como en Glc+YE (fig. IV.47B). Este resultado puede reflejar diferencias en la eficacia de precipitación de estas proteínas en comparación con otras en los extractos. También puede estar relacionado con que *T. salexigens* contenga dos posibles proteínas con actividad GOX.

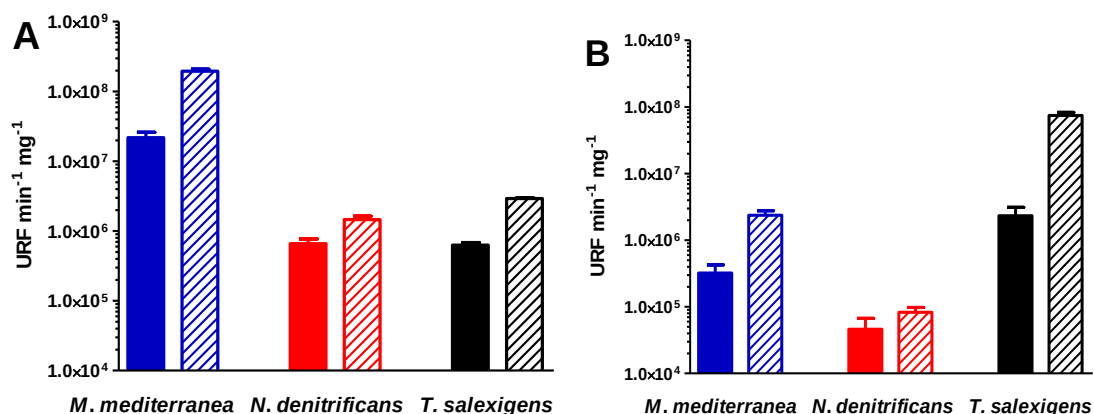


Figura IV.47. Actividad GOX de *M. mediterranea* MMB-1R, *N. denitrificans* y *T. salexigens* cultivadas en los medios 2216 (barras rellenas) y Glc+YE (barras ralladas) en los sobrenadantes (A) y extractos celulares (B) al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

La detección de la actividad GOX en los sobrenadantes de los cultivos indica que GoxA es una proteína extracelular. Cabe destacar que NdGoxA, TsGox1A y TsGox2A poseen en su extremo N-terminal el motivo típico de secreción TAT (Twin Arginine Translocation) (Bendtsen *et al.*, 2005b) (fig. IV.48), al igual que GoxA (apartado IV.1.5.1). Además, es importante resaltar que tanto en *N. denitrificans* como en *T. salexigens* podemos detectar proteínas con homología a las proteínas TatA, TatB y TatC, que forman el complejo translocasa del sistema TAT. En *N. denitrificans*, las proteínas con homología a TatA, TatB y TatC son, respectivamente, el producto de los locus K328DRAFT_1116, _1115 y _1114, mientras que en *T. salexigens*, las proteínas con homología son G578DRAFT_1864, _1865 y _1866, respectivamente. Estos datos apoyan la idea de que las proteínas similares a GoxA en estas alfa-proteobacterias son secretadas mediante el sistema TAT, permitiendo la detección de la actividad GOX en los sobrenadantes.

GoxA	-----MQNDGKKMK RR DFLSMAGSVTALSAFPLIPKSAIASTHREEAPK
NdGoxA	<u>MGRKFLNNQPQGN</u> SVR RR DFLAGTAAGVLGANLIWQPKAAVAAGTAKPAPE
TsGox1A	----MGDGRTPKTSMK RR DFLAGAGAMALSGPLMARAAVAQGTGPGVAPAG
TsGox2A	-----MPDKTETR RR DFLAGAGTAAWIAGLGFLPIKPAVAATTPEAE

Figura IV.48. Extremo N-terminal de las proteínas GoxA, NdGoxA, TsGox1A y TsGox2A mostrando el péptido señal de las Twin-Ariginas. El par de argininas se destacan en negrita y con un mayor tamaño. En subrayado se resalta el péptido que se escindiría en el proceso de secreción según el programa TatP 1.0 (Bendtsen *et al.*, 2005b).

IV.4.4.1.2. Expresión recombinante de NdGoxA, TsGox1A y TsGox2A en *E. coli*.

Una vez observada la actividad GOX en *Nisaea denitrificans* y *Thalassobaculum salexigens*, el siguiente paso era demostrar si las actividades detectadas en los cultivos era codificada por los operones similares a *gox*, *ndgox* (K328DRAFT_3844 y _3845) en *N. denitrificans*, y *tsgox1* (G578DRAFT_2845 y _2846) y *tsgox2* (G578DRAFT_3226 y _3227) en *T. salexigens*. Con este objetivo, los tres operones fueron clonados en el vector pET11b, tal y como se describe en el apartado III.14.1, obteniendo los plásmidos pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211. Se clonaron los operones completos ya que la expresión de la proteína similar a GoxB puede ser requerida para la síntesis de la enzima activa, tal y como sucede en el caso de la lisina y la glicina oxidasa (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

En un primer ensayo se utilizaron las mismas condiciones empleadas para la expresión recombinante de GoxA descritas en el apartado IV.2.2.3, esto es, una concentración 0,5 mM de IPTG, temperatura de inducción de 15 °C, la presencia de un 1 % de glucosa y la incubación de las muestras 4 h a 25 °C tras el sonicado. Con estas condiciones se intentó detectar la actividad GOX en los extractos de la cepa CD03 (Kishishita *et al.*, 2003) transformada con los plásmidos pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211, que contienen los operones *ndgox*, *tsgox1* y *tsgox2* respectivamente (fig. III.6). En el experimento también se utilizó el plásmido pETGOXAB11 como control positivo y el pET11 sin inserto como control negativo. Tras inducir los cultivos o/n, se recogieron alícuotas que fueron procesadas, tal como se describe en el apartado III.14.3, para obtener tanto la fracción soluble como insoluble con el fin realizar geles SDS-PAGE y medidas de actividad GOX en el fluorímetro.

Los resultados obtenidos revelaron que una de las proteínas similares a GoxA en *Thalassobaculum salexigens*, TsGox2A (G578DRAFT_3226), posee actividad glicina oxidasa (fig. IV.49A). Sin embargo, la actividad GOX no fue detectada para las proteínas NdGoxA y TsGox1A en las condiciones ensayadas. Posiblemente, en el caso de NdGoxA, la ausencia de actividad se deba a que la proteína está localizada en la fracción insoluble (fig. IV.49B). En el caso de TsGox1A, si se detecta en gran cantidad en la fracción soluble. La ausencia de actividad podría deberse a que esta no hubiese

sufrido modificación post-traducciona por la flavoproteína asociada. De hecho, no se observa la banda correspondiente a esta flavoproteína (fig. IV.49B), aunque esto no constituye una prueba definitiva ya que sólo es necesaria una baja concentración de ésta.

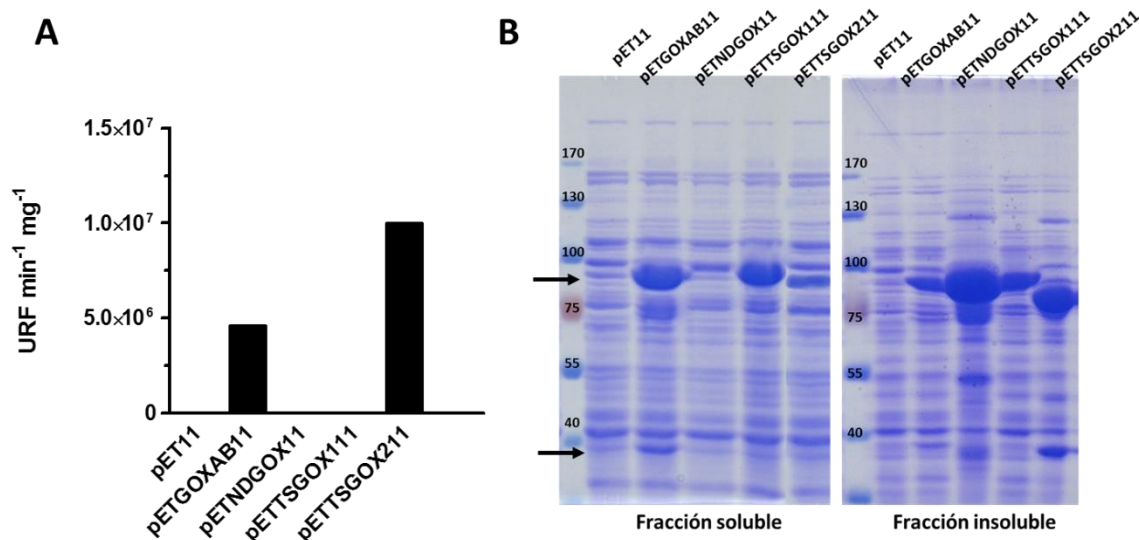


Figura IV.49. Expresión heteróloga de los plásmidos pETGOXAB11, pETNDGOX11, pETTSGOX111 y pETTSGOX211 en *E. coli* CD03 incubada durante 16 h a 15 °C con 0,5 mM de IPTG y 1 % de glucosa. **A**, actividad GOX en la fracción soluble. **B**, SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes. Se utilizó como control el plásmido pET11 sin inserto. Las flechas indican el tamaño aproximado de GoxA y GoxB.

IV.4.4.1.3. Intentos de detección de actividad en NdGoxA y TsGox1A.

Con el objetivo de detectar la actividad GOX en la expresión recombinante de NdGoxA y TsGox1A, se ensayaron diferentes cepas de *E. coli*, así como diferentes condiciones de inducción cambiando la temperatura, concentración de IPTG y tiempo de inducción (tabla IV.8). Además, en algunas condiciones se utilizaron algunos plásmidos accesorios (Takara) que codifican ciertas chaperonas con el fin de ayudar en el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes (Hussain *et al.*, 2013) (tabla IV.8).

Aunque en algunas de las condiciones ensayadas las proteínas NdGoxA y TsGox1A se detectaron, en mayor o menor medida, en la fracción soluble de los geles SDS-PAGE, en ningún caso se observó actividad GOX en las condiciones ensayadas (datos no mostrados). Para explorar la posibilidad de que, pese a la similitud de secuencia, estas

proteínas tuviesen una actividad enzimática distinta, se ensayó la utilización de casaminoácidos al 2 % como sustrato. En todos los casos el resultado fue también negativo. La ausencia de actividad oxidasa puede deberse a que no consigamos expresar correctamente la flavoproteína asociada, o a que ésta no sea capaz de modificar a la quinoproteína para generar el cofactor presumiblemente necesario para la expresión de la forma activa de la proteína (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

Tabla IV.8. Condiciones ensayadas para la expresión recombinante de los plásmidos pETNDGOX11 y pETTSGOX111 en varias cepas de *E. coli*.

Cepa de <i>E. coli</i>	Plásmidos auxiliares	Temperatura	Inductor	Tiempo de inducción	Glucosa 1 %
CD03 ¹	--	15 °C	IPTG 1 mM	o/n	+
CD03 ¹	pRARE ²	15 °C	IPTG 1 mM	1h y o/n	+
CD03 ¹	pRARE ²	15 °C	IPTG 0,5 mM	o/n	+
CD03 ¹	pRARE ²	15 °C	IPTG 1 mM	2h y o/n	-
CD03 ¹	pRARE ²	25 °C	IPTG 1 mM	2h y o/n	+
CD03 ¹	pGro7 ³	15 °C	IPTG 1 mM, Ara 0.5mg/ml	2h y o/n	+
CD03 ¹	pG-KJE8K ⁴	15 °C	IPTG 1 mM Ara 0.5mg/ml Tc 5ng/ml	o/n	+
CD03 ¹	pG-Tf2 ⁵	15 °C	Tc 5ng/ml	o/n	+
BL21(DE3)	pRARE ²	15 °C	IPTG 1 mM	o/n	+
BL21(DE3)	pRARE ²	25 °C	IPTG 0,5 mM	1h y o/n	+
BL21(DE3)	pRARE ²	30 °C	IPTG 0,5 mM	1h y o/n	+

¹, BL21 (DE3) afectada en la actividad catalasa (Kishishita *et al.*, 2003); ², pRARE (Novagen) codifica tRNAs para codones no frecuentes en *E. coli*; ³, pGro7 (Takara) codifica las chaperonas groES/groEL; ⁴, pG-KJE8 (Takara) codifica las chaperonas dnaK/dnaJ/grpE y groES/groEL; ⁵, pG-Tf2 (Takara) codifica las chaperonas tig y groES/groEL; Ara, L-arabinosa; Tc, tetraciclina.

IV.4.4.1.4. Optimización de la expresión de TsGox2A recombinante.

En las condiciones de inducción estándar (15 °C, 1 mM de IPTG, 1 % de glucosa y o/n como tiempo de inducción) se observó como la mayor parte de TsGox2A se encontraba en la fracción insoluble (fig. IV.49B). Para tratar de incrementar la actividad en la fracción soluble se transformó la cepa CD03 de *E. coli* con el plásmido pETSGOX211 y con el plásmido pETGOXAB11 como control y, junto con estos vectores, se co-indujeron por separado algunos plásmidos auxiliares que pudieran facilitar la expresión de la proteína en la fracción soluble (Hussain *et al.*, 2013). Estos vectores auxiliares fueron el pRARE (Novagen), que codifica tRNAs para codones poco frecuentes en *E. coli*, y los plásmidos pGro7, pG-KJE8 y pG-Tf2 (Takara), que codifican las chaperonas groES/groEL, dnaK/dnaJ/grpE + groES/groEL, y tig + groES/groEL, respectivamente. Tras la preparación de los extractos celulares, las muestras fueron incubadas a 25 °C midiendo actividad GOX a diferentes tiempos para tratar de ver si se produce un aumento de actividad GOX, al igual que sucede en la expresión recombinante de GoxA cuando los extractos celulares se incuban a 25 °C (apartado IV.2.2.2).

De acuerdo a datos previos, en el control con GoxA recombinante se observó un incremento de la actividad con el tiempo de incubación tras la preparación de los extractos celulares (fig. IV.50A). Este efecto se observa también con el uso de plásmidos auxiliares, aunque en el mejor de los casos dichos plásmidos sólo consiguen igualar, con mayores tiempos de incubación, la actividad obtenida con el plásmido pETGOXAB11. Por tanto, el uso de pETGOXAB11 en solitario es suficiente para obtener los niveles máximos de actividad GOX recombinante. Por el contrario, en la expresión de la proteína recombinante TsGox2A, el uso del plásmido auxiliar pGro7, que codifica las chaperonas groEL y groES, mejora notablemente la actividad obtenida, ya de por sí alta, con un máximo tras 6,5 horas de incubación después de la sonicación (fig. IV.50B).

Cabe destacar que, para todas las condiciones, se obtienen valores de actividad más altos en la expresión de TsGox2A que en la de GoxA, siendo el valor máximo de actividad obtenido para TsGox2A casi unas 20 veces el máximo obtenido para GoxA (fig. IV.50).

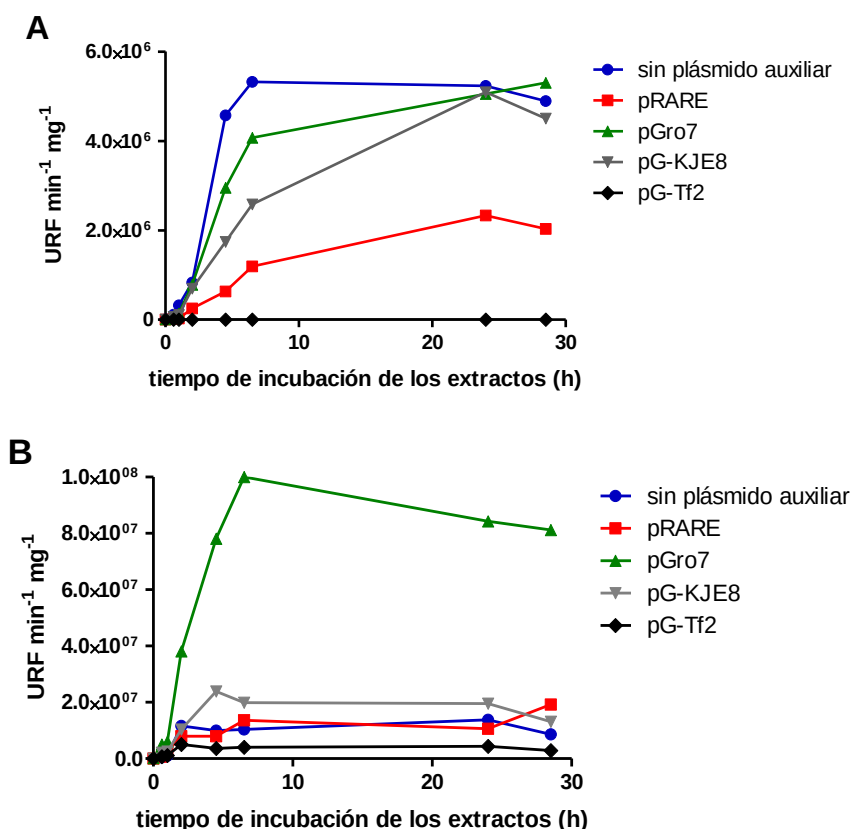


Figura IV.50. Actividad GOX medida a diferentes tiempos, tras la preparación de los extractos celulares, en la expresión recombinante de *E. coli* CD03 transformada con los plásmidos pETGOXAB11 (A) y pETTSGOX211 (B). Junto a ellos se co-indujeron por separado los plásmidos auxiliares que se indican.

Por otra parte, para cada condición se realizaron geles SDS-PAGE con el fin de ver posibles diferencias en la expresión de proteínas (fig. IV.51). En todos los casos se cargaron $30 \mu\text{g}$ de proteína a partir de la fracción soluble de las diferentes muestras. Como control se utilizó el pET11 sin inserto.

Si comparamos el patrón de expresión de bandas de las distintas condiciones ensayadas observamos que, en la condición en donde TsGox2A muestra la actividad más alta (co-transformación con pGro7) (fig. IV.51C), se puede apreciar una mayor intensidad de las bandas de TsGox2A y TsGox2B que en los cultivos sin los plásmidos auxiliares que codifican chaperonas (fig. IV.51A y B). Sin embargo, no hay diferencias significativas con los cultivos co-inducidos con los otros plásmidos auxiliares (fig. IV.51D y E). Tampoco se observa ninguna banda de alto peso molecular que pudiera

corresponder a la forma multimérica activa como ocurre con LodA. Por tanto, las diferencias en las actividades entre los distintos cultivos puede deberse a causas no reconocibles por SDS-PAGE, como puede ser la modificación post-traducciona.

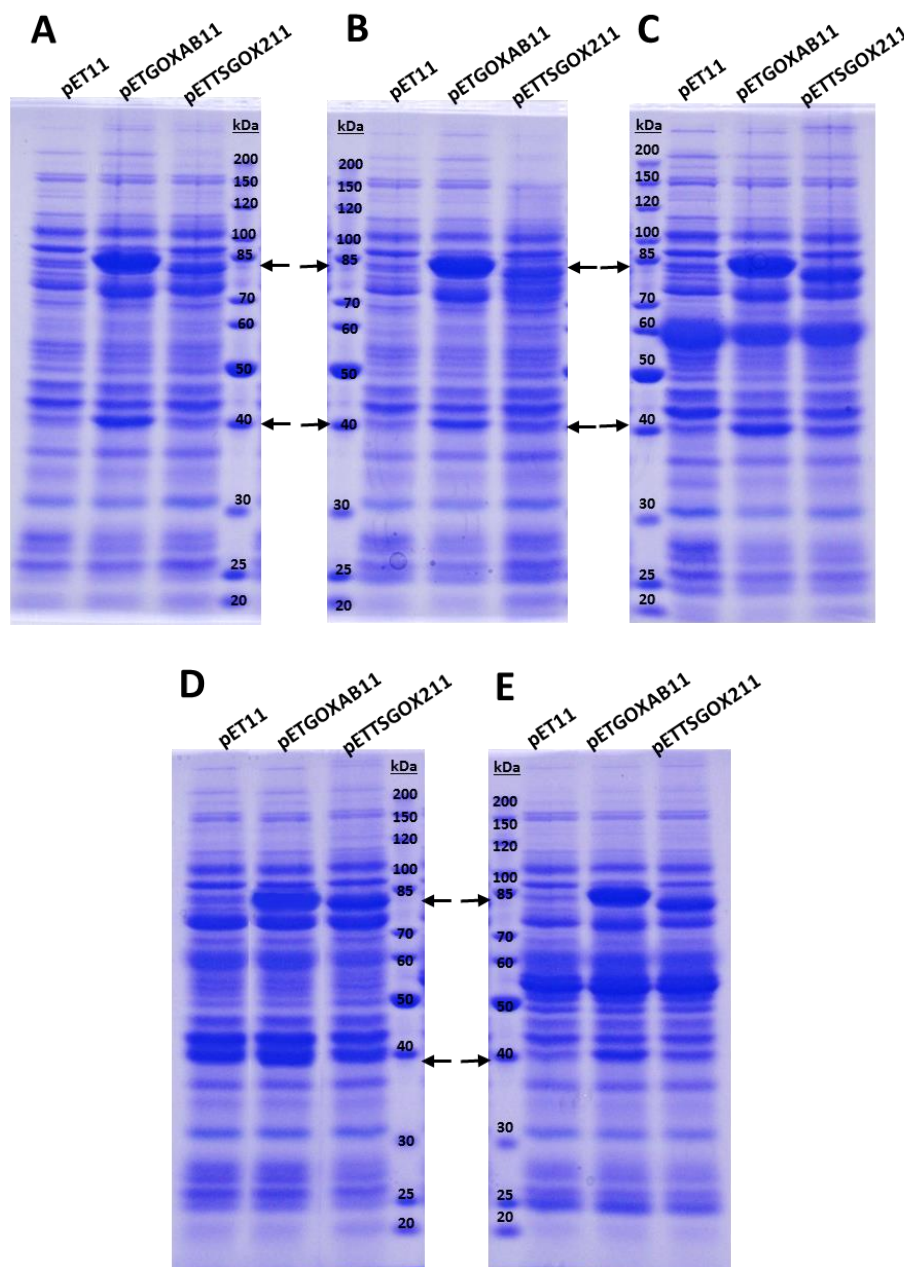


Figura IV.51. SDS-PAGE en condiciones no desnaturizantes de los extractos de *E. coli* CD03 transformada con los plásmidos pETGOXAB11, pETTSGOX211, y pET11 como control. **A**, sin plásmido auxiliar. **B**, co-transformación con plásmido auxiliar pRARE, que codifica tRNAs para codones raros. **C**, co-transformación con plásmido auxiliar pGro7 que codifica las chaperonas gro-ES (10kDa) / groEL (60 kDa). **D**, co-transformación con plásmido pG-KJE8 que codifica las chaperonas gro-ES/groEL/dnaK (70 kDa) y dnaJ (40 kDa) / grpE (22 kDa). **E**, co-transformación con plásmido auxiliar pG-Tf2 que codifica las chaperonas tig (56 kDa) y gro-ES/groEL. Las flechas indican el tamaño aproximado de GoxA y GoxB.

IV.4.4.1.5. Caracterización de la glicina oxidasa recombinante de *Thalassobaculum salexigens*, TsGox2A.

Como hemos expuesto en el apartado IV.1.2, la glicina oxidasa de *M. mediterranea* posee algunas características que la diferencian de otras glicinas oxidasas descritas (Job *et al.*, 2002a; Nishiya e Imanaka, 1998), como son su especificidad de sustrato y la naturaleza de su cofactor. TsGox2A guarda un 60,9 % de identidad y un 74,8 % de similitud con GoxA y, por lo tanto, el objetivo de este apartado ha sido comparar la actividad glicina oxidasa detectada en *T. salexigens* con la actividad GOX de *M. mediterranea*.

IV.4.4.1.5.1. Especificidad de sustrato y Km para TsGox2A recombinante.

Con el fin de calcular la Km para TsGox2A, se midió la actividad GOX sobre un rango de 20 μ M a 20 mM de Gly (fig. IV.52). Se obtuvo un valor de Km de 0,86 mM, valor muy similar al obtenido para la GoxA de *M. mediterranea* expresada recombinantemente (0,77 mM, apartado IV.2.5).

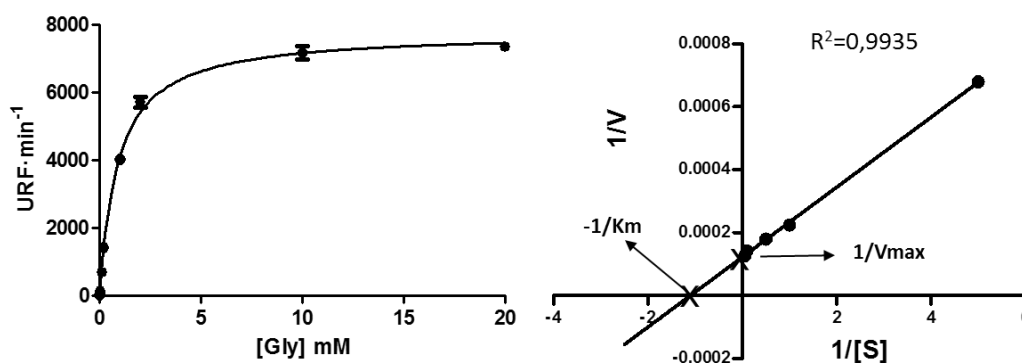


Figura IV.52. A, actividad enzimática de TsGox2A recombinante en función de la concentración de sustrato. B, representación doble recíproca de Lineweaver-Burk para el cálculo de los parámetros cinéticos. V, velocidad de la reacción medida como URF/min. S, concentración de glicina (mM).

Por otra parte, se midió en el ensayo fluorimétrico de detección de peróxido de hidrógeno, la actividad sobre todos los aminoácidos proteicos, así como sobre otros sustratos estructuralmente parecidos a la Gly (apéndice A.2). Los resultados indican que la glicina oxidasa de *T. salexigens* posee un rango de sustratos muy similar a GoxA

de *M. mediterranea*, aunque posee incluso una mayor especificidad que esta, ya que apenas oxida otros sustratos como la glicina-etil-éster (tabla IV.9).

Tabla IV.9. Comparación de la Vmax relativa de distintas glicinas oxidasas expresadas recombinantemente en *E. coli* frente a diferentes sustratos. La actividad se expresa como % de actividad relativa frente al mejor sustrato para cada enzima.

<u>Glicina oxidasas:</u>	Gly	Sarcosina	Gly-etil-éster	N-Etil-Gly	D-HPG	D-Ala	D-Pro	D-Glu	D-Lys
¹ <i>M. mediterranea</i>	100	0.4	44.4	0.7	0.2	0.3	0.5	0.3	0.6
¹ <i>T. salexigens</i>	100	0.1	19.9	0.3	0.4	0.3	0.4	0.2	0.2
² <i>B. subtilis</i>	77.4	100	NE	85.3	NE	7.4	15.1	ND	ND
³ <i>G. kaustophilus</i>	69	36	22.3	22.9	NE	28	100	NE	NE

¹, actividad de las proteínas GoxA de *M. mediterranea* y TsGox2A de *T. salexigens* frente a diferentes sustratos a una concentración de 20 mM; ², datos de (Nishiya e Imanaka, 1998); ³, datos de (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b); NE, no ensayado; ND, no detectado; D-HPG, D-p-hidroxifenilglicina.

IV.4.4.1.5.2. Sensibilidad de TsGox2A a inhibidores de quinoproteínas.

Como se vio en el apartado IV.1.2.3 y IV.2.4, la glicina oxidasa de *M. mediterranea* posee un cofactor quinónico y no flavínico como en el resto de glicina oxidasas descritas hasta la fecha. Para determinar la naturaleza del cofactor de TsGox2A, se realizó un ensayo con inhibidores de quinoproteínas tal y como se expone en el apartado IV.1.2.3. En el ensayo se midió la inhibición de la semicarbazida 1 mM, hidroxilamina 100 μ M, β -aminopropionitrilo 50 μ M y fenilhidrazina 100 μ M sobre TsGox2A, sobre la quinoproteína GoxA de *M. mediterranea* y sobre la flavoproteína lisina- α -oxidasa de *Trichoderma viride*, las dos últimas como controles positivo y negativo respectivamente. A diferencia de los otros inhibidores, la fenilhidrazina requirió una diálisis posterior a la incubación con la enzima, ya que la peroxidasa utilizada en el ensayo del Amplex Red se inhibe en presencia de este compuesto.

Los resultados indican que TsGox2A, al igual que GoxA, es sensible a los inhibidores de quinoproteínas de una forma tiempo-dependiente (fig. IV.53). Sin embargo, TsGox2A es más sensible que GoxA para la semicarbazida, hidroxilamina, y fenilhidrazina, pero

menos sensible para el β -aminopropionitrilo. Estas diferencias podrían deberse a diferencias en las conformaciones tridimensionales de las proteínas activas.

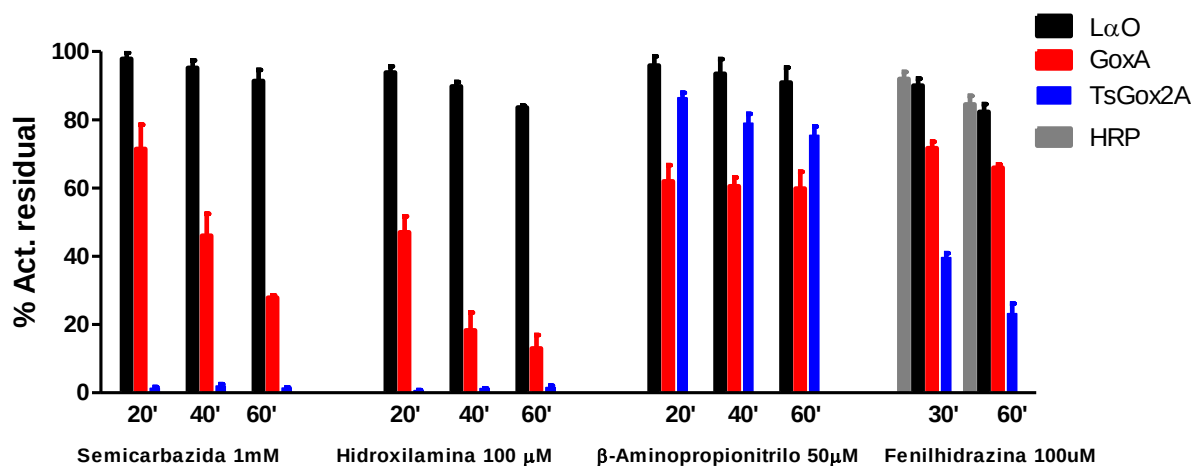


Figura IV.53. Sensibilidad de la glicina oxidasa de *T. salexigens* (TsGox2A) frente a inhibidores típicos de quinoproteínas a diferentes tiempos de incubación. Como controles se empleó la lisina- α -oxidasa de *Trichoderma viride* (L α O) que es una flavoproteína y la quinoproteína glicina oxidasa de *M. mediterranea* (GoxA). El efecto de la fenilhidrazina remanente tras la diálisis sobre la peroxidasa de rábano (HRP) fue determinado usando H₂O₂ 10 μ M como sustrato en ese ensayo.

IV.4.4.1.5.3. Análisis de secuencia de TsGox2A.

El alineamiento de las secuencias de GoxA y TsGox2A muestra que los residuos de Cys-551 y Trp-566 que forman el cofactor CTQ en GoxA (apartado IV.1.5.2) (Chacón-Verdú *et al.*, 2015) alinean claramente con la Cys-551 y el Trp-566 de TsGox2A, sugiriendo que éstos sean los residuos implicados en la generación del cofactor CTQ en TsGox2A (fig. IV.54A). Además, estos residuos quedan muy próximos en el modelo tridimensional propuesto para TsGox2A elaborado en el programa “SWISS-MODEL” (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Arnold *et al.*, 2006) (fig. IV.54 B y C). Cabe destacar que el Asp-547 que interviene de forma esencial en la generación del cofactor en Loda y GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015), también se encuentra conservado en TsGox2A (fig. IV.54A).

Por tanto, el ensayo con inhibidores de quinoproteínas, el análisis de la secuencia peptídica de TsGox2A en comparación con la de GoxA y el estudio de su modelo

tridimensional apoyan la hipótesis de que TsGox2A sea una quinoproteína con cofactor CTQ.

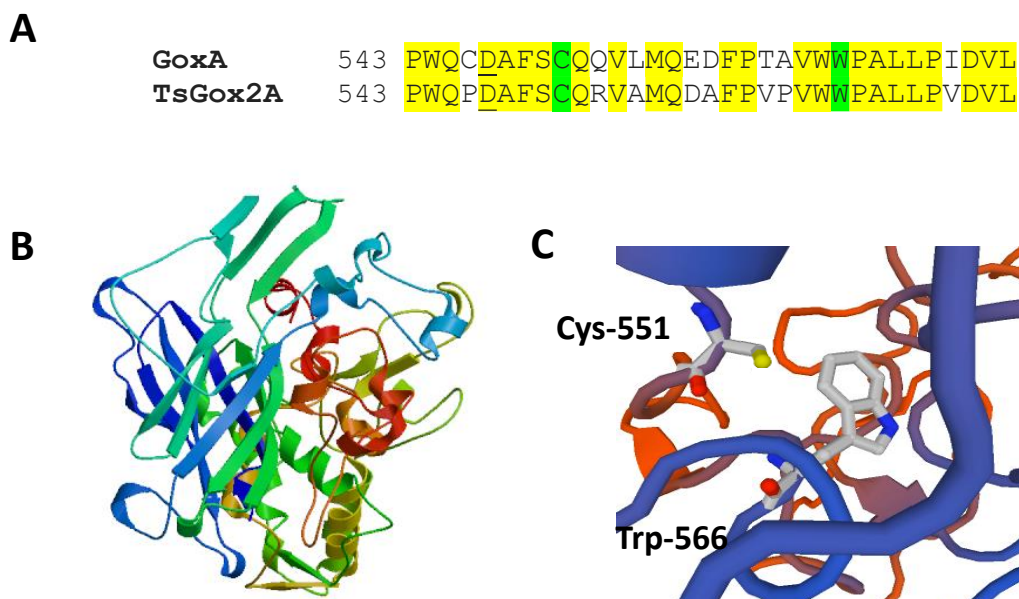


Figura IV.54. **A**, alineamiento de secuencia alrededor de los residuos implicados en la generación del cofactor CTQ en GoxA y TsGox2A. En amarillo se destacan los residuos conservados en ambas proteínas, y en verde, los residuos que forman el cofactor. Los residuos de aspártico esenciales en la generación del cofactor están subrayados. **B**, modelo tridimensional de TsGox2A construido en el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) teniendo en cuenta la secuencia peptídica de TsGox2A y la estructura de LodA (PDB ID 2YMW). **C**, figura mostrando la proximidad de la Cys-551 y el Trp-566, residuos que estarían implicados en la generación del cofactor CTQ en TsGox2A.

En conclusión, los resultados obtenidos en el apartado IV.4.4.1.5 muestran claramente que, las actividades glicina oxidasa descritas para las proteínas GoxA de *M. mediterranea* y TsGox2A de *T. salexigens* guardan una gran similitud y comparten algunas características como la especificidad de sustrato y la naturaleza del cofactor que, por el contrario, las diferencian claramente del resto de glicina oxidasas.

IV.4.4.2. Análisis de actividad aminoácido oxidasa en otros microorganismos.

Además de las proteínas codificadas por *N. denitrificans* y *T. salexigens*, que pertenecen al grupo II de la familia LodA y que poseen actividad glicina oxidasa, se intentó detectar actividad AO en microorganismos que contienen genes que codifican

proteínas similares a LodA pertenecientes a otros grupos filogenéticos (tabla IV.10). Entre estos microorganismos se incluye la cepa LGD de *M. mediterranea*, que tras la delección del operón *lod* y *gox* sigue conteniendo un gen que codifica una proteína similar a LodA perteneciente al subgrupo IIIB; la cepa MWYL1 de *Marinomonas* sp. que contiene un gen que codifica una proteína de la familia LodA en el subgrupo IA; *Marinomonas* sp. MED121 y *Caulobacter crescentus* CB15 parecen expresar unas proteínas similares a LodA en el subgrupo IB; por último, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12471 y *Saccharophagus degradans* 2-40 codifican unas proteínas similares a LodA pertenecientes, respectivamente, al grupo 1C y 1D. Cabe destacar que en *Chromobacterium violaceum* ATCC 12471 y *Caulobacter crescentus* CB15 se ha descrito la generación de peróxido de hidrógeno pero todavía no ha sido asociada a ninguna actividad LAO en particular (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

Para todos los microorganismos se ensayó la actividad frente a todos los aa proteicos, tanto en los sobrenadantes como en los extractos precipitados con EtOH, de muestras en fase estacionaria de crecimiento (48 h aprox.) de los microorganismos cultivados en medios complejos. Las cepas del género *Marinomonas*, así como *N. denitrificans*, *T. salexigens* y *P. luteoviolacea* fueron cultivadas en medio marino 2216. *C. crescentus* fue cultivada en el medio PYE, *C. violaceum* en medio LB y *S. degradans* en medio 2216+Agar y 2216+Almidón.

En la tabla IV.10 podemos observar un resumen de las actividades detectadas. Hay que destacar que la cepa MWYL1 de *Marinomonas* sp., que sintetiza una proteína similar a LodA muy próxima a la lisina oxidasa de *M. mediterranea* en el subgrupo IA, posee actividad lisina oxidasa. En este caso, parece lógico pensar que la actividad detectada pueda deberse a dicha proteína. Por otra parte, no se ha detectado actividad en ningún otro de los microorganismos ensayados. Una posible explicación es que en las condiciones ensayadas no se hayan expresado estas proteínas, o bien que no hayamos encontrado el sustrato de las posibles actividades.

Tabla IV.10. Actividad aminoácido oxidasa presente en diversos microorganismos que contienen proteínas similares a LodA en diferentes grupos filogenéticos. Todos los sustratos fueron ensayados tanto en los sobrenadantes como en los extractos a una concentración de 20 mM o, en el caso de los casaminoácidos, a una concentración del 2 %.

Microorganismo	Grupo filogenético de similares a LodA	Sustratos ensayados				
		Lys	Gly	Casa	Resto de aa proteicos	Otros
<i>M. mediterranea</i> MMB-1R	IA, IIB, IIIB	+	+	+	-	*+ Gly-etil-éster
<i>M. mediterranea</i> LGD	IIIB	-	-	-	-	*-
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	IA	+	-	NE	NE	NE
<i>Marinomonas</i> sp. MED121	IB	-	-	NE	-	*-
<i>Nisaea denitrificans</i> DSM 18348	IIB	-	+	+	-	-
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	IIB, IIB	-	+	+	-	-
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	IB	-	-	NE	-	*-
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12471	IC	-	-	NE	-	*-
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	ID	-	-	-	-	NE

Casa, casaminoácidos; NE, no ensayado; Otros, hace referencia a los siguientes compuestos: D-ala, D-pro, D-glu, D-p-hidroxifenilglicina, N-etil-glicina, sarcosina y glicina-etil-éster; *, de forma adicional se ensayaron los compuestos ornitina, citrulina, β -ala, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, cadaverina, putrescina, y los ácidos diaminopimélico, 6-amino-caproico, L-amino-adípico y 5-amino-valérico. Además, los compuestos glifosato, aminoacetona y β -glutámico se ensayaron frente a muestras de MMB-1R.

En general, los resultados del apartado IV.4 apoyan la idea de que las proteínas similares a LodA pueden constituir un grupo de enzimas con diferentes actividades oxidasa.

V. Discusión

Dentro del grupo de enzimas capaces de oxidar aminoácidos, el más estudiado clásicamente ha sido el de las L-aminoácido oxidasas (LAOs o LAAOs; EC 1.4.3.2). Estas son flavoproteínas que oxidan L-aminoácidos en posición alfa y producen el cetoácido correspondiente, amonio y peróxido de hidrógeno (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013). El peróxido de hidrógeno generado les proporciona a estas enzimas cierta capacidad antimicrobiana (Kasai *et al.*, 2015b) y facilita su detección a través de diversas técnicas (Yu *et al.*, 2014a). Las LAOs están ampliamente distribuidas a lo largo de la escala evolutiva, detectándose en bacterias, hongos, algas, insectos, moluscos, peces, serpientes y mamíferos (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013; Singh, 2014; Yu y Qiao, 2012). De entre todas ellas, las LAOs mejor estudiadas son las que forman parte del veneno de serpientes (Guo *et al.*, 2012), a las que se les atribuyen propiedades antiprotozoarias, bactericidas, antivirales y proapoptóticas (Izidoro *et al.*, 2014; Zuliani *et al.*, 2009). Adicionalmente, la LAO producida por el hongo *Trichoderma* posee actividad antitumoral in vitro (Lukasheva y Berezov, 2002). El estudio de las LAOs no solo tiene interés por su relación con el campo de la biomedicina, sino también por su interés biotecnológico, ya que las LAOs pueden ser aplicadas en el desarrollo de biosensores, en la producción de precursores de antibióticos β -lactámicos, en biotransformaciones, etc. (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013).

La búsqueda y caracterización de nuevas aminoácido oxidasas (AOs) tiene una gran importancia a nivel biotecnológico, pero también desde el punto de vista de la investigación básica, por ejemplo describiendo nuevas relaciones estructura-función y nuevos mecanismos de actuación enzimática. En este sentido, el estudio de la enzima LodA sintetizada por *Marinomonas mediterranea*, llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, ha supuesto la descripción de la primera AO que oxida un aminoácido, en concreto la L-lisina, en posición épsilon y no en alfa como hacen las LAOs o las D-aminoácido oxidasas (DAOs o DAAOs; EC 1.4.3.3). Esta actividad catalizada por LodA no había sido descrito con anterioridad, por lo que recibió un nuevo número por la comisión de enzimas (EC 1.4.3.20) (Lucas-Elío *et al.*, 2006). Además LodA no es una flavoproteína, sino que presenta un cofactor quinónico generado por modificación post-traducciona de ciertos residuos en la misma proteína (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). En comparación con las LAOs, la presencia de un cofactor

quinónico en LodA supone una ventaja en relación a sus aplicaciones biotecnológicas, ya que no sería necesaria la adición de un cofactor externo. Además, otras ventajas son la estabilidad de LodA frente a diversas condiciones ambientales (Lucas-Elío *et al.*, 2005) y su alta especificidad frente a L-lisina (Gómez *et al.*, 2006). De hecho, en virtud a dichas capacidades, se ha propuesto la utilización de LodA como biosensor para detectar L-lisina en plasma (Matsuda y Asano, 2010).

Genes que codifican proteínas similares a LodA se detectan en diversos genomas de microorganismos, donde están generalmente anotados como proteínas hipotéticas. De hecho, en el genoma de *M. mediterranea* se detectan dos de estos genes (Lucas-Elío *et al.*, 2012b). La ausencia de actividad lisina oxidasa en la cepa LD, mutante con delección del operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010), sugiere que dichos genes podrían codificar otro tipo de enzimas.

Con estos antecedentes, se ha llevado a cabo en este trabajo una búsqueda de nuevas aminoácido oxidasas, tanto en la bacteria objeto de estudio de nuestro grupo de investigación *M. mediterranea*, como en otros microorganismos. En concreto, se ha descrito en *M. mediterranea* una novedosa proteína con similitud a LodA que posee actividad glicina oxidasa, se ha determinado el operón que la codifica y estudiado su regulación. Adicionalmente, se ha identificado y caracterizado una proteína similar en *Thalassobaculum salexigens* que también posee actividad glicina oxidasa. Por último, se han detectado y analizado filogenéticamente numerosas proteínas similares a LodA/GoxA presentes en diversos microorganismos, que parecen codificar una nueva familia de quinoproteínas con actividad aminoácido oxidasa.

V.1. Identificación y caracterización de nuevas quinoproteínas con actividad glicina oxidasa.

En una primera parte de este trabajo, se estudió la posible actividad enzimática de las proteínas similares a LodA codificadas en el genoma de *M. mediterranea*. Se ha demostrado que el gen Marme_1655 codifica una enzima con actividad glicina oxidasa (GOX) que se detecta en los sobrenadantes de *M. mediterranea* (apartado IV.1). Posteriormente, se observó que *T. salexigens* sintetiza una proteína similar en secuencia y que presenta el mismo tipo de actividad enzimática (apartado IV.4.4.1.2). *Marinomonas* y *Thalassobaculum* son microorganismos alejados filogenéticamente. La primera es una gammaproteobacteria y la segunda una alfarproteobacteria, lo que sugiere que puedan existir mecanismos de transferencia horizontal de este tipo de genes. En ambos casos se trata de quinoproteínas, lo que las diferencia de las glicinas oxidasas descritas previamente que son flavoproteínas (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b; Nishiya e Imanaka, 1998).

En este estudio, los análisis genómicos han sido importantes en la identificación de los genes que codifican estas enzimas. En el caso de *M. mediterranea*, se corrieron muestras de sobrenadante en SDS-PAGE y se detectó el trozo del gel con actividad GOX. Los fragmentos peptídicos tras digestión trípica de este trozo del gel se analizaron por HPLC-MS/MS en comparación con la secuencia genómica. Estos estudios han revelado que la glicina oxidasa está codificada por Marme_1655, uno de los dos genes similares a *lodA* en *M. mediterranea* (apartado IV.1.3). A lo largo de esta memoria, la proteína con actividad GOX sintetizada por *M. mediterranea* ha sido denominada GoxA. Partiendo de la información disponible en *M. mediterranea*, se localizaron genes similares en los genomas de otras bacterias y se intentó detectar actividad glicina oxidasa. En el caso de *Thalassobaculum salexigens* DSM 19539 se ha observado dicha actividad y se puede asociar a uno de los dos genes similares a *goxA* detectados en este microorganismo (apartado IV.4.4.1). En este caso la enzima ha sido denominada TsGox2A.

V.1.1. Comparación de GoxA y TsGox2A con las flavoproteínas con actividad glicina oxidasa.

La actividad glicina oxidasa (EC 1.4.3.19) fue descrita por primera vez en *Bacillus subtilis* y supone la desaminación oxidativa de la glicina para dar glioxilato, amonio y peróxido de hidrógeno (Nishiya e Imanaka, 1998). La proteína que cataliza dicha reacción, denominada glicina oxidasa (Gox) (número de acceso BSU11670), está codificada por el gen *yjbR* (*thiO*). Se trata de una flavoproteína que es capaz de oxidar, además de glicina, otras aminas de bajo peso molecular como la sarcosina, N-etil-glicina y glicina-etil-éster, así como algunos D-aminoácidos (D-Ala y D-Pro principalmente) (Job *et al.*, 2002a). En *Geobacillus kaustophilus* se ha descrito una proteína con actividad glicina oxidasa (GoxK, número de acceso BAD74908) muy similar a Gox de *B. subtilis* en cuanto a su rango de sustratos y estructura (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). Recientemente, otras proteínas similares se han descrito en *Pseudomonas putida* (Equar *et al.*, 2015) y en otras especies del género *Bacillus* como *B. cereus* (Zhan *et al.*, 2013) y *B. licheniformis* (Zhang *et al.*, 2016).

Hay que tener en cuenta que estas glicina oxidasas comparten cierta similitud con otras flavoproteínas como las D-aminoácido oxidasas (DAO o DAAO, EC 1.4.3.3) y las sarcosina oxidasas (SOX, EC 1.5.3.1), en cuanto a su rango de sustratos y a su estructura primaria y cuaternaria (Job *et al.*, 2002b; Mortl *et al.*, 2004). De hecho, Gox, DAOs y SOXs pueden incluirse dentro de una misma familia desde el punto de vista estructural (Fitzpatrick, 2010). Estas observaciones, y el hecho de que la glicina carezca de estereoisomería, han suscitado cierta controversia en la bibliografía con respecto a la inclusión o no de las Gox dentro de la familia de las LAOs (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en esta memoria han puesto de manifiesto importantes diferencias, en términos de secuencia, naturaleza del cofactor y especificidad de sustrato, entre las glicina oxidasas con cofactor quinónico y las que son flavoproteínas.

En términos de secuencia, GoxA (número de acceso ADZ90918) posee una secuencia peptídica de 680 aa y una masa molecular de ~ 76 kDa, y TsGox2A (número de acceso WP_028795812), tiene unos 677 aa y una MM de ~ 75 kDa. Estos valores son muy similares entre estas dos proteínas y a su vez muy superiores a los de la Gox de *B. subtilis*, con 369 aa y una MM de ~ 42 kDa, y de *G. kaustophilus*, con 377 aa y una MM de ~ 43 kDa.

Las diferencias más evidentes están relacionadas con los residuos que participan en la unión del cofactor. Las Gox descritas hasta ahora son flavoproteínas, pues presentan en su extremo N-terminal la secuencia conservada GXGXXG típica del motivo de Rossmann de unión a FAD (Rossmann *et al.*, 1974). Sin embargo, en la secuencia peptídica de GoxA y TsGox2A no está presente esta secuencia, ni otras típicas de proteínas que unen FAD, indicando que no son flavoproteínas. Por otra parte, el alineamiento de secuencia entre GoxA y LodA ha permitido detectar en la secuencia peptídica de GoxA los motivos y residuos conservados propuestos para LodA y proteínas similares (Lucas-Elío *et al.*, 2006) (fig. IV.9). Concretamente, el alineamiento muestra que la Cys-516 y Trp-581 que forman parte de cofactor cisteína triptofilquinona (CTQ) en LodA, están conservados en GoxA (Cys-551 y Trp-566), sugiriendo que el cofactor quinónico de GoxA es de tipo CTQ (fig. IV.10A). Adicionalmente, el resultado obtenido tras el análisis por espectrometría de masas de GoxA recombinante confirma la formación del cofactor CTQ generado por modificaciones en la Cys-551 y el Trp-566 de la secuencia peptídica de GoxA (tabla IV.2). Por otra parte, el Asp-512 que interviene de forma esencial en las primeras etapas de generación de CTQ en LodA, está también conservado en GoxA y corresponde al Asp-547 (fig. IV.10A), por lo que podría intervenir del mismo modo en la generación del cofactor CTQ en GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Estos mismos residuos están también conservados en el caso de TsGox2A (apartado IV.4.4.1.5.3), indicando la importancia de los mismos en la generación de estas quinoproteínas. El cofactor CTQ se había descrito en la quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QHNDH) de *Paracoccus denitrificans* (Datta *et al.*, 2001) y de *Pseudomonas putida* (Vandenberghe *et al.*, 2001). LodA fue la primera enzima no deshidrogenasa en la que

se demostró la presencia de este tipo de cofactor (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo indican por primera vez que CTQ también está presente en otras oxidasas como GoxA y TsGox2A.

Además, el ensayo con inhibidores típicos de quinoproteínas ha revelado que es posible diferenciar las glicina oxidasas que tienen cofactor quinónico de las que son flavoproteínas. Al igual que la quinoproteína LodA y aunque de distinta intensidad, dependiendo de la enzima considerada y del método de preparación de la muestra, las glicina oxidasas que presentan cofactor quinónico han mostrado una inhibición tiempo-dependiente en presencia de semicarbazida, hidroxilamina, β -aminopropionitrilo y fenilhidrazina, confirmando que se trata de proteínas con cofactor quinónico (fig. IV.53).

Por otra parte, el análisis de secuencia de las Gox con cofactor quinónico ha permitido detectar en su extremo N-terminal una región con homología al motivo TAT (Twin Arginine Translocation) de secreción al espacio periplásmico (Lee *et al.*, 2006). Este motivo no está presente en las flavoproteínas con actividad GOX, las cuales, según las herramientas bioinformáticas empleadas (apartado III.20.2), estarían localizadas en el interior celular. La presencia de genes en *M. mediterranea* y en *T. salexigens* con homología a los que codifican las proteínas que forman parte del complejo translocasa del sistema TAT (apartado IV.1.5.1 y IV.4.4.1.1) hacen plausible la idea de que GoxA y TsGox2A sean transportadas al espacio periplásmico por este sistema. Dicho sistema se caracteriza, a diferencia de otros como el sistema de secreción "Sec", por translocar al espacio periplásmico proteínas totalmente plegadas que, en el caso de que lo requieran, ya han adquirido su cofactor y conformación oligomérica (Frobel *et al.*, 2012).

Diversas proteínas que intervienen en la respiración anaeróbica, en la remodelación de la envoltura celular, así como algunos factores de virulencia son transportadas por el sistema TAT (Frobel *et al.*, 2012). Un ejemplo de translocación al periplasma sería el caso de las subunidades α y β que, junto a la subunidad γ que contiene el cofactor CTQ, forman parte de la quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QHNDH). Tanto α

como β poseen péptido señal de translocación al espacio periplásmico y son transportadas utilizando el sistema TAT o bien el translocón Sec (Nakai *et al.*, 2014). A diferencia de éstas, la quinoproteína LodA es transportada al exterior celular por algún sistema de secreción no clásico aún desconocido (Gómez *et al.*, 2010). En la región C-terminal de la secuencia peptídica de LodA se puede identificar una secuencia señal, rica en aminoácidos con carga positiva, que ha sido descrita en *Agrobacterium tumefaciens* (Vergunst *et al.*, 2005). Sin embargo, no se han obtenido evidencias de que este motivo en el extremo C-terminal participe en la secreción de LodA, sino más bien, en la generación de su forma activa (Chacón-Verdú, 2015).

Otra diferencia entre las glicina oxidasas con cofactor quinónico y flavínico es el rango de sustratos. GoxA y TsGox2A son más específicas de glicina, no pudiendo oxidar ningún otro aminoácido proteínogénico (fig. IV.2D), ni otros compuestos parecidos a glicina como sarcosina, N-etil-glicina o ciertos D-aminoácidos que son sustratos para las flavoproteínas (apéndice A.2). En términos de V_{max} , la Gly es el mejor sustrato de las quinoproteínas, mientras que la sarcosina y la D-Pro lo son para la Gox de *B. subtilis* y de *G. kaustophilus*, respectivamente (tabla IV.1) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b). En la bibliografía se han descrito varias LAOs que presentan especificidad de sustrato, propiedad que convierte a estas enzimas en potenciales biosensores específicos del aminoácido que oxidan. Por ejemplo, este es el caso de la L-glutamato oxidasa sintetizada por *Streptomyces* sp. X-119-6 (Ryan *et al.*, 1997) y de la L-lisina α -oxidasa de *Trichoderma viride* (Chauhan *et al.*, 2013). Por consiguiente, la especificidad de GoxA y TsGox2A sugiere el empleo de estas enzimas como posibles biosensores de Gly.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que tanto GoxA, la glicina oxidasa detectada en *M. mediterranea*, como TsGox2A de *T. salexigens* son quinoproteínas con similitud estructural a LodA, específicas de Gly, que presenta notables diferencias con las flavoproteínas descritas que oxidan glicina (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b; Nishiya e Imanaka, 1998).

V.1.2. Análisis de GoxB.

La inmensa mayoría de proteínas similares a LodA están codificadas en operones en los que también se codifica una flavoproteína (apartado IV.4.1). El análisis de la región adyacente a Marme_1655 y los resultados obtenidos por RT-PCR (fig. IV.7) muestran que el operón *gox* está formado, al igual que el operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010), por sólo dos genes: *goxA*, que codifica la oxidasa (Marme_1655) y *goxB*, que codifica una flavoproteína hipotética (Marme_1654). Además, se ha podido establecer el posible inicio de la transcripción a través de la técnica 5'-RACE y se han identificado las regiones -10 y -35 similares a las del factor de transcripción sigma 70 (fig. IV.8).

GoxB (número de acceso ADZ90917) presenta un 26 % de identidad y un 42,8 % de similitud con LodB, flavoproteína codificada por el gen *lodB* que está presente en el operón *lod* (Gómez *et al.*, 2010). Además, la estructura secundaria de GoxB es muy similar a la que presenta LodB (Chacón-Verdú, 2015) (fig. IV.11). En la región N-terminal de GoxB podemos identificar la secuencia VAIVGGGLAGAAVIALKQSGFSIVWIRPKME, similar al motivo de unión a dinucleótidos (DBM, "Dinucleotide Binding Motif") (Vallon, 2000). En esta región también se observa una estructura $\beta 1\alpha 1\beta 2$ en la que la disposición de las glicinas coincide con la disposición característica del motivo de Rossmann (Bottoms *et al.*, 2002), siendo éste un motivo típico de proteínas que unen FAD como cofactor (Dym y Eisenberg, 2001). Esta secuencia es característica de la familia estructural glutatión reductasa (GR) que puede dividirse en dos grupos. En concreto, GoxB parece pertenecer al grupo GR2, ya que no presenta ningún otro motivo adicional GxGxxG de unión a NAD(P). Entre las enzimas incluidas en el grupo GR2 están las DAOs, fenolhidroxilasas, p-hidroxibenzoato-hidroxilasas, glucosa oxidasas y LodB (Chacón-Verdú, 2015; Dym y Eisenberg, 2001). Para algunas enzimas de este grupo, aunque no presentan otro motivo adicional de unión a NAD(P), se ha demostrado que sí unen este cofactor (Eppink *et al.*, 1997). Por otro lado, a diferencia de LodB, en GoxB no se ha identificado el motivo GD de unión al cofactor, ni otros motivos característicos de flavoproteínas (Dym y Eisenberg, 2001; Vallon, 2000).

Los resultados de este trabajo muestran que GoxB se co-purifica junto con GoxA (tabla IV.2), lo que indica que GoxA y GoxB forman un complejo, posiblemente relacionado con la generación de GoxA activa. Este hecho justifica por si mismo la codificación de ambas proteínas en un mismo operón (apartado IV.1.4) (Sneppen *et al.*, 2010). Además, estudios paralelos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han revelado que la presencia de GoxB es necesaria para la correcta expresión de GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015), de forma similar a lo que ocurre en el sistema LodA/LodB (Chacón-Verdú *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2010). En este sistema, para generar el cofactor CTQ primero se produce una hidroxilación del Trp-581, en un proceso autocatalítico independiente de LodB, generando PreLodA (Chacón-Verdú, 2015). PreLodA es el sustrato de LodB para generar el cofactor, de forma semejante a lo que ocurre en la generación del cofactor triptófano triptofilquinona (TTQ) de MADH, en el que interviene MauG (Jensen *et al.*, 2010). La oxidación de preMADH tiene lugar mediante un proceso de “electron hopping” en el que participan varios residuos de Trp que están en la superficie de la proteína, mientras que el residuo 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; Tarboush *et al.*, 2011). Este proceso puede que tenga lugar también en la formación del cofactor de GoxA, puesto que en su secuencia se pueden observar una serie de residuos de triptófano (Trp-123, Trp-243 Trp-270 Trp-327, Trp-420 y Trp-544) que también están conservados en LodA (Trp85, Trp217, Trp243, Trp311, Trp416 y Trp509) y para los que se ha propuesto que intervienen en el proceso de “electron hopping” (Chacón-Verdú, 2015).

En cuanto el papel de GoxB en la formación de GoxA activa, cabe destacar que en ausencia de GoxB es posible identificar con un incremento de +16 a PreGoxA, intermediario en el que se ha producido una monohidroxilación del Trp-566 mediante algún mecanismo que se desconoce. Este intermediario sería modificado por GoxB para generar la forma activa de GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Por otro lado, según lo expuesto en el apartado IV.1.5.3, GoxB es una proteína intracelular, por lo que intervendría en la generación de GoxA activa dentro del interior celular. Este hecho concuerda con que, antes de abandonar el citoplasma, GoxA debe contener el cofactor

y estar completamente plegada como el resto de proteínas que son transportadas por el sistema TAT rumbo al espacio periplásmico (Frobel *et al.*, 2012).

En definitiva, todos los datos apuntan a que GoxB podría actuar de forma similar a LodB sobre el intermediario monohidroxilado, completando la síntesis del cofactor mediante la oxidación de este intermediario. La maduración del cofactor en LodA o GoxA ocurre por un mecanismo de modificación post-traducciona que no se había descrito anteriormente, por lo que el estudio de la generación de este cofactor quinónico podría revelar nuevos mecanismos de modificación post-traducciona en proteínas. Para estudiar el mecanismo de generación de CTQ en estos sistemas será preciso poner a punto mecanismos “*in vitro*” de generación del cofactor quinónico, además de mutagénesis dirigida de residuos importantes implicados. De forma complementaria, sería interesante comparar la actividad catalítica de LodB, GoxB y MauG. En este sentido, resultados de nuestro grupo de investigación han mostrado que LodB y GoxB están relacionados específicamente con las modificaciones post-transcripcionales de LodA y GoxA respectivamente, no siendo intercambiables (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010).

V.1.3. Expresión recombinante del operón *gox*.

Uno de los objetivos de la presente memoria ha sido la expresión heteróloga del operón *gox*. Partiendo de la base de que la presencia de GoxB es necesaria para que se genere la forma activa de GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015), ambas proteínas se han expresado en varias cepas de *E. coli* bajo diferentes condiciones, con el fin de encontrar posibles diferencias y obtener altos niveles de actividad GOX. Hay que destacar, que la realización de trabajos previos de nuestro grupo sobre la expresión recombinante de LodA han sido de gran ayuda a la hora de estudiar las condiciones adecuadas para la expresión de GoxA (Chacón-Verdú, 2015; Gómez, 2010). Entre todas las condiciones ensayadas, se ha determinado que 16 h de inducción en *E. coli* CD03 a 15 °C, con glucosa 1 % e IPTG 0,5 mM, son las condiciones óptimas de expresión del

operón *gox*. Éstas son similares a las descritas para el operón *lod* (Chacón-Verdú *et al.*, 2015), exceptuando la adición de glucosa y una menor concentración de inductor. Respecto a la glucosa al 1 %, ésta se adicionó porque reduce los niveles de expresión basal de las proteínas recombinantes en los sistemas de expresión pET (Grossman *et al.*, 1998). Por otro lado, aunque no hay grandes diferencias entre la inducción con 1 mM o 0,5 mM de IPTG, se escogió esta última porque los niveles de actividad son ligeramente superiores (fig. IV.16).

En este trabajo se ha conseguido expresar GoxA fusionada a una cola de poli-histidinas en su extremo N-terminal, que ha permitido su purificación sin que su actividad se vea afectada (fig. IV.18). Muestras de GoxA purificada han sido empleadas en el cálculo de los parámetros cinéticos de la proteína recombinante. Por un lado, el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) obtenido para la Gly es de 0,77 mM (apartado IV.2.5), muy similar al obtenido para la TsGox2A recombinante ($K_m=0,86$ mM) (apartado IV.4.4.1.5.1). Por otro lado, llama la atención que esta K_m obtenida para GoxA recombinante sea aproximadamente un orden de magnitud inferior a la obtenida en el sistema nativo ($K_m= 8,3$ mM, apartado IV.1.2.1). Teniendo en cuenta que la muestra del sistema recombinante está purificada, podemos pensar que esta diferencia se debe a la presencia de algunos componentes, como proteínas y diferentes metabolitos secretados por *Marinomonas* a los sobrenadantes, que pueden interferir con el método de medida empleado. Una posible interpretación sería que dicha interferencia podría provocar un incremento de la actividad en las medidas y, en consecuencia, este error por exceso se traduciría en un aumento de K_m . Cabe destacar que el valor de K_m para la Gly obtenido para la GoxA y la TsGox2A recombinantes es similar al obtenido para las Gox flavoproteicas, también expresadas recombinantemente, de *Bacillus* (tabla IV.3) y de *Geobacillus kaustophilus* ($K_m=0,25$ mM) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b).

También a partir de muestras de GoxA recombinante y purificada, se calculó de forma aproximada la constante catalítica (K_{cat}) y de especificidad (K_{cat}/K_m) de GoxA para la Gly (apartado IV.2.5), obteniendo como resultado un valor de $0,2284\text{ s}^{-1}$ y de $0,2966\text{ s}^{-1}\text{ mM}^{-1}$, respectivamente. Estos valores son similares a los presentados para las glicina

oxidasas recombinantes de *Bacillus* para este mismo sustrato (tabla IV.3). El cálculo de los parámetros cinéticos de GoxA que se ha llevado a cabo en este trabajo se debe de considerar sólo como una primera aproximación, ya que entre otras cuestiones, se desconoce el peso molecular de la proteína con exactitud y el número de centros activos. Incluso la muestra empleada en estos experimentos no estaba completamente pura, ya que también contenía GoxB (fig. IV.18B). En futuros experimentos, habrá que tener en cuenta al menos estos aspectos bioquímicos para el cálculo más preciso de los parámetros cinéticos de GoxA.

El estudio de la forma molecular activa de GoxA ha sido otro de los objetivos de este trabajo. El análisis electroforético de GoxA llevado a cabo tanto en el sistema nativo como en el recombinante sugieren que la forma activa tiene un peso molecular aparente entre 130 y 170 kDa (fig. IV.6 y IV.19), que concuerda con una conformación dimérica (76 kDa cada monómero de GoxA). Estudios recientes en colaboración con el grupo del Dr. Victor Davidson han permitido confirmar esta hipótesis mediante el uso de cromatografía de exclusión molecular (Sehanobish *et al.*, 2016). Sin embargo, esta conformación dimérica no ha podido ser identificada en los SDS-PAGE. Una posible explicación es que no seamos capaces de detectarla mediante tinción de Coomassie porque ésta se encuentre a una baja concentración. En este sentido, hay que señalar que la detección mediante tinción de plata, una técnica más sensible, tampoco permitió identificar esta conformación dimérica (datos no mostrados). En próximos experimentos, el empleo de técnicas aún más sensibles, como el Western Blot, podrían facilitar su detección.

El análisis electroforético de la enzima recombinante permitió a su vez detectar los monómeros de GoxA en la fracción soluble, con un tamaño aproximado similar, o quizás ligeramente superior, al esperado según su secuencia peptídica (76 kDa aproximadamente). Este mayor tamaño aparente de GoxA se observa claramente en la muestra de la proteína purificada (fig. IV.19A). Este hecho puede ser considerado como una estimación por exceso y atribuirse a una forma desplegada de movilidad electroforética anormalmente alta por mostrar un radio hidrodinámico o de Stokes mayor del que correspondería a su tamaño si su forma fuera globular (Kim *et al.*, 2006;

Neville, 1971). También podría ser consecuencia de la modificación post-traducciona de la proteína. Adicionalmente, en la figura IV.19A, así como en el resto de geles, se puede apreciar una banda justo debajo de GoxA con una menor intensidad que podría corresponder a GoxA con algún tipo de procesamiento inespecífico o a una forma de esta proteína sin el péptido señal de las Twin-Argininas, que daría una masa molecular de 72,5 kDa aproximadamente. Bajo esta hipótesis, la mayoría de GoxA expresada en *E. coli* contendría el péptido señal TAT sin escindir, posiblemente por un mal reconocimiento de la peptidasa I al tratarse de un péptido señal algo diferente a los que son reconocidos generalmente en el sistema de expresión empleado. De hecho, la escisión del péptido líder no es un requisito esencial para la translocación por el sistema TAT, por lo que se han descrito proteínas transportadas y funcionalmente activas que contienen el péptido TAT (Frobel *et al.*, 2012).

Sin duda, un resultado llamativo de esta memoria es el aumento de actividad GOX, tanto en el caso de GoxA como en el de TsGox2A, cuando los extractos se dejan incubar a 25 °C (apartado IV.2.2.2 y IV.4.4.1.4). Este incremento, de hasta unas 10 veces respecto a la actividad inicial (fig. IV.15A y IV.50B), puede ser debido a que después de la sonicación se produzca la liberación de algún componente esencial o un cambio en las condiciones de la muestra, por ejemplo en el pH o en el potencial redox, que sean favorables para la generación de mayor cantidad de GoxA activa. Además, el aumento de actividad GOX observado no se aprecia tras purificar las muestras mediante colas de histidinas o mediante precipitación con EtOH (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con la interpretación propuesta ya que en ambos casos, el método de purificación cambia las condiciones bioquímicas de las muestras, que pierden la mayoría de los componentes de los extractos celulares. Llama la atención que el análisis de los SDS-PAGE indica que el incremento de actividad observado no va acompañado por una variación en los niveles proteicos (fig. IV.15B). Esta observación nos lleva a pensar que el complejo dimérico que supone la forma activa de GoxA puede que se disocie en el proceso electroforético, impidiendo así su detección en los geles. Sin embargo, según los resultados expuestos en la figura IV.19, debe de permanecer sin disociarse cierta cantidad de proteína activa capaz de mantener su estructura cuaternaria. Por otro lado, el aumento de actividad tras este periodo de

incubación no se aprecia en el caso de la actividad LOD (fig. IV.15A), lo que sugiere diferencias en la generación de las formas activas de LodA, y de GoxA y TsGox2A, posiblemente relacionadas con distintos mecanismos de formación del cofactor en estos sistemas.

Con anterioridad a este estudio y a los trabajos sobre LodA, la expresión recombinante de quinoproteínas solo había sido posible en el caso de la proteína MADH, que contiene TTQ y que había sido expresada con éxito en *Rhodobacter sphaeroides* (Graichen *et al.*, 1999), y 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). En ambos casos es necesario expresar varios de los genes presentes en estos operones. El hecho de que, al igual que el operón *lod*, los operones *gox* y *tsgox2* sólo tengan dos genes, el que codifica la oxidasa y un segundo gen que codifica la flavoproteína necesaria para su correcta expresión, ha facilitado enormemente el estudio de la expresión recombinante de estas proteínas y ha puesto de manifiesto el potencial que posee este sistema, como modelo de estudio de los procesos de modificación post-traducciona y de generación de cofactores quinónicos.

V.2. Regulación del operón *gox*.

El estudio de los elementos y mecanismos regulatorios del operón *gox* puede aportar información relacionada con la posible función biológica que desempeña GoxA en *M. mediterranea*. Los análisis realizados en este trabajo indican que GoxA está regulada por fase de crecimiento, ya que se expresa cuando el microorganismo alcanza la fase estacionaria (fig. IV.21, IV.26A y IV.31). Como se discutirá en el siguiente apartado V.3, este hecho indica una posible relación de GoxA con el metabolismo secundario. Adicionalmente, los datos de actividad β -galactosidasa obtenidos a partir de las cepas que poseen una fusión transcripcional del promotor del operón *gox* (*Pgox*) con el gen *lacZ*, muestran que esta regulación por fase de crecimiento se produce a nivel transcripcional (fig. IV.23 y IV.24). En este aspecto, la regulación de GoxA tiene lugar de

forma similar al resto de oxidasas, (lacasa, tirosinasa y LodA) estudiadas en *M. mediterranea* (Molina-Quintero, 2011).

Para explorar la regulación común entre las distintas oxidasas, se procedió al análisis comparativo de los promotores de los genes que las codifican con el fin de obtener alguna pista sobre las bases moleculares que intervienen en dicha regulación (fig. V.1).

Pgox

...GAAGATATCCGAGACAAAAATACACTTCATATACCTTCCTTATACAACATGTTTCACAAC
GCGACTTTCAAGCGCGCTCTCAAACACGACGTTAAACCGCGTGAATTAAGTGTTCCT
TGTCATTCTATACTCTGATATTAAGTGTAAACACCGTGAATGTGATTTTTTTCAGAAAATG
AGCTAATTTAATCAA**GA**CCCTTACATTTTCATATTAATGGATAGAGAT**AGGAC**GATACGATG

Plod

...ATTGGAGTTAGATAAATGAGGGTTCTATTTGTGAACAGAGATTAAGACGAATCAAATTAC
GCGATCTAATTTTAGATCGCGAATTTAACGTTGGGTCTTTCAGAGAAACAGCCTCCCTTGT
CAAGAGGGATTAAGTACTGATACTGAAGTACTGCGGTACCTGCATTGCTCTGCTTAAGTGA
AAGAC**C**CATTTCGTATAAAAACGGTTTATGGATTTTAGTTATCAACAA**AGGAG**TAAGTTATG

PppoA

...AATTAGCCACGCTCGGCAACTGCTCCTGCGTTGCCCTAATGACCTACATCCATGTAGG
CCTCCCTTTGGGTCTTCCATAGACAGCAATCTAACTGACTGCTATTTTCATTGATTGCTTAA
TTGTCTCGCCAAAGCGACTGCACTCACAGCGAGACACTAGTGTAAATCCCGTGAATTTGATG
ACTGAGCCGCTTTTGCTAGTCTTTAGA**G**TACCGACACTCTCACAA**AGGACT**CATCAATG

PppoB

...CTCTAGCGTTTTAAGAGCAAAGAACTGTGTAAATAAATTGGCTAGTGAACAGGAATTTTC
TGATTAGACCTAAAAAGAGGGCATATGGAAAACAAAGTGTAAACAAGGTGAATTTGAATAAT
TGAAGTTACTCTTATATTTTGTAA**G**GCTAGAGAACCAGTCTTGTTTTTAATTAAAAATG
TCATCCGAAATTACAATTATATTTTGTTTAAAAAGGTTTTTA**ACTGAGGG**AAAATCATG

Figura V.1. Comparación de los promotores *Pgox*, *Plod* (Molina-Quintero *et al.*, 2010), *PppoA* (Sánchez-Amat *et al.*, 2001) y *PppoB* (López-Serrano *et al.*, 2004) de *M. mediterranea*. Las secuencias se muestran hasta el codón ATG de inicio de la traducción. El sitio de unión al ribosoma se indica en negrita. El lugar de inicio de la transcripción, determinado mediante 5'-RACE, se muestra de mayor tamaño y en gris. Los hexámeros de las posibles regiones -10 y -35 están subrayados. Las flechas con doble subrayado indican zonas palindrómicas de función desconocida.

Los factores sigma (σ) participan de forma esencial junto a la RNA polimerasa en el inicio de la transcripción, punto crucial en la expresión génica de procariotas (Feklistov *et al.*, 2014). Por ello se ha realizado un análisis de la región promotora de las oxidasas de *M. mediterranea* en comparación con el consenso del factor sigma mayoritario de

gammaproteobacterias, el factor σ^{70} de *E. coli* (Lisser y Margalit, 1993) (tabla V.1). *PppoA* y *PppoB* muestran gran de similitud con este consenso, tanto en la secuencia de los hexámeros -35 y -10 como en el espaciamiento entre éstos, mientras que *Pgox* y *Plod* se distancian algo más. Esto puede indicar diferentes mecanismos regulatorios a nivel transcripcional, o bien que *Pgox* y *Plod* no son reconocidos por el factor σ^{70} sino que su expresión dependa de algún factor sigma alternativo.

Tabla V.1. Análisis de las secuencias promotoras *Pgox*, *Plod*, *PppoA* y *PppoB* en comparación con el consenso de promotores del factor σ^{70} de *E. coli* (Lisser y Margalit, 1993). Los residuos conservados aparecen subrayados. El subíndice en cada residuo del consenso σ^{70} indica la frecuencia, en términos de porcentaje, con el que suelen aparecer en la posición determinada.

	Región -35	nt intermedios	Región -10	nt intermedios	+1
Consenso σ^{70}	T ₆₉ T ₇₉ G ₆₁ A ₅₆ C ₅₄ A ₅₄	16-18	T ₇₇ A ₇₆ T ₆₀ A ₆₁ A ₅₆ T ₈₂	5-8	C ₅₅ /A ₅₁ / T ₄₈ /G ₄₂
<i>Pgox</i>	A <u>T</u> <u>G</u> T G <u>A</u>	18	<u>T</u> <u>A</u> A T T <u>T</u>	6/7	G/A
<i>Plod</i>	C <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> T <u>A</u>	23	<u>T</u> T A <u>A</u> C <u>T</u>	6	C
<i>PppoA</i>	<u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> T G	16	<u>T</u> <u>A</u> G T C <u>T</u>	5	G
<i>PppoB</i>	<u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> A T	17	<u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> T T <u>T</u>	6	G

Esta última observación se ve apoyada por el hecho de que el factor σ^{70} está implicado en la expresión de genes principalmente durante la fase exponencial de crecimiento (Ishihama, 2000), mientras que *GoxA*, al igual que *LodA*, se expresan principalmente en fase estacionaria (fig. IV.25). En este sentido hay que mencionar que el BLASTP realizado con la secuencia de los factores sigma descritos en *E. coli*, frente al genoma de *M. mediterranea* y con un límite de corte E-value de 1e-10, indica que este microorganismo posee todos los genes que codifican dichos factores, excepto el del factor sigma que interviene en la homeostasis del hierro (σ^{19}). Sin embargo, hasta el momento no hemos podido identificar similitudes, ni en *Pgox* ni en *Plod*, con ninguna de las secuencias reconocidas por los factores sigma caracterizados de *E. coli* (Feklistov *et al.*, 2014; Zhang y Buck, 2015). Por tanto, cabe la posibilidad de que en la regulación por fase de crecimiento de estas oxidasas intervengan otro tipo de factores transcripcionales, o bien, que existan diferencias notables en las secuencias de

reconocidas por los diferentes factores sigma debido, por ejemplo, a que *M. mediterranea* es una bacteria marina.

Uno de los elementos comunes que participa en la regulación de las actividades oxidasa en *M. mediterranea* son las proteínas reguladoras PpoS y PpoR (Molina-Quintero, 2011). PpoS es una histidín quinasa sensora de membrana (Lucas-Elío *et al.*, 2002), similar a otras descritas en sistemas de fosfotransferencia de gammaproteobacterias como GacS o BarA (Lapouge *et al.*, 2008). Por su parte, el regulador de respuesta PpoR (Molina-Quintero, 2011), es una proteína con homología a otros reguladores de respuesta como GacA o UvrY, proteínas que participan respectivamente en el mismo sistema de fosfotransferencia que GacS o BarA (Lapouge *et al.*, 2008). En anteriores trabajos se han obtenido, mediante transposición, cepas de *M. mediterranea* mutadas en PpoS y PpoR, que se han denominado mutante T103 (Lucas-Elío *et al.*, 2002) y mutante T102 (Lucas-Elío, 2003), respectivamente. En este estudio se ha demostrado que tanto la cepa T103 como la T102 carecen de actividad GOX (fig. IV.36) y que además, la regulación de la actividad GOX por PpoS y PpoR se produce a nivel transcripcional (fig. IV.37), de forma similar a lo que ocurre en la regulación de la actividad LOD (Molina-Quintero, 2011). Sin embargo, aunque tanto PpoA como PpoB también están reguladas por las proteínas PpoS y PpoR, en el caso de PpoA y, sobre todo, PpoB parecen intervenir también otros mecanismos post-transcripcionales (Molina-Quintero, 2011). Además, la regulación por fase de crecimiento del operón *gox*, previamente comentada, puede que sea también dependiente de PpoS y PpoR. En los sistemas similares como GacS/GacA de *Pseudomonas*, la inducción tiene lugar en condiciones de alta densidad celular donde se acumulan señales extracelulares que podrían estimular a la histidín quinasa sensora (Lapouge *et al.*, 2008). Este modelo sería compatible con la regulación de GoxA y LodA en *M. mediterranea*.

PpoS y PpoR no sólo controlan las actividades oxidasa, sino que también regulan el crecimiento en medios limitados por nitrógeno y la supervivencia celular en *M. mediterranea* (Molina-Quintero, 2011). La capacidad que presentan estas proteínas de controlar diversos procesos celulares ya había sido descrita para sistemas como

BarA/UvrY y GacS/GacA (Lapouge *et al.*, 2008). Por ejemplo, en algunas gammaproteobacterias marinas, como *Vibrio vulnificus*, se ha demostrado que GacA interviene en procesos de citotoxicidad y virulencia (Gauthier *et al.*, 2010). En otras, como *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se ha demostrado que estos sistemas de dos componentes controlan, entre otros procesos, la formación de biofilms (Irie *et al.*, 2010; Jorgensen *et al.*, 2013). En *Pseudoalteromonas tunicata*, se ha identificado la proteína reguladora WmpR, homóloga al regulador transcripcional ToxR de *Vibrio* y CadC de *E. coli*, que también interviene en la regulación de la formación de biopelículas. Asimismo, WmpR está relacionada con la síntesis de pigmentos y de AlpP, proteína autolítica similar a LodA (Stelzer *et al.*, 2006). Es importante mencionar que en el genoma de *M. mediterranea* no es posible detectar, empleando un BLASTP con límite de corte E-value de 1e-10, ninguna proteína con similitud a WmpR, lo que sugiere que procesos similares, como la producción de pigmentos y la síntesis de proteínas con homología que intervienen en el desarrollo de biofilms, son controlados por sistemas de regulación diferentes en estas dos bacterias. Antes que en *M. mediterranea* y *Pseudoalteromonas tunicata*, ya se había descrito una regulación común entre la síntesis de compuestos antimicrobianos y pigmentación en otras alfa-proteobacterias marinas como *Roseobacter* (Bruhn *et al.*, 2005) y otros microorganismos como *Streptomyces avermitilis* (Demain, 1999; Omura *et al.*, 2001).

Una cuestión de interés es que en el genoma de *M. mediterranea* se pueden detectar proteínas con homología tanto a PpoS como a PpoR (Molina-Quintero, 2011), indicando que, de forma complementaria, esta bacteria posee numerosos sistemas de regulación que pueden ser objeto de futuros análisis. Además, anteriores estudios de nuestro grupo pusieron de manifiesto la presencia en *M. mediterranea* de otros elementos que pueden intervenir en la ruta mediada por sistemas de dos componentes (Molina-Quintero, 2011). Estos elementos son pequeños RNAs (sRNAs) que muestran motivos de unión a CsrA de *E. coli*, para la que *M. mediterranea* posee dos proteínas homólogas, Marme_0752 (81 % identidad y 93 % similitud) y Marme_1812 (64 % identidad y 87 % similitud). No obstante, un análisis preliminar de los operones *gox*, *lod* y de los genes *ppoA* y *ppoB* no ha permitido identificar claramente los motivos de unión de CsrA (Timmermans y Van Melderren, 2010), por lo

que la posible implicación de estas proteínas en la regulación de las actividades oxidasa en *M. mediterranea* todavía está por demostrar.

A lo largo de esta memoria se ha incidido en el hecho de que el operón *gox* comparte elementos reguladores comunes con el operón *lod*. El alineamiento de *Pgox* y *Plod* ofrece diferentes secuencias conservadas no caracterizadas, como “CCTTGTC” o “CTGATA” (fig. V.2), que pueden ser indicativos de elementos regulatorios comunes. Una posibilidad es que estas secuencias conservadas sean reconocidas por proteínas reguladoras de respuesta, como por ejemplo PpoR. No obstante, algunas regiones distintas entre estos dos promotores podrían justificar ciertas diferencias, como el hecho de que *Pgox* no sea un promotor tan fuerte como el *Plod* (fig. IV.25). Curiosamente, las “cajas TyrR” propuestas para ambos promotores (apartado IV.3.1.3) no alinean según nuestro análisis (fig. V.2).

```

Pgox GAAGATATCCGAGACAAAAAT-ACACTTCATATACCTTCCTT-ATA-CAACATGT
Plod ATTGGAGTT--AGAT--AAATGAGGGTTC-TATTTGTGAACAGAGATTAAGACGA

Pgox TTCACA--ACGCGACTTTCAAGCGCGCTCTCAAAACACGACGTTAAAACCGCGTG
Plod ATCAAATTACGCGA-TCTAATTTTAGATCGCGAA-TTAAACGTTGGG-TCTTTCA

Pgox AATTAAGTGTTTTCTTGTCATTCCT-ATACTCTGATATTAAGTGTAACACCGTG
Plod GAGAAACAGCCTCCCTTGTCAGAGGGATTAAGTGATA----CTG-----A-----

Pgox TAATGTGATTTT-TT-CAGAAAATGA---GCTAATTT-AATCAAGAC-CTTACAT
Plod -ACTGATACTGCCGTACCTGCATTGCTCTGCTTAAGTAAAGAGACCATTTCGTATAA

Pgox TTCATATTAATGGAT---AGAGA-----TAGGACGATACGATG
Plod AAACGGTTTATGGATTTTAGTTATCAACAAAGGAGTAAGTTATG

```

Figura V.2. Alineamiento de las regiones promotoras de los operones *gox* y *lod* mostrando las secuencias comunes entre ambos. Las secuencias fueron alineadas usando el programa “Clustal Omega” (Sievers *et al.*, 2011). Sombreados en gris se indican los nucleótidos idénticos en ambos promotores. Las secuencias se muestran hasta el codón ATG de inicio de la traducción. Las posibles cajas TyrR aparecen subrayadas en gris (Pittard *et al.*, 2005). Los hexámeros de las posibles regiones -10 y -35 se indican en negrita. Los sitios de unión al ribosoma están doblemente subrayados.

Del cultivo de *M. mediterranea* en diferentes medios se puede concluir que la expresión de la actividad GOX en los sobrenadantes se ve reprimida cuando dicho microorganismo es cultivado en medios ricos en nutrientes, en comparación a cuando es cultivada en medios mínimos (fig. IV.31). Esta circunstancia ya había sido descrita para la actividad LOD (Lucas-Elío *et al.*, 2005; Molina-Quintero, 2011). Una posible

explicación es que en dicha represión intervenga el regulón TyrR, un sistema de regulación transcripcional dependiente de L-Tyr y otros aminoácidos aromáticos (Pittard *et al.*, 2005). La presencia en el genoma de *M. mediterranea* de un homólogo a la proteína TyrR de *E. coli* y la existencia de posibles “cajas TyrR” en la región promotora *Pgox* y *Plod* (fig. IV.33), hacen plausible esta hipótesis (apartado IV.3.1.3). Los datos presentados muestran que tanto GoxA como LodA están reguladas transcripcionalmente por L-Tyr, aunque en el caso de la glicina oxidasa deben de intervenir también mecanismos post-transcripcionales que puedan justificar la acusada disminución de la actividad GOX en presencia de L-Tyr al llegar los cultivos a fase estacionaria (fig. IV.34 y IV.35). En próximos estudios, se podría comprobar la participación del regulón TyrR en la represión de las actividades GOX y LOD en medios complejos, por ejemplo, creando mutantes deficientes en Marme_2488, la proteína homóloga a TyrR en *M. mediterranea*. En el momento actual no disponemos de ninguna hipótesis para explicar su posible relación con las quinoproteínas en *M. mediterranea*. En otras bacterias, se ha descrito que el regulón TyrR está relacionado con la biosíntesis y el transporte de aminoácidos aromáticos (Pittard *et al.*, 2005).

Mientras que la L-Tyr reprime la actividad GOX, se ha demostrado que dicha actividad es inducible por L-lisina, en mayor medida de lo que la induce su propio sustrato, la glicina (fig. IV.21 y IV.26A). La regulación por L-Lys se produce a nivel post-transcripcional (fig. IV.24), de forma similar a lo descrito para LodA (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Una posible explicación a la regulación observada por estos aminoácidos podría ser la presencia de “riboswitches” o ribointerruptores de lisina (Serganov *et al.*, 2008) o glicina (Mandal *et al.*, 2004). Los ribointerruptores son secuencias en el extremo 5' del gen que actúan como elementos regulatorios en *cis*, involucrados tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los aminoácidos por los que son regulados (Serganov y Patel, 2009). La L-Lys o la Gly se pueden unir a esta zona del gen provocando cambios conformacionales que conducen a la modulación de su expresión. Sin embargo, mediante análisis bioinformáticos no se han podido detectar secuencias de ribointerruptores de L-Lys o Gly (Chang *et al.*, 2009; Mukherjee y Sengupta, 2015) en la secuencia transcrita del operón *gox*. Además, la secuencia no traducida en el extremo

5' de dicho operón parece ser demasiado corta como para contener un ribointerruptor (fig. IV.8). Por tanto, todavía queda por determinar el mecanismo de regulación post-transcripcional que ejercen los compuestos inductores de la actividad GOX. En relación con el efecto inductor que ejerce la L-Lys, es interesante señalar, que lo que realmente se produce es un aumento de los niveles generales de secreción proteica (fig. IV.28), en donde GoxA y LodA pertenecen al grupo de proteínas que se secretan al medio externo. En consecuencia, si se normaliza las actividades GOX y LOD por mg de proteína extracelular, no es posible detectar el efecto inductor que ejerce la L-Lys (fig. IV.29).

La inducción por aminoácidos ha sido descrita para ciertas LAOs de amplio espectro sintetizadas por hongos, que están relacionadas con el catabolismo de los L-aa que pueden utilizar como fuente de nitrógeno. Este es el caso de la LAO sintetizada por *Neurospora crassa*, que se induce cuando en el medio hay limitación por fuente de nitrógeno (Sikora y Marzluf, 1982). En estas condiciones, dicha inducción está mediada por Nit-2, proteína que regula positivamente a nivel transcripcional los genes requeridos para la utilización de diversas fuentes de nitrógeno (Fu y Marzluf, 1990). La LAO de *Aspergillus nidulans* está regulada por *areA*, gen homólogo a *nit-2* en este microorganismo (Wilson y Arst, 1998) y también se induce bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Davis et al., 2005; Niedermann y Lerch, 1991). La represión de estas actividades en condiciones de amplia disponibilidad de nutrientes evita el posible daño oxidativo asociado al peróxido de hidrógeno producido por estas enzimas (Davis et al., 2005). Sin embargo, a diferencia de las LAOs de hongos, no se ha podido demostrar en las condiciones ensayadas ninguna relación entre el metabolismo de la Gly y la actividad GOX, tal como se discutirá en el apartado V.3, ni entre la actividad LOD y el metabolismo de la lisina (Molina-Quintero, 2011).

V.3. Posible función fisiológica de GoxA.

Actualmente, uno de los principales desafíos a los que se enfrenta el mundo científico es asignar funciones bioquímicas y celulares a los miles de productos de genes que hasta ahora no han sido caracterizados y que se han puesto de manifiesto gracias a las modernas técnicas de secuenciación de genomas (Clark y Radivojac, 2011). Aunque muchas veces la actividad de la proteína sea caracterizada, al menos *in vitro*, la función fisiológica que desempeñan en el organismo es más difícil de establecer. En el caso de GoxA sintetizada por *M. mediterranea*, se ha explorado su posible función fisiológica en comparación con las glicina oxidasas que son flavoproteínas.

Por un lado, se ha descrito que Gox en *B. subtilis* interviene en la biosíntesis de la vitamina B1 (tiamina), cofactor esencial para ciertas enzimas del metabolismo de carbohidratos. En concreto, Gox (ThiO) interviene en la formación del anillo de tiazol (Settembre *et al.*, 2003). En procariotas, la síntesis de tiamina requiere la formación en dos rutas separadas del anillo de tiazol y del derivado pirimidínico, compuestos que más tarde se condensan para dar monofosfato de tiamina y, posteriormente, pirofosfato de tiamina que es el cofactor activo (Begley *et al.*, 2012; Jurgenson *et al.*, 2009). En la formación del derivado de pirimidina intervienen dos enzimas, mientras que en la generación del anillo de tiazol intervienen seis, siendo una de ellas ThiO en *B. subtilis* (Settembre *et al.*, 2003). Las rutas biosintéticas de formación de tiamina mejor estudiadas en procariotas son las de *E. coli* y *B. subtilis*. Ambas rutas son similares, pero alguna de las enzimas que actúan son diferentes. Por ejemplo, en *B. subtilis*, ThiO cataliza la formación de imino-glicina a partir de Gly, mientras que en *E. coli*, este compuesto es generado por otra enzima, ThiH, a partir del aminoácido Tyr (Jurgenson *et al.*, 2009).

El gen que codifica ThiO en *B. subtilis* se encuentra formando parte de un operón con otros genes que codifican enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de tiamina, lo cual permite una co-regulación de estos genes (Rodionov *et al.*, 2002). El análisis del genoma de *G. kaustophilus* permite detectar los genes necesarios para llevar a cabo la

misma vía metabólica de síntesis de tiamina descrita en *B. subtilis*. De hecho, el gen que codifica a GoxK (similar a *thiO*) también se encuentra formando un operón con genes que están anotados que codifican las enzimas que intervienen en dicha ruta, indicando que la actividad glicina oxidasa en *G. kaustophilus* muy probablemente también intervenga en la síntesis de tiamina. Sin embargo *M. mediterranea* no posee ninguna proteína similar a ThiO, sino que la proteína con actividad GOX es similar a LodA, y está formando parte de un operón únicamente con la proteína GoxB, relacionada con formación de GoxA activa (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Este hecho indica que *M. mediterranea* no posee una ruta de biosíntesis de tiamina idéntica a la descrita en *B. subtilis*. En este sentido, la proteína Marme_1906 parece ser una proteína homóloga a ThiH de *E. coli*, pues guarda un 47,8 % de identidad y un 61,8 % de similitud con ésta. Además, el gen que codifica esta proteína en *M. mediterranea* parece estar localizado en un operón, que es similar al que contiene *thiH* en *E. coli*. Estas observaciones sugieren claramente que la biosíntesis de tiamina en *M. mediterranea* sigue una ruta similar a la de *E. coli* y, por tanto, la actividad GOX expresada por *M. mediterranea* no interviene en esta vía metabólica, sino que debe de cumplir otra función.

Por otro lado, una posible hipótesis es que la función fisiológica de GoxA esté relacionada con el metabolismo de compuestos nitrogenados y, en concreto, con el catabolismo de Gly. El hecho de que la actividad GOX libere amonio, indujo a considerar esta posibilidad. Sin embargo, en este trabajo no se han obtenido evidencias que lo indiquen. Por un lado, el crecimiento de la cepa silvestre MMB-1R y de la cepa LGD, que pierde la actividad GOX (fig. IV.12), es muy similar cuando éstas se cultivan en medio que contiene Gly como única fuente de nitrógeno (figura IV.30). Por otro, los datos de actividad GOX obtenidos son muy similares al cultivar *M. mediterranea* en un medio basal al que se le adicionaron por separado diferentes fuentes de nitrógeno, entre ellas glicina, indicando que cuando la Gly es la única fuente de nitrógeno, este aminoácido, en comparación con el resto de fuentes de nitrógeno empleadas, no induce la enzima en las condiciones ensayadas (fig. IV.27 y IV.29). Estos resultados indican que GoxA no es una enzima esencial en el catabolismo de la Gly en esta bacteria y que deben de existir otras rutas para el metabolismo de este

aminoácido que permitan el crecimiento de la cepa LGD en estas condiciones. En este sentido, el análisis del genoma de *M. mediterranea* permite detectar los genes Marme_2175, Marme_2176 y Marme_2178, cuyos productos guardan un 74, 75 y 53 % de similitud, respectivamente, con las proteínas GcvP, GcvH y GcvT. Estas proteínas forman el complejo de degradación de Gly en *E. coli* y están relacionadas con el metabolismo de dicho aminoácido (Okamura-Ikeda *et al.*, 1993). La construcción de mutantes defectuosos en estos genes en combinación con mutantes en el operón *gox*, permitiría comprobar experimentalmente la posible implicación de la actividad GOX en el metabolismo de la glicina.

Además, en todos los análisis realizados GoxA se expresa durante la fase estacionaria de crecimiento, lo que indica su posible relación con el metabolismo secundario. Una observación interesante es que las curvas de crecimiento de las cepas estudiadas (MMB-1, LD y LGD) en diferentes condiciones de cultivo resultaron ser similares, sin que se observen diferencias significativas como consecuencias de las deleciones genéticas. Este resultado sugiere que las LAOs producidas por *M. mediterranea* no son esenciales para el crecimiento y no interfieren en el metabolismo celular en las condiciones de cultivo ensayadas, apoyando la hipótesis de que estas enzimas estarían relacionadas con el metabolismo secundario de este microorganismo.

Otra posibilidad a tener en cuenta es que, debido a la similitud tanto a nivel estructural como regulatorio entre GoxA y LodA, ambas proteínas podrían desempeñar un papel fisiológico parecido en *M. mediterranea*. Por tanto, es importante mencionar que para LodA, y algunas proteínas similares como AlpP de *Pseudoalteromonas tunicata* (Lucas-Elío *et al.*, 2006), se ha descrito que intervienen en la diferenciación de las biopelículas formadas por los microorganismos productores, ejerciendo un efecto autolítico y provocando la liberación de células microbianas que pueden colonizar nuevos nichos (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Este proceso de dispersión microbiana mediado por LodA podría jugar un papel primordial en la supervivencia de *M. mediterranea* como parte de la microbiota asociada a la planta marina *Posidonia oceanica* (Espinosa *et al.*, 2010). Sin embargo, en los ensayos llevados a cabo en este trabajo se ha observado que el efecto antimicrobiano de GoxA es bastante bajo (fig. IV.2A y B). Estudios paralelos en

nuestro grupo de investigación han demostrado que LodA presenta una mayor actividad antimicrobiana que GoxA frente a *E. coli* UM202 y *S. epidermidis* CECT 231, tanto en medio líquido como en antibiogramas en placa. Además, se ha observado que en el caso de que LodA, el peróxido de hidrógeno no es el único responsable del efecto antimicrobiano, sino que participan otros compuestos relacionados con los productos de la oxidación de la Lys (Carrasco-González, 2015). En el mismo sentido, otros autores ya habían descrito que el efecto antimicrobiano ejercido por la lisina oxidasa de *Aplysia californica* (escapina) se debe fundamentalmente a los productos de la oxidación de la Lys que, al reaccionar con el H₂O₂ producido, generan compuestos intermediarios inestables con capacidad antimicrobiana (Ko *et al.*, 2008). Por el contrario, el glioxilato generado en la reacción catalizada por GoxA no parece ser un compuesto que pueda inhibir el crecimiento microbiano. Este hecho está relacionado con que, en las condiciones ensayadas *in vitro*, GoxA presente una baja actividad antimicrobiana. En resumen, estos resultados sugieren que GoxA no participa, como lo hace LodA, en la dispersión de los biofilms de *M. mediterranea*.

Por último, a pesar de que los resultados presentados en este trabajo indican que GoxA esté relacionada con el metabolismo secundario, es interesante comentar la siguiente observación. *M. mediterranea* posee tres genes que codifican proteínas con similitud de secuencia: LodA, GoxA y XoA (Marme_2396) (Lucas-Elío *et al.*, 2012b). Los sistemas biológicos poseen copias funcionalmente redundantes de muchos de los componentes implicados en el desarrollo celular, en las rutas metabólicas, en la transducción de señales, etc., funciones que son vitales para la célula (Kafri *et al.*, 2009). Los resultados de esta memoria indican que el crecimiento de las cepas LD (Δlod) y LGD (Δgox y Δlod) es similar al de la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas. Una posible explicación a este resultado podría ser que XoA pudiera sustituir a LodA y GoxA realizando alguna función redundante en las cepas con las deleciones genéticas. En futuros experimentos, esta hipótesis se podría comprobar construyendo una cepa de *M. mediterranea* con la delección en estas tres proteínas similares.

V.4. Descripción de una nueva familia de quinoproteínas con actividad aminoácido oxidasa.

Debido a que *M. mediterranea* codifica tres proteínas con similitud de secuencia (LodA, GoxA y XoA) y con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre este tipo de proteínas, en este trabajo se ha estudiado la abundancia y distribución en microorganismos de los genes que codifican proteínas similares (apartado IV.4). Además, el hecho de que LodA y GoxA son aminoácido oxidasas con cofactor quinónico que no se habían descrito con anterioridad, sugiere que los genes similares a *lodA/goxA* presentes en diferentes genomas bacterianos pueden constituir un reservorio de genes que codifiquen proteínas novedosas con actividad oxidasa.

Mediante análisis bioinformáticos se han detectado un total de 168 genes similares a *lodA/goxA* que codifican proteínas hipotéticas de función desconocida (apéndice A.3). Estos genes están distribuidos en 144 genomas distintos, ya que algunos microorganismos poseen más de una copia de genes similares a *lodA/goxA* (tabla IV.5). Curiosamente, la gran mayoría de los organismos que poseen dos o más copias son proteobacterias (16/19), y más concretamente pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* (9/19), aunque estas observaciones pueden deberse a la existencia del gran número de genomas secuenciados en estos grupos microbianos. Los 144 genomas que albergan proteínas similares a LodA representan el 0,91 % de todos los genomas depositados en la base de datos del IMG en el momento del análisis (Enero de 2014). Este bajo porcentaje sugiere que las proteínas de la familia LodA son poco predominantes y que no deben de ser esenciales para la supervivencia de los microorganismos. En este sentido, el crecimiento normal de los mutantes de *M. mediterranea* con las deleciones en LodA y GoxA, así como de las cepas de *P. tunicata*, *C. violaceum* y *C. crescentus* con las deleciones en las proteínas similares a LodA (Mai-Prochnow *et al.*, 2008), indica que no son proteínas esenciales.

La gran mayoría de genes detectados que codifican proteínas similares LodA/GoxA pertenecen a genomas bacterianos (97 %). Dichos genes muestran una distribución

desigual, con algunos grupos microbianos más representados que otros, aunque de forma general, el porcentaje de bacterias que contienen genes similares a *lodA* en la mayoría de grupos bacterianos se mantiene entre 1-3 % (tabla IV.4). La amplia distribución de genes similares a *lodA* en diferentes clases bacterianas sugiere la existencia de un mismo origen evolutivo, una proteína ancestral a partir de la cual evolucionaron el resto. Por otro lado, mientras que en el dominio *Archaea* no se han detectado genes de la familia *lodA*, en eucariotas sólo se han detectado 5 genes distribuidos en 4 genomas diferentes, todos ellos pertenecientes a la clase *Agaricomycetes*. Esta acotada distribución y su gran homología con las proteínas bacterianas, sugieren que la adquisición en hongos del gen similar a *lodA* tuvo lugar a través de un evento de transferencia horizontal de genes a partir de una bacteria.

Cabe destacar que no se han detectado genes similares a *lodA* en ningún patógeno humano o animal conocido. Por el contrario, muchos microorganismos que los contienen interactúan con plantas o han sido aislados de su microbiota. Por ejemplo, este es el caso de algunas alfaproteobacterias simbióticas del género *Bradyrhizobium*, o algunos microorganismos asociados a algas o plantas marinas dentro de *Gammaproteobacteria* como es el caso de *M. mediterranea*. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que las proteínas similares a LodA desempeñen algún tipo de papel ecológico en la interacción entre la planta y su microbiota asociada. Estas proteínas también podrían participar en la formación de biopelículas microbianas en la superficie de la planta, tal como se ha propuesto para *M. mediterranea* (Mai-Prochnow *et al.*, 2008), un microorganismo que forma parte de la microbiota de la planta marina *Posidonia oceanica* (Espinosa *et al.*, 2010).

El alineamiento de las proteínas similares a LodA ha permitido detectar ciertos dominios y residuos conservados en la secuencia peptídica de GoxA, entre los que se encuentran la Cys-551 y Trp-566, que alinean con la Cys-516 y Trp-581 que forman parte del cofactor quinónico CTQ de LodA (fig. IV.38) (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). Esto sugiere que las proteínas de la familia LodA contienen el mismo tipo de cofactor quinónico. Además, la detección del intermediario hidroxilado en la generación de CTQ de GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015), de forma similar a lo

descrito en el caso de *LodA*, sugiere un mecanismo común de formación del cofactor para todas las proteínas de la familia *LodA*. Aparte de la Cys y el Trp, el resto de residuos conservados en las proteínas similares a *LodA* podrían estar relacionados con la actividad catalítica de estas enzimas, con el mecanismo de generación del cofactor quinónico, o con otros procesos comunes a todas ellas. En futuros experimentos, el análisis de los residuos conservados permitirá estudiar el mecanismo de modificación post-transcripcional implicado en la formación del cofactor y establecer relaciones estructura-función en este tipo de proteínas.

El estudio de la región adyacente de los genes de la familia *lodA* permitió detectar, en todos los casos menos en uno, la presencia de un segundo gen que codifica una flavoproteína similar a *LodB*. De hecho, en el caso de *lod* y *gox* se ha demostrado que ambos genes forman parte de un mismo operón (Gómez *et al.*, 2010) (apartado IV.1.4). Nuestro grupo de investigación ha evidenciado que la presencia de ambos genes es necesaria para expresar correctamente la actividad (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010), hecho que ha debido de ejercer a lo largo de la evolución una enorme presión selectiva para mantener dicha asociación. Además, esta asociación es específica, ya que cada proteína similar a *LodB* está relacionada con las modificaciones post-transcripcionales de la proteína similar a *LodA* a la que acompañan en el mismo operón, no siendo intercambiables (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010).

En procariotas, la mayoría de los genes se expresan en operones, lo que permite regular la expresión génica de una forma compacta reduciendo el número de promotores, factores de transcripción y otros elementos regulatorios necesarios (Price *et al.*, 2006; Touchon y Rocha, 2016). Los genes en operones suelen codificar proteínas que interaccionan físicamente o que poseen funciones relacionadas, por ejemplo, proteínas que interactúan o que participan en una misma ruta metabólica. Han sido muchas las hipótesis que se han propuesto para explicar porqué los genes se organizan en operones, sin embargo, la comunidad científica todavía no ha obtenido una respuesta definitiva (Ray y Igoshin, 2012; Touchon y Rocha, 2016). En un trabajo paralelo se ha descrito que los operones similares a *lod* y *gox* presentan un patrón general en el que el gen similar a *lodA* va seguido del gen similar a *lodB* (Chacón-Verdú,

2015). Sin embargo, se han detectado algunas modificaciones a este patrón. Por ejemplo, los genes similares a *lodA* y *lodB* se encuentran separados por un pequeño gen adicional en el operón detectado en *Bradyrhizobium japonicum* USDA6, que además contiene otro tipo de genes que podrían corresponder a hipotéticas tirosinasas y MCOs. En otros casos, como por ejemplo en *Gymnopus luxurians*, el gen similar a *lodB* se encuentra orientado en sentido inverso al gen similar a *lodA* (Chacón-Verdú, 2015).

El análisis filogenético de las proteínas similares a LodA/GoxA permitió establecer cinco grupos cuyos miembros poseen una similitud estadísticamente relevante, mientras que algunas de las proteínas analizadas no pudieron ser asociadas a ningún grupo taxonómico concreto de los propuestos (fig. IV.39).

El grupo IA de proteínas similares a LodA (fig. IV.40) incluye a LodA y AlpP, proteínas con actividad lisina oxidasa y capacidad antimicrobiana debida a la generación de peróxido de hidrógeno (James *et al.*, 1996; Lucas-Elío *et al.*, 2005). Este subgrupo también incluye otra proteína con actividad antimicrobiana sintetizada por *P. flavipulchra* JG1, PfaP, cuyo sustrato todavía no se ha descrito (Yu *et al.*, 2012). Es interesante comentar que *Rheinheimera aquatica* GR5 sintetiza una proteína con actividad lisina oxidasa que posee un péptido de 19 residuos similar a AlpP y LodA (Chen *et al.*, 2010b). Ese fragmento es también similar al producto del locus Rhein_1334 de *Rheinheimera* sp. A13L, que también pertenece al subgrupo IA (fig. IV.40). Aunque todavía no se ha demostrado, la actividad lisina oxidasa observada en los cultivos de *Marinomonas* sp. MWYL1 puede ser producida por su proteína similar a LodA que también está presente en el subgrupo IA (tabla IV.10). Estas observaciones sugieren que las proteínas similares a LodA del subgrupo IA puede que sean enzimas con actividad lisina oxidasa, lo que les conferiría capacidad antimicrobiana.

Otras proteínas con actividad antimicrobiana debida a la generación de peróxido de hidrógeno son las proteínas similares a LodA de *C. crescentus* y *C. violaceum*, que están presentes en los subgrupos IB y IC respectivamente (Mai-Prochnow *et al.*, 2008) (fig. IV.41). Se han llevado a cabo ensayos de actividad oxidasa empleando diferentes

sustratos con cultivos de estos dos microorganismos, así como con *Marinomonas* sp. MED121 (que posee una proteína similar a LodA en el subgrupo IB) y *Saccharophagus degradans* 2-40 (con una proteína similar a LodA en el subgrupo ID), aunque hasta el momento no se ha conseguido detectar la producción de peróxido de hidrógeno en las condiciones ensayadas (tabla IV.10). Una interpretación de este resultado es que los medios de cultivo empleados para dichos microorganismos no permitan expresar de forma significativa la posible actividad AO. En este sentido, hay que tener en cuenta que las actividades LOD y GOX se inducen en medios mínimos (Molina-Quintero, 2011) (fig. IV.31) y que ciertos compuestos pueden regular de forma negativa la expresión de la actividad, como es el caso de la L-Tyr que inhibe dichas actividades (apartado IV.3.1.3). En próximos experimentos sería interesante modificar las condiciones de cultivo de estos microorganismos intentando obtener medios mínimos en los cuales presumiblemente las actividades AO fueran expresadas. No obstante, aunque se detectara actividad AO en estos microorganismos, habría que realizar un estudio más exhaustivo para poder demostrar que las proteínas propuestas son responsables de las actividades observadas, por ejemplo, mediante experimentos de delección y complementación, así como de expresión recombinante de las proteínas similares a LodA.

Por su parte, el grupo II de proteínas de la familia LodA posee una gran importancia en este trabajo pues alberga la proteína objeto de estudio, GoxA (fig. IV.42). Los resultados obtenidos en esta memoria demuestran que las bacterias *Nisaea denitrificans* y *Thalassobaculum salexigens*, que poseen genes similares a *goxA*, expresan actividad glicina oxidasa (fig. IV.46 y IV.47). Esta observación sugiere que probablemente las proteínas de este grupo tengan actividad glicina oxidasa, afirmación que apoya nuestra hipótesis de que los distintos grupos taxonómicos contienen enzimas con diferentes actividades enzimáticas. La actividad GOX observada en *N. denitrificans* y *T. salexigens* comparte ciertas características con GoxA y LodA de *M. mediterranea*, como por ejemplo que están reprimidas en medios ricos con respecto a medios más pobres en nutrientes (fig. IV.47). Esto indica que, posiblemente, las proteínas de la familia LodA comparten mecanismos regulatorios comunes. Otra característica común es que estas proteínas son precipitables con etanol, lo que

sugiere una estructura estable y resistente que puede estar relacionada con la presencia del cofactor quinónico CTQ.

Es preciso aclarar que de los tres genes similares a *goxA* detectados en los genomas de *N. denitrificans* (*ndgoxA*) y *T. salexigens* (*tsgox1A* y *tsgox2A*), sólo se ha podido demostrar que codifica una glicina oxidasa en el caso de *tsgox2A* (fig. IV.49A). A pesar de las distintas condiciones de inducción ensayadas (tabla IV.8), no se consiguió detectar actividad GOX, ni ninguna otra actividad aminoácido oxidasa, asociada a NdGoxA o TsGox1A. Una posible interpretación es que no hayamos sido capaces de conseguir expresar correctamente la flavoproteína compañera, o que ésta no sea capaz de modificar a la quinoproteína para generar el cofactor en las condiciones ensayadas.

Es interesante comentar que, en la expresión de la proteína recombinante TsGox2A (G578DRAFT_3226, número de acceso WP_028795812), la coexpresión de las chaperonas groEL y groES mejora notablemente la actividad obtenida (fig. IV.50B). El empleo de estas chaperonas ya se había descrito en la bibliografía para mejorar la expresión recombinante de diversas enzimas como la tiocianato hidrolasa de la alfa proteobacteria THI201 o la nitrilo hidratasa de *Comamonas testosteroni* (Hussain *et al.*, 2013; Stevens *et al.*, 2003). Cabe destacar que ciertas chaperonas pueden unirse al péptido señal de las Twin-Argininas antes del plegamiento de las proteínas que van a ser transportadas por el sistema TAT (Frobel *et al.*, 2012). En este sentido, una posibilidad es que TsGox2A, que contiene el péptido señal TAT, pueda ver mejorado su plegamiento por la sobreexpresión de las chaperonas empleadas.

Por otra parte, la similitud de secuencia entre GoxA y TsGox2A parece reflejar características comunes cuando comparamos ambas proteínas expresadas recombinantemente. Algunas de estas propiedades las diferencian del resto de glicina oxidasas descritas (apartado IV.4.4.1.5). Por un lado, ambas proteínas son específicas de Gly, sólo oxidando en menor medida a la Gly-etil-éster, y además, presentan un valor de Km muy similar (0,86 y 0,77 mM). Por otro lado, el ensayo con inhibidores de

quinoproteínas, así como el estudio del modelo tridimensional, indica que TsGox2A es una quinoproteína con cofactor CTQ.

El grupo II es también un ejemplo de los distintos procesos evolutivos que han podido sufrir las proteínas similares a LodA a lo largo del tiempo. Por un lado, un evento de duplicación génica parece el proceso más probable que ha originado las dos proteínas de *Thalassobaculum salexigens* presentes en este grupo (apartado IV.4.3.2). Por otro, GoxA parece haber sido obtenida mediante un proceso de transferencia horizontal de genes a partir de una alfa proteobacteria, según los resultados presentados en el apartado IV.4.3.2. De una forma similar pudo haber adquirido la beta proteobacteria *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* el gen que codifica su proteína similar a LodA, ya que guarda un 74,1 % de identidad y un 84,2 % de similitud con la proteína similar a LodA de la alfa proteobacteria *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. Además, esta transferencia podría haber ocurrido evolutivamente hace mucho tiempo, pues ninguno de los genes que codifican estas dos proteínas presentan diferencias significativas en el contenido GC respecto al genoma de los microorganismos que las sintetizan (tabla IV.7) (Brown, 2003).

Con respecto al resto de grupos filogenéticos de proteínas similares a LodA, cabe destacar que no albergan ninguna proteína que haya sido caracterizada hasta la fecha. El grupo III incluye proteínas de una gran variedad de microorganismos pertenecientes a numerosas clases, lo que sugiere un origen evolutivo antiguo (fig. IV.43). Este grupo incluye Marme_2396 (*xoA*), el tercer gen de la familia *lodA* presente en *M. mediterranea* (Lucas-Elío *et al.*, 2012b). A pesar de que se han realizado experimentos con la cepa LGD, que posee delecionados *lodA* y *goxA*, hasta ahora no han sido posible identificar su posible actividad enzimática (tabla IV.10). El IV es un grupo pequeño que contiene solo 9 miembros, en el que destacan las proteínas pertenecientes a las alfa proteobacterias del orden *Rhizobiales* (fig. IV.44). Por último, el grupo V contiene los cinco genes detectados en eucariotas (fig. IV.45) incluyendo las dos copias presentes en *Gymnopus luxurians* que posiblemente procedan de un evento de duplicación génica (apartado IV.4.3.5).

M. mediterranea MMB-1 y *Pseudoalteromonas citrea* NCIMB 1889 son los únicos microorganismos que poseen 3 copias de genes similares a *lodA*. Curiosamente, los genes de la familia *lodA* son abundantes en ambos géneros, ya que en el género *Marinomonas*, cuatro de los cinco genomas secuenciados contienen este tipo de genes, con un total de 6 copias, mientras que en el género *Pseudoalteromonas* en torno al 50 % de las cepas secuenciadas muestran genes de la familia *lodA*, siendo claramente el género que mayor número de copias alberga con un total de 19. De forma llamativa, las 3 copias de genes similares a *lodA* se encuentran distribuidas en los mismos grupos filogenéticos (I, II y III) en ambos microorganismos (tabla IV.5). Esta observación sugiere que las proteínas codificadas por estos genes puede que actúen sobre sustratos diferentes, cumpliendo así funciones complementarias y no redundantes. De hecho, las proteínas que realizan funciones redundantes suelen proceder de duplicaciones génicas y suelen estar reguladas por mecanismos distintos con el fin de conseguir un mayor control sobre su expresión (Kafri *et al.*, 2009). Sin embargo, como ya se ha comentado, la presencia de GoxA en *M. mediterranea* parece ser consecuencia de un evento de transferencia horizontal de genes y, además, *LodA* y *GoxA* comparten mecanismos regulatorios comunes.

Hay que destacar que, hasta la fecha, todas las AOs descritas con capacidad antimicrobiana son sintetizadas por proteobacterias marinas, con excepción de la de *Aquimarina* sp. antisso-27, perteneciente al phylum *Bacteroidetes* (Chen *et al.*, 2011). La mayoría de ellas pertenecen a bacterias del género *Pseudoalteromonas*. AlpP es sintetizada por *P. tunicata* D2 y PfaP por *P. flavipulchra* JG1 (Yu *et al.*, 2012). Las proteínas con actividad LAO de amplio espectro de *Pseudoalteromonas flavipulchra* C2 y *Pseudoalteromonas luteoviolacea* todavía no se han clonado (Chen *et al.*, 2010a; Gómez *et al.*, 2008). Tampoco se han identificado las LAOs descritas en *Rheinheimera aquatica* GR5 (Chen *et al.*, 2010b) y *Aquimarina* sp. antisso-27 (Chen *et al.*, 2011). Una observación interesante es que todas las LAOs antimicrobianas descritas parecen ser quinoproteínas, puesto que pertenecen a la familia *LodA* o presentan similitud de secuencia con éstas (apéndice A.1). La única excepción descrita hasta el momento es la LAO de *Pseudoalteromonas* sp. B3 que contiene cofactor FAD (Yu *et al.*, 2014b). Esta enzima presenta homología con las L-aspartato oxidasas (LASPOs, EC 1.4.3.16),

LAOs de gasterópodos

- L-phenylalanine oxidase* P501 BAD66877
- LAO monooxygenase* Pseudomonas sp. T1010
- Triptofano oxidase* BAO51829
- Pseudomonas savastanoi* TMO
- L-tryptophan oxidase* V101
- Chromobacterium violaceum* C953V1
- Sarcosine oxidase* Bacillus sp. B-0618 BAA03867
- Aminooacetone oxidase* EDP07010
- Streptococcus oligofermentans* ACA52024
- Pindina nucleotid-disulfuro oxidoreductase* WP_045773325
- Streptococcus sanguinis* O3161
- Glicina oxidase* Bacillus subtilis
- Glicina oxidase* Geobacillus kaustophilus BAD74908

LAOs de hongos

- LAO Rhodococcus opacus* AAL14831
- L-glutamate oxidase* Streptomyces sp. AAK15071
- L-glutamate oxidase* Streptomyces sp. X-199-6 BAB93449
- L-tryptophan oxidase* StaO Streptomyces sp. TP-A0274 BAC55210
- Lechevalieria aerocolonigenes* BAC15750

LAOs de vertebrados

- Rhodococcus erythropolis* PR-4 BAH35117
- Putrescine oxidase* PCC6301 CAAB8452

Quinoproteínas de la familia Loda

LASPOs

DAOs

0.1

222

En este análisis se incluyeron las proteínas cuyo gen ha sido clonado y que presentan actividad L-aminoácido oxidasa tanto de origen microbiano (detalladas en apéndice A.1) como de organismos superiores (apéndice A.5), así como las proteínas más características con actividad D-aminoácido oxidasa (apéndice A.6). La figura V.3 muestra que es posible diferenciar seis grupos estadísticamente significativos. Entre ellos, podemos identificar claramente los que contienen las proteínas de la familia LodA, las proteínas con actividad L-aspartato oxidasa (LASPOs) y las D-aminoácido oxidasas (DAOs) (apéndice A.7). También están diferenciados los grupos que albergan las LAOs presentes en hongos, en gasterópodos y en vertebrados (apéndice A.8). Por otro lado, varias proteínas empleadas en el análisis no pudieron ser incluidas en ninguno de estos grupos (fig. V.3).

En general, los datos expuestos en esta memoria confirman el hecho de que estamos frente a una nueva familia de enzimas que poseen cofactor quinónico y oxidan aminoácidos. Además, esta familia de quinoproteínas ha evolucionado de una manera independiente al resto de proteínas con actividad aminoácido oxidasa (fig. V.3). Dentro de esta familia, los diferentes grupos filogenéticos descritos pueden presentar distintas actividades enzimáticas. Así pues, las proteínas con mayor relación filogenética con LodA poseen actividad lisina oxidasa, como es el caso de AlpP de *P. tunicata* (Mai-Prochnow *et al.*, 2008), o muy probablemente sean responsables de dicha actividad, como es el caso de la proteína similar a LodA en *Marinomonas* sp. MWYL1. Por otra parte, las proteínas más similares a GoxA tendrán actividad GOX, como puede ser el caso de la proteína sintetizada por *N. denitrificans*, o más concretamente, como se ha demostrado para TsGox2A de *T. salexigens*. Estas observaciones también confirman la posibilidad de que los operones similares a *lod* y *gox* pertenecientes a otros clusters en diversos genomas bacterianos sean un reservorio de nuevas oxidasas no descritas hasta la fecha y cuyo estudio será de gran interés en un futuro para determinar las relaciones estructura-función de esta familia que puedan derivar en aplicaciones biotecnológicas.

VI. Conclusiones

La realización de este trabajo ha aportado las siguientes conclusiones principales:

1. Se ha identificado y caracterizado en *M. mediterranea* una nueva proteína con actividad glicina oxidasa (GOX) que ha sido denominada GoxA y que posee similitud de secuencia con la L-lisina épsilon-oxidasa (LodA) también sintetizada por dicho microorganismo. La actividad GOX supone la oxidación del aminoácido glicina para generar glioxilato, amonio y peróxido de hidrógeno.
2. GoxA es una proteína novedosa que difiere de las glicina oxidasas convencionales en cuanto a sus especificidad de sustrato y naturaleza del cofactor. Por un lado, es muy específica del aminoácido glicina y, por otro, no une FAD sino que posee un cofactor quinónico de tipo cisteína triptofilquinona (CTQ).
3. El cofactor CTQ de GoxA está formado por modificación post-traducciona de los residuos Cys-551 y Trp-566 de la misma proteína. Además, el aspártico implicado en la síntesis del cofactor CTQ de LodA está conservado en GoxA (Asp-547), sugiriendo un mecanismo similar de generación del cofactor en ambas proteínas.
4. GoxA está codificada por el gen *goxA* que forma parte de un operón junto a *goxB*, gen que codifica una flavoproteína necesaria para generar GoxA activa. En este trabajo se ha identificado el inicio de la transcripción así como la región promotora del operón *gox*, la cual contiene posibles elementos regulatorios.
5. El operón *gox* está regulado a nivel transcripcional por fase de crecimiento. Determinados compuestos regulan la expresión de dicho operón. Mientras que la L-lisina induce a nivel post-transcripcional la secreción de ciertas proteínas a los sobrenadantes, entre las que se encuentra la glicina oxidasa, la L-tirosina reprime transcripcionalmente, y en parte también post-transcripcionalmente, la expresión del operón *gox*. Por otro lado, se ha demostrado que las proteínas reguladoras PpoS y PpoR, que regulan las actividades oxidasa de *M.*

mediterranea, también intervienen en la regulación de la actividad GOX a nivel transcripcional.

6. No se ha conseguido determinar la función fisiológica que cumple la actividad GOX en *M. mediterranea*. Por un lado, no se han encontrado evidencias de que GoxA esté relacionada con la biosíntesis de tiamina, rol fisiológico propuesto para la Gox de *B. subtilis* y *G. kaustophilus*. Por otro lado, las curvas de crecimiento de las cepas LD y LGD en diferentes medios de cultivo indican que GoxA tampoco interviene en el metabolismo de la glicina.
7. El operón *gox* ha sido expresado recombinantemente en varias cepas de *E. coli*. Se han optimizado las condiciones de inducción y se ha conseguido expresar GoxA fusionada a una cola de poli-histidinas en N-terminal sin pérdida aparente de actividad, lo que ha permitido su purificación y caracterización. Los resultados indican que la proteína nativa y recombinante poseen características similares.
8. Se ha detectado actividad glicina oxidasa en los microorganismos *N. denitrificans* y *T. salexigens*. En este último, se ha demostrado que la actividad GOX es debida a una proteína similar a GoxA, TsGox2A. Ambas proteínas comparten propiedades bioquímicas como la especificidad de sustrato, la presencia de cofactor CTQ y ciertos mecanismos regulatorios como su inducción en medios mínimos, indicando que son proteínas muy similares.
9. Las proteínas similares a LodA/GoxA (familia de proteínas LodA) están ampliamente distribuidas en diferentes grupos microbianos, lo que sugiere un origen evolutivo antiguo. Los diferentes grupos filogenéticos descritos en este trabajo pueden presentar distintas actividades enzimáticas. Las proteínas de la familia LodA muestran ciertos dominios y residuos conservados, entre los que destacan la cisteína y el triptófano que forman parte del cofactor CTQ en LodA. Además, están codificadas por genes que forman parte de un operón junto a un segundo gen que codifica una hipotética flavoproteína similar a LodB/GoxB.

- 10.** En general, los datos expuestos en esta memoria demuestran la existencia de una nueva familia de quinoproteínas con actividad oxidasa que han evolucionado de una manera independiente al resto de proteínas descritas con actividad aminoácido oxidasa. Este trabajo supone una plataforma para estudiar el mecanismo de modificación post-transcripcional implicado en la formación del cofactor CTQ, así como para explorar las posibles nuevas actividades de las proteínas similares a LodA/GoxA cuyo estudio puede derivar en novedosas aplicaciones biotecnológicas.

VII. Summary and Conclusions

Identification and Characterization of a Glycine Oxidase in *Marinomonas mediterranea* Belonging to a New Family of Quinoproteins.

VII.1. Background.

In a broad sense, amino acid oxidases (AOs or AAOs) can be described as enzymes that oxidize amino acids releasing ammonium and hydrogen peroxide. The most studied AOs are the L-amino acid oxidases (LAOs or LAAOs; EC 1.4.3.2), which are flavoproteins that catalyze the stereospecific oxidative deamination of L-amino acids in the alpha position releasing the corresponding keto acid, in addition to ammonium and hydrogen peroxide (Macheroux *et al.*, 2011; Pollegioni *et al.*, 2013). The generation of hydrogen peroxide gives to these enzymes antimicrobial properties that have been related to different physiological processes. Some of these functions include their use as biocontrol agents in fungi against microbial competitors (Yang *et al.*, 2011a; Yang *et al.*, 2011b), protection of fish skin from bacterial infections (Kitani *et al.*, 2007) and participation in the human immune system (Puiffe *et al.*, 2013). LAOs are distributed in many biological groups. The best characterized members of this family have been studied in snake venoms (Izidoro *et al.*, 2014; Zuliani *et al.*, 2009). Additionally, several enzymes with LAO activity have also been described in a wide variety of organisms such as bacteria, fungi, algae, plants, insects, molluscs, fishes and mammals, including humans (Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013; Singh, 2014; Yu and Qiao, 2012).

LAOs are of great biotechnological interest in different applications such as the design of biosensors, biotransformations and biomedicine (Ehara *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2014; Pollegioni *et al.*, 2013; Singh, 2014). However, in some cases their use is limited by the difficulties of their recombinant expression (Pollegioni *et al.*, 2013). The study of LAOs is relevant in other fields in addition to biotechnology. For instance, the unraveling of novel metabolic pathways of amino acids is of great interest since, apart from their essential roles in primary metabolism, these pathways could be also related

to the secondary metabolism in processes such as the synthesis of pigments, antibiotics, etc.

The marine bacterium *Marinomonas mediterranea* synthesizes LodA, the first enzyme described with L-lysine epsilon-oxidase activity (EC 1.4.3.20) (Gómez *et al.*, 2006). LodA is not a flavoprotein but contains a cysteine tryptophylquinone (CTQ) cofactor generated by the post-translational modification of two residues in the same protein (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Okazaki *et al.*, 2013). The CTQ quinone cofactor had been previously described in the quinoxinoprotein amine dehydrogenases (QHNDH) synthesized by *Paracoccus denitrificans* (Datta *et al.*, 2001) and *Pseudomonas putida* (Vandenberghe *et al.*, 2001). LodA is encoded by the *lod* operon that contains a second gene coding for LodB, a protein required for the post-translational modification generating the quinone cofactor (Chacón-Verdú *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2010). It has been proposed that LodA is involved in biofilm development and dispersal through hydrogen peroxide generation. The same role was described for proteins with sequence similarity to LodA, such as the *Pseudoalteromonas tunicata* autolytic protein AlpP and the LodA-like proteins from *Chromobacterium violaceum* and *Caulobacter crescentus* (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

Genome sequencing of *M. mediterranea* has revealed that it contains two additional operons encoding proteins with sequence similarity to LodA (Lucas-Elío *et al.*, 2012b). The characterization of the LD mutant of *M. mediterranea*, a strain with *lod* deletion, indicated that it lacks lysine oxidase activity, suggesting that these other genes similar to *lodA* must be encoding different enzymes. Furthermore, BLAST analysis revealed that genes similar to *lodA*, which are annotated to encode hypothetical proteins with unknown function, can be detected in different microbial genomes. Those observations represent the starting point of this study.

Taking into account that LodA is a new enzyme with biochemical characteristics different from conventional LAOs, the main goal of this work has been to study whether operons similar to *lod*, detected in *M. mediterranea* as well as in other microbial genomes, could encode novel enzymes with amino acid oxidase activity.

VII.2.Results and Discussion.

VII.2.1. Identification and characterization in *M. mediterranea* of a novel glycine oxidase.

In a preliminary screening, an antimicrobial activity was observed in *M. mediterranea* LD (Δlod) supernatants. The inhibition by catalase of that activity suggested that hydrogen peroxide was involved. Later, the generation of hydrogen peroxide was confirmed by a fluorometric assay, when glycine was used as substrate. The activity was specific for this amino acid, as no other proteinogenic amino acid could be oxidized. In *M. mediterranea* LD supernatants, ammonium production associated to the oxidation of glycine was detected spectrophotometrically by the method of the glutamate dehydrogenase-coupled assay (Job *et al.*, 2002). These results indicated the presence of an enzyme with glycine oxidase activity (GOX). Glycine oxidases (Gox; EC 1.4.3.19) have been previously described in microorganisms of the genera *Bacillus* (Nishiya and Imanaka, 1998; Zhan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016), *Geobacillus* (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b) and *Pseudomonas* (Equar *et al.*, 2015). They are flavoproteins that catalyze the oxidative deamination of glycine generating glyoxylate, hydrogen peroxide and ammonium. They show similarity in sequence and substrate range with other flavoproteins such as D-amino acid oxidases (DAOs or DAAOs; EC 1.4.3.3) and sarcosine oxidases (SOX; EC 1.5.3.1), although these last enzymes are not able to oxidize glycine and the former only show low activity on that amino acid (Molla *et al.*, 2003). Bioinformatic analysis showed that genes similar to those encoding Gox, DAO or SOX were not detected in *M. mediterranea* genome. Therefore, a different protein was responsible for the GOX activity observed in LD supernatants.

To identify the protein with GOX activity, concentrated supernatants of LD strain were run under SDS-PAGE in the nondenaturing conditions previously described for LodA (Lucas-Elío *et al.*, 2005). In those conditions, the antimicrobial and GOX activity were

detected between 170-130 kDa. This fragment was excised, trypsin digested, subjected to HPLC-MS/MS and analyzed against *M. mediterranea* genome. It was observed that several peptides matched the predicted product of the gene Marme_1655. Marme_1655 and the adjacent gene Marme_1654 show similarity to *lodA* and *lodB* respectively, suggesting that they also constitute an operon. To confirm that these genes form an operon we carried out a RT-PCR, which showed that no other neighbor gene belonged to the same transcriptional unit. In addition, we identified the transcription start site through 5'-RACE and the putative promoter of this operon. To demonstrate that this operon encodes the glycine oxidase, a mutant strain called LGD with a deletion of Marme_1655 and Marme_1654 was created by double recombination. This deletion determined the complete loss of GOX activity. In addition, GOX activity was recovered when the strain with the deletion was complemented by reintroducing the two genes. These results demonstrated that the operon encoded the glycine oxidase. Accordingly, the operon was named *gox*, for glycine oxidase, and the two genes *goxA* and *goxB*.

The predicted molecular mass of GoxA (accession number ADZ90918) is ~76 kDa containing 680 aa. GOX activity was observed between 170-130 kDa in the SDS-PAGE of the supernatants, suggesting that the enzyme is probably synthesized as a dimer. This possibility has been confirmed by recent studies (Sehanobish *et al.*, 2016). The molecular mass and amino acid length of GoxA are higher than those from the Gox synthesized by *Bacillus* (~42 kDa and 369 aa), *G. kaustophilus* (~43 kDa and 377 aa) and *Pseudomonas putida* (~39 kDa and 365 aa). Another feature different from conventional Gox is that GoxA shows a typical twin-arginine signal peptide (Bendtsen *et al.*, 2005b), which could be related to its detection in the supernatants of the cultures.

According to EMBOSS-Needle (McWilliam *et al.*, 2013), GoxA shows 22.8 % identity and 34.6 % similarity to LodA. Although those values are not very high, GoxA possesses the same conserved regions previously described in LodA (Lucas-Elío *et al.*, 2006). In fact, sequence alignment of the sequences of LodA and GoxA, as well as a homology model of the structure of GoxA, strongly support that this protein contains the CTQ

cofactor too, which would be formed from modifications of Cys-551 and Trp-566. The Asp residue that is critical for CTQ biosynthesis in LodA is also conserved in GoxA, corresponding to residue Asp-547. Regarding GoxB (accession number ADZ90917), it shows 26 % identity and 42.8 % similarity to LodB. In GoxB sequence, we detected the dinucleotide binding motif (DBM) and the Rossmann fold (Bottoms *et al.*, 2002; Dym and Eisenberg, 2001; Vallon, 2000), indicating that GoxB is a flavoprotein. In other study of our group, it has been demonstrated that GoxB participates in the post-translation modification of the GoxA generating the CTQ cofactor (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

GoxA was characterized in terms of some biochemical properties showing novel characteristics in comparison with the glycine oxidases previously described. The analysis of the substrate range revealed that the *M. mediterranea* GoxA was more specific for glycine than any other Gox. In fact, the flavoprotein enzymes showed a higher activity on other substrates such as sarcosine (*B. subtilis*) or D-proline (*G. kaustophilus*) than on glycine. On the contrary, the *M. mediterranea* enzyme only showed 0.1 % and 0.3 % activity respectively on those two substrates. On the other hand, the GoxA K_m for Gly was 8.33 mM, which is higher than the value previously reported for Gly oxidation by the *Bacillus* and *Geobacillus* enzymes (0.22–0.99 mM) (Martínez-Martínez *et al.*, 2008b; Nishiya and Imanaka, 1998). Additionally, the study with quinoprotein inhibitors indicates that, similar to LodA, GoxA is sensitive to those compounds in agreement with having a quinone cofactor.

VII.2.2. Recombinant expression of the *gox* operon.

The heterologous expression of GoxA required the cloning of the whole *gox* operon since GoxB is necessary for the post-translational modification of GoxA (Chacón-Verdú *et al.*, 2015). Firstly, the *gox* operon was cloned into the vector pET11 (Novagen) and was successfully expressed in *E. coli* Rosetta [BL21(DE3)pRARE] when the conditions described for the correct expression of *lod* operon were used (Gómez, 2010). With

those conditions, GOX activity was obtained and both GoxA and GoxB were identified in SDS-PAGE in soluble fraction.

Secondly, we tested different combinations of temperature, time of induction and IPTG concentration to improve glycine oxidase expression. Finally, culture conditions were optimized resulting in 16 h of incubation with IPTG 0,5 mM and glucose 1 % at 15 °C. The strain used was *E. coli* CD03 which is a BL21(DE3) strain mutated in catalase activity. This mutation allows the detection of enzymatic activities releasing hydrogen peroxide in cell extracts (Kishishita *et al.*, 2003). Glucose was added to the cultures since it reduces basal expression levels of recombinant proteins in vectors containing *lac*-based promoters (Grossman *et al.*, 1998). Interestingly, using the previous conditions, we observed that the incubation of cell extracts at 25 °C increased GOX activity up to 10 times compared with the non-incubated samples. A possible explanation for this observation could be that some elements in the cell extracts may be involved in the generation of active GoxA.

GoxA was also expressed in the pET15 vector (Novagen) fused to a poly-His tag in its N-terminus that did not affect GOX activity. The poly-His tag allowed the purification of GoxA using columns with Ni-NTA resin (Qiagen). In the purification of GoxA, a band with a molecular mass compatible with GoxB was also co-purified. Trypsin digestion of this band and MALDI-TOF analysis confirmed that both proteins were co-purified, suggesting that GoxA and GoxB were forming a complex, probably related to the cofactor generation. MALDI-TOF analysis also showed two peptides of different sizes containing the modified Cys-551 and Trp-566 with a MM increase of + 28, as expected for the generation of the CTQ cofactor. This result confirmed that these residues form the CTQ cofactor in GoxA, as expected based on the analysis of the sequence similarity between GoxA and LodA.

The purification of the recombinant GoxA allowed its comparison with the native protein. While substrate range for both proteins was similar, the K_m obtained for Gly in the recombinant system was lower than the one observed for the native enzyme (0.77 mM). This result is probably due to impurities interfering with the measurements

in the native unpurified samples. On the other hand, similar to the native system, in the recombinant expression GOX activity was detected in a region located between 170-130 kDa.

VII.2.3. Regulation and physiological function of the *gox* operon.

The study of the regulation of the *gox* operon might shed light on the physiological role of the glycine oxidase in *M. mediterranea*. Thus, in this section we examined *gox* expression and its transcriptional regulation under different culture conditions, as well as its relation with PpoS and PpoR, two regulatory proteins that control the other oxidases (LodA, the laccase PpoA and the tyrosinase PpoB) synthesized by *M. mediterranea* (Molina-Quintero *et al.*, 2010; Molina-Quintero, 2011). PpoS is a hybrid sensor kinase (Lucas-Elío *et al.*, 2002), which shows a strong similarity to other sensor kinases that are highly conserved in *Gammaproteobacteria*, such as GacS or BarA (Lapouge *et al.*, 2008). PpoR is a response regulator similar to GacA or UvrY, proteins that participate with GacS or BarA respectively in the same phospho-relay system (Molina-Quintero, 2011).

GOX activity levels in the supernatants increased during the exponential growth phase, reaching a maximum at the beginning of the stationary phase. Transcriptional fusion of the *gox* promoter with *lacZ* revealed that this regulation took place at the transcriptional level, similarly to the other oxidases in *M. mediterranea* (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Regarding the role of PpoS and PpoR, the results obtained with strains T103 (PpoS-) and T102 (PpoR-) revealed that no activity was detected in these strains, indicating that both proteins regulate *gox* expression. The analysis of strains with transcriptional *lacZ* fusions showed that the regulation takes place at the transcriptional level.

Regarding media composition, GOX activity was higher when *M. mediterranea* was grown in mineral media than in nutrient-rich cultures. In this sense, we demonstrated

that media containing L-tyrosine repressed *gox* expression at both transcriptional and post-transcriptional level. Such effect of L-Tyr has been already reported for LOD activity but, in this case, the regulation was only at transcriptional level (Lucas-Elío *et al.*, 2005; Molina-Quintero, 2011). The TyrR protein of *E. coli* can act both as a repressor and as an activator of transcription, interacting with aromatic amino acids and recognizing the “TyrR boxes” in promoter sequences (Pittard *et al.*, 2005). Since we detected a homolog to TyrR in *M. mediterranea* genome (Marme_2488) and some plausible “TyrR boxes” in *gox* and *lod* promoters, we propose that TyrR regulon may be involved in L-Tyr repression of GOX and LOD activity in this bacterium.

On the other hand, it has been observed that the presence of L-lysine in minimal media induced at the post-transcriptional level the secretion of a group of proteins into the supernatants, being GoxA one of such proteins. This observation has been already described for LodA expression (Molina-Quintero *et al.*, 2010). Lysine riboswitches specifically control expression of genes predominantly involved in L-Lys metabolism and transport through the recognition of the so-called L box (Serganov and Patel, 2009). However, sequence analysis of *gox* operon did not reveal any sequence similarity to the above-mentioned L box (Chang *et al.*, 2009; Mukherjee and Sengupta, 2015). The molecular mechanism for the post-transcriptional regulation in the presence of L-Lys remains to be determined. LAOs from some fungi, such as *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, are also induced in the presence of amino acids and under nitrogen-limiting conditions (Davis *et al.*, 2005; Sikora and Marzluf, 1982). It has been proposed that the utilization of amino acids as nitrogen source is the major physiological function of fungal LAOs. Accordingly, they usually have a broad substrate range to be able to use distinct amino acids for growing. As discussed below, we have found no evidences of any role of GoxA in nitrogen metabolism.

Concerning the possible function of GoxA in physiological conditions, it has been demonstrated that Gox from *B. subtilis* (ThiO) participates in the biosynthesis of the thiazole moiety of the thiamin (vitamin B1) (Settembre *et al.*, 2003). The best-studied thiamin biosynthetic pathways for prokaryotes are those of *E. coli* and *B. subtilis*, which utilize very similar pathways but some distinct enzymes (Jurgenson *et al.*, 2009). The

enzymes involved in thiamin biosynthesis are co-regulated and encoded by the same operon in both microorganisms (Rodionov *et al.*, 2002). BLASTP analysis revealed that *M. mediterranea* possesses a thiamin biosynthetic operon similar to that in *E. coli*, but does not contain homologues to the thiamin biosynthetic genes, among them *thiO*, of *B. subtilis*. In addition, as previously mentioned, GoxA is encoded by the gene *goxA* that forms part of an operon only with a second gene, *goxB*, which codes for a flavoprotein necessary to generate active GoxA. These observations suggest that the enzyme with GOX activity in *M. mediterranea* is not required for thiamin synthesis.

Due to the structural and regulatory similarity of GoxA and LodA, it is important to mention that LodA and other similar proteins in other microorganisms play a role in microbial biofilm development through hydrogen peroxide generation. This compound causes cell death of part of the population and the release of the surviving cells, which can colonize new environments (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). In the *Pseudoalteromonas tunicata* autolytic protein AlpP, lysine oxidase activity was reported. However, in other cases, such as *Chromobacterium violaceum* and *Caulobacter crescentus*, although hydrogen peroxide was released, the substrate of the activity was not identified (Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Results of our group have shown that the *in vitro* antimicrobial effect of GoxA is much lower than the LodA effect. In fact, as already reported for other lysine oxidase activities (Ko *et al.*, 2008), the reaction catalyzed by LodA releases some unstable intermediates products that are related with the bactericidal activity (Carrasco-González, 2015). Based in these observations, it seems unlikely that GoxA might have any role in biofilm development related to its antimicrobial properties.

Finally, the evidences collected in experiments with *M. mediterranea* *gox*-deletion strain (LGD) and with Gly-supplemented minimal media indicated that GoxA is not involved in Gly metabolism. This amino acid can be used as nitrogen source, but not as the only source of carbon and energy. The growth curves of LGD strain compared with wild type indicated that *gox* presence is not essential in *M. mediterranea* for growing. Nevertheless, the existence in this microorganism of three similar proteins (LodA, GoxA and the product of the gene Marme_2396 with unknown activity) could indicate

that they play a complementary role. Further studies are necessary to better understand the physiological function of *gox* in *M. mediterranea*.

VII.2.4. Description of a new family of quinoproteins similar to LodA

The study of GoxA, a quinoprotein synthesized by *M. mediterranea* similar to LodA but with distinct enzymatic activity, suggests that proteins similar to LodA could constitute a reservoir of novel enzymes oxidizing different amino acids. The aim of this chapter has been to study the distribution of genes encoding proteins similar to LodA/GoxA in sequenced microbial genomes and to get insight into the evolution of this novel family of quinoproteins through phylogenetic analysis.

A BLASTP search was performed against sequenced microbial genomes deposited in the Integrated Microbial Genomes (IMG) database as of January 2014, using LodA and GoxA as query and a cut-off limit for the E-value of $1e-10$. As a result, we detected 168 genes encoding proteins named in this study as LodA-like proteins or belonging to the LodA family.

Most of genes encoding LodA-like proteins were observed in *Bacteria* (97 %). In this domain they were detected in, approximately, the 0.94 % of the genomes sequenced and showed an uneven distribution, with some microbial groups more represented than others. On the contrary, they were absent in *Archaea* and detected only in a small group of fungi of the class *Agaromycetes*. The 168 genes selected were distributed in 144 different microbial genomes since several microorganisms contained more than one copy. Only two marine gammaproteobacteria, *M. mediterranea* and *Pseudoalteromonas citrea*, showed three copies of those genes.

Noteworthy, no known human or animal pathogen contained genes of the *lodA* family. On the contrary, many microorganisms associated with plants showed in their genomes those genes. For example, they were detected in many symbiotic

Alphaproteobacteria such as *Bradyrhizobium*, and in certain *Gammaproteobacteria* associated with algae or plants such as *M. mediterranea*, which is a member of the microbiota of the seagrass *Posidonia oceanica* (Espinosa *et al.*, 2010). These observations suggest the possibility of an ecological role of this kind of enzymes in the interaction between the plant and its associated microbiota, or in the growth of the microorganisms on the surface of the plant. In this regard, it has been observed that in several microorganisms, these LodA-like proteins are involved in biofilm differentiation and dispersal (Mai-Prochnow *et al.*, 2008).

The vast majority of the genes encoding proteins of LodA family are detected in a genome region with a nearby *lodB*-like gene, suggesting a strong selective force to maintain the specific interaction between both partner proteins. Moreover, results from our group showed that each LodB-like protein might specifically be involved in the post-translational modification of its partner protein (Chacón-Verdú *et al.*, 2015).

Sequence alignment of the LodA-like proteins allowed the detection of several conserved residues. All these proteins showed a Cys and a Trp that aligned with the residues that are forming part of the cysteine tryptophilquinone (CTQ) cofactor in LodA and GoxA. Thus, this observation strongly suggests that proteins of the LodA-like family may all contain a CTQ quinone cofactor. The other residues conserved in these proteins could be involved in common processes to all of those proteins, being a possibility that they play a role in the generation of the quinone cofactor or in the catalytic activity of the enzymes.

Phylogenetic analysis of LodA-like proteins showed that most of them could be clustered in different groups. The fact that LodA and GoxA cluster in distinct phylogenetic groups, indicate that these groups may inform the enzymatic activity of the protein clusters. In this regard, *M. mediterranea* LodA and *P. tunicata* AlpP, both with LOD activity, clustered in group IA, which also contains a protein from *Marinomonas* sp. MWYL1. In this strain, lysine oxidase activity has been detected, although it has not been demonstrated yet that the LodA-like protein is responsible for that activity. Besides, this group enclosed a LodA-like protein from *Rheinheimera* sp.

A13L. Interestingly, it has been reported that *Rheinheimera aquatica* GR5 synthesizes a lysine oxidase, which has not been cloned, with a 19-peptide similar to AlpP and LodA (Chen *et al.*, 2010b). Overall, our results suggest that LodA-like proteins in the group IA may possess lysine oxidase activity.

Proteins that clustered in the phylogenetic group II, such as GoxA, seem to have glycine oxidase activity. The most similar proteins to GoxA are encoded by genes detected in the alphaproteobacteria *Nisaea denitrificans* and *Thalassobaculum salexigens*, containing one gene the former and two genes the latter. In fact, we demonstrated that both microorganisms show GOX activity, which shares with GoxA a similar substrate range and an induction of the activity in minimal growth conditions. Although these three LodA-like proteins were expressed in a recombinant system, GOX activity has been only detected in one of them, TsGox2A from *T. salexigens* (accession number WP_028795812). Its comparison with recombinant GoxA showed similar biochemical properties, such as a comparable K_m for Gly (0.86 mM), sensitivity to quinolone inhibitors and an activity increase after incubation of cell extracts.

The other proposed clusters contained LodA-like proteins that have not been characterized so far. Group III of LodA-like proteins includes a wide range of proteins detected in different microbial groups, what indicates an ancient evolutionary origin. This group also contains the product of Marme_2396, which is the third gene of the *lodA* family detected in *M. mediterranea*. As it has been previously described, the double mutant LGD with deletion of *lod* and *gox* operons lost both activities, suggesting that the product of Marme_2396 in group III possesses a different enzymatic activity. Nevertheless, we have not been able to identify its activity in this study. Group IV is a small one containing just 9 members, mostly belonging to the order *Rhizobiales*. The last phylogenetic group (V) consists of the five proteins whose encoding genes were detected in fungi, including the two copies detected in *Gymnopus luxurians*. The description of the products of those genes is of broad interest as it may help to understand the role of the other LodA-like proteins detected in many different bacterial genomes.

This work also showed that the LodA family of quinoproteins has evolved separately from the rest of enzymes reported with amino acid oxidase activity. According to their phylogenetic distribution, *lodA*-like genes seem to have an ancient origin since they are present in many different groups of bacteria. Their evolution in distinct genomes has possibly involved different processes. In some cases, such as the presence of *goxA* in *M. mediterranea*, a process of horizontal gene transfer could have taken place from an alphaproteobacterium. In others, such as *T. salexigens*, a genetic duplication event seems to be the most reasonable explanation.

In conclusion, this study provides a platform to analyze the enzymatic activity of novel LodA-like proteins which we consider to be a reservoir of novel enzymatic activities of potential biotechnological interest. In addition, this work will be very helpful to experimentally address structure-function studies in LodA-like proteins.

VII.3. Conclusions.

1. A new protein with glycine oxidase activity (GOX) has been identified and characterized in *M. mediterranea*. This enzyme was named GoxA and presents sequence similarity to the L-lysine epsilon-oxidase from the same microorganism. GoxA oxidizes glycine releasing glyoxylate, ammonium and hydrogen peroxide.
2. GoxA is a novel protein that differs from conventional glycine oxidases. It is much more specific for Gly and it does not bind FAD but contains a cysteine tryptophylquinone (CTQ) cofactor.
3. The CTQ cofactor in GoxA is generated by post-translational modification of the residues Cys-551 and Trp-566 in the same protein. In addition, the aspartic residue that is critical for CTQ biosynthesis in LodA is also conserved in GoxA,

corresponding to residue Asp-547. This observation suggests a similar mechanism of cofactor generation in both proteins.

4. GoxA is encoded by the *goxA* gene that forms part of an operon with a second gene, *goxB*, which codes for a flavoprotein necessary to generate the active form of GoxA. We identified the transcriptional start site of the *gox* operon, as well as its promoter, which exhibits potential regulatory elements.
5. GoxA expression shows growth phase regulation at the transcriptional level. Some compounds can regulate its expression. In one hand, L-lysine induces at the post-transcriptional level the secretion of certain proteins, including GoxA, to the supernatants. On the other hand, L-tyrosine represses *gox* operon expression both at the transcriptional and post-transcriptional levels. . Besides, it has been observed that PpoS and PpoR regulate at the transcriptional level the expression of *gox*.
6. The physiological function of GOX activity in *M. mediterranea* remains to be determined. No evidences were found to associate GoxA with glycine metabolism or thiamine biosynthesis, which is the role proposed for *B. subtilis* glycine oxidase.
7. *gox* operon has been successfully expressed in various *E. coli* strains. Conditions for induction were optimized. GoxA was expressed fused to a poly-His tag in its N-terminus. This tag, which did not affect GOX activity, has allowed the isolation and characterization of the recombinant enzyme. Our results show that both native and recombinant proteins share similar properties.
8. GOX activity has been detected in the alphaproteobacteria *N. denitrificans* and *T. salexigens*. In the latter, the activity was associated to TsGox2A, a protein similar to GoxA. Both GoxA and TsGox2A display similar characteristics, such as substrate specificity.

9. LodA-like proteins are widespread in many different groups of bacteria and in some fungi suggesting an ancient origin. Sequence alignment of the LodA family of proteins allowed the detection of several conserved domains and residues. These conserved residues included the Cys and Trp that are forming part of the CTQ cofactor in LodA and GoxA. Furthermore, LodA-like proteins are encoded by operons that contain a second gene similar to *lodB*, which can be involved in the correct expression of the associated LodA-like protein.
10. Our results have revealed the existence of a novel family of quinoproteins with oxidase activity that has evolved separately from the rest of the amino acid oxidases described. The different phylogenetic groups of LodA-like proteins proposed in this study may possess distinct enzymatic activities. This study provides a platform to explore the potentially novel enzymatic activities of the proteins detected, the mechanisms of post-translational modifications involved in their synthesis, their biological relevance, and biotechnological applications.

VIII. Bibliografía

- Ahn, M. Y., K. S. Ryu, Y. W. Lee and Y. S. Kim. (2000)** Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Arch Pharm Res.* 23: 477-481.
- Aitken, J. B., N. Naumovski, B. Curry, C. G. Grupen, Z. Gibb and R. J. Aitken. (2015)** Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. *Biol Reprod.* 92: 125.
- Akyilmaz, E., A. Erdogan, R. Ozturk and I. Yasa. (2007)** Sensitive determination of L-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Biosens Bioelectron.* 22: 1055-1060.
- Alexeyev, M. F. and I. N. Shokolenko. (1995)** Mini-Tn10 transposon derivatives for insertion mutagenesis and gene delivery into the chromosome of gram-negative bacteria. *Gene.* 160: 59-62.
- Amano, M., H. Mizuguchi, T. Sano, H. Kondo, K. Shinyashiki, J. Inagaki, T. Tamura, T. Kawaguchi, H. Kusakabe, K. Imada and K. Inagaki. (2015)** Recombinant expression, molecular characterization and crystal structure of antitumor enzyme, L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. *J Biochem.* 157: 549-559.
- Ande, S., H. Fussi, H. Knauer, M. Murkovic, S. Ghisla, K. Fröhlich and P. Macheroux. (2008)** Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Yeast.* 25: 349-357.
- Arima, J., C. Sasaki, C. Sakaguchi, H. Mizuno, T. Tamura, A. Kashima, H. Kusakabe, S. Sugio and K. Inagaki. (2009)** Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. *FEBS J.* 276: 3894-3903.
- Arima, J., T. Tamura, H. Kusakabe, M. Ashiuchi, T. Yagi, H. Tanaka and K. Inagaki. (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.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede. (2006)** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 22: 195-201.
- Bai, X., Q. Lai, C. Dong, F. Li and Z. Shao. (2014)** *Marinomonas profundimaris* sp. nov., isolated from deep-sea sediment sample of the Arctic Ocean. *Antonie van Leeuwenhoek.* 106: 449-455.
- Balibar, C. J. and C. T. Walsh. (2006)** In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA–E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry.* 45: 15444-15457.

- Baumann, L., P. Baumann, M. Mandel and Allen R.D. (1972)** Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol.* 110: 402-429.
- Begley, T. P., S. E. Ealick and F. W. McLafferty. (2012)** Thiamin biosynthesis - still yielding fascinating biological chemistry. *Biochem Soc Trans.* 40: 555-560.
- Bendtsen, J. D., L. Kiemer, A. Fausboll and S. Brunak. (2005a)** Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5: 58.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer and S. Brunak. (2005b)** Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics.* 6: 167.
- Bhunia, A. K., M. C. Johnson and B. Ray. (1987)** Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J Indust Microbiol.* 2 : 319-322.
- Bifulco, D., L. Pollegioni, D. Tessaro, S. Servi and G. Molla. (2013)** A thermostable L-aspartate oxidase: a new tool for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 7285-7295.
- Bohmer, A., A. Muller, M. Passarge, P. Liebs, H. Honeck and H. G. Muller. (1989)** A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. *Eur J Biochem.* 182: 327-332.
- Bollinger, J. A., D. E. Brown and D. M. Dooley. (2005)** The formation of lysine tyrosylquinone (LTQ) is a self-processing reaction. Expression and characterization of a *Drosophila* lysyl oxidase. *Biochemistry.* 44: 11708-11714.
- Bossi, R. T., A. Negri, G. Tedeschi and A. Mattevi. (2002)** Structure of FAD-bound L-aspartate oxidase: insight into substrate specificity and catalysis. *Biochemistry.* 41: 3018-3024.
- Bottoms, C. A., P. E. Smith and J. J. Tanner. (2002)** A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. *Protein Sci.* 11: 2125-2137.
- Boulland, M. L., J. Marquet, V. Molinier-Frenkel, P. Moller, C. Guiter, F. Lasoudris, C. Copie-Bergman, M. Baia, P. Gaulard, K. Leroy, F. Castellano and M. JIMBO. (2007)** Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood.* 110: 220-227.
- Bouvrette, P. and J. H. T. Luong. (1994)** Purification and further characterization of an L-phenylalanine oxidase from *Morganella morganii*. *Appl Biochem Biotechnol.* 48: 61-74.
- 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., J. M. Kim and R. D. Schmid. (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.
- Brazilian National Genome Project Consortium. (2003)** The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 11660-11665.
- Brearley, G. M., C. P. Price, T. Atkinson and P. M. Hammond. (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.
- Brown, J. R. (2003)** Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet.* 4: 121-132.
- Bruhn, J. B., K. F. Nielsen, M. Hjelm, M. Hansen, J. Bresciani, S. Schulz and L. Gram. (2005)** Ecology, inhibitory activity, and morphogenesis of a marine antagonistic bacterium belonging to the *Roseobacter* clade. *Appl Environ Microbiol.* 71: 7263-7270.
- Burchard, R. P. and M. L. Sorongon. (1998)** A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4079-4083.
- Butzke, D., R. Hurwitz, B. Thiede, S. Goedert and T. Rudel. (2005)** Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. *Toxicon.* 46: 479-489.
- Caldinelli, L., M. Pedotti, L. Motteran, G. Molla and L. Pollegioni. (2009)** FAD binding in glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie.* 91: 1499-1508.
- Carrasco-González, A. (2015)** Caracterización enzimática y propiedades antimicrobianas de distintas L-aminoácido oxidasas. Tesis de Master. Universidad de Murcia.
- Chacón-Verdú, M. D. (2015)** Estudio de la lisina-épsilon-oxidasa LodA sintetizada por *M. mediterranea*. Papel de la flavoproteína LodB en la generación del cofactor quinónico de LodA mediante modificación post-traducciona. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Chacón-Verdú, M. D., J. C. Campillo-Brocal, P. Lucas-Elío, V. L. Davidson and A. Sánchez-Amat. (2015)** Characterization of recombinant biosynthetic precursors of the cysteine tryptophylquinone cofactors of L-lysine epsilon-oxidase and glycine oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta.* 1854: 1123-1131.
- Chacón-Verdú, M. D., D. Gómez, F. Solano, P. Lucas-Elío and A. Sánchez-Amat. (2014)** LodB is required for the recombinant synthesis of the quinoprotein L-lysine-

- epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 2981-2989.
- Chaiyen, P. and N. S. Scrutton. (2015)** Special Issue: Flavins and Flavoproteins. *FEBS J*. 282: 3001-3003.
- Chang, T. H., H. D. Huang, L. C. Wu, C. T. Yeh, B. J. Liu and J. T. Horng. (2009)** Computational identification of riboswitches based on RNA conserved functional sequences and conformations. *RNA*. 15: 1426-1430.
- Chapman, S. K. and Reid, G. A. (1999)** Flavoprotein protocols en Methods in Molecular Biology. Editado por Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Chauhan, N., J. Narang, Sunny and C. S. Pundir. (2013)** Immobilization of lysine oxidase on a gold–platinum nanoparticles modified Au electrode for detection of lysine. *Enzyme Microb Technol*. 52: 265-271.
- Chen, C. Y., W. T. Wu, C. J. Huang, M. H. Lin, C. K. Chang, H. J. Huang, J. M. Liao, L. Y. Chen and Y. T. Liu. (2001)** A common precursor for the three subunits of L-glutamate oxidase encoded by *gox* gene from *Streptomyces platensis* NTU3304. *Can J Microbiol*. 47: 269-275.
- Chen, W. M., C. Y. Lin, C. A. Chen, J. T. Wang and S. Y. Sheu. (2010a)** Involvement of an L-amino acid oxidase in the activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Enzyme Microb Technol*. 47: 52-58.
- Chen, W. M., C. Y. Lin and S. Y. Sheu. (2010b)** Investigating antimicrobial activity in *Rheinheimera* sp. due to hydrogen peroxide generated by L-lysine oxidase activity. *Enzyme Microb Technol*. 46: 487-493.
- Chen, W. M., F. S. Sheu and S. Y. Sheu. (2011)** Novel L-aminoacid oxidase with algicidal activity against toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* synthesized by a bacterium *Aquimarina* sp. *Enzyme Microb Technol*. 49: 372-379.
- Chimetto, L. A., I. Cleenwerck, M. Brocchi, A. Willems, P. De Vos and F. L. Thompson. (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.
- Christiansen, L. and Budolfson, G. (2002)** Preparation of baked product from dough. Patent US 6890570 B2.
- Clark, W. T. and P. Radivojac. (2011)** Analysis of protein function and its prediction from amino acid sequence. *Proteins*. 79: 2086-2096.

- Corpet, F. (1988)** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res.* 16: 10881-10890.
- Costa, T., S. Burin, D. Menaldo, F. Castro and V. Sampaio. (2014)** Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 20: 23.
- Coudert, M. (1975)** Characterization and physiological function of a soluble L-amino acid oxidase in *Corynebacterium*. *Arch Microbiol.* 102: 151-153.
- Crowley, D. J., I. Boubriak, B. R. Berquist, M. Clark, E. Richard, L. Sullivan, S. DasSarma and S. McCready. (2006)** The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1. *Saline Systems.* 2: 11.
- Cummins, S. F., A. E. Nichols, A. Amare, A. B. Hummon, J. V. Sweedler, G. T. Nagle and M. JIMBO. (2004)** Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel water-borne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. *J Biol Chem.* 279: 25614-25622.
- Datta, S., Y. Mori, K. Takagi, K. Kawaguchi, Z. W. Chen, T. Okajima, S. Kuroda, T. Ikeda, K. Kano, K. Tanizawa and F. S. Mathews. (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.
- 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. (2007)** Protein-derived cofactors. Expanding the scope of post-translational modifications. *Biochemistry.* 46: 5283-5292.
- Davidson, V. L. (2011)** Generation of protein-derived redox cofactors by posttranslational modification. *Mol Biosyst.* 7: 29-37.
- Davidson, V. L. and A. Liu. (2012)** Tryptophan tryptophylquinone biosynthesis: A radical approach to posttranslational modification. *BBA - Proteins and Proteomics.* 1824: 1299-1305.
- Davidson, V. L. and C. M. Wilmot. (2013)** Post-translational biosynthesis of the protein-derived cofactor tryptophan tryptophylquinone. *Annu Rev Biochem.* 82: 531-550.

- Davis, M. A., M. C. Askin and M. J. Hynes. (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 K. N. Timmis. (1994)** Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235: 386-405.
- Demain, A. L. (1999)** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52: 455-463.
- Dijkman, W. P., G. de Gonzalo, A. Mattevi and M. W. Fraaije. (2013)** Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 5177-5188.
- Dong, C., X. Bai, Q. Lai, Y. Xie, X. Chen and Z. Shao. (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., J. F. Miller and C. W. Ragsdale. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- Drozdetskiy, A., C. Cole, J. Procter and G. J. Barton. (2015)** JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 43 (W1): W389-W394.
- Du, X. Y. and K. J. Clemetson. (2002)** Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon.* 40: 659-665.
- Duerre, J. A. and S. Chakrabarty. (1975)** L-amino acid oxidases of *Proteus rettgeri*. *J Bacteriol.* 121: 656-663.
- Duine, J. A. and J. Frank. (1979)** Purification and properties of methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium-X*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 45: 151-152.
- Dym, O. and D. Eisenberg. (2001)** Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 10: 1712-1728.
- Eggink, G., H. Engel, G. Vriend, P. Terpstra and B. Witholt. (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., S. Kitajima, N. Kanzawa, T. Tamiya and T. Tsuchiya. (2002)** Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett.* 531: 509-512.

- Ekborg, N. A., J. M. González, M. B. Howard, L. E. Taylor, S. W. Hutcheson and R. M. Weiner. (2005)** *Saccharophagus degradans* gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 1545-1549.
- Endo, H., Y. Hayashi, Y. Kitani, H. Ren, T. Hayashi and Y. Nagashima. (2008)** Optical enzyme sensor for determining L-lysine content using L-lysine oxidase from the rockfish *Sebastes schlegeli*. *Anal Bioanal Chem.* 391: 1255-1261.
- Equar, M.Y., Y. Tani and H. Mihara. (2015)** Purification and properties of glycine oxidase from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 61:506-510.
- Eppink, M. H., H. A. Schreuder and W. J. van Berkel. (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.
- Errico, F., V. D'Argenio, F. Sforazzini, F. Iasevoli, M. Squillace, G. Guerri, F. Napolitano, T. Angrisano, A. Di Maio, S. Keller, D. Vitucci, A. Galbusera, L. Chiariotti, A. Bertolino, A. de Bartolomeis, F. Salvatore, A. Gozzi and A. Usiello. (2015)** A role for D-aspartate oxidase in schizophrenia and in schizophrenia-related symptoms induced by phencyclidine in mice. *Transl Psychiatry.* 5: e512.
- Espinosa, E. (2007)** Caracterización de la microbiota perteneciente al género *Marinomonas* asociada a *Posidonia oceanica*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Murcia.
- Espinosa, E., E. Marco-Noales, D. Gómez, P. Lucas-Elío, M. Ordax, N. Garcías-Bonet, C. M. Duarte and A. Sánchez-Amat. (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.
- Faust, A., B. Geueke, K. Niefind, W. Hummel and D. Schomburg. (2006)** Crystallization and preliminary x-ray analysis of a bacterial L-amino-acid oxidase from *Rhodococcus opacus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 62: 279-281.
- Feklistov, A., B. D. Sharon, S. A. Darst and C. A. Gross. (2014)** Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol.* 68: 357-376.
- Fernández, E., A. Sánchez-Amat and F. Solano. (1999)** Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell Res.* 12: 331-339.

- Fernández-Gómez, R., H. Zerrouk, F. Sebti, M. Loyens, A. Benslimane and M. A. Quaissi. (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.
- Finn, R. D., A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E. L. Sonnhammer, J. Tate and M. Punta. (2014)** Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 42: D222-D230.
- Fitzpatrick, P. F. (2010)** Oxidation of amines by flavoproteins. *Arch Biochem Biophys*. 493: 13-25.
- Fraaije, M. W. and A. Mattevi. (2000)** Flavoenzyme: diverse catalyst with recurrent features. *TIBS*. 25: 126-132.
- Frobel, J., P. Rose and M. Muller. (2012)** Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367: 1029-1046.
- Fu, Y. H. and G. A. Marzluf. (1990)** *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol*. 10: 1056-1065.
- Furuya, Y., H. Sawada, T. Hirahara, K. Ito, T. Ohshiro and Y. Izumi. (2000)** A novel enzyme, L-tryptophan oxidase, from a basidiomycete, *Coprinus* sp. SF-1: purification and characterization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64: 1486-1493.
- Gao, X., Q. Ma and H. Zhu. (2015)** Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99: 3341-3349.
- García-Borrón, J. C. and F. Solano. (2002)** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*. 15: 162-173.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel and A. Bairoch. (2003)** ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*. 31: 3784-3788.
- Gau, A. E., A. Heindl, A. Nodop, U. Kahmann and E. K. Pistorius. (2007)** L-amino acid oxidases with specificity for basic L-amino acids in cyanobacteria. *Z Naturforsch C*. 62: 273-284.
- Gauthier, J. D., M. K. Jones, P. Thiaville, J. L. Joseph, R. A. Swain, C. J. Krediet, P. A. Gulig, M. Teplitski and A. C. Wright. (2010)** Role of GacA in virulence of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology*. 156: 3722-3733.

- Gay, P., C. D. Le, M. Steinmetz, E. Ferrari and J. A. Hoch. (1983)** Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 153: 1424-1431.
- Geueke, B. and W. Hummel. (2003)** Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*. *Protein Expr Purif.* 28: 303-309.
- Geueke, Birgit, Hummel, Werner, and Bommarius, A. (2002)** L-amino acid oxidase from *Rhodococcus* species. Patent US 6461841 B2.
- Geueke, B., A. Weckbecker and W. Hummel. (2007)** Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 1240-1247.
- Gómez, D. (2010)** Síntesis y caracterización molecular en *Marinomonas mediterranea* de una novedosa proteína antimicrobiana con actividad L-lisina épsilon-oxidasa. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Gómez, D., E. Espinosa, M. Bertazzo, P. Lucas-Elío, F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2008)** The macromolecule with antimicrobial activity synthesized by *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains is an L-amino acid oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79: 925-930.
- Gómez, D., P. Lucas-Elío, A. Sánchez-Amat and F. Solano. (2006)** A novel type of lysine oxidase: L-lysine-epsilon-oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 1764: 1577-1585.
- Gómez, D., P. Lucas-Elío, F. Solano and A. Sánchez-Amat. (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.
- Govindaraj, S., E. Eisenstein, L. H. Jones, J. Sanders-Loehr, A. Y. Chistoserdov, V. L. Davidson and S. L. Edwards. (1994)** Aromatic amine dehydrogenase, a second tryptophan tryptophylquinone enzyme. *J Bacteriol.* 176: 2922-2929.
- Graichen, M. E., L. H. Jones, B. V. Sharma, R. J. M. van Spanning, J. P. Hosler and V. L. Davidson. (1999)** Heterologous expression of correctly assembled methylamine dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 181: 4216-4222.
- Grilli, J., M. Romano, F. Bassetti and L. M. Cosentino. (2014)** Cross-species gene-family fluctuations reveal the dynamics of horizontal transfers. *Nucleic Acids Res.* 42: 6850-6860.
- Grossman, T. H., E. S. Kawasaki, S. R. Punreddy and M. S. Osburne. (1998)** Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene.* 209: 95-103.
- Guo, C., S. Liu, Y. Yao, Q. Zhang and M. Sun. (2012)** Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon.* 60: 302-311.

- Gupta, P., P. Chaturvedi, S. Pradhan, D. Delille and S. Shivaji. (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.
- 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.
- Hanahan, D., J. Jessee and F. R. Bloom. (1991)** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204: 63-113.
- Hernández-Romero, D., P. Lucas-Elío, D. López-Serrano, F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2003)** *Marinomonas mediterranea* is a lysogenic bacterium that synthesizes R-bodies. *Microbiology.* 149: 2679-2686.
- Hernández-Romero, D., F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2005)** Polyphenol oxidase activities expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 6808-6815.
- Heruth, D. P., F. R. Pond, J. A. Dilts and R. L. Quackenbush. (1994)** Characterization of genetic determinants for R body synthesis and assembly in *Caedibacter taeniospiralis* 47 and 116. *J Bacteriol.* 176: 3559-3567.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma and H. P. Schweizer. (1998)** A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene.* 212: 77-86.
- Holmes, D. S. and M. Quigley. (1981)** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114: 193-197.
- Holscher, T., D. Weinert-Sepalage and H. Gorisch. (2007)** Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology.* 153: 499-506.
- Hossain, G. S., J. Li, H. D. Shin, G. Du, L. Liu and J. Chen. (2014)** L-amino acid oxidases from microbial sources: types, properties, functions, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 1507-1515.
- Houston, B., B. Curry and R. J. Aitken. (2015)** Human spermatozoa possess an IL4I1 L-amino acid oxidase with a potential role in sperm function. *Reproduction.* 149: 587-596.
- Hussain, A., T. Ogawa, M. Saito, T. Sekine, M. Nameki, Y. Matsushita, T. Hayashi and Y. Katayama. (2013)** Cloning and expression of a gene encoding a novel

thermostable thiocyanate-degrading enzyme from a mesophilic alphaproteobacteria strain THI201. *Microbiology*. 159: 2294-2302.

- Ida, K., M. Kurabayashi, M. Suguro, Y. Hiruma, M. Yamamoto and H. Suzuki. (2008)** Structural basis of proteolytic activation of L-phenylalanine oxidase from *Pseudomonas* sp. P-501. *J Biol Chem*. 24: 16584-16590.
- Ida, K., M. Suguro and H. Suzuki. (2011)** High resolution x-ray crystal structures of L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. Structures of the enzyme-ligand complex and catalytic mechanism. *J Biochem*. 150: 659-669.
- Irie, Y., M. Starkey, A. N. Edwards, D. J. Wozniak, T. Romeo and M. R. Parsek. (2010)** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol*. 78: 158-172.
- Ishihama, A. (2000)** Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*. 54: 499-518.
- Isobe, K., S. Asami, H. Domon, Y. Fukuta and Y. Asano. (2012)** Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Pseudomonas* sp. AIU 813. *J Biosci Bioeng*. 114: 257-261.
- Isobe, K., N. Fukuda and S. Nagasawa. (2008)** Analysis of selective production of Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-amino adipate-delta-semialdehyde and Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-amino adipic acid by *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *J Biosci Bioeng*. 105: 152-156.
- Isobe, K. and S. Nagasawa. (2007)** Characterization of Nalpha-benzyloxycarbonyl-L-lysine oxidizing enzyme from *Rhodococcus* sp. AIU Z-35-1. *J Biosci Bioeng*. 104: 218-223.
- Isobe, K., S. Satou, E. Matsumoto, S. Yoshida, M. Yamada, M. Hibi and J. Ogawa. (2013)** Characterization and application of a L-specific amino acid oxidase from *Rhodococcus* sp. AIU LAB-3. *J Biosci Bioeng*. 115: 613-617.
- Isogai, T., H. Ono, Y. Ishitani, H. Kojo, Y. Ueda and M. Kohsaka. (1990)** Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. *J Biochem*. 108: 1063-1069.
- Ivanova, E. P., O. M. Onyshchenko, R. Christen, A. M. Lysenko, N. V. Zhukova, L. S. Shevchenko and E. A. Kiprianova. (2005)** *Marinomonas pontica* sp. nov., isolated from the Black Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55: 275-279.
- Izidoro, L. F., J. C. Sobrinho, M. M. Mendes, T. Costa, A. N. Grabner, V. M. Rodrigues, S. L. da Silva, F. B. Zanchi, J. Zuliani, C. Fernandes, L. Calderon, R. Stabeli and**

A. M. Soares. (2014) Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*. 2014: 196754.

James, S. G., C. Holmstrom and S. Kjelleberg. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2461. *Appl Environ Microbiol*. 62: 2783-2788.

Janes, S. M., D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame and J. P. Klinman. (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., R. Sanishvili, V. L. Davidson and C. M. Wilmot. (2010) In crystallo posttranslational modification within a MauG/pre-methylamine dehydrogenase complex. *Science*. 327: 1392-1394.

Jimbo, M., F. Nakanishi, R. Sakai, K. Muramoto and H. Kamiya. (2003) Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein. *Fisheries Sci*. 69: 1240-1246.

Job, V., G. L. Marcone, M. S. Pilone and L. Pollegioni. (2002a) Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein. *J Biol Chem*. 277: 6985-6993.

Job, V., G. Molla, M. S. Pilone and L. Pollegioni. (2002b) Overexpression of a recombinant wild-type and His-tagged *Bacillus subtilis* glycine oxidase in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. 269: 1456-1463.

Johnson, P. M., C. E. Kicklichter, M. Schmidt, M. Kamio, H. Yang, D. Elkin, W. C. Michel, P. C. Tai and C. D. Derby. (2006) Packaging of chemicals in the defensive secretory glands of the sea hare *Aplysia californica*. *J Exp Biol*. 209: 78-88.

Jorgensen, M. G., M. K. Thomason, J. Havelund, P. Valentin-Hansen and G. Storz. (2013) Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes Dev*. 27: 1132-1145.

Jung, S. K., A. Mai, M. Iwamoto, N. Arizono, D. Fujimoto, K. Sakamaki and S. Yonehara. (2000) Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis. *J Immunol*. 165: 1491-1497.

Jung, Y. T., T. K. Oh and J. H. Yoon. (2012) *Marinomonas hwangdonensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 62: 2062-2067.

Jurgenson, C. T., T. P. Begley and S. E. Ealick. (2009) The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 78: 569-603.

- Kafri, R., M. Springer and Y. Pilpel. (2009)** Genetic redundancy: new tricks for old genes. *Cell*. 136: 389-392.
- Kamei, T., K. Asano, H. Suzuki, M. Matsuzaki and S. Nakamura. (1983)** L-glutamate oxidase from *Streptomyces violascens*. I. Production, isolation and some properties. *Chem Pharm Bull*. 31: 1307-1314.
- Kameya, M., H. Onaka and Y. Asano. (2013)** Selective tryptophan determination using tryptophan oxidases involved in bis-indole antibiotic biosynthesis. *Anal Biochem*. 438: 124-132.
- Kamiya, H., K. Muramoto and M. Yamazaki. (1986)** Aplysianin-A, an antibacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare, *Aplysia kurodai*. *Experientia*. 42: 1065-1067.
- Kara, S., J. H. Schrittwieser, F. Hollmann and M. B. Ansorge-Schumacher. (2014)** Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98: 1517-1529.
- Kasai, K., K. Hashiguchi, H. Takahashi, A. Kasai, S. Takeda, M. Nakano, T. Ishikawa, T. Nakamura and T. Miura. (2015a)** Recombinant production and evaluation of an antibacterial L-amino acid oxidase derived from flounder *Platichthys stellatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99: 6693-703
- Kasai, K., T. Ishikawa, T. Nakamura and T. Miura. (2015b)** Antibacterial properties of L-amino acid oxidase: mechanisms of action and perspectives for therapeutic applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99: 7847-7857.
- Katane, M., Y. Saitoh, Y. Seida, M. Sekine, T. Furuchi and H. Homma. (2010)** Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biodivers*. 7: 1424-1434.
- Khang, Y. H., I. W. Kim, Y. R. Hah, J. H. Hwangbo and K. K. Kang. (2003)** Fusion protein of *Vitreoscilla* hemoglobin with D-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C. *Biotechnol Bioeng*. 82: 480-488.
- Khoronenkova, S. V. and V. I. Tishkov. (2008)** D-amino acid oxidase: physiological role and applications. *Biochem (Mosc)*. 73: 1511-1518.
- Kim, C., S. Han, K. Kim, B. Cho, Y. H. Kim, B. Koo and Kim.Y.C. (2003)** Cloning and expression of pyrroloquinoline quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. *Curr Microbiol*. 47: 457-461.
- Kim, J. Y., S. H. Ahn, S. T. Kang and B. J. Yoon. (2006)** Electrophoretic mobility equation for protein with molecular shape and charge multipole effects. *J Colloid Interface Sci*. 299: 486-492.

- Kishishita, S., T. Okajima, M. Kim, H. Yamaguchi, S. Hirota, S. Suzuki, S. Kuroda, K. Tanizawa and M. Mure. (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.
- Kitani, Y., J. M. O. Fernandes and V. Kiron. (2015) Identification of the atlantic cod L-amino acid oxidase and its alterations following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol.* 50: 116-120.
- Kitani, Y., C. Tsukamoto, G. Zhang, H. Nagai, M. Ishida, S. Ishizaki, K. Shimakura, K. Shiomi and Y. Nagashima. (2007) Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. *FEBS J.* 274: 125-136.
- Klema, V. J. and C. M. Wilmot. (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. P. and F. Bonnot. (2014) The intrigues and intricacies of the biosynthetic pathways for the enzymatic quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ and LTQ. *Chem Rev.* 114: 4343-4365.
- Ko, K. C., B. Wang, P. C. Tai and C. D. Derby. (2008) Identification of potent bactericidal compounds produced by escapin, an L-amino acid oxidase in the ink of the sea hare *Aplysia californica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 52: 4455-4462.
- Kodama, Y., Hoshino, W., Takahashi, K., and ITO, M. (2014) Modified glycine oxidase. Patent WO 2014157705 A1.
- Koyama, H. (1984) Oxidation and oxygenation of L-amino acids catalyzed by a L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501. *J Biochem.* 96: 421-427.
- Kumari, P., A. Poddar and S. K. Das. (2014) *Marinomonas fungiae* sp. nov., isolated from the coral *Fungia echinata* from the Andaman Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64: 487-494.
- Kurosawa, N., T. Hirata and H. Suzuki. (2009) Characterization of putative tryptophan monooxygenase from *Ralstonia solanasearum*. *J Biochem.* 146: 23-32.
- Kusakabe, H., K. Kodama, A. Kuninaka, H. Yoshino, H. Misono and K. Soda. (1980) A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J Biol Chem.* 255: 976-981.
- Kusakabe, H., Y. Midorikawa, T. Fujishima, A. Kuninaka and H. Yoshino. (1983) Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6 grown on wheat bran. *Agric Biol Chem.* 47: 1323-1328.

- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lapouge, K., M. Schubert, F. H. Allain and D. Haas. (2008)** Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol*. 67: 241-253.
- Lata, S. and C. S. Pundir. (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., J. Ren, N. L. Wai, S. C. Lau, P. Y. Qian, P. K. Wong and M. Wu. (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, P. A., D. Tullman-Ercek and G. Georgiou. (2006)** The bacterial Twin-Arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol*. 60: 373-395.
- Leese, C., I. Fotheringham, F. Escalettes, R. Speight and G. Grogan. (2012)** Cloning, expression, characterization and mutational analysis of L-aspartate oxidase from *Pseudomonas putida*. *J Mol Catal B Enzym*. 85: 17-22.
- Li, R. and A. Li. (2014)** Antibacterial efficacy of recombinant *Siganus oramin* L-amino acid oxidase expressed in *Pichia pastoris*. *Fish Shellfish Immunol*. 41: 356-361.
- Lisser, S. and H. Margalit. (1993)** Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res*. 21: 1507-1516.
- Liu, L., G. S. Hossain, H. Shin, J. Li, G. Du and J. Chen. (2013)** One-step production of alfa-ketoglutaric acid from glutamine acid with an engineered L-amino acid deaminase from *Proteus mirabilis*. *J Biotechnol*. 164: 97-104.
- Liu, Ziduo, Zhan, Tao, Lin, Yongjun, Wu, Gaobing, and Zhang, Lili. (2014)** Resistance gene capable of degrading herbicide glyphosate and encoded protein of resistance gene. Patent CN 103421824 B.
- Loewen, P. C., J. Switala and B. L. Triggs-Raine. (1985)** Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch Biochem Biophys*. 243: 144-149.
- Loewen, P. C. and B. L. Triggs. (1984)** Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 160: 668-675.
- López-Serrano, D. (2005)** Estudios moleculares sobre la melanogénesis en *Marinomonas mediterranea*. Caracterización del operón *ppoB*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- López-Serrano, D., A. Sánchez-Amat and F. Solano. (2002)** Cloning and molecular characterization of a SDS-activated tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Res.* 15: 104-111.
- López-Serrano, D., F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2007)** Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology.* 153: 2241-2249.
- López-Serrano, D., F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2004)** Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene.* 342: 179-187.
- Lucas-Elío, P. (2003)** 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.
- Lucas-Elío, P., D. Gómez, F. Solano and A. Sánchez-Amat. (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.
- Lucas-Elío, P., L. Goodwin, T. Woyke, S. Pitluck, M. Nolan, N. C. Kyrpides, J. C. Detter, A. Copeland, M. Lu, D. Bruce, C. Detter, R. Tapia, S. Hans, M. L. Land, N. Ivanova, N. Mikhailova, A. W. Johnston and A. Sánchez-Amat. (2012a)** Complete genome sequence of *Marinomonas posidonica* type strain (IVIA-Po-181^T). *Stand Genomic Sci.* 7: 31-43.
- Lucas-Elío, P., L. Goodwin, T. Woyke, S. Pitluck, M. Nolan, N. C. Kyrpides, J. C. Detter, A. Copeland, H. Teshima, D. Bruce, C. Detter, R. Tapia, S. Han, M. L. Land, N. Ivanova, N. Mikhailova, A. W. Johnston and A. Sánchez-Amat. (2012b)** Complete genome sequence of the melanogenic marine bacterium *Marinomonas mediterranea* type strain (MMB-1^T). *Stand Genomic Sci.* 6: 63-73.
- Lucas-Elío, P., P. Hernández, A. Sánchez-Amat and F. Solano. (2005)** Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta.* 1721: 193-203.
- Lucas-Elío, P., E. Marcos-Noales, E. Espinosa, M. Ordax, M. M. López, N. Garcías-Bonet, N. Marba, C. M. Duarte and A. Sánchez-Amat. (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-Elío, P., F. Solano and A. Sánchez-Amat. (2002)** Regulation of polyphenol oxidase activities and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*: Identification of *ppoS*, a gene encoding a sensor histidine kinase. *Microbiology.* 148: 2457-2466.

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

Ma, S., X. Y. Li, N. Gong and Y. X. Wang. (2015) Contributions of spinal D-amino acid oxidase to chronic morphine-induced hyperalgesia. *J Pharm Biomed Anal*. 116: 131-8.

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

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

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

Mandal, M., M. Lee, J. E. Barrick, Z. Weinberg, G. M. Emilsson, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker. (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*. 306: 275-279.

Mandal, S. and D. Bhattacharyya. (2008) Two L-amino acid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs. *FEBS J*. 275: 2078-2095.

Marchler-Bauer, A., C. Zheng, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang and S. H. Bryant. (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res*. 41: D348-D352.

Marinoni, I., S. Nonnis, C. Monteferrante, P. Heathcote, E. Hartig, L. H. Bottger, A. X. Trautwein, A. Negri, A. M. Albertini and G. Tedeschi. (2008) Characterization of L-aspartate oxidase and quinolinate synthase from *Bacillus subtilis*. *FEBS J*. 275: 5090-5107.

Markowitz, V. M., I. M. Chen, K. Chu, E. Szeto, K. Palaniappan, M. Pillay, A. Ratner, J. Huang, I. Pagani, S. Tringe, M. Huntemann, K. Billis, N. Varghese, K. Tennessen, K. Mavromatis, A. Pati, N. N. Ivanova and N. C. Kyrpides. (2014) IMG/M 4 version of the integrated metagenome comparative analysis system. *Nucleic Acids Res*. 42: D568-D573.

Martínez-Martínez, I., C. Kaiser, A. Rohde, A. Ellert, F. García-Carmona, A. Sánchez-Ferrer and R. Luttmann. (2007) High-level production of *Bacillus subtilis* glycine oxidase by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Biotechnol Progress*. 23: 645-651.

- Martínez-Martínez, I., J. Navarro-Fernández, F. García-Carmona and A. Sánchez-Ferrer. (2008a)** 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.
- Martínez-Martínez, I., J. Navarro-Fernández, F. García-Carmona, H. Takami and A. Sánchez-Ferrer. (2008b)** Characterization and structural modeling of a novel thermostable glycine oxidase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426. *Proteins.* 70: 1429-1441.
- Martínez-Martínez, I., J. Navarro-Fernández, JD. Lozada-Ramírez, F. García-Carmona and A. Sánchez-Ferrer. (2006)** Maximization of production of His-tagged glycine oxidase and its M261 mutant proteins. *Biotechnol Progress.* 22: 647-652.
- Mason, J. M., M. D. Naidu, M. Barcia, D. Porti, S. S. Chavan, C. C. Chu and M. JIMBO. (2004)** IL-4-induced gene-1 is a leukocyte L-amino acid oxidase with an unusual acidic pH preference and lysosomal localization. *J Immunol.* 173: 4561-4567.
- Matsuda, M. and Y. Asano. (2010)** Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028(T). *Anal Biochem.* 406: 19-23.
- Matsui, D., D. H. Im, A. Sugawara, Y. Fukuta, S. Fushinobu, K. Isobe and Y. Asano. (2014)** Mutational and crystallographic analysis of L-amino acid oxidase/monooxygenase from *Pseudomonas* sp. AIU 813: Interconversion between oxidase and monooxygenase activities. *FEBS Open Bio.* 4: 220-228.
- Matsumura, H., K. Umezawa, K. Takeda, N. Sugimoto, T. Ishida, M. Samejima, H. Ohno, M. Yoshida, K. Igarashi and N. Nakamura. (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.
- McIntire, W. S., D. E. Wemmer, A. Chistoserdov and M. E. Lidstrom. (1991)** A new cofactor in a prokaryotic enzyme: tryptophan tryptophylquinone as the redox prosthetic group in methylamine dehydrogenase. *Science.* 252: 817-824.
- McWilliam, H., W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley and R. López. (2013)** Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 41: W597-W600.
- Meulenberg, J., E. Sellink, N. Riegman and P. Postman. (1992)** Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* *pqq* operon. *Mol Gen Genet.* 232: 284-294.
- Miller, J. H. (1992)** A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Editado por Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Miller, V. L. and J. J. Mekalanos. (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.
- Misra, H. S., Y. Rajpurohit and N. Khairnar. (2012)** Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci.* 37: 313-325.
- Molina-Quintero, L. R. (2011)** Mecanismos regulatorios de las actividades oxidasa en *Marinomonas mediterranea*. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- Molina-Quintero, L. R., P. Lucas-Elío and A. Sánchez-Amat. (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., S. Sacchi, M. Bernasconi, M. S. Pilone, K. Fukui and L. Pollegioni. (2006)** Characterization of human D-amino acid oxidase. *FEBS Lett.* 580: 2358-2364.
- Molla, G., L. Motteran, V. Job, M. S. Pilone and L. Pollegioni. (2003)** Kinetic mechanisms of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 270: 1474-1482.
- Molla, G., M. Nardini, P. Motta, P. D'Arrigo, W. Panzeri and L. Pollegioni. (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 W. H. Flurkey. (1990)** Sodium dodecyl sulphate activation of a plant poliphenoloxidase. *J Biol Chem.* 265 : 4982-4988.
- Moore, R. H., M. A. Spies, M. B. Culpepper, T. Murakawa, S. Hirota, T. Okajima, K. Tanizawa and M. Mure. (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., K. Kiran, S. Veena and J. Gadag. (2010)** Purification of an L-amino acid oxidase from *Bungarus caeruleus* (Indian krait) venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 16: 60-75.
- Mortl, M., K. Diederichs, W. Welte, G. Molla, L. Motteran, G. Andriolo, M. S. Pilone and L. Pollegioni. (2004)** Structure-function correlation in glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 279: 29718-29727.
- Moynihn, K., G. B. Elion, C. Pegram, C. J. Reist, D. Wellner, D. D. Bigner, O. W. Griffith and H. S. Friedman. (1997)** L-amino acid oxidase (LOX) modulation of melphalan activity against intracranial glioma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 39: 179-186.

- Mu, D., S. M. Janes, A. J. Smith, D. E. Brown, D. M. Dooley and J. P. Klinman. (1992)** Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *J Biol Chem.* 267: 7979-7982.
- Mukherjee, S. and S. Sengupta. (2015)** Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences. *Bioinformatics.* 32: 776-778.
- Müller, F. (1991)** Free flavins: synthesis, chemical and physical properties en Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, vol. I. Editado por CRC Press, Ed. Boca Raton, FL, Inc. Pag. 1-71.
- Murakawa, M., S. K. Jung, K. Iijima and S. Yonehara. (2001)** Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms. *Cell Death Differ.* 8: 298-307.
- Mure, M. (2004)** Tyrosine-derived quinone cofactors. *Acc Chem Res.* 37: 131-139.
- Nagashima, Y., C. Tsukamoto, Y. Kitani, S. Ishizaki, H. Nagai and T. Yanagimoto. (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 B Biochem Mol Biol.* 154: 55-61.
- Nakai, T., T. Deguchi, I. Frebort, K. Tanizawa and T. Okajima. (2014)** Identification of genes essential for the biogenesis of quinoxemoprotein amine dehydrogenase. *Biochemistry.* 53: 895-907.
- Nakai, T., K. Ono, S. Kuroda, K. Tanizawa and T. Okajima. (2012)** An unusual subtilisin-like serine protease is essential for biogenesis of quinoxemoprotein amine dehydrogenase. *J Biol Chem.* 287: 6530-6538.
- Neville, D. M. (1971)** Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *J Biol Chem.* 246: 6328-6334.
- Nicolia, A., N. Ferradini, G. Molla, E. Biagetti, L. Pollegioni, F. Veronesi and D. Rosellini. (2014)** Expression of an evolved engineered variant of a bacterial glycine oxidase leads to glyphosate resistance in alfalfa. *J Biotechnol.* 184: 201-208.
- Niedermann, D. M. and K. Lerch. (1991)** Regulation of biosynthesis of L-amino acid oxidase by *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett.* 79: 309-314.
- Nierman, W. C. et al. (2001)** Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 4136-4141.
- Nishiya, Y. and T. Imanaka. (1998)** Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 438: 263-166.

- Nishizawa, T., C. Aldrich and D. H. Sherman. (2005)** Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *J Bacteriol.* 187: 2084-2092.
- Nuutinen, J. T., E. Marttinen, R. Soliymani, K. Hilden and S. Timonen. (2012)** L-amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* displays substrate preference towards glutamate. *Microbiology.* 158: 272-283.
- Nuutinen, J. T. and S. Timoneni. (2008)** Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-amino acid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor*. *Mycol Res.* 112: 1453-1464.
- Obara, K., H. Otsuka-Fuchino, N. Sattayasai, Y. Nonomura, T. Tsuchiya, T. Tamiya and M. JIMBO. (1992)** Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac. *Eur J Biochem.* 209: 1-6.
- Ojha, S., E. C. Meng and P. C. Babbitt. (2007)** Evolution of function in the "Two dinucleotide binding domains" flavoproteins. *PLoS Comput Biol.* 3: 1268-1280.
- Okamura-Ikeda, K., Y. Ohmura, K. Fujiwara and Y. Motokawa. (1993)** Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *Eur J Biochem.* 216: 539-548.
- Okazaki, S., S. Nakano, D. Matsui, S. Akaji, K. Inagaki and Y. Asano. (2013)** X-ray crystallographic evidence for the presence of the cysteine tryptophylquinone cofactor in L-lysine epsilon-oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *J Biochem.* 154: 233-236.
- Olsthooorn, A. J. and J. A. Duine. (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.
- Omura, S., H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, Y. Takahashi, H. Horikawa, H. Nakazawa, T. Osonoe, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki and M. Hattori. (2001)** Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 12215-12220.
- Ono, K., T. Okajima, M. Tani, S. Kuroda, D. Sun, V. L. Davidson and K. Tanizawa. (2006)** Involvement of a putative [Fe-S]-cluster-binding protein in the biogenesis of quinoxinoprotein amine dehydrogenase. *J Biol Chem.* 281: 13672-13684.
- Oviatt, C., C. Doering, B. Nowicki, L. Reed, J. Cole and J. Frithsen. (1995)** An ecosystem level experiment on nutrient limitation in temperate coastal marine environments. *Mar Ecol Prog Ser.* 116: 171-179.

- P**alenik, B. and F. M. M. Morel. (1990) Amino acid utilization by marine phytoplankton: a novel mechanism. *Limnol Oceanogr.* 35: 260-269.
- Pantaleone, D. P., A. M. Geller and P. P. Taylor. (2001) Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids. *J Mol Catal B Enzym.* 11: 795-803.
- Pearson, A. R., T. De la Mora-Rey, M. E. Graichen, Y. Wang, L. H. Jones, S. Marimanikkupam, S. A. Agger, P. A. Grimsrud, V. L. Davidson and C. M. Wilmot. (2004) Further insights into quinone cofactor biogenesis: probing the role of *mauG* in methylamine dehydrogenase tryptophan tryptophylquinone formation. *Biochemistry.* 43: 5494-5502.
- Pearson, A. R., L. H. Jones, L. Higgins, A. E. Ashcroft, C. M. Wilmot and V. L. Davidson. (2003) Understanding quinone cofactor biogenesis in methylamine dehydrogenase through novel cofactor generation. *Biochemistry.* 42: 3224-3230.
- Pedotti, M., S. Ghisla, L. Motteran, G. Molla and L. Pollegioni. (2009a) Catalytic and redox properties of glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie.* 91: 604-612.
- Pedotti, M., E. Rosini, G. Molla, T. Moschetti, C. Savino, B. Vallone and L. Pollegioni. (2009b) Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. *J Biol Chem.* 284: 36415-36423.
- Pelmont, J., G. Arlaud and A. M. Rossat. (1972) L-amino acid oxidases of *Proteus mirabilis*: general properties. *Biochimie.* 54: 1359-1374.
- Petersen, T. N., S. Brunak, H. G. von and H. Nielsen. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 8: 785-786.
- Pistorius, E. K. and H. Voss. (1982) Presence of an amino acid oxidase in photosystem II of *Anacystis nidulans*. *Eur J Biochem.* 126: 203-209.
- Pittard, J., H. Camakaris and J. Yang. (2005) The TyrR regulon. *Mol Microbiol.* 55: 16-26.
- Pokrovsky, V. S., H. M. Treshalina, E. V. Lukasheva, L. A. Sedakova, A. G. Medentzev, A. Y. Arinbasarova and T. T. Berezov. (2013) Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMf-4268D. *Anticancer Drugs.* 24: 846-851.
- Pollegioni, L. and G. Molla. (2011) New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. *Trends Biotechnol.* 29: 276-283.
- Pollegioni, L., P. Motta and G. Molla. (2013) L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? *Appl Microbiol Biotechnol.* 97: 9323-9341.

- Pollegioni, L., L. Piubelli, S. Sacchi, M. S. Pilone and G. Molla. (2007)** Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci.* 64: 1373-1394.
- Pond, F. R., I. Gibson, J. Lalucat and R. L. Quackenbush. (1989)** R-body-producing bacteria. 53: 25-67.
- Prabakaran, S. R., K. Suresh, R. Manorama, D. Delille and S. Shivaji. (2005)** *Marinomonas ushuaiensis* sp. nov., isolated from coastal sea water in Ushuaia, Argentina, sub-Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 309-313.
- Price, M. N., A. P. Arkin and E. J. Alm. (2006)** The life-cycle of operons. *PLoS Genet.* 2: e96.
- Puiffe, M. L., I. Lachaise, V. Molinier-Frenkel and F. Castellano. (2013)** Antibacterial properties of the mammalian L-amino acid oxidase IL4I1. *PLoS One.* 8: e54589.
- Qi, L., J. Qiao, G. Yang and Y. Chen. (2009)** Chiral ligand-exchange CE assays for separation of amino acid enantiomers and determination of enzyme kinetic constant. *Electrophoresis.* 30: 2266-2272.
- Ray, J. C. and O. A. Igoshin. (2012)** Interplay of gene expression noise and ultrasensitive dynamics affects bacterial operon organization. *PLoS Comput Biol.* 8: e1002672.
- Raymann, K., L. M. Bobay, T. G. Doak and M. Lynch. (2013)** A genomic survey of *reb* homologs suggests widespread occurrence of R-Bodies in *Proteobacteria*. *G3 Gene.* 3: 505-516.
- Revelles, O., M. Espinosa-Urgel, T. Fuhrer, U. Sauer and J. L. Ramos. (2005)** Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol.* 187: 7500-7510.
- Rodionov, D. A., A. G. Vitreschak, A. A. Mironov and M. S. Gelfand. (2002)** Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 277: 48949-48959.
- Roe, S. (2006)** Protein Purification Techniques. Practical Approach. Editado por Simon Roe. Oxford. Pag. 111-155.
- Romanenko, L. A., N. Tanaka and G. M. Frolova. (2009)** *Marinomonas arenicola* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59: 2834-2838.
- Romanenko, L. A., M. Uchino, V. V. Mikhailov, N. V. Zhukova and T. Uchimura. (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.

- Rosini, E., L. Piubelli, G. Molla, L. Frattini, M. Valentino, A. Varriale, S. D'Auria and L. Pollegioni. (2014) Novel biosensors based on optimized glycine oxidase. *FEBS J.* 281: 3460-3472.
- Rossmann, M. G., D. Moras and K. W. Olsen. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature.* 250: 194-199.
- Ryan, R., P. Lowry and R. D. O'Neil. (1997) Biosensor for neurotransmitter L-glutamic acid designed for efficient use of L-glutamate oxidase and effective rejection of interference. *Analyst.* 122: 1419-1424.
- S**akuraba, H., T. Satomura, R. Kawakami, S. Yamamoto, Y. Kawarabayasi, H. Kikuchi and T. Ohshima. (2002) L-aspartate oxidase is present in the anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3: characteristics and role in the de novo biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide proposed by genome sequencing. *Extremophiles.* 6: 275-281.
- Sakuraba, H., K. Yoneda, I. Asai, H. Tsuge, N. Katunuma and T. Ohshima. (2008) Structure of L-aspartate oxidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *Biochim Biophys Acta.* 1784: 563-571.
- Salisbury, S. A., H. S. Forrest, W. B. Cruse and O. Kennard. (1979) A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature.* 280: 843-844.
- Sambrock, J. and Rusell, D. W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Editado por Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sánchez-Amat, A. (2006) Inclusions in prokaryotes R-bodies en Microbiology monograph (J M Shively eds.). Editado por Springer. Berlin. Pag. 331-341.
- Sánchez-Amat, A. and F. Solano. (2005) Genus III. *Marinomonas* (Van Landschoot and De Ley 1984) en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition (DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley, and GM Garrity eds.). Editado por Springer. New York. Pag. 284-289.
- Sánchez-Amat, A., P. Lucas-Elío, E. Fernández, J. C. García-Borrón and F. Solano. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta.* 1547: 104-116.
- Sánchez-Amat, A. and F. Torrella. (1990) Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine bdellovibrios. *Appl Environ Microbiol.* 56: 2717-2725.
- Schneider, P., Pedersen, A. H., and Hansen, S. A. (1998) L-amino acid oxidase. Patent US 5801035 A.

- Sehanobish, E., M. D. Chacón-Verdu, A. Sánchez-Amat and V. L. Davidson. (2015)** Roles of active site residues in LodA, a cysteine tryptophylquinone dependent ϵ -lysine oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 579: 26-32.
- Sehanobish, E., J. C. Camprillo-Brocal, H. R. Williamson, A. Sanchez-Amat and V. L. Davidson. (2016)** Interaction of GoxA with its modifying enzyme and its subunit assembly are dependent on the extent of cysteine tryptophylquinone biosynthesis. *Biochemistry.* 55: 2305–2308.
- Seifert, J., N. Kunz, R. Flachmann, A. Laufer, K. D. Jany and H. G. Gassen. (1990)** Expression of the *E. coli nadB* gene and characterization of the gene product L-aspartate oxidase. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 371: 239-248.
- Serganov, A., L. Huang and D. J. Patel. (2008)** Structural insights into amino acid binding and gene control by a lysine riboswitch. *Nature.* 455: 1263-1267.
- Serganov, A. and D. J. Patel. (2009)** Amino acid recognition and gene regulation by riboswitches. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms.* 1789: 592-611.
- Setoyama, C., R. Miura and M. JIMBO. (1997)** Structural and functional characterization of the human brain D-aspartate oxidase. *J Biochem.* 121: 798-803.
- Settembre, E. C., P. C. Dorrestein, J. H. Park, A. M. Augustine, T. P. Begley and S. E. Ealick. (2003)** Structural and mechanistic studies on ThiO, a glycine oxidase essential for thiamin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.* 42: 2971-2981.
- Shin, S., M. Feng and V. L. Davidson. (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., E. Yukl, E. Sehanobish, C. M. Wilmot and V. L. Davidson. (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., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. López, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins. (2011)** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 7: 539.
- Sikora, L. and G. A. Marzluf. (1982)** Regulation of L-amino acid oxidase and of D-amino acid oxidase in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet.* 186: 33-39.
- Singh, S. (2014)** L-amino acid oxidases-microbial and snake venom. *J Microb Biochem Technol.* 6: 128-134.

- Singh, S., B. K. Gogoi and R. L. Bezbaruah. (2009)** Optimization of medium and cultivation conditions for L-amino acid oxidase production by *Aspergillus fumigatus*. *Can J Microbiol.* 55: 1096-1102.
- Singh, S., B. Gogoi and R. Bezbaruah. (2011)** Racemic resolution of some DL-amino acids using *Aspergillus fumigatus* L-amino acid oxidase. *Curr Microbiol.* 63: 94-99.
- Skarnes, R. C. (1970)** L-amino-acid oxidase, a bactericidal system. *Nature.* 225: 1072-1073.
- Sneppen, K., S. Pedersen, S. Krishna, I. Dodd and S. Semsey. (2010)** Economy of operon formation: cotranscription minimizes shortfall in protein complexes. *MBio.* 1: e00177-10.
- Solano, F., E. García, E. Pérez de Egea and A. Sánchez-Amat. (1997)** Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3499-3506.
- Solano, F., P. Lucas-Elío, E. Fernández and A. Sánchez-Amat. (2000)** *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: isolation of a multipotent polyphenol oxidase mutant. *J Bacteriol.* 182: 3754-3760.
- Solano, F. and A. Sánchez-Amat. (1999)** Studies on the phylogenetic relationships of melanogenic marine bacteria: proposal of *Marinomonas mediterranea* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 1241-1246.
- Solovyev, V. and A. Salamov. (2011)** Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences en Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies. Editado por Robert W. Li. New York. Pag. 61-78.
- Stelzer, S., S. Egan, M. R. Larsen, D. H. Bartlett and S. Kjelleberg. (2006)** Unravelling the role of the ToxR-like transcriptional regulator WmpR in the marine antifouling bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Microbiology.* 152: 1385-1394.
- Stevens, J. M., N. Rao Saroja, M. Jaouen, M. Belghazi, J. M. Schmitter, D. Mansuy, I. Artaud and M. A. Sari. (2003)** Chaperone-assisted expression, purification, and characterization of recombinant nitrile hydratase NI1 from *Comamonas testosteroni*. *Protein Expr Purif.* 29: 70-76.
- Stothard, P. (2000)** The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques.* 28: 1102-1104.
- Sukhacheva, M. V. and N. I. Zhuravleva. (2004)** Properties and prospects of practical use of extracellular L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. Z-11-6. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 40: 173-177.

- Takahashi, S., K. Abe and Y. Kera. (2015)** Bacterial D-amino acid oxidases: Recent findings and future perspectives. *Bioengineered*. 6: 237-241.
- Takahashi, S., M. Furukawara, K. Omae, N. Tadokoro, Y. Saito, K. Abe and Y. Kera. (2014)** A highly stable D-amino acid oxidase of the thermophilic bacterium *Rubrobacter xylanophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 80: 7219-7229.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. (2013)** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30: 2725-2729.
- Tarboush, A. N., L. M. Jensen, C. M. Wilmot and V. L. Davidson. (2013a)** A Trp199Glu MauG variant reveals a role for Trp199 interactions with pre-methylamine dehydrogenase during tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *FEBS Lett*. 587: 1736-1741.
- Tarboush, A. N., L. M. R. Jensen, E. T. Yukl, J. Geng, A. Liu, C. M. Wilmot and V. L. Davidson. (2011)** Mutagenesis of tryptophan199 suggests that hopping is required for MauG-dependent tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 16956-16961.
- Tarboush, A. N., E. Yukl, S. Shin, M. Feng, C. M. Wilmot and V. L. Davidson. (2013b)** Carboxyl group of Glu113 is required for stabilization of the diferrous and bis-Fe(IV) states of MauG. *Biochemistry*. 52: 6358-6367.
- Thayer, P. S. and N. H. Horowitz. (1951)** The L-amino acid oxidase of *Neurospora*. *J Biol Chem*. 192: 755-767.
- Thurston, C. F. (1994)** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140: 19-26.
- Timmermans, J. and L. Van Melderren. (2010)** Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci*. 67: 2897-2908.
- Todd, J. D., R. Rogers, Y. G. Li, M. Wexler, P. L. Bond, L. Sun, A. R. Curson, G. Malin, M. Steinke and A. W. Johnston. (2007)** Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science*. 315: 666-669.
- Tong, H., W. Chen, W. Shi, F. i and X. Dong. (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.
- Touchon, M. and E. P. Rocha. (2016)** Coevolution of the organization and structure of prokaryotic genomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8.
- Toyama, H., L. Chistoserdova and M. E. Lidstrom. (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., E. V. Lukasheva, L. A. Sedakova, G. A. Firsova, G. K. Guerassimova, N. V. Gogichaeva and T. T. Berezov. (2000) Anticancer enzyme L-lysine alpha-oxidase. Properties and application perspectives. *Appl Biochem Biotechnol*. 88: 267-273.

Ullah, A., T. A. C. B. Souza, J. R. B. Abrego, C. Betzel, M. T. Murakami, R. K. Arni and M. JIMBO. (2012) Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. *Biochem Biophys Res Commun*. 421: 124-128.

Umhau, S., L. Pollegioni, G. Molla, K. Diederichs, W. Welte, M. S. Pilone and S. Ghisla. (2000) The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 12463-12468.

Urios, L., V. Michotey, L. Intertaglia, F. Lesongeur and P. Lebaron. (2008) *Nisaea denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Nisaea nitritireducens* sp. nov., two novel members of the class *Alphaproteobacteria* from the Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58: 2336-2341.

Urios, L., V. Michotey, L. Intertaglia, F. Lesongeur and P. Lebaron. (2010) *Thalassobaculum salexigens* sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* from the NW Mediterranean Sea, and emended description of the genus *Thalassobaculum*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 60: 209-213.

Utsumi, T., J. Arima, C. Sakaguchi, T. Tamura, C. Sasaki, H. Kusakabe, S. Sugio and K. Inagaki. (2012) Arg305 of *Streptomyces* L-glutamate oxidase plays a crucial role for substrate recognition. *Biochem Biophys Res Commun*. 417: 951-955.

Vallon, O. (2000) New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 38: 95-114.

Vallon, O., L. Bulte, R. Kuras, J. Olive and F. A. Wollman. (1993) Extensive accumulation of an extracellular L-amino-acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*. 215: 351-360.

van der Palen, C. J., W. N. Reijnders, V. S. De, J. A. Duine and R. J. van Spanning. (1997) MauE and MauD proteins are essential in methylamine metabolism of *Paracoccus denitrificans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 72: 219-228.

van der Palen, C. J., D. J. Slotboom, L. Jongejan, W. N. Reijnders, N. Harms, J. A. Duine and R. J. van Spanning. (1995) Mutational analysis of *mau* genes involved in

- methyamine metabolism in *Paracoccus denitrificans*. *Eur J Biochem*. 230: 860-871.
- van Landschoot, A. and J. de Ley. (1983)** Intra- and intergenic similarities of the rRNA cistrons of *Alteromonas*, *Marinomonas* (gen. nov.) and some other Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 129: 3057-3074.
- Vandenberghe, I., J. Kim, B. Devreese, A. Hacısalıhıoglu, H. Iwabuki, T. Okajima, S. Kuroda, O. Adachi, J. A. Jongejan, J. A. Duine, K. Tanizawa and J. Van Beeumen. (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.
- Varadi, M., N. Adanyi, E. E. Szabo and N. Trummer. (1999)** Determination of the ratio of D- and L-amino acids in brewing by an immobilised amino acid oxidase enzyme reactor coupled to amperometric detection. *Biosens Bioelectron*. 14: 335-340.
- Vargas, L., J. Quintana, J. Pereañez, V. Nuñez, L. Sanz and J. Calvete. (2013)** Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon*. 15: 1-11.
- Vergunst, A. C., M. C. M. van Lier, A. den Dulk-Ras, T. A. Grosse Stüve, A. Ouwehand and P. J. J. Hooykaas. (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., J. Posfai and R. Roberts. (2003)** NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*. 31: 3688-3691.
- Wang, E. (2011)** Determination method of glycine and kit for determining glycine. Patent CN 102087265 A.
- Wang, S. X., M. Mure, K. F. Medzihradszky, A. L. Burlingame, D. E. Brown, D. M. Dooley, A. J. Smith, H. M. Kagan and J. P. Klinman. (1996)** A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science*. 273: 1078-1084.
- Wcislo, M., D. Compagnone and M. Trojanowicz. (2007)** Enantioselective screen-printed amperometric biosensor for the determination of D-amino acids. *Bioelectrochemistry*. 71: 91-98.
- Weber, S. and Schleicher, E. (2014)** Flavins and flavoproteins. Methods and protocols. Methods in molecular biology. Editado por Springer Science+Business Media. New York.

- Whittaker, C. A. and R. O. Hynes. (2002)** Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*. 13: 3369-3387.
- Wierenga, R. K., P. Terpstra and W. G. J. Hol. (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 V. L. Davidson. (2009)** Uncovering novel biochemistry in the mechanism of tryptophan tryptophylquinone cofactor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*. 13: 462-467.
- Wilmot, C. M. and E. Yukl. (2013)** MauG: a di-heme enzyme required for methylamine dehydrogenase maturation. *Dalton Trans*. 42: 3127-3135.
- Wilson, R. A. and H. N. Arst. (1998)** Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "Streetwise" GATA family of transcription factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62: 586-596.
- Wittenberg, C. and E. L. Triplett. (1985)** A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. Purification and partial characterization. *J Biol Chem*. 290: 12535-12541.
- Yang, C. A., C. H. Cheng, J. W. Lee, C. T. Lo, S. Y. Liu and K. C. Peng. (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., C. H. Cheng, S. Y. Liu, C. T. Lo, J. W. Lee and K. C. Peng. (2011a)** Identification of antibacterial mechanism of L-amino acid oxidase derived from *Trichoderma harzianum* ETS 323. *FEBS J*. 278: 3381-3394.
- Yang, C. A., C. H. Cheng, C. T. Lo, S. Y. Liu, J. W. Lee and K. C. Peng. (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., P. M. Johnson, K. C. Ko, M. Kamio, M. W. Germann, C. D. Derby and P. C. Tai. (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., G. F. Zhong, J. P. Lin, D. B. Mao and D. Z. Wei. (2010)** Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* pqqABCDE gene cluster. *J Indust Microbiol Biotechnol*. 37: 575-580.

- Yao, P., Y. Lin, G. Wu, Y. Lu, T. Zhan, A. Kumar, L. Zhang and Z. Liu. (2015)** Improvement of glycine oxidase by DNA shuffling, and site-saturation mutagenesis of F247 residue. *Int J Biol Macromol.* 79: 965-970.
- Ye, Y. and A. Godzik. (2003)** Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. *Bioinformatics.* 19 Suppl 2: ii246-ii255.
- Yoon, J. H., S. J. Kang and T. K. Oh. (2005)** *Marinomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 2303-2307.
- Yu, C. S., C. J. Lin and J. K. Hwang. (2004)** Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* 13: 1402-1406.
- Yu, E. K. and I. W. DeVoe. (1981)** L-cysteine oxidase activity in the membrane of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 145: 280-287.
- Yu, M., J. Wang, K. Tang, X. Shi, S. Wang, W. M. Zhu and X. H. Zhang. (2012)** Purification and characterization of antibacterial compounds of *Pseudoalteromonas flavipulchra* JG1. *Microbiology.* 158: 835-842.
- Yu, Z. and H. Qiao. (2012)** Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase. *Appl Biochem Biotechnol.* 167: 1-13.
- Yu, Z., Y. Wang, N. Zhou, M. Zhao, J. Qiu and J. Lin. (2014a)** Advances in detection methods of L-amino acid oxidase activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 174: 13-27.
- Yu, Z., N. Zhou, H. Qiao and J. Qiu. (2014b)** Identification, cloning, and expression of L-amino acid oxidase from marine *Pseudoalteromonas* sp. B3. *ScientificWorldJournal.* 2014: 979858.
- Yukl, E. T., F. Liu, J. Krzystek, S. Shin, L. M. R. Jensen, V. L. Davidson, C. M. Wilmot and A. Liu. (2013)** Diradical intermediate within the context of tryptophan tryptophylquinone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 4569-4573.
- Zeller, E. A. and A. Martiz. (1944)** Über eine neue L-aminosäure-oxidase. *Helv Chim Acta.* 27: 1888-1902.
- Zhang, D. C., H. R. Li, Y. H. Xin, H. C. Liu, B. Chen, Z. M. Chi, P. J. Zhou and Y. Yu. (2008)** *Marinomonas arctica* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 1715-1718.
- Zhang K., Y. Gu, P. Yao, Y. Lin, A. Kumar, Z. Liu, G. Wu and L. Zhang. (2016)** Characterization and directed evolution of BliGO, a novel glycine oxidase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb Technol.* 85: 12-18.

- Zhan, T., K. Zhang, Y. Chen, Y. Lin, G. Wu, L. Zhang, P. Yao, Z. Shao and Z. Liu. (2013)** Improving glyphosate oxidation activity of glycine oxidase from *Bacillus cereus* by directed evolution. *PLoS ONE*. 8: e79175.
- Zhang, N. and M. Buck. (2015)** A perspective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. *Biomolecules*. 5: 1012-1019.
- Zhou, P., L. Liu, H. Tong and X. Dong. (2012)** Role of operon *aaoSo-mutT* in antioxidant defense in *Streptococcus oligofermentans*. *PLoS ONE*. 7: e38133.
- Zuliani, J. P., A. M. Kayano, K. D. Zaqueo, A. C. Neto, S. V. Sampaio, A. M. Soares and R. G. Stabeli. (2009)** Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. *Protein Pept Lett*. 16: 908-912.

IX. Apéndices

Apéndice A.1. L-aminoácido oxidasas (LAOs) de origen microbiano. Los microorganismos marinos se indican en negrita. *, actividad o cofactor atribuido por similitud de secuencia con LodA; ND, no determinado; NA, no accesible.

Microorganismo (Nombre de la enzima)	Principal sustrato / actividad	Cofactor	Estructura / Masa molecular	Varios	Número de acceso	Fuente o Referencia
L-lisina ϵ-oxidasas						
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1 (LodA)	L-Lys	CTQ	Homotetrámero (80,9x4 kDa). Estructura cristalina resuelta a 2,4 Å (PDB ID 2YMW)	Antimicrobiana. Dispersión de Biofilms. Extracelular	AAY33849	(Lucas-Elío <i>et al.</i> , 2006; Okazaki <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2 (AlpP)	L-Lys	*CTQ	110 kDa	Antimicrobiana. Dispersión de Biofilms	Q7X0I8	(James <i>et al.</i> , 1996; Mai-Prochnow <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rheinheimera aquatica</i> GR5	L-Lys (*L-lisina- ϵ -oxidasas)	*CTQ	Monómero (71 kDa)	Antimicrobiana. $pI=3,6$. Contiene un péptido de 19 aa similar a AlpP y LodA	NA	(Chen <i>et al.</i> , 2010b)
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1 (PfaP)	*L-lisina- ϵ -oxidasas	*CTQ	77 kDa	Antimicrobiana. $pI=4,6$	AFB71049	(Yu <i>et al.</i> , 2012)
L-lisina α-oxidasas						
<i>Trichoderma viride</i> (LysOX)	L-Lys	FAD	Homodímero (55x2 kDa). Estructura cristalina resuelta a 1,9 Å (PDB ID 3X0V)	Antitumoral. Biosensor de L-Lys. Otros sustratos: L-Ornitina>L-Arg>L-Phe. $pI=4,2$. $pH_{opt}=4,5-10$. $T_a_{opt}=50^\circ C$	BAR88116	(Amano <i>et al.</i> , 2015; Chauhan <i>et al.</i> , 2013; Kusakabe <i>et al.</i> , 1980)
<i>Pseudomonas</i> sp. AIU 813	L-Lys	FAD	Homodímero (54,5x2 kDa)	Otros sustratos: L-Ornitina>L-Arg. También posee actividad monooxigenasa. Inducible por L-Lys. $pI=4,6$. $pH_{opt}=7$	BAO51829	(Isobe <i>et al.</i> , 2012; Matsui <i>et al.</i> , 2014)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-Lys	ND	ND	Biosensor de L-Lys. Otros sustratos: L-Arg, L-Asn. pH opt=7,5. Tª opt=30 °C	NA	(Akyilmaz <i>et al.</i> , 2007)

L-aspartato oxidasas (LASPO)

<i>Bacillus subtilis</i>	L-Asp	FAD	Equilibrio Monómero-Dímero (55-110 kDa) (según la concentración de sal)	Biosíntesis de NAD ⁺ . Inhibida por iminoaspartato, succinato, fumarato, oxalacetato y D-Asp	NP_390665	(Marinoni <i>et al.</i> , 2008)
<i>Escherichia coli</i>	L-Asp	FAD	Equilibrio Monómero-Dímero (60,3-120 kDa) Estructura cristalina resuelta a 2,2 Å (PDB ID 1KNP)	Biosíntesis de NAD ⁺ . Inhibida por iminoaspartato, succinato y fumarato. pI=5,6	P10902	(Bossi <i>et al.</i> , 2002; Seifert <i>et al.</i> , 1990)
<i>Pseudomonas putida</i>	L-Asp	FAD	Homodímero (60×2 kDa)	Biosíntesis de NAD ⁺ . Baja actividad frente L-Asn y L-Glu. Tª opt=40 °C. pH opt=7,4.	AAN67048	(Leese <i>et al.</i> , 2012)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT-3	L-Asp	FAD	Homotrímero (51,925×3 kDa)	Termoestable (completamente activa a 80 °C)	O57765	(Sakuraba <i>et al.</i> , 2002)
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	L-Asp	FAD	Monómero (53,6 kDa) Estructura cristalina resuelta a 2,1 Å (PDB ID 2E5V)	Otros sustratos: L-Asn. Tª opt=79–87,5 °C	WP_010979215	(Bifulco <i>et al.</i> , 2013; Sakuraba <i>et al.</i> , 2008)

L-glutamato oxidasas (LGO)

<i>Streptomyces</i> sp. X-119-6	L-Glu	FAD	Hexámero $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ [(42+17+10)×2 kDa] Estructura cristalina resuelta a 2,8 Å (PDB ID 2E1M)	Biosensor de L-Glu. Extracelular. pH opt=7. Tª opt=58 °C	BAB93449	(Arima <i>et al.</i> , 2003; Kusakabe <i>et al.</i> , 1983; Ryan <i>et al.</i> , 1997; Utsumi <i>et al.</i> , 2012)
<i>Streptomyces endus</i>	L-Glu	FAD	Dímero (45×2 kDa)	pI=6,2. pH opt=6,5-8. Tª opt=30-45 °C	NA	(Bohmer <i>et al.</i> , 1989)
<i>Streptomyces platensis</i> NTU3304	L-Glu	FAD	Heterotrímero de 78 kDa (39, 19 y 16 kDa)	Biosensor de L-Glu	AAK15071	(Chen <i>et al.</i> , 2001)

<i>Streptomyces violascens</i>		L-Glu	FAD	Monómero (60 kDa)	Otros sustratos: L-Gln	NA	(Kamei <i>et al.</i> , 1983)
<i>Streptomyces</i> sp. Z-11-6		L-Glu	FAD	Tetramero $\alpha_2\beta_2$ [(25+22.5)×2 kDa]	Extracelular	NA	(Sukhacheva y Zhuravleva, 2004)

L-triptófano oxidasas

<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i> 39243 (RebO)	ATCC	L-Trp y sus derivados	FAD	Homodímero (54×2 kDa)	Biosíntesis de rebeccamicina	BAC15750	(Nishizawa <i>et al.</i> , 2005)
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0274 (StaO)		L-Trp y sus derivados	FAD	Homodímero (57×2 kDa)	Biosíntesis de estaurosporina. Biosensor de L-Trp. No oxida otros L-aa. pH opt=7-8	BAC55210	(Kameya <i>et al.</i> , 2013)
<i>Chromobacterium violacium</i> (VioA)		L-Trp y sus derivados	FAD	48 KDa	Biosíntesis de violaceína. pH opt=9,25	Q9S3V1	(Balibar y Walsh, 2006)
<i>Coprinus</i> sp. SF-1 (Tod)		L-Trp y sus derivados	FAD	68 KDa	Otros sustratos: L-Phe y L-Tyr. Tª opt=35-43 °C. pH opt=7	NA	(Furuya <i>et al.</i> , 2000)

L-fenilalanina oxidasas (PAO)

<i>Pseudomonas</i> sp. P-501 (PAO)		L-Phe	FAD	Heterodímero $\alpha_2\beta_2$ [(10+60)×2 kDa]. Estructura cristalina resuelta a 1,1 Å (PDB ID 3AYJ)	Otros sustratos: L-Tyr>L-Met>L-NorLeu>L-Trp. También cataliza la descarboxilación oxidativa de L-Phe	BAD66877	(Ida <i>et al.</i> , 2008; Ida <i>et al.</i> , 2011; Koyama, 1984)
<i>Ralstonia solanasearum</i> (PTMO)		L-Phe	FAD	Heterodímero $\alpha_2\beta_2$ [(9,2+64,5)×2 kDa].	Otros sustratos: L-Tyr>L-Trp>L-Met. También cataliza la descarboxilación oxidativa de L-Phe	NA	(Kurosawa <i>et al.</i> , 2009)

Glicina oxidasas (Gox)

<i>Bacillus subtilis</i> 168 (GoxB)		Gly	FAD	Homotetramero (42×4 kDa)	Biosíntesis de tiamina. Otros sustratos: Sarcosina, N-etil-Gly, D-Pro, D-Ala	O31616	(Nishiya e Imanaka, 1998; Settembre <i>et al.</i> , 2003)

<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 (GoxK)	Gly	FAD	Homotetrámero (42x4 kDa)	Otros sustratos: Sarcosina, N-etil-Gly, Gly-etil-éster, D-Pro, D-Ala. Termoestable	BAD74908	(Martínez-Martínez <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Bacillus cereus</i> HYC-7 (BceGO)	Gly	FAD	ND	Alta actividad frente a glifosato	AGC29723	(Zhan <i>et al.</i> , 2013; Yao <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus licheniformis</i> (BliGO)	Gly	FAD	40,2 kDa	Alta actividad frente a glifosato. T ^a opt=40 °C. pH opt=8,5	KND06304	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (GOPP)	Gly	FAD	Monómero (42,7 kDa)	Otros sustratos: Sarcosina>N-etil-Gly>D-Pro>D-Ala>Gly-etil-éster. T ^a opt=40 °C. pH opt=8,5	NP_742774	(Equar <i>et al.</i> , 2015)

L-aminoácido oxidasas (LAOs) de amplio espectro

<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> C2	L-Lys>L-Met>L-Glu>L-Leu>L-Gln>L-Tyr>L-Phe	ND	60 KDa	Antimicrobiana. pl=9,4. Contiene un péptido de 9 aa similar a AlpP	NA	(Chen <i>et al.</i> , 2010a)
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	L-Met>L-Gln>L-Leu>L-Phe>L-Glu>L-Trp	ND	Oligómero 110 kDa	Antimicrobiana	NA	(Gómez <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. B3	L-Leu>L-Lys>L-Tys>L-Asn>L-Gln>L-Met>L-cystine>L-Arg>L-Trp>L-Glu	FAD	60 kDa	Homología con LASPOs	AJZ73816	(Yu <i>et al.</i> , 2014b)
<i>Aquimarina</i> sp. antisso-27	L-Leu>L-Ile>L-Met>L-Val	ND	190 KDa	Algicida y antimicrobiana. pl=9,4	NA	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus carotarum</i> 2Pfa	L-Leu>L-Lys>L-Arg>L-Met>L-Asn	FAD	Homodímero (54x2 kDa)	Otros sustratos: D-isómeros. pl=4,8. pH opt=8–8,5	NA	(Brearley <i>et al.</i> , 1994)
<i>Cellulomonas cellulans</i> AM8	Todos los aa proteicos excepto Gly, L-Pro y L-Thr	FAD	55 kDa	Extracelular. pH opt=6,5-7,5	NA	(Braun <i>et al.</i> , 1992)
<i>Streptococcus oligofermentas</i> (SO-LAAO)	L-Asp>L-Trp>L-Lys>L-Ile>L-Arg>L-Asn>L-Gln. Reclasificada como aminoacetona oxidasa	FAD	43 KDa. Estructura cristalina resuelta a 1,9 Å (PDB ID 4CNK)	Antioxidante y competencia microbiana	ACA52024	(Tong <i>et al.</i> , 2008; Zhou <i>et al.</i> , 2012)

<i>Corynebacterium</i> sp. A20	Todos los aa proteicos excepto L-Asp, L-Thr, L-Pro y Gly	ND	130-140 kDa	Catabolismo de L-aa	NA	(Coudert, 1975)
<i>Morganella morganii</i>	L-Leu>L-Phe>L-Trp>L-Met>L-Tyr	FAD	ND	Tª opt=35-43 °C	NA	(Bouvrette y Luong, 1994)
<i>Rhodococcus opacus</i> DSM 43250	Todos los aa proteicos excepto Gly, L-Thr y L-Pro	FAD	Homodímero (53×2 kDa). Estructura cristalina resuelta a 1,6 Å (PDB ID 2JB2)	pl=4,8. pH opt=8-9. Tª opt=30 °C	AAL14831	(Faust <i>et al.</i> , 2006; Geueke y Hummel, 2003)
<i>Rhodococcus</i> sp. AIU Z-35-1	L-Ala>Nα-Z-L-Lys>L-His>L-Tyr>L-Ornitina>L-Gln	FAD	Homodímero (51×2 kDa)	Inhibida por hidracina, fenilhidrazina e hidroxilamina. pl=4,8. pH opt=8-8,5.	NA	(Isobe y Nagasawa, 2007)
<i>Rhodococcus</i> sp. AIU LAB-3	L-Ala>L-Gln>Nα-Z-L-Lys>L-rn>L-Arg>L-Phe>L-Met>L-Lys	FAD	Homodímero (52,5×2 kDa)	Inhibida por hidrazina y fenilhidrazina. pH opt=6–8,5. Tª opt=45 °C	NA	(Isobe <i>et al.</i> , 2013)
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301 y PCC 7942	L-Arg>L-Lys>L-Ornitina>L-His (L-aa básicos)	FAD	50 kDa	Periplásmica. pl= 8,5	CAA88452	(Gau <i>et al.</i> , 2007; Pistorius y Voss, 1982)
<i>Synechococcus cedrorum</i> PCC 6908	L-Arg>L-Lys>L-Ornitina>L-His (L-aa básicos)	FAD	Homodímero (49×2 kDa)	pl= 8,5	NA	(Gau <i>et al.</i> , 2007)
<i>Trichoderma harzianum</i> ETS 323	L-Phe>L-Lys>L-Glu>L-Ala	FAD	Monómero-Dímero en equilibrio (63,5 kDa)	Agente de biocontrol. Extracelular. pH opt=7	ADD91592	(Yang <i>et al.</i> , 2011a; Yang <i>et al.</i> , 2011b)
<i>Habeloma cylindrosporum</i>	L-Glu>L-Gln>L-Ornitina>L-Asn>L-Leu>L-His>L-Phe ...	FAD	70 y 140 KDa	Catabolismo de L-aa. Mineralización del nitrógeno. pl=6,2. pH opt=7–8	ADM80414	(Nuutinen <i>et al.</i> , 2012; Nuutinen y Timoneni, 2008)
<i>Laccaria bicolor</i> S238N	L-Phe, L-His, L-Met, L-Leu, y L-Lys	FAD	ND	Catabolismo de L-aa. Mineralización del nitrógeno. pl=6,2	DAA34975	(Nuutinen <i>et al.</i> , 2012; Nuutinen y Timoneni, 2008)
<i>Neurospora crassa</i>	L-His>aminobutírico>L-canavanina>L-Tyr>D,L-Ornitina>D,L-Phe>L-Leu	FAD	ND	Catabolismo de L-aa	CAD21325	(Thayer y Horowitz, 1951)

<i>Aspergillus nidulans</i>	L-His>aminobutírico>L-canavanina>L-Tyr>D,L-Ornitina>D,L-Phe>L-Leu	FAD	ND	Catabolismo de L-aa	AAT84085	(Davis <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aspergillus fumigatus</i> P13	L-Tyr>L-Phe>L-Pro>L-Ser>L-Leu/L-Ala>L-Asp	ND	ND	No oxida D-aa	NA	(Singh <i>et al.</i> , 2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Todos los aa proteicos excepto L-Cys	FAD	Oligómero $\alpha_x\beta_x$ [(66+135) $\times$ X kDa].	Catabolismo de L-aa. Periplasmática	EDP07010	(Vallon <i>et al.</i> , 1993)
Fitoplancton del género <i>Pleurochrysis</i> , <i>Prymnesium</i> , y <i>Amphidinium</i>	L-Ala, L-Glu, L-Leu, L-Lys y L-Ornitina	ND	ND	Catabolismo de L-aa. No oxida L-Ser o Gly	NA	(Palenik y Morel, 1990)

Apéndice A.2. Actividad, expresada como % de actividad relativa respecto a la actividad sobre la Gly, frente a los diferentes sustratos que se indican en el sobrenadante de la cepa LD de *M. mediterranea* y en las proteínas GoxA y TsGox2A expresadas recombinantemente en *E. coli*. En la tabla se muestran los valores de actividad media así como la desviación estándar obtenida por triplicado. En gris se destaca la actividad frente a la Gly, el mejor sustrato, y frente a la glicina-etil-éster, único sustrato oxidado aparte de la Gly; NE, no ensayado; r., recombinante.

SUSTRATO:	Sobrenadante LD	GoxA r.	TsGox2A r.
Gly	100,00 %	100,00 %	100,00 %
Glicina-etil-éster	30,07 ± 2,98 %	44,36 ± 0,95%	19,90 ± 3,57 %
Val	<1 %	<1 %	<1 %
Leu	<1 %	<1 %	<1 %
Thr	<1 %	<1 %	<1 %
Lys	<1 %	<1 %	<1 %
Trp	<1 %	<1 %	<1 %
His	<1 %	<1 %	<1 %
Phe	<1 %	<1 %	<1 %
Ile	<1 %	<1 %	<1 %
Arg	<1 %	<1 %	<1 %
Met	<1 %	<1 %	<1 %
Ala	<1 %	<1 %	<1 %
Pro	<1 %	<1 %	<1 %
Ser	<1 %	<1 %	<1 %
Cys	<1 %	<1 %	<1 %
Asn	<1 %	<1 %	<1 %
Gln	<1 %	<1 %	<1 %
Tyr	<1 %	<1 %	<1 %
Asp	<1 %	<1 %	<1 %
Glu	<1 %	<1 %	<1 %
D-Ala	<1 %	<1 %	<1 %
D-Pro	<1 %	<1 %	<1 %
D-Glu	<1 %	<1 %	<1 %
D-Lys	<1 %	<1 %	<1 %
D-p-hidroxifenilglicina	<1 %	<1 %	<1 %
N-Etil-Gly	<1 %	<1 %	<1 %
Sarcosina	<1 %	<1 %	<1 %
Ornitina	<1 %	<1 %	NE
Citrulina	<1 %	<1 %	NE
β-Ala	<1 %	<1 %	NE
Metilamina	<1 %	<1 %	NE
Dimetilamina	<1 %	<1 %	NE
Trimetilamina	<1 %	<1 %	NE
Cadaverina	<1 %	<1 %	NE
Putrescina	<1 %	<1 %	NE
Ác. diaminopimélico	<1 %	<1 %	NE
Ác. 6-amino-caproico	<1 %	<1 %	NE
Ác. L-amino-adípico	<1 %	<1 %	NE
Ác. 5-amino-valérico	<1 %	<1 %	NE
Glifosato	<1 %	<1 %	NE
Aminoacetona	<1 %	NE	NE
β-Glutámico	<1 %	NE	NE

Apéndice A.3. Genes de la familia *lodA* depositados en la base de datos del IMG con fecha de Enero de 2014.

Genoma / Muestra	Dominio	Phylum	Clase	Orden	Referencia IMG	Locus	AA long	Grupo	Dominios conservados
<i>Terriglobus saanensis</i> SP1PR4, DSM 23119	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	649914559	AciPR4_2529	913	ID	
<i>Actinoplanes globisporus</i> DSM 43857	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2515244410	A3CQDRAFT_07977	985	Ninguno	pfam 14518
<i>Amycolatopsis balhimycina</i> DSM 44591	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2517477565	A3CEDRAFT_0690	481	Ninguno	
<i>Amycolatopsis vancoresmycina</i> DSM 44592	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2546378692	H480_25957	1114	Ninguno	pfam 13519
<i>Cryptosporangium arvum</i> YU 629-21, DSM 44712	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2510402938	CryarDRAFT_3973	1026	Ninguno	pfam 13519
<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054, NBRC 14216	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2511595487	KSE_06200	664	IIIC	
<i>Microlunatus phosphovorus</i> NM-1	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	650913489	MLP_20440	664	IVB	
<i>Streptomyces afghaniensis</i> 772	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2546772914	STAFG_1983	999	III	pfam 00199
<i>Streptomyces auratus</i> AGR0001	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2533914306	SU9_01650	673	IIIC	
<i>Streptomyces flavidovirens</i> DSM 40150	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2523212643	G412DRAFT_06355	745	Ninguno	
<i>Streptomyces purpureus</i> KA281, ATCC 21405	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2516519010	StrpuDRAFT_3616	993	III	pfam 00199
<i>Streptomyces scabiei</i> 87.22	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	646659180	SCAB_78081	673	IIIC	
<i>Streptomyces</i> sp. HPH0547	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2541458761	HMPREF1486_04898	674	IIIC	
<i>Streptomyces turgidiscabies</i> Car8	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	2541331106	STRTUCAR8_01195	673	IIIC	
<i>Rudanella lutea</i> DSM 19387	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	2517151029	RudluDRAFT_3652	645	III	
<i>Aquimarina latercula</i> DSM 2041	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2523972987	H526DRAFT_00682	737	ID	
<i>Aquimarina muelleri</i> DSM 19832	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2524103209	H527DRAFT_03370	709	IA	
<i>Chryseobacterium gregarium</i> DSM 19109	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2523744441	H561DRAFT_01490	646	III	
<i>Donghaeana dokdonensis</i> DSW-6	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2540718439	DDD_3116	641	IVB	
<i>Flavobacterium soli</i> DSM 19725	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2523123554	G508DRAFT_03147	1072	IIIA	pfam 00199
<i>Flavobacterium subsaxonicum</i> DSM 21790	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2525331177	G509DRAFT_1169	679	IA	
<i>Kordia algicida</i> OT-1	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	641459908	KAOT1_07778	704	II	

<i>Kordia algicida</i> OT-1	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	641460223	KAOT1_05622	664	IVB	
<i>Owenweeksia hongkongensis</i> DSM 17368	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2509012461	Oweho_2121	725	IB	
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2523672835	H518DRAFT_02976	1061	IIIA	pfam 00199
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> DSM 18103	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	2523673417	H518DRAFT_03559	807	II	
<i>Lewinella cohaerens</i> DSM 23179	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	2515281512	A3EUDRAFT_02929	655	III	
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> DSM 785	Bacteria	Chloroflexi	Chloroflexi	Herpetosiphonales	2509059539	Haur_00883	645	III	
<i>Nitrolancetus hollandicus</i> Lb	Bacteria	Chloroflexi	Thermomicrobia	Sphaerobacterales	2520384729		667	IA	
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	643475666	PCC8801_2625	518	Ninguno	
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	644981411	Cyan8802_3478	518	Ninguno	
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	2535024168		990	IIIB	pfam 00199
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7336	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	2506749096	Syn7336_3773	626	III	
<i>Synechococcus</i> sp. WH7805	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	639022017	WH7805_00980	672	II	
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7103	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Nostocales	2507474092	Cal7103DRAFT_00009910	1049	Ninguno	pfam 14158
<i>Geitlerinema</i> sp. PCC 7105	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Oscillatoriales	2510099035	Gei7105DRAFT_0285	691	IA	
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Oscillatoriales	2509841119	Lepto7375DRAFT_1136	703	IB	
<i>Lyngbya majuscula</i> 3L	Bacteria	Cyanobacteria	unclassified	Oscillatoriales	2506481954	LYNGBM3L_45960	636	IIIB	
<i>Paenibacillus pinihi</i> DSM 23905	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	2524187775	H583DRAFT_01923	1099	Ninguno	pfam 14158
<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	637435365	RB4289	527	Ninguno	
<i>Rhodopirellula baltica</i> SH28	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	2537186271	RBSH_01579	487	Ninguno	
<i>Rhodopirellula</i> sp. SWK7	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	2534782291	RRSWK_06616	676	IA	
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	637086590	CC0556	687	IB	
<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Magnetococcales	639721039	Mmc1_0290	608	IC	
<i>Agrobacterium vitis</i> S4	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	643648894	Avi_5261	672	IIIB	
<i>Ancylobacter</i> sp. FA202	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2517476494	A3M1DRAFT_4583	666	IIB	
<i>Ancylobacter</i> sp. 501b	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2520000086	D895DRAFT_0836	666	IIB	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> WSM2783	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513671317	YY7DRAFT_00616	654	IIA	

<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 123	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2528856988	K287DRAFT_08450	759	ID	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513941113	A3AODRAFT_03549	664	IVA	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 38	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513943876	A3AODRAFT_06316	759	ID	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2512002546	BJ6T_70320	664	IVA	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2512000708	BJ6T_51940	759	ID	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCGE-LA001	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2520791139	BCCGELA001_11569	664	IVA	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Cp5.3	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2524441264	K289DRAFT_05852	654	IIA	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. EC3.3	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513716746	YUUDRAFT_02264	654	IIA	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. WSM3983	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513638820	YUADRAFT_02114	654	IIA	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2511394679	PMI42_01600	754	ID	
<i>Mesorhizobium</i> sp. WSM4349	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2515624897	B041DRAFT_00946	660	IVA	
<i>Methylobacterium</i> sp. 10	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2546997099	K368DRAFT_2874	654	IIA	
<i>Microvirga lotononidis</i> WSM3557	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2509073503	MicloDRAFT_00001400	661	IVA	
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	637969517	Nham_1019	881	ID	
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	637971096	Nham_2642	674	Ninguno	
<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	638920629	NB311A_15287	666	Ninguno	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 128C53	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2515651856	B062DRAFT_04548	1004	IIIB	pfam 00199
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513714293	YUSDRAFT_07289	883	ID	
<i>Rhizobium mesoamericanum</i> STM6155	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2513599306	YY3DRAFT_04971	1413	Ninguno	pfam 14158
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	637475602	RPA2471	654	IIA	
<i>Xanthobacter</i> sp. 126	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2517234183	XAN126DRAFT_4633	706	IB	
<i>Xanthobacter</i> sp. 126	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	2517234373	XAN126DRAFT_4823	888	Ninguno	
<i>Citricella</i> sp. SE45	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	647843968	CSE45_2361	655	IIIB	
<i>Citricella</i> sp. SE45	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	647844929	CSE45_3261	694	IB	
<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	648284617	R2601_05863	556	Ninguno	
<i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	2523511524	salmuc_02447	685	Ninguno	

<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2512035869	AZOLI_p50417	999	III	pfam 00199
<i>Azospirillum</i> sp. B510	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	646556648	AZL_e04100	1004	III	pfam 00199
<i>Fodinicurvata sediminis</i> DSM 21159	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2523907283	G502DRAFT_3288	677	IIB	
<i>Inquilinus limosus</i> DSM 16000	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2523933296	G537DRAFT_06397	662	IIIB	
<i>Nisaea denitrificans</i> DSM 18348	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2525379171	K328DRAFT_3844	684	IIB	
<i>Nisaea</i> sp. BAL199	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	641432191	BAL199_14697	677	IIB	
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2523407328	G578DRAFT_2845	700	IIB	
<i>Thalassobaculum salexigens</i> DSM 19539	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2523407709	G578DRAFT_3226	677	IIB	
<i>Tistrella mobilis</i> KA081020-065	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	2519490909	TMO_c0491	648	IIIB	
<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC 31461	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	2547435671	KK7DRAFT_01671	881	ID	
<i>Sphingomonas</i> sp. S17	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	651582060	SUS17_588	986	III	pfam 00199
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC 19860	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	650735002	Acav_2541	670	IIIB	
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> RS-1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2547287637	AASARDRAFT_02021	670	IIIB	
<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>phenolicus</i> DSM 16503	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2524227850	G456DRAFT_01748	659	IIA	
<i>Azohydromonas australica</i> DSM 1124	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2527176977	H537DRAFT_05061	601	IC	
<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	642413908	BamIOP4010DRAFT_0033	706	IB	
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2563064361	PMI06_008734	963	III	pfam 00199
<i>Burkholderia</i> sp. BT03	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2563064354	PMI06_008727	1409	Ninguno	pfam 14158
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	646771440	BC1002_7113	667	Ninguno	
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2524916787	F559DRAFT_00293	629	III	
<i>Chitinimonas koreensis</i> DSM 17726	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2524920575	F559DRAFT_04084	905	ID	
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2514031881	A3A5DRAFT_06866	1025	IIIB	pfam 00199
<i>Delftia acidovorans</i> CCUG 15835	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2541343206	HMPREF9702_04267	633	III	
<i>Delftia acidovorans</i> CCUG 274B	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2541346198	HMPREF9701_00976	633	III	
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	641298631	Daci_3528	633	III	

<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	650860805	DelCs14_3291	633	III	
<i>Duganella zoogloeoides</i> ATCC 25935	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2518931950	F460DRAFT_04769	740	IA	
<i>Massilia timonae</i> CCUG 45783	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2532942463	HMPREF9710_03282	979	III	pfam 00199
<i>Pusillimonas</i> sp. T7-7	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	650826134	PT7_3642	666	Ninguno	
<i>Ralstonia solanacearum</i> MolK2	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	2541798314		1000	IIIB	pfam 00199
<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	651230827	RSPO_m00447	999	IIIB	pfam 00199
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Neisseriales	637454099	CV3268	606	IC	
<i>Coralloccoccus coralloides</i> DSM 2259	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	2512829099	COCOR_02746	669	I	
<i>Cystobacter fuscus</i> DSM 2262	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	2538044953	D187_001636	750	Ninguno	
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	Bacteria	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	641164698	PPSIR1_31258	701	IVB	
<i>Ferrimonas kyonanensis</i> DSM 18153	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2524104645	H598DRAFT_00619	689	IB	
<i>Marinimicrobium agarilyticum</i> DSM 16975	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2524121843	G547DRAFT_01229	689	IB	
<i>Marinobacterium rhizophilum</i> DSM 18822	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2519006291	F451DRAFT_01570	612	III	
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542023514	PCIT_20074	821	II	
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542023929	PCIT_22144	649	IIIA	
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> NCIMB 1889	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542024022	PCIT_22609	678	IA	
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2505176536	PflaDRAFT_00014030	642	IIIA	
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> 2ta6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2505179241	PflaDRAFT_00041100	694	IA	
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2550715157	UY7DRAFT_04898	646	IIIA	
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> JG1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2550713913	UY7DRAFT_03653	694	IA	
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2505183675	PlutDRAFT_00005330	694	IA	
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> 2ta16	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2505186349	PlutDRAFT_00032070	718	IB	
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2520471309	G366DRAFT_00653	642	IIIA	
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ATCC 15057	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2520473375	G366DRAFT_02721	694	IA	
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542029830	PPIS_10015	642	IIIA	
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> JCM 20779	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542031718	PPIS_19511	694	IA	

<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2541424619	PRUB_04171	722	IB	
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2541428757	PRUB_24676	1039	IIIA	pfam 00199
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20495	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2540458794		1000	IIIA	pfam 00199
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Bsw20308	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2540452162	D172_1358	1000	IIIA	pfam 00199
<i>Pseudoalteromonas spongiae</i> UST010723-006	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2542035141	PSPO_13067	715	IB	
<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	639009030	PTD2_20217	749	IA	
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	637919379	Sde_0317	767	ID	
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	643424060	swp_0649	707	IB	
<i>Shewanella</i> sp. 38A_GOM-205m	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	2546918702	N512DRAFT_04273	706	IB	
<i>Shewanella woodyi</i> MS32, ATCC 51908	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	641635855	Swoo_4290	700	IB	
<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	646692023	Nhal_1391	683	IA	
<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	2512463316	Rhein_1334	674	IA	
<i>Rheinheimera</i> sp. A13L	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	2512464576	Rhein_2598	657	IIIA	
<i>Arsenophonus nasoniae</i> DSM 15247	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	2526112037	G468DRAFT_01095	771	III	
<i>Arsenophonus</i> sp. ArN	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	2510071413	ArN_00015340	771	III	
<i>Methylomonas</i> sp. 11b	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	2516192574	Meth11bDRAFT_4055	524	Ninguno	
<i>Methylomonas</i> sp. MK1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Methylococcales	2522499056	G006DRAFT_1989	524	Ninguno	
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	637833463	HCH_03141	619	III	
<i>Hahella ganghwensis</i> DSM 17046	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2520615829	F566DRAFT_05357	692	IB	
<i>Halomonas anticariensis</i> DSM 16096	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2524952843	F567DRAFT_04168	589	IC	
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2506228520	Marme_1655	680	IIB	
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2506229270	Marme_2396	673	IIIB	
<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB-1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2506229543	Marme_2662	726	IA	
<i>Marinomonas</i> sp. GOBB3-320	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2504626912	M320_pool_00037300	727	IA	
<i>Marinomonas</i> sp. MED121	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	638943768	MED121_12495	679	IB	
<i>Marinomonas</i> sp. MWYL1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	640806104	Mmwyl1_3721	727	IA	

<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2524095414	H579DRAFT_00201	973	III	pfam 00199
<i>Oceanospirillum beijerinckii</i> DSM 7166	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	2524097887	H579DRAFT_02675	692	IB	
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i> MTCC 11365	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2546621803	L293_0743	1008	IIIB	pfam 00199
<i>Acinetobacter</i> sp. NBRC 100985	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2533901541		1008	IIIB	pfam 00199
<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> DSM 14971	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2518262899	C502DRAFT_01575	1006	IIIB	pfam 00199
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	642701566	CJA_0227	684	IB	
<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	642705102	CJA_3778	616	III	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NZ17	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2506351877	PfINZI7_00013260	617	III	
<i>Pseudomonas resinovorans</i> DSM 21078	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2525344494	G559DRAFT_00896	668	IA	
<i>Pseudomonas viridiflava</i> CC1582 (CC1582)	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2506935211	CC1582_00022990	674	IA	
<i>Pseudomonas viridiflava</i> TA043 (TA043)	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	2506970397	TA043_00024900	674	IA	
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> ART-Xtg29	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	2536428630	XTG29_02241	687	IB	
<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	Eukaryota	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	2509255936	e_gw1.16.416.1.1	574	V	
<i>Gymnopus luxurians</i> FD-317 M1	Eukaryota	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	2509255939	estExt_Genewise1.C_160241.1	607	V	
<i>Hypholoma sublateritium</i> FD-334 SS-4	Eukaryota	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	2509219408	e_gw1.22.201.1.1	636	V	
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	Eukaryota	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	645819475	LACBIDRAFT_304964	632	V	
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	Eukaryota	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	645908373	POSPLDRAFT_96923	653	V	

Apéndice A.4. Condiciones ensayadas para el cultivo de *N. denitrificans* y *T. salexigens*. Todos los medios poseen una base de SST (Sánchez Amat y Torrella, 1990). Act, Acetato de sodio; Casa, Casaminoácidos; Glc, Glucosa; Glu, Glutamato; Leu, L-Leucina; Lys, L-Lisina; Man, D-Manitol; Pept, Peptona; Pyr, Piruvato de sodio; Tr, Elementos traza; Vit, Solución de vitaminas Kao and Michayluk (Sigma); YE, Extracto de levadura.

			<i>N. denitrificans</i>	<i>T. salexigens</i>
Fuente de C	Fuente de N	Suplementos	Crecimiento	Crecimiento
Glc 30 mM	Glu 3 mM	-	-	-
Glc 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	-	-	-
Glc 30 mM	Glu 3 mM + Leu 3 mM	-	-	-
Glc 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	Vit	-	-
Glc 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	Tr	-	-
Pyr 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	Vit	-	-
Act 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	Vit	-	-
Man 30 mM	Glu 3 mM + Lys 3 mM	Vit	-	-
Glc 30 mM + Casa 0.05 %			-	+
Pept 0.5 %			-	-
YE 0.1 %			+	+
Pept 0.5 % + YE 0.1 %			+	+
Glc 30 mM + YE 0.1 %			+	+
Glc 30 mM + YE 0.01 %			+	+

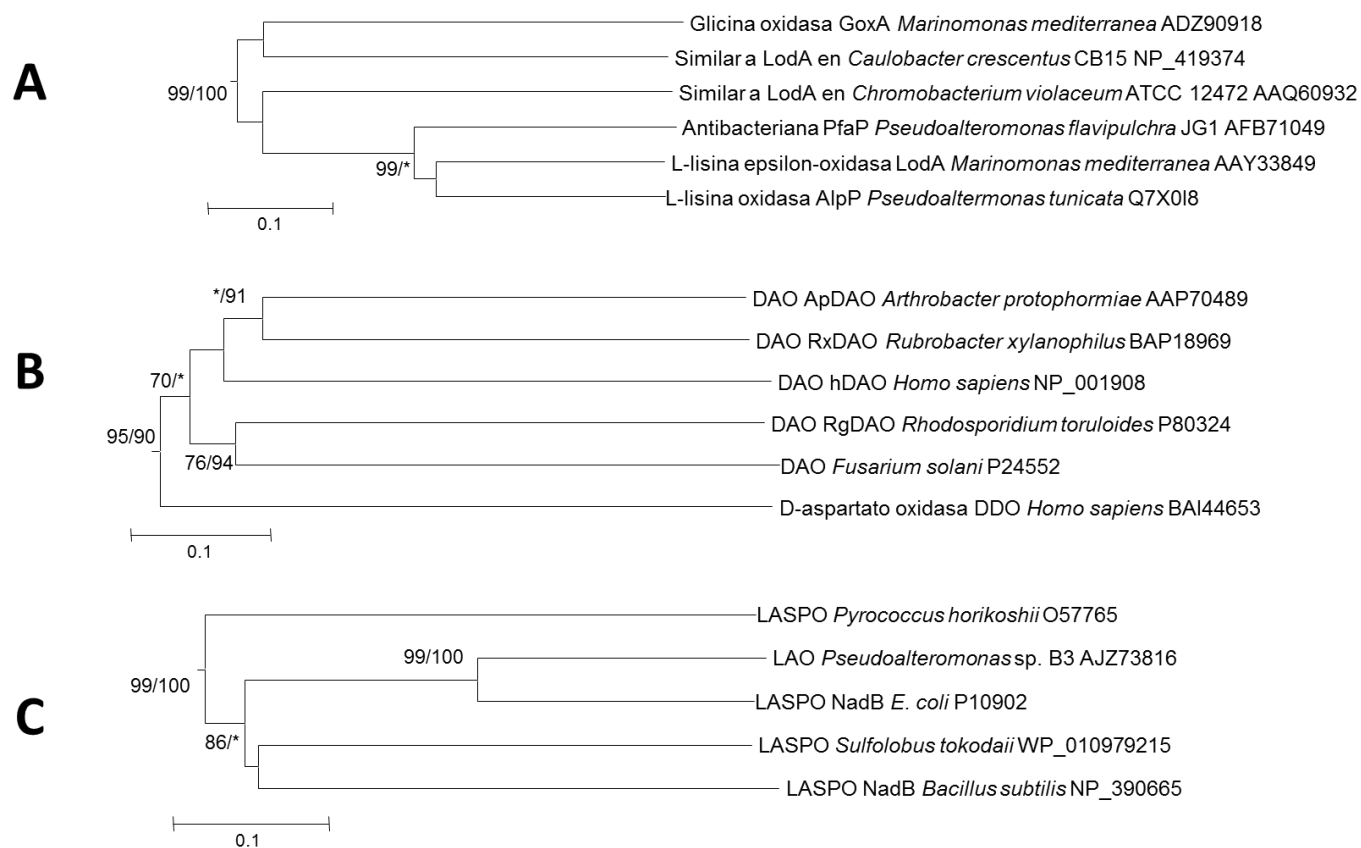
Apéndice A.5. L-aminoácido oxidasas (LAOs) características de organismos superiores. Los organismos marinos se indican en negrita. ND, no determinado.

Organismo (Nombre de la enzima)	Actividad (principal sustrato)	Cofactor	Estructura / Masa molecular	Varios	Número de acceso	Fuente o Referencia
Gasterópodos						
<i>Aplysia californica</i> (Escapina)	L-lisina y L-arginina oxidasa (L-Lys, L-Arg)	FAD	Monómero (60 kDa)	Antimicrobiana. Defensa frente a depredadores	Q6IWZ0	(Yang <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aplysia kurodai</i> (Aplisianina A)	L-lisina y L-arginina oxidasa (L-Lys, L-Arg)	FAD	Homotetrámero (85 × 4 kDa)	Antimicrobiana	BAA11867	(Jimbo <i>et al.</i> , 2003; Kamiya <i>et al.</i> , 1986)
<i>Aplysia californica</i> (Aplisianina A)	L-lisina y L-arginina oxidasa (L-Lys, L-Arg)	FAD	Homotetrámero (85 × 4 kDa)	Antimicrobiana. Comparte un 85 % de identidad con Aplisianina A de <i>A. kurodai</i>	NP_001191524	(Cummins <i>et al.</i> , 2004)
<i>Achatina fulica</i> (Achacina)	LAO de amplio espectro (L-Met>L-Leu>L-Trp>L-Lys>L-Arg>L-Phe>L-Cys>L-Asn)	FAD	56 kDa	Antimicrobiana	CAA45871	(Ehara <i>et al.</i> , 2002; Obara <i>et al.</i> , 1992)
Vertebrados						
<i>Sebastes schlegelii</i> (SSAP)	L-lisina oxidasa (L-Lys)	FAD	Homodímero (53 × 2 kDa)	Antimicrobiana. Inmunidad innata de peces	BAF43314	(Kitani <i>et al.</i> , 2007)
<i>Danio rerio</i> (Isoforma X1)	ND	FAD	ND	Hipotética LAO	XP_009289996	NCBI
<i>Bothrops jararacussu</i> (BjsuLAO)	Oxidasa de L-aa aromáticos/hidrofóbicos (L-Met>L-Leu>L-Phe>L-Ile>L-Trp>L-Tyr)	FAD	Homodímero (56 × 2 kDa). Estructura cristalina resuelta (PDB ID: 4e0v)	Antimicrobiana. Presente en el veneno de la serpiente	AAR31182	(Ullah <i>et al.</i> , 2012)
<i>Crotalus durissus cumanensis</i> (CdcLAO)	Oxidasa de L-aa aromáticos/hidrofóbicos	FAD	Monómero (55 kDa)	Antimicrobiana. Presente en el veneno de la serpiente	K9N7B7	(Vargas <i>et al.</i> , 2013)
<i>Homo sapiens</i> (IL4I1)	Oxidasa de L-aa aromáticos (L-Phe>L-Trp>L-Tyr)	FAD	~70 kDa	Regulador del sistema inmune	Q96RQ9	(Boulland <i>et al.</i> , 2007; Mason <i>et al.</i> , 2004)

Apéndice A.6. Proteínas representativas con actividad D-aminoácido oxidasa (DAO). ND, no determinado.

Organismo (Nombre de la enzima)	Actividad (principal sustrato)	Cofactor	Estructura / Masa molecular	Varios	Número de acceso	Fuente o Referencia
DAOs de microorganismos						
<i>Rubrobacter xylophilus</i> (RxDAO)	Oxidasa de D-aa neutros/básicos	FAD	Monómero (24,1 kDa)	Termostable. pH opt=7.5–10. T ^a opt=65 °C	BAP18969	(Takahashi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Arthrobacter protophormiae</i> (ApDAO)	Oxidasa de D-aa neutros/hidrofóbicos	FAD	Homodímero (34.6 × 2 kDa)	pI=4.2. pH opt=6.5–8.5	AAP70489	(Geueke <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> (RgDAO)	DAO	FAD	Homodímero (40 × 2 kDa). Estructura cristalina resuelta (PDB ID: 1COL)		P80324	(Umhau <i>et al.</i> , 2000)
<i>Fusarium solani</i>	DAO	FAD	40 kDa	Oxida la cefalosporina C	P24552	(Isogai <i>et al.</i> , 1990)
DAOs de organismos superiores						
<i>Homo sapiens</i> (hDAO)	DAO (D-Ala, D-Ser, D-Pro, Gly)	FAD	Homodímero (39.4 × 2 kDa)	Relacionada con el catabolismo de la D-Ser	NP_001908	(Molla <i>et al.</i> , 2006)
<i>Homo sapiens</i> (DDO)	D-aspartato oxidasa (D-Asp, N-methyl-D-aspartate, D-Glu)	FAD	37 kDa	Relacionada con el catabolismo del D-Asp	BAI44653	(Katane <i>et al.</i> , 2010; Setoyama <i>et al.</i> , 1997)

Apéndice A.7. Relación filogenética de las proteínas representativas de la familia LodA (A), D-aminoácido oxidasas (DAOs) (B) y L-aspartato oxidasas (LASPOs) (C). El árbol fue construido con el método del “Vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas con la herramienta MUSCLE en MEGA6. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood, ML). Los asteriscos indican que esa rama no fue detectada o tenía un valor inferior al 70 %.



Apéndice A.8. Relación filogenética de L-aminoácido oxidasas (LAOs) representativas de vertebrados (A), gasterópodos (B) y hongos (C). El árbol fue construido con el método del “Vecino más cercano” (Neighbor-Joining, NJ) en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas con la herramienta MUSCLE en MEGA6. La distancia evolutiva fue calculada como proporción de residuos diferentes (p-distance). En las ramas se indican los valores estadísticos de probabilidad superiores al 70 % (bootstrap > 70 %) para los métodos NJ y “Máxima verosimilitud” (Maximum Likelihood, ML).

