



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Biología Molecular

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Estudio bioquímico, genético y biotecnológico de la ruta catabólica responsable de la degradación de histamina en *Pseudomonas putida* U.

Manuel de la Torre García

Tesis Doctoral. León,

2018



Programa de Doctorado "Biología Molecular y Biotecnología"

Tesis Doctoral dirigida por el Dr. D. José María Luengo Rodríguez y el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	17
1. AMINAS BIOGÉNICAS.....	19
1.1. Aspectos generales.....	19
1.2. Clasificación.	20
1.3. Papel de las aminas biogénicas.	21
1.4. Aminas biogénicas como neurotransmisores.....	22
1.4.1. Catecolaminas.....	22
1.4.2. Triptaminas.....	25
1.4.3. Histamina.....	25
1.4.4. Aminas traza.	26
1.5. Aminas biogénicas en los alimentos.	27
1.6. Toxicidad de las aminas biogénicas.....	28
1.7. Producción de aminas biogénicas.	32
1.7.1. Descarboxilación de aminoácidos.	33
1.7.2. Microorganismos productores de aminas biogénicas.....	35
1.8. Detección de aminas biogénicas.	36
1.8.1. Detección de microorganismos productores de aminas biogénicas.	36
1.8.2. Métodos analíticos empleados para la detección de aminas biogénicas en los alimentos.....	37
1.9. Degradación de aminas biogénicas.....	38
1.9.1. Quinoproteínas amino oxidasas.....	40
1.9.2. Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas.	40

1.9.3.	Quinoproteínas amino deshidrogenasas.	41
1.9.4.	Flavoproteínas amino oxidasas.	41
1.9.5.	Degradación de aminas biogénicas en pseudomonadales.	42
1.10.	Perspectivas de futuro.	50
2.	HISTAMINA.	52
2.1.	Aspectos generales.	52
2.2.	Síntesis de histamina: histidina descarboxilasa.	53
2.3.	Histamina endógena en el ser humano.	55
2.4.	Histamina exógena.	55
2.4.1.	Histamina en pescados.	57
2.4.2.	Histamina en quesos.	59
2.4.3.	Histamina en carne fermentada.	60
2.4.4.	Histamina en vinos.	61
2.4.5.	Histamina en otros alimentos.	62
2.5.	Intoxicación por histamina y legislación.	63
2.6.	Intolerancia a la histamina.	66
2.7.	Receptores de histamina.	67
2.8.	Antihistamínicos.	70
3.	DEGRADACIÓN DE HISTAMINA.	72
3.1.	Diamino oxidasa.	73
3.2.	Histamina N-metiltransferasa.	75
3.3.	Degradación de núcleos de imidazol mediada por ácido ascórbico.	76
3.4.	Hidantoinasas microbianas.	78
4.	DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS.	79
4.1.	Hidroxilación del anillo aromático.	79
4.2.	Degradación de compuestos formados por un núcleo de imidazol.	81

4.2.1. Ácido formimino-aspártico como intermediario de la degradación de ácido imidazolacético.....	82
5. FUNCIONES DEL ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO.....	83
OBJETIVOS.....	87
MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.	95
1.1. Especies bacterianas pertenecientes al género <i>Pseudomonas</i>	95
1.1.1. <i>Pseudomonas putida</i> U.....	95
1.1.2. <i>Pseudomonas putida</i> DOC21.	98
1.2. Especies bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	99
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> HB101.	99
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> DH10B.....	99
2. VECTORES UTILIZADOS.	102
2.1. pGS9.	102
2.3. pUC18.....	103
2.4. pGEM [®] -T Easy.....	103
2.5. pTZ57R/T.	104
2.6. pK18:: <i>mob</i>	105
2.7. pJQ200KS.....	105
2.8. pBBR1MCS-3/ pBBR1MCS-5.....	106
3. REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.	109
3.1. Síntesis química de compuestos que podrían actuar como intermediarios catabólicos de la ruta de degradación de histamina en <i>P. putida</i> U.....	110
3.1.1. Síntesis de ácido N-formimino-aspártico (FIA).....	110
3.1.2. Síntesis de ácido N- formil-L-aspártico (FAsp).....	111

4. MEDIOS DE CULTIVO.....	112
4.1. Medio Luria Bertani (LB).....	112
4.2. Medio Φ	113
4.3. Sales del medio mínimo (MM) de <i>Pseudomonas</i>	113
4.4. Suplementos a los medios de cultivo.	113
5. MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.	114
6. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS Y/O TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE DNA.	116
6.1. Determinación de la concentración y pureza del DNA/RNA.	116
6.2. Digestión del DNA.	117
6.3. Desfosforilación del DNA.	117
6.4. Ligación de fragmentos de DNA.	118
6.5. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.	118
6.6. Recuperación del DNA desde los geles de agarosa.	119
6.7. Aislamiento de DNA genómico de <i>Pseudomonas putida</i> U.	120
6.8. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	122
7. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>.....	123
7.1. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> : método del cloruro de rubidio.	123
7.2. Procedimiento de transformación: choque térmico.	124
8. TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).	125
9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA.	128
10. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE <i>P. PUTIDA</i> U.	129
10.1. Mutagénesis con el transposón Tn5.	129
10.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico.	132

10.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”.	135
10.1.3. Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.	139
10.2. Obtención de mutantes mediante disrupción.	139
10.3. Obtención de mutantes mediante delección.	142
11. EXPRESIÓN DE LOS GENES EN “TRANS”.	145
12. MÉTODOS PARA MUESTRAS DE PROTEÍNAS.	147
12.1. Obtención de extractos libres de células: disrupción celular mediante homogeneización mecánica.	147
12.2. Determinación de la actividad imidazolacetato monooxigenasa.	148
13.PCR A TIEMPO REAL (RT-QPCR).	149
14.ANÁLISIS DE LOS CALDOS DE CULTIVO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).	152
15. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).	153
15.1. Determinación de ácido aspártico.	153
16.EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS CATABÓLICOS EN DIFERENTES MUTANTES.	154
17. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR).	155
18. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	156
19. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).	156
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
1. AISLAMIENTO DE MUTANTES INCAPACES DE DEGRADAR HISTAMINA Y ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO.	164
2. ANÁLISIS MEDIANTE HPLC DEL CONSUMO DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO, ASÍ COMO DEL ACÚMULO DE INTERMEDIARIOS METABÓLICOS EN LOS CALDOS DE CULTIVO DE PSEUDOMONAS PUTIDA U Y DE LOS DISTINTOS MUTANTES.	170

3. IDENTIFICACIÓN DEL PUNTO DE INSERCIÓN DEL TRANSPOSÓN Tn5 Y SECUENCIACIÓN DE LAS ZONAS ADYACENTES.....	179
4. ANÁLISIS DE LOS DIFERENTES CLUSTERS IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE LA HISTAMINA Y DEL ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN <i>P. PUTIDA</i> U.....	180
4.1. <i>Cluster hin2</i> en <i>P. putida</i> U y análisis comparativo en otros microorganismos.	180
4.1.1. Gen <i>hinF</i> .	187
4.1.2. Gen <i>hinL</i> .	197
4.1.3. Gen <i>hinG</i> .	203
4.1.4. Gen <i>hinH</i> .	212
4.1.5. Análisis del ORF <i>PpU_0003</i> adyacente al <i>cluster hin2</i> .	235
4.2. <i>Cluster hin3</i> en <i>P. putida</i> U y análisis comparativo en otros microorganismos.	236
4.2.1. Gen <i>hinI</i> .	240
4.2.2. Gen <i>hinJ</i> .	250
4.3. Gen <i>hinK</i> .	258
4.4. Organización génica de los genes responsables del catabolismo de histamina y de ImAA en <i>P. putida</i> U.	265
4.5. Regulación de la ruta catabólica: actuación de los genes <i>hinK</i> Y <i>hinJ</i> .	266
4.5.1. Regulador transcripcional HinK.	266
4.5.2. Regulador transcripcional HinJ.	268
4.6. Análisis comparativo de los <i>clusters hin2</i> , <i>hin3</i> y del gen <i>hinK</i> en diferentes microorganismos.	270
5. RUTA CATABÓLICA PROPUESTA PARA LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> U.....	275
6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN <i>P. PUTIDA</i> U.....	279
<i>P. putida</i> DOC21 pMC-3 <i>hin2</i> .	279

<i>P. putida</i> DOC21 pMC-3 <i>hin2</i> pMC-5 <i>hinK</i>	282
<i>P. putida</i> DOC21 pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hin2</i> pMC-5 <i>hinK</i>	283
<i>P. putida</i> DOC21 pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hinF</i> pMC-5 <i>hinK</i> y <i>P. putida</i> DOC21 pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hinFL</i> pMC-5 <i>hinK</i>	285
7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS ENZIMAS CODIFICADAS EN LOS CLUSTERS HIN PARA DEGRADAR OTROS COMPUESTOS.	288
7.1. Aminas biogénicas y aminoácidos.....	288
7.2. Compuestos imidazólicos.	291
8. POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.	294
 CONCLUSIONES	 301
BIBLIOGRAFÍA	307

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia.

Ap: ampicilina.

ATP: trifosfato de adenosina.

CA: ácido carbamoilaspártico.

Cm: cloranfenicol.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

COMT: catecol *O*-metiltransferasa.

DAO: diamino oxidasa.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNasa: desoxirribonucleasa.

DO: densidad óptica.

DOPA: dihidroxifenilalanina

EC: comisión enzimática.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EFSA: European Food Safety Authority.

ESI: ionización por electropulverización (electrospray ionisation).

FAD(H₂): flavín adenín dinucleótido oxidado (reducido).

FAsp: ácido N-formil-aspártico.

FDA: Food and Drug Administration.

FIA: ácido N-formimino-aspártico.

FiAsn: N₂-formil-isoasparagina.

fi: fragmento interno.

G-: Gram-negativas.

G+: Gram-positivas.

G+C: contenido de guanina y citosina.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GRAS: Generalmente Reconocido Como Seguro.

Gm: gentamicina.

h: horas.

HA: ácido hidantoinacético.

HDC: histidina descarboxilasa.

hin: genes catabólicos de histamina y de ImAA.

his: genes catabólicos de histidina.

HIT: intolerancia a histamina.

HNMT: histamina N-metiltransferasa.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

H_nR: receptor de histamina.

ImAA: ácido imidazolacético.

ImAdh: imidazolacetaldehído.

IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosido.

IR: espectroscopía de infrarrojo.

Km: kanamicina.

LAB: bacterias ácido lácticas

LB: Luria Bertani.

MAO: monoamino oxidasa.

min: minuto.

MM: medio mínimo de composición definida.

MMH: medio mínimo histamina.

MMI: medio mínimo ácido imidazolacético.

MS: espectrometría de masas.

Mw: peso molecular.

NAD^(+/H): nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado/reducido).

NADP^(+/H): nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidado/reducido).

OIV: Organización Internacional de la Viña y Vino.

ORF: marco abierto de lectura.

pau: genes catabólicos de glutamilación de aminas biogénicas.

Pea: proteínas catabólicas de 2-feniletilamina.

PhAc: ácido fenilacético.

3-OH-PhAc: ácido 3-hidroxifenilacético.

3,4-OH-PhAc: ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

4-OH-PhAc: ácido 4-hidroxifenilacético.

pI: punto isoeléctrico.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PLP: piridoxal-5-fosfato.

p/v: relación peso/volumen.

Q-AmDH: quinoproteína amino deshidrogenasa.

Q-AmO: quinoproteína amino oxidasa.

QH-AmDH: quinohemoproteína amino deshidrogenasa.

Rf: rifampicina.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RNA: ácido ribonucleico.

RNasa: ribonucleasa.

rpm: revoluciones por minuto.

Rt: tiempo de retención.

RT-QPCR: PCR cuantitativa a tiempo real.

s: segundos.

SAM: S-adenosil-L-metionina.

SNC: sistema nervioso central.

Str: estreptomicina.

Tc: tetraciclina.

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

TE: Tris-EDTA.

TLC: cromatografía en capa fina.

Tm: temperatura de fusión.

Tyn: proteínas catabólicas de tiramina y dopamina.

UV: ultravioleta.

v/v: relación volumen/volumen.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS:

A: Alanina.

I: Isoleucina.

R: Arginina.

C: Cisteína.

K: Lisina.

S: Serina.

D: Aspártico.

L: Leucina.

T: Treonina.

E: Glutámico.

M: Metionina.

V: Valina.

F: Fenilalanina.

N: Asparragina.

W: Triptófano.

G: Glicina.

P: Prolina.

Y: Tirosina.

H: Histidina.

Q: Glutamina.

INTRODUCCIÓN

1. AMINAS BIOGÉNICAS.

1.1. Aspectos generales.

Las aminas son compuestos químicos orgánicos, de bajo peso molecular, derivados del amoniaco y resultantes de la sustitución de uno, dos o tres átomos de hidrógeno de la molécula por uno o más radicales alquilo. Dependiendo del número de sustituciones, las aminas se clasifican en primarias, secundarias o terciarias, respectivamente (Eller *et al.*, 2000). Cuando éstas se forman como resultado de la actividad de organismos vivos y poseen actividad biológica se denominan aminas biogénicas (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014; Santos, 1996).

Las aminas biogénicas se forman y se degradan como resultado de una actividad metabólica normal tanto en humanos como en animales, en plantas y en microorganismos (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014). Un ejemplo claro es la diamina putrescina, muy extendida en la naturaleza (Benkerroum, 2016). Otro ejemplo lo constituyen las poliaminas espermidina y espermina, producidas por animales, por plantas y por la mayoría de las bacterias (Smith, 1981). Las aminas aromáticas (histamina, 2-feniletilamina, tiramina, dopamina, adrenalina, noradrenalina, serotonina, etc.) son las aminas más comunes en los alimentos y desempeñan papeles fisiológicos muy importantes, ya que suelen actuar como neurotransmisores dentro del sistema nervioso central (Deutch y Roth, 1999).

La aparición de aminas biogénicas en los alimentos (usualmente los que han sufrido procesos de fermentación) suele ser dependiente de la cepa bacteriana que participa en la elaboración del mismo, del nivel de actividad descarboxilasa de la misma y de la disponibilidad de sustrato (aminoácidos) (Naila *et al.*, 2010). Cuando las aminas

biogénicas se acumulan en altas concentraciones en los alimentos, pueden causar efectos tóxicos en los consumidores (Biji *et al.*, 2016; Gardini *et al.*, 2006; Naila *et al.*, 2010; Santos, 1996). Afortunadamente, los seres vivos cuentan con diferentes sistemas de detoxificación de estas aminas biogénicas (la monoamino oxidasa -MAO- o la diamino oxidasa -DAO-), permitiendo su eliminación y evitando, de este modo, sus efectos perjudiciales. Sin embargo, puede haber casos en los que estos sistemas no funcionen correctamente o que se encuentren inhibidos por la acción de determinadas sustancias. Es entonces cuando la presencia de aminas biogénicas en los alimentos puede suponer un grave problema para la salud (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014; Naila *et al.*, 2010).

1.2. Clasificación.

Podemos clasificar las aminas biogénicas de acuerdo con diferentes criterios tales como su procedencia, la estructura química y/o el número de grupos amino presentes en la molécula (Benkerroum, 2016; Biji *et al.*, 2016; EFSA, 2011; Santos, 1996).

- En función de su procedencia, las consideramos:

- **Endógenas:** si son sintetizadas en los tejidos de los organismos superiores.
- **Exógenas:** si se ingieren en la dieta.

- Según su estructura química, podemos clasificarlas como:

- **Acíclicas** o de cadena lineal como son la putrescina, la espermidina, la espermina o la cadaverina.

- **Cíclicas:**
 - **Sin heteroátomo.** En ellas el ciclo está formado exclusivamente por átomos de carbono e hidrógeno: tiramina y feniletilamina.
 - **Con heteroátomo.** Al menos uno de los componentes del ciclo es diferente del carbono, esto es, poseen al menos un heteroátomo en el anillo. Dentro de este grupo se incluyen la histamina y la triptamina.

- Finalmente, según el número de grupos amino de la molécula, se clasifican en:

- **Monoaminas:** histamina, feniletilamina y tiramina.
- **Diaminas:** putrescina y cadaverina.
- **Poliaminas:** espermidina y espermina.

1.3. Papel de las aminas biogénicas.

Las aminas biogénicas desempeñan importantes funciones en el cuerpo humano. Algunas actúan como neurotransmisores, otras participan en la regulación del pH del organismo o en la secreción de ácido gástrico (HCl estomacal), en la respuesta inmune y, a veces, en procesos tan complejos como el crecimiento y diferenciación celular (Ladero *et al.*, 2010; Naila *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, estas moléculas son importantes para el crecimiento, renovación y metabolismo de cada órgano en el cuerpo y suelen ser esenciales para mantener la alta actividad metabólica del sistema inmunológico del intestino, así como para el funcionamiento normal del mismo (Ladero *et al.*, 2010; Shalaby, 1996). Además, algunas poliaminas, al ser tomadas preferentemente por tejidos muy activos metabólicamente, pueden favorecer la

cicatrización de heridas, el crecimiento y el desarrollo del sistema digestivo de los neonatos (Kalač y Krausová, 2005).

Debido a que las aminas biogénicas están implicadas en multitud de procesos muy complejos (desde funciones homeostáticas centrales a fenómenos cognitivos como el mantenimiento de la atención), no es de extrañar que aquellas drogas que afectan a su síntesis, a la unión a receptores específicos o bien al catabolismo de estos neurotransmisores, se encuentren entre las más importantes dentro del arsenal que constituye la farmacología moderna (Fu *et al.*, 2016).

1.4. Aminas biogénicas como neurotransmisores.

Uno de los papeles más importantes que desempeñan las aminas biogénicas en el organismo es el de actuar como neurotransmisores. Hay seis que cumplen esta función: tres catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), dos triptaminas (serotonina y melatonina) y la histamina (Deutch y Roth, 1999).

1.4.1. Catecolaminas.

Todas las catecolaminas, denominadas así porque comparten un grupo catecol (un isómero del bencenodiol), derivan de un precursor común, el aminoácido tirosina, y actúan como mediadoras en la transmisión catecolaminérgica. La síntesis de estos neurotransmisores (**Figura 1A**) está mediada por la enzima tirosina hidroxilasa mediante una reacción que requiere oxígeno como sustrato y tetrahidrobiopterina como cofactor, y que permite obtener como producto final dihidroxifenilalanina (DOPA) (Arreola *et al.*, 2016). Por lo tanto, la cantidad de tirosina hidroxilasa va a ser el factor

limitante para la síntesis de estas tres aminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) (Gizang-Ginsberg y Ziff, 1990).

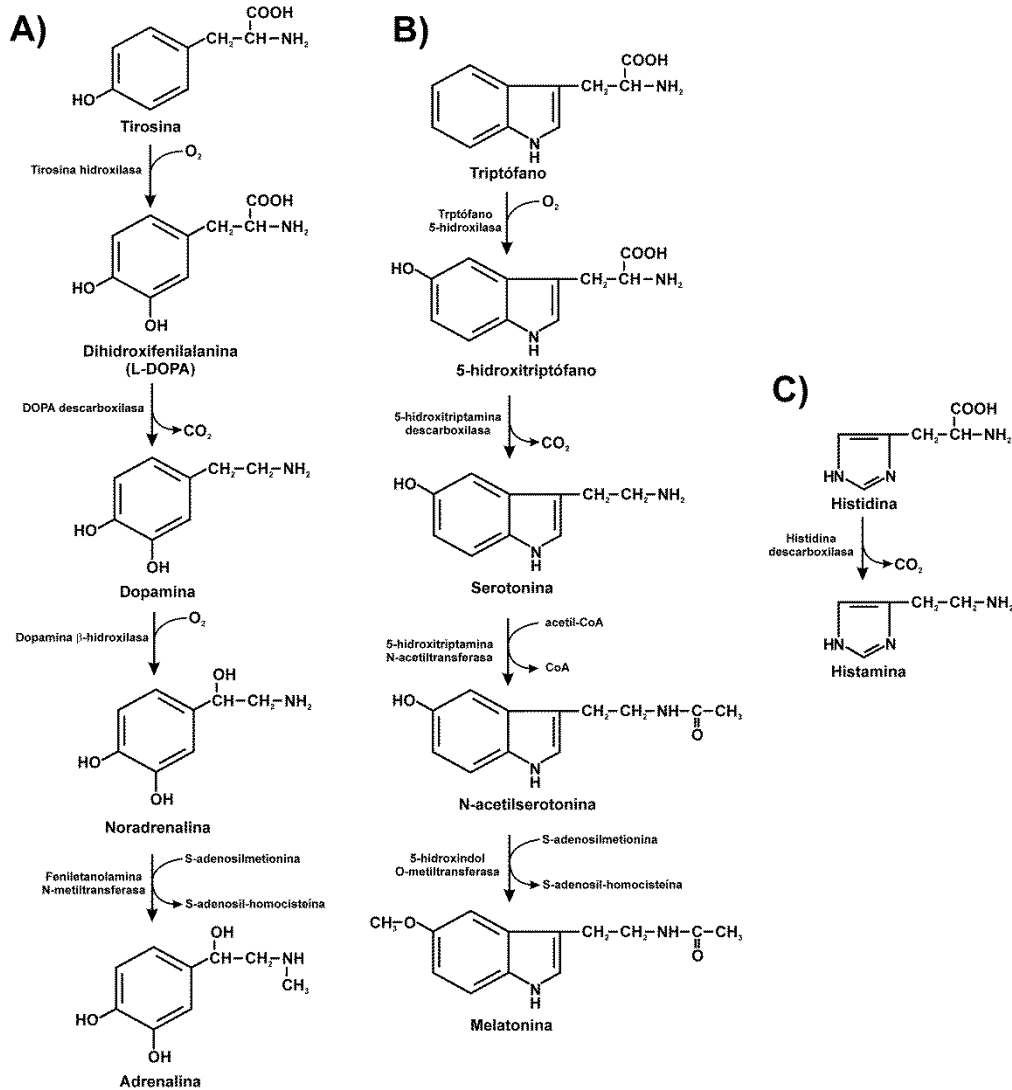


Figura 1. Representación esquemática de la ruta biosintética de los neurotransmisores catecolaminérgicos (A), de la triptamina y derivados (B) y de la histamina (C).

La **dopamina** se produce a partir de L-DOPA, por la acción de la enzima DOPA descarboxilasa. Aunque esta amina está presente en varias regiones del cerebro, la zona en la que es más abundante corresponde al *corpus estriatum*, desempeñando un papel

esencial en la coordinación de los movimientos corporales (Carlsson, 1993). Así por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas han degenerado, lo que conduce a una disfunción motora característica (Olanow *et al.*, 1997).

También se cree que la dopamina puede estar involucrada en procesos relacionados con la motivación, con la recompensa y con el esfuerzo. Así por ejemplo, la cocaína y otras drogas adictivas actúan estimulando la liberación de esta amina en áreas específicas del cerebro. Adicionalmente, la esquizofrenia se ha relacionado con un exceso de dopamina, o bien con la existencia de una elevada sensibilidad a este neurotransmisor (Matthysse, 1974).

La **noradrenalina**, denominada también norepinefrina, se forma a partir de la dopamina mediante una reacción catalizada por la enzima dopamina β -hidroxilasa. Esta molécula se sintetiza mayoritariamente en las células ganglionares simpáticas y está involucrada en el sueño, la vigilia, la atención y la conducta (Schwartz, 2001).

La **adrenalina**, o epinefrina, está presente en el cerebro a concentraciones más bajas que otras catecolaminas. Es sintetizada por la enzima feniletanolamina-*N*-metiltransferasa y participa en el control de la frecuencia cardíaca, en la contracción de los vasos sanguíneos y en procesos relacionados con la broncodilatación. Además, participa en la reacción de lucha o huida originada en el sistema nervioso simpático (Schwartz, 2001).

Las catecolaminas se catabolizan por la acción de dos enzimas: la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol *O*-metiltransferasa (COMT) (Haavik *et al.*, 2008). Ambas enzimas, MAO (mitocondrial) y COMT (citoplasmática) se encuentran tanto en las neuronas como en la glía. Los inhibidores de estas enzimas son utilizados en clínica como antidepresivos (Fibiger, 1995).

1.4.2. Triptaminas.

La **serotonina**, o 5-hidroxitriptamina, se sintetiza en las neuronas a partir del aminoácido triptófano, mediante una reacción catalizada por la enzima triptófano 5-hidroxilasa (**Figura 1B**) (Walther *et al.*, 2003). Esta indolamina está implicada en la regulación del sueño y la vigilia y su degradación primaria está mediada por la enzima MAO.

La **melatonina**, o N-acetil-5-metoxitriptamina, se sintetiza en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano, y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos complejos tales como aquellos relacionados con el control del ciclo diario del sueño (Olivier, 2015).

1.4.3. Histamina.

La **histamina** se produce por descarboxilación del aminoácido histidina mediante la acción de la enzima histidina descarboxilasa (**Figura 1C**) (Landete *et al.*, 2008). Esta amina se sintetiza mayoritariamente en las neuronas del hipotálamo, enviando señales a casi todas las regiones del cerebro y de la médula espinal, lo que provoca excitación y un incremento de la atención. Esto explica por qué los antihistamínicos actúan como sedantes. La histamina también se libera en las células cebadas o mastocitos como respuesta a reacciones alérgicas o a daño en los tejidos. La proximidad de los mastocitos a los vasos sanguíneos, junto con la potente vasodilatación que produce la histamina, aumenta la posibilidad de que esta amina pueda influir en el aumento del flujo sanguíneo cerebral (Maintz y Novak, 2007).

1.4.4. Aminas traza.

Las aminas traza o microaminas son monoaminas que se encuentran en concentraciones mucho más bajas (0,1-100 ng/g de tejido) en el cerebro de los mamíferos y otros vertebrados (Boulton, 1980). Estas concentraciones son unas 100 veces menores que las correspondientes a monoaminas tradicionales tales como la dopamina, la serotonina o la noradrenalina (Berry, 2004; Grandy, 2007).

Las aminas traza más importantes son la *p*-tiramina, la 2-feniletilamina, la *p*-octopamina y la 3-triptamina (**Figura 2**). Otras aminas traza con menor relevancia incluyen la *m*-octopamina, la feniletanolamina, la *m*-tiramina, la sinefrina, la 3-iodotironamina, la 3-metoxitiramina, la N-metiltiramina y la N-metilfenetilamina (Khan y Nawaz, 2016).

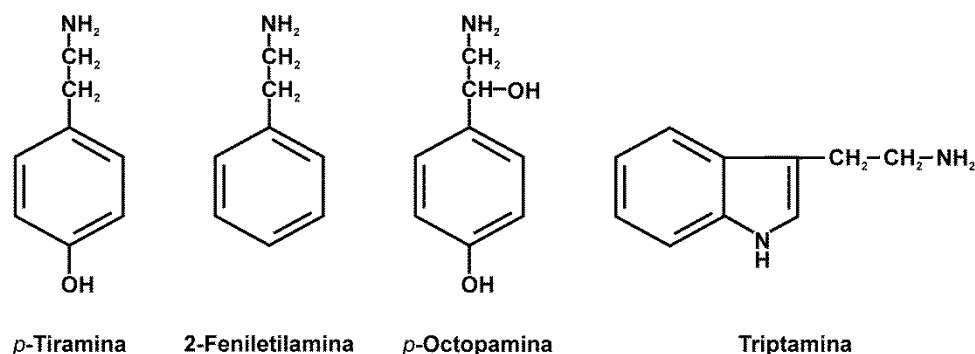


Figura 2. Estructura de las aminas traza más importantes. La 2-feniletilamina, la tiramina y la triptamina son sintetizadas por descarboxilación de sus correspondientes aminoácidos precursores por la acción de una L-aminoácido aromático descarboxilasa. La octopamina es sintetizada por hidroxilación de la tiramina por la acción de una dopamina-β-hidroxilasa.

Aunque hasta hace poco su papel en diferentes patologías humanas era desconocido, fundamentalmente debido a la dificultad de su medición en fluidos

biológicos y al desconocimiento de receptores específicos (Khan y Nawaz, 2016), hoy día sabemos que la concentración de estas aminas cerebrales se altera en varios trastornos neuropsiquiátricos (esquizofrenia, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, depresión y en la enfermedad de Parkinson), lo que sugiere la implicación de estas aminas en la fisiopatología de los sistemas monoaminérgicos (Branchek y Blackburn, 2003; Burchett y Hicks, 2006).

1.5. Aminas biogénicas en los alimentos.

Las aminas biogénicas se encuentran presentes en multitud de alimentos y bebidas fermentadas (Naila *et al.*, 2010) y su acumulación puede hacer que la ingesta de los mismos resulte perjudicial para la salud. Las que encontramos mayoritariamente son la histamina, la putrescina, la cadaverina, la tiramina, la triptamina, la feniletilamina, la espermina y la espermidina (Ten Brink *et al.*, 1990).

Estos compuestos se encuentran de forma natural en los productos de origen vegetal, ya que están presentes en las plantas y en sus frutos formando parte de las paredes celulares de éstos o actuando como sistema defensivo frente al ataque de patógenos o depredadores (Ross *et al.*, 2004). Sin embargo, las aminas biogénicas presentes en la mayoría de los alimentos tienen origen exógeno, siendo generadas por descarboxilación de aminoácidos (Gardini *et al.*, 2006). Las enzimas responsables de la formación de estos compuestos, las descarboxilasas de aminoácidos, están muy presentes en algunos microorganismos (usualmente bacterias ácido lácticas -LAB-) que suelen formar parte de la matriz de los alimentos fermentados.

Los que comúnmente contienen concentraciones elevadas de aminas biogénicas son el pescado y sus derivados, así como ciertos productos fermentados (carne, leche,

algunos vegetales, cerveza y vino). Su acumulación es difícil de prevenir debido a que las condiciones microbiológicas, químicas y físicas en las que se realizan esos procesos no suelen ser fácilmente controlables (Bover-Cid *et al.*, 2001; Santos, 1996; Shalaby, 1996).

Además, algunas de estas aminas pueden provocar una disminución o una variación de las propiedades organolépticas de algunos productos alimenticios, lo que suele ser utilizado como un valioso indicador de la calidad y/o aceptación de muchos de ellos (Ruiz-Capillas y Jiménez-Colmenero, 2004; Shalaby, 1996).

Hay diversos factores que van a limitar la acumulación de aminas biogénicas (sobre todo las que son debidas a la actividad microbiana). Así, el piridoxal fosfato, cofactor de las descarboxilasas de aminoácidos, es un factor requerido para el correcto funcionamiento de estas enzimas en la mayoría de las bacterias y, por consiguiente, su presencia o ausencia será determinante para la aparición de aminas (Bover-Cid *et al.*, 2001). Por otra parte, la disponibilidad de sustrato, el pH del medio, la concentración de sales y la temperatura, también van a tener una gran influencia en la producción de aminas (Ten Brink *et al.*, 1990).

1.6. Toxicidad de las aminas biogénicas.

Como se ha indicado con anterioridad, las aminas biogénicas pueden provocar importantes efectos fisiológicos en el ser humano, tanto psicoactivos (neuromoduladores) como vasoactivos. El consumo de alimentos y bebidas que contienen una alta concentración de estos compuestos puede causar intoxicación que cursa con síntomas comunes tales como dolor de cabeza, náuseas, palpitaciones,

variaciones en la presión arterial, etc. (Ladero *et al.*, 2010; Santos, 1996). Además, se ha comprobado que las aminas biogénicas pueden actuar como precursores de ciertos compuestos carcinogénicos (Shalaby, 1996).

La histamina y la tiramina son consideradas como las aminas biogénicas más tóxicas, motivo por el que la determinación de su concentración en los alimentos es particularmente relevante a la hora de establecer criterios relacionados con la seguridad alimentaria. Otras, casos de la putrescina y de la cadaverina, actúan sinérgicamente con la histamina y la tiramina potenciando sus efectos tóxicos. Además, estas aminas biogénicas, al ser termoestables, no pueden ser inactivadas mediante los tratamientos térmicos usualmente empleados durante el procesamiento de ciertos nutrientes (Becker *et al.*, 2001). Por tanto, una actividad microbiana no controlada sobre los alimentos puede conducir al acúmulo de concentraciones altas de aminas biogénicas, las cuales pueden sobrepasar la capacidad de los mecanismos de detoxificación del consumidor, ejerciendo, de este modo, su efecto nocivo.

En algunos alimentos, las aminas biogénicas pueden alcanzar concentraciones superiores a 1.000 mg/kg, lo que supone, sin duda, un peligro para la salud (Fernández *et al.*, 2006; Roig-Sagués *et al.*, 2002; Shalaby, 1996).

Numerosas investigaciones han descrito y analizado la toxicidad de las aminas biogénicas, aunque la mayoría de ellas se han centrado en el estudio de los efectos causados por la **histamina**, ya que ésta es una de las más tóxicas. Sin embargo, conviene advertir que el grado de intolerancia a estas moléculas depende de las características del individuo. Se supone que la ingesta de alimentos con concentraciones de histamina superiores a 400 mg/kg es peligroso para la salud (Taylor y Eitenmiller, 1986). Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que 75 mg de histamina

pura, administrada por vía oral, puede provocar síntomas en, al menos, un 50% de mujeres sanas sin antecedentes de intolerancia a este compuesto (Wöhrl *et al.*, 2004). Del mismo modo, la ingesta de, aproximadamente, 1 g de histamina, está asociada con intoxicaciones de carácter grave (Rauscher-Gabernig *et al.*, 2009).

Por otro lado, la ingesta de alimentos que poseen concentraciones elevadas de histamina por aquellas personas que poseen una baja actividad de la enzima DAO, parece estar directamente relacionado con el padecimiento de ciertas enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa e incluso con la neoplasia colonorrectal (Maintz y Novak, 2007).

Otra de las aminas biogénicas cuya concentración debe controlarse cuidadosamente en los alimentos es la **tiramina**. Los efectos tóxicos de su ingesta se conocen como "reacción del queso", debido a que, inicialmente, esta patología fue asociada con el consumo de este nutriente (Blackwell, 1963), por contener cantidades muy elevadas de esta amina. Así, se ha descrito que una concentración de tiramina superior a 125 mg/kg tiene efectos nocivos sobre individuos sanos y una concentración de 6 mg/kg es potencialmente tóxica para los pacientes tratados con inhibidores de la enzima MAO (McCabe, 1986).

A parte de los efectos tóxicos descritos, las aminas biogénicas también pueden afectar a la estabilidad y a la composición de la microbiota intestinal (Gardini *et al.*, 2006; Grundy, 2008). De hecho, se sabe que la tiramina favorece la adherencia de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* 1057H a las células epiteliales (Lyte, 2004). Por otro lado, la putrescina está asociada a factores de virulencia en bacterias Gram-positivas (G+) y patógenos Gram-negativos (G-) (Shah y Swiatlo, 2008), y se ha

demostrado que puede activar la patogenicidad en *Proteus mirabilis* (Sturgill y Rather, 2004).

Otro problema a tener en cuenta es el efecto sinérgico causado por varios tipos de aminas biogénicas, debido a que hay alimentos en los que existen mezclas de estos compuestos. Así, por ejemplo, la putrescina y la cadaverina actúan como inhibidores de la DAO y, por lo tanto, potencian la toxicidad producida por la histamina (Lehane y Olley, 2000).

En resumen, el consumo de nutrientes con un elevado contenido en aminas biogénicas puede provocar un gran número de síndromes y efectos nocivos sobre el organismo, ya que pueden alterar procesos fisiológicos muy diferentes y, como consecuencia, ser la causa de diversas patologías (**Tabla 1**).

Tabla 1. Aminas biogénicas presentes en los alimentos y descripción de sus efectos fisiológicos y tóxicos (Ladero *et al.*, 2010).

Amina biogénica	Efectos fisiológicos	Efectos tóxicos
Histamina	Neurotransmisor; hormona local; liberación de adrenalina y noradrenalina; estimulación de la musculatura lisa, tanto uterina, intestinal, como del aparato respiratorio; incremento de la secreción de ácido gástrico; crecimiento y diferenciación celular; regulación del ritmo circadiano, de la temperatura corporal y de la ingesta de alimentos; aprendizaje y memoria; respuesta inmune.	Dolor de cabeza, sudoración, ardor, secreción nasal, enrojecimiento facial, erupciones, mareos, picazón, edema (párpados), urticaria, dificultad para tragar, diarrea, dificultad respiratoria, broncoespasmo, aumento de gasto cardíaco, taquicardia, extrasístoles, trastornos de la presión arterial, reacciones alérgicas.
Tiramina	Neurotransmisor, estimulación de neuronas sensoriales y motoras; liberación de noradrenalina; vasoconstricción periférica, incremento de la presión sanguínea; aumento del ritmo respiratorio; elevación de glucosa en sangre; control de la secreción gástrica; liberación de norepinefrina; estimulación de la lacrimación y de la salivación.	Cefalea, migraña, trastornos neurológicos, náuseas, vómitos, trastornos respiratorios, aumento del gasto cardíaco, hipertensión.
Putrescina y cadaverina	Regulación de la expresión génica; maduración del intestino; crecimiento y diferenciación celular.	Aumento del gasto cardíaco, taquicardia, hipotensión, efectos cancerígenos. Potenciación del efecto de otras aminas.
2-Feniletilamina	Liberación de noradrenalina, incremento de la presión sanguínea.	Migraña.
Dopamina	Emula la acción del sistema nervioso simpático, promoviendo el incremento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial.	Taquicardia; hipertensión arterial.

1.7. Producción de aminas biogénicas.

Como hemos indicado, la producción de aminas biogénicas es un proceso natural que ocurre en microorganismos, animales y plantas, por lo que la ingesta de estos compuestos en la dieta es algo habitual. El principal mecanismo químico que

conduce a la formación de aminas biogénicas es la descarboxilación de ciertos aminoácidos (Gardini *et al.*, 2006).

Para que las aminas biogénicas aparezcan en los alimentos es necesario que se cumplan una serie de condiciones tales como: (i) disponibilidad de aminoácidos libres (generalmente originados por acción de enzimas proteolíticas sobre las proteínas presentes en los alimentos); (ii) presencia de microorganismos que posean enzimas descarboxilasas (denominados por ello descarboxilasa positivos); y (iii) que se den las condiciones fisicoquímicas requeridas para que se produzca el crecimiento bacteriano, así como la síntesis de las enzimas con actividad descarboxilásica.

1.7.1. Descarboxilación de aminoácidos.

Durante el proceso químico conocido como descarboxilación de aminoácidos se produce la eliminación del grupo carboxilo (usualmente α -carboxilo) del aminoácido en cuestión, dando lugar a CO₂ y a la amina correspondiente (Blaschko, 1950).

La mayoría de las enzimas que catalizan estas reacciones (descarboxilasas) son dependientes de piridoxal-5-fosfato (PLP o vitamina B6). El análisis comparativo de estas enzimas ha permitido clasificarlas en cuatro grupos e identificar regiones funcionalmente importantes dentro de sus secuencias de aminoácidos (**Tabla 2**) (Sandmeier *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque la mayoría de las descarboxilasas utilizan PLP, otras (caso de histidin descarboxilasas) son dependientes de piruvato (Tolbert *et al.*, 2003).

Tabla 2. α -Aminoácido descarboxilasas dependientes de PLP (Sandmeier *et al.*, 1994).

Enzima	Números de acceso y fuente
Grupo I	
Glicina descarboxilasa (EC 1.4.4.2)	P23378, humana; P15505, pollo; P26969, <i>Pisum sativum</i>
Grupo II	
Glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15)	M84024, <i>Escherichia coli</i> (GAD-a); M84025, <i>Escherichia coli</i> (GADp); P20228, <i>Drosophila melanogaster</i> ; JH0423, rata (GAD65); P18088, rata (GAD67); P14748, gato; M74826, humana (GAD65); M81883, humana (GAD67)
Histidina descarboxilasa (EC 4.1.1.22)	P28577, <i>Enterobacter aerogenes</i> ; P28578, <i>Klebsiella planticola</i> ; P05034, <i>Morganella morganii</i> ; X70644, <i>Drosophila melanogaster</i> ; P23738, ratón; P16453, rata; P19113, humana
Tirosina descarboxilasa (EC 4.1.1.25)	M96070, <i>Petroselinum crispum</i>
Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28)	S19796, <i>Caenorhabditis elegans</i> ; P05031, <i>Drosophila melanogaster</i> ; P14173, rata; P22781, cobaya, P80041, cerdo; P27718, bovina; P20711, humana
Triptófano descarboxilasa (EC 4.1.1.17)	P17770, <i>Catharanthus roseus</i>
Grupo III	
Ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.18)	P21169, <i>Escherichia coli</i> ; P24169, <i>Escherichia coli</i> (inducible)
Lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.19)	P05033, <i>Hafnia alvei</i> ; P26934, <i>Bacillus subtilis</i> ; P23892, <i>Escherichia coli</i>
Arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.17)	P28629, <i>Escherichia coli</i> (biodegradativa)
Grupo IV	
Ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.19)	P07805, <i>Trypanosoma brucei</i> ; P27116, <i>Leishmania donovani</i> ; P27121, <i>Neurospora crassa</i> ; P08432, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; P27120, <i>Xenopus laevis</i> ; P27118, pollo; P00860, ratón; P27119, <i>Mus pahari</i> ; P09057, rata; P14019, hámster; P27117, bovina; P11926, humana
Arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.20)	P21170, <i>Escherichia coli</i> ; P22220, <i>Avena sativa</i>

Es interesante reseñar que el proceso de descarboxilación de aminoácidos cumple una importante función energética en algunas bacterias, ya que constituye un sistema de generación de ATP y provoca un aumento del pH del medio, lo que favorece el crecimiento bacteriano. Además, bajo condiciones de estrés ácido, los microorganismos activan un mecanismo de supervivencia basado en la descarboxilación de aminoácidos que implica un consumo de protones y la excreción de aminas biogénicas y de CO₂ (EFSA, 2011). Por todas estas razones, podemos considerar la

descarboxilación de aminoácidos como un mecanismo muy ventajoso que permite la adaptación a diferentes ambientes a un gran número de microorganismos.

1.7.2. Microorganismos productores de aminas biogénicas.

La producción de aminas biogénicas está asociada a un gran número de bacterias, tanto G+ como G-. Adicionalmente, se ha comprobado que varias especies de levaduras (*Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii* o *Geotrichum candidum*) también pueden sintetizar estos compuestos (Gardini *et al.*, 2006; Roig-Sagués *et al.*, 2002; Suzzi *et al.*, 2003; Wyder *et al.*, 1999). Entre las bacterias G-capaces de producir aminas biogénicas en los alimentos caben destacarse las siguientes especies: *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas* spp. y *Serratia* spp.

La presencia de estos microorganismos en los alimentos es, por lo tanto, un problema de seguridad alimentaria tan común, que debe ser resuelto mediante una buena manufactura, y, sobre todo, cuidando escrupulosamente las medidas de higiene (Linares *et al.*, 2012). De hecho, como ya hemos indicado, la concentración de aminas biogénicas es un buen indicador del deterioro microbiano que sufren algunos alimentos no fermentados y de mala praxis en la elaboración de los mismos (Santos, 1996). La proliferación de las bacterias G- en alimentos fermentados suele estar inhibida por las condiciones inherentes al propio proceso (Adams y Nicolaidis, 1997; Caplice y Fitzgerald, 1999), siendo las bacterias G+, especialmente las LAB, las principales responsables de la aparición de aminas biogénicas (Linares *et al.*, 2011). De hecho, las LAB generadoras de esas aminas forman parte de la microbiota responsable de las transformaciones que transcurren durante los procesos fermentativos y son las causantes de las variaciones de las propiedades organolépticas de los alimentos. Por tal razón, la

búsqueda de soluciones que pretendan evitar la génesis de estos compuestos es, usualmente, un proceso complicado y no siempre fácil de conseguir.

1.8. Detección de aminas biogénicas.

La determinación de las concentraciones de aminas biogénicas en los alimentos frescos y en los procesados es interesante no sólo por la toxicidad asociada a alguno de estos compuestos, sino también porque puede ser, como hemos mencionado, un indicativo del deterioro o de la maduración de los mismos.

1.8.1. Detección de microorganismos productores de aminas biogénicas.

Uno de los sistemas seguidos para detectar la presencia de aminas biogénicas en los alimentos se basa, por lo tanto, en la identificación de la presencia de aquellos microorganismos que pueden producir estos compuestos. Actualmente existe un método molecular, basado en la técnica de PCR, que permite la detección de aquellas bacterias que, al menos potencialmente, pueden producir aminas biogénicas (histamina, tiramina, putrescina, cadaverina o feniletilamina). El método consiste en el uso de un conjunto de oligonucleótidos específicos empleados para la detección de cada uno de los genes que codifican las descarboxilasas de aminoácidos, enzimas responsables, en última instancia, de la aparición de aminas biogénicas (**Tabla 3**) (de las Rivas *et al.*, 2006).

Tabla 3. Relación de oligonucleótidos comúnmente usados para la detección de cada uno de los genes que codifican las aminoácido descarboxilasas.

Amina biogénica	Gen*	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño
Histamina	<i>hdc</i>	G+		372 pb
		HIS1-F	GGNATNGTNWSNTAYGAYMGNGCNGA	
		HIS1-R	ATNGCDATNGCNSWCCANACNCCRТА	
		G-		531 pb
		HIS2-F	AAYTSNTTYGAYTTYGARAARGARGT	
		HIS2-R	TANGGNSANCCDATCATYTTRTGNC	
Tiramina Feniletilamina	<i>tdc</i>	TDC-F	TGGYTNGTNCNCARACNAARCAУТА	825 pb
		TDC-R	ACRTARTCNACCATRTTRAARTCNGG	
Putrescina	<i>odc</i>	LAB y enterobacterias		1.440 pb
		PUT1-F	TWYMAYGcNGAYAAACNTAYTTYGT	
		PUT1-R	ACRCANAGNACNCCNGGNGGRTANGG	
		<i>Pseudomonas</i> sp.		624 pb
		PUT2-F	ATHWGNTWYGGNAAYACNATHAARAA	
		PUT2-R	GCNARNCCNCCRAAYTTNCCDATRTC	
Cadaverina	<i>ldc</i>	G-		1.098 pb
		CAD1-F	TTYGAYWCNGCNTGGGTNCCNTAYAC	
		CAD1-R	CCRTGDATRTCNGTYTCRAANCCNGG	
		G+		1.185 pb
		CAD2-R	CAYRTNCCNGGNCAYAA	
		CAD2-F	GGDATNCCNGGNGGRTA	

**hdc*, histidina descarboxilasa; *tdc*, tirosina descarboxilasa; *odc*, ornitina descarboxilasa; *ldc*, lisina descarboxilasa. Y= C o T; R= A o G; W= A o T; S= C o G; M= A o C; D= A, G, o T; H= A, C, o T; B= C, G, o T; N= A, C, G, o T.

1.8.2. Métodos analíticos empleados para la detección de aminas biogénicas en los alimentos.

Además de los métodos basados en la detección de microorganismos productores de aminas biogénicas, existen otros fundamentados en la aplicación de métodos analíticos en la propia matriz de los alimentos. Éstos son métodos basados en la separación e identificación de esas sustancias mediante técnicas cromatográficas tales

como la cromatografía de gases, la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o por otros procedimientos, como es el caso de la electroforesis en papel (Karovičová y Kohajdova, 2005; Bajc y Gačnik, 2009). El más utilizado es HPLC, con derivatización pre o post-columna (Malle *et al.*, 1996). La derivatización es debida a dos características de las aminas biogénicas: la volatilidad y la falta de cromóforos. Por esta razón, se emplean diferentes reactivos químicos como derivatizantes, siendo el cloruro de dansilo el más comúnmente utilizado. En cuanto a la detección, se emplea fluorescencia, detección ultravioleta (UV) o detectores electroquímicos.

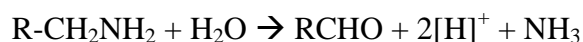
A pesar de la existencia de varios métodos para la determinación analítica de aminas biogénicas, este proceso no es simple debido a la complejidad de las muestras a analizar. En primer lugar, uno de los inconvenientes más importantes es la limitación que impone la extracción de las aminas desde los alimentos, siendo éste un paso crítico para proceder a su posterior análisis. Además, la etapa de derivatización ralentiza mucho el proceso analítico. Por ello, la técnica de cromatografía acoplada a espectrometría de masas está ganando importancia últimamente ya que es un proceso más específico y sensible, y, además, evita los tediosos procedimientos de derivatización (Biji *et al.*, 2016).

1.9. Degradación de aminas biogénicas.

En el momento actual, y como consecuencia de la ingente actividad industrial, se está incrementando la presencia de aminas en el medio ambiente. Algunas de estas aminas, especialmente las metiladas, son muy volátiles y están implicadas en la formación de óxido nítrico, un gas causante del “efecto invernadero” (Chistoserdov,

2001; Van Neste *et al.*, 1987). Otras pueden ser liberadas por los organismos vivos o generadas *post mortem*. Dado que las aminos biogénicas, sobre todo cuando superan ciertos límites, pueden producir efectos tóxicos en el organismo, la identificación de las rutas y enzimas implicadas en el catabolismo de estas aminos debe ser de gran ayuda para abordar con éxito la eliminación de esos compuestos evitando, así, su efecto nocivo tanto en los organismos como en el medio ambiente (Capozzi *et al.*, 2012).

Existen multitud de microorganismos capaces de degradar aminos primarias mediante reacciones de oxidación, consecuencia de las cuales se generan productos sin toxicidad alguna, que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía y/o como fuente de nitrógeno (Yamada *et al.*, 1965).



Las enzimas responsables de la degradación de aminos utilizan distintos cofactores que son reducidos tras la oxidación del sustrato y que participan en la transferencia de electrones a uno o dos aceptores exógenos, tales como el citocromo c, las cupredoxinas (azurina o amocianina) o el oxígeno molecular. En función de quién sea el aceptor de e^- podemos tener amino oxidasas o amino deshidrogenasas. La mayoría de estas enzimas son oxidorreductasas que se caracterizan por utilizar cofactores diferentes a NAD(P)^+ o FAD^+ (aunque, como se explicará más adelante, existen excepciones de flavoproteínas amino oxidasas que utilizan FAD como cofactor), y son denominadas quinoproteínas debido a que los cofactores que utilizan suelen ser quinonas (Oubrie *et al.*, 2002). De esta forma, en función del cofactor utilizado, podemos diferenciar varios tipos de desaminasas. La reacción de desaminación oxidativa de aminos es un proceso ampliamente distribuido en la naturaleza que puede ser utilizado tanto por eucariotas como por procariotas, y en el que participan diferentes

enzimas. Entre ellas caben destacarse las amino oxidasas, las quinohemoproteínas amino deshidrogenasas, las quinoproteínas amino deshidrogenasas y las flavoproteínas amino oxidasas (Hacisalihoglu *et al.*, 1997). Todas ellas conducen a la conversión de las aminas en sus correspondientes aldehídos. La diferencia radica en que mientras las amino oxidasas (presentes tanto en eucariotas como en procariotas) producen peróxidos tóxicos, las amino deshidrogenasas (presentes exclusivamente en bacterias) producen equivalentes reducidos que transfieren directamente los e^- a la cadena respiratoria (McIntire y Hartmann, 1993; Vandenberghe *et al.*, 2001).

1.9.1. Quinoproteínas amino oxidasas.

Estas enzimas homodiméricas, también llamadas amino oxidasas dependientes de cobre (Q-AmO), se caracterizan porque son las únicas que están ampliamente distribuidas tanto en bacterias como en organismos superiores y catalizan la oxidación de un gran número de aminas primarias. Poseen cobre, necesario tanto para la biosíntesis del cofactor de la enzima, como para la catálisis enzimática (Matsunami *et al.*, 2004).

1.9.2. Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas.

Estas enzimas (QH-AmDH) presentan una estructura heterotrimérica constituida por tres subunidades ($\alpha\beta\gamma$) que utilizan como cofactor el CTQ (cisteína triptofilquinona), el cual se forma a partir de un residuo de cisteína presente en la subunidad pequeña (γ). Presentan, además del grupo quinona, dos grupos hemo c unidos a una de las subunidades de la enzima, que actúan como grupos redox activos (Hacisalihoglu *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 2003). En este caso, los e^- liberados durante el

proceso de oxidación son transferidos en último término a una citocromo oxidasa presente en la cadena de transporte.

A este grupo pertenece la quinohemoproteína amino deshidrogenasa (QH-AmDH) de *Pseudomonas putida* U, responsable de la desaminación oxidativa de la 2-feniletilamina (Arias *et al.*, 2008).

1.9.3. Quinoproteínas amino deshidrogenasas.

Estas enzimas (Q-AmDH) utilizan como cofactor el TTQ (triptófano triptofilquinona) que se forma a partir de dos residuos de triptófano presentes en la subunidad pequeña de la enzima. Presentan una estructura $\alpha_2\beta_2$, donde el cofactor se encuentra unido a las subunidades β (Takagi *et al.*, 1999). El mecanismo catalítico es similar al de las enzimas QH-AmDH, aunque estas enzimas carecen de los dos grupos hemo.

1.9.4. Flavoproteínas amino oxidasas.

El último grupo de enzimas implicadas en la oxidación de aminas está formado por aquellas que utilizan FAD como cofactor y denominadas, por ello, flavoproteínas amino oxidasas (EC 1.4.3.4). Dentro de este grupo caben destacarse las monoamino oxidasas (MAOs), que son unas flavoproteínas que catalizan la desaminación oxidativa de algunas aminas biogénicas (monoaminas) presentes en la dieta y cuyo resultado es la formación del correspondiente aldehído, peróxido de hidrógeno y amoníaco. En humanos, hay dos isoformas de MAO (MAO-A y MAO-B) que presentan diferentes especificidades de unión al sustrato y al inhibidor (Wang *et al.*, 2012).

La desaminación de la tiramina en la cepa *P. putida* U transcurre a través de un proceso descrito en nuestro laboratorio en el que participan enzimas de este tipo (Arcos

et al., 2010). Sin embargo, la histamina también puede ser eliminada tras su conversión en N-metilhistamina, reacción catalizada por metil o acetiltransferasas (Linares *et al.*, 2011).

Si las enzimas arriba mencionadas no son funcionales, ya sea debido a errores genéticos o debido a la ingesta de inhibidores tales como el alcohol o ciertos medicamentos antidepresivos, las aminas biogénicas entrarán en el torrente sanguíneo y ejercerán su efecto tóxico sobre diferentes órganos, causando graves problemas de salud (Blackwell, 1963; Ladero *et al.*, 2010; McCabe-Sellers *et al.*, 2006).

1.9.5. Degradación de aminas biogénicas en pseudomonadales.

Existen múltiples referencias bibliográficas que aluden a la capacidad de ciertas enzimas presentes en bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* para desaminar diferentes aminas biogénicas.

1.9.5.1. 2-Feniletilamina.

La vía de degradación de 2-feniletilamina en *P. putida* U fue descrita en nuestro laboratorio (Arias *et al.*, 2008). La asimilación de este compuesto implica la participación de nueve proteínas (PeaABCDEFGHR) que constituyen: (i) un sistema de transporte (PeaHR) responsable de la entrada al interior celular de este compuesto; (ii) una quinohemoproteína aminodeshidrogenasa periplasmática (PeaABCD), similar a otras QH-AmDHs descritas; (iii) una aldehído deshidrogenasa (PeaE) cuya función es reemplazable por alguna otra; y (iv) dos proteínas adicionales (PeaFG) que no se habían relacionado nunca con el catabolismo de aminas primarias, y que pueden constituir junto con PeaE y, probablemente, con otras proteínas codificadas en ORFs adyacentes, un complejo enzimático implicado en la oxidación del aldehído generado por

PeaABCD. Todas estas proteínas, denominadas abreviadamente Pea, constituyen la ruta catabólica responsable de la degradación aeróbica de 2-feniletilamina hasta ácido fenilacético (PhAc) en *P. putida* U (**Figura 3**). Posteriormente, una ruta adicional es responsable de la degradación de este ácido hasta succinil-CoA (Olivera *et al.*, 1998).

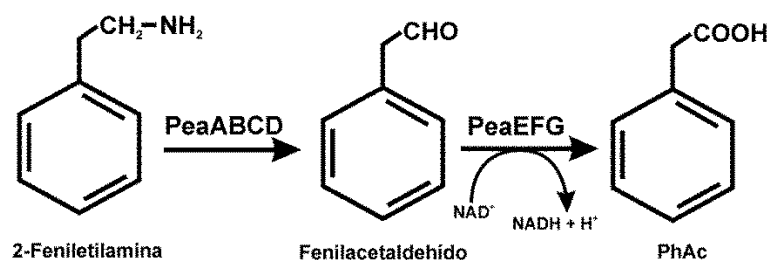


Figura 3. Etapas de la ruta catabólica responsable de la transformación de 2-feniletilamina en PhAc en *P. putida* U (Arias *et al.*, 2008).

1.9.5.2. Tiramina y dopamina.

La ruta catabólica requerida para la asimilación de tiramina y dopamina en *P. putida* U también fue identificada en nuestro laboratorio (Arcos *et al.*, 2010). Ésta implica la participación de ocho proteínas denominadas Tyn. La vía Tyn cataliza la conversión de tiramina y dopamina en ácido 4-hidroxifenilacético (4-OH-PhAc) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (3,4-OH-PhAc), respectivamente. Los genes implicados en esta ruta están organizados en cuatro unidades transcripcionales consecutivas (*tynABFEC*, *tynG*, *tynR* y *tynD*). Entre las proteínas codificadas por esta agrupación genética se encuentran: (i) una tiramina oxidasa dependiente de FAD (TynAB); (ii) una 4-OH-fenilacetaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (TynC); (iii) una amino-oxidasa (TynD) que participa en el proceso de desaminación de la tiramina y (iv) una proteína reguladora (TynR) que actúa como activador de la expresión de las proteínas TynAB y TynC (**Figura 4**). Posteriormente, el 4-OH-PhAc y el 3,4-OH-PhAc son

degradados hasta metabolitos generales utilizando las etapas enzimáticas que componen el catabolón del 3,4-OH-PhAc (Arcos *et al.*, 2010).

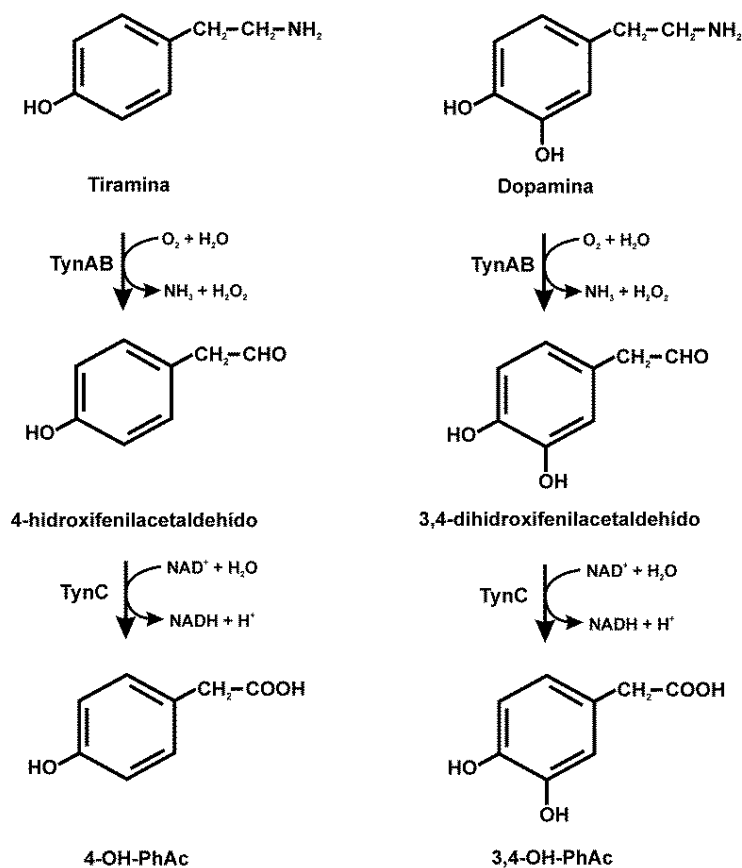


Figura 4. Ruta catabólica responsable de la transformación de la tiramina y de la dopamina en 4-OH-PhAc y en 3,4-OH-PhAc, respectivamente, en *P. putida* U (Arcos *et al.*, 2010).

Por otro lado, la degradación de tiramina también ha sido descrita en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En esta vía, la tiramina es catabolizada por una tiramina deshidrogenasa que produce 4-hidroxifenilacetaldehído, el cual es transformado mediante una deshidrogenasa en 4-OH-PhAc (Cuskey y Olsen, 1988; Cuskey *et al.*, 1987) (**Figura 5**).

1.9.5.3. Octopamina.

P. aeruginosa PAO1 es capaz de asimilar diferentes aminas biogénicas como fuente de carbono y nitrógeno. Entre ellas se encuentra la octopamina, un compuesto que se degrada siguiendo un mecanismo similar al descrito anteriormente para la tiramina. La enzima octopamina hidrolasa transforma la octopamina en 4-hidroxifenilacetaldehído, el cual se metaboliza hasta 4-OH-PhAc mediante una reacción de deshidrogenación (Cuskey y Olsen, 1988; Cuskey *et al.*, 1987) (**Figura 5**).

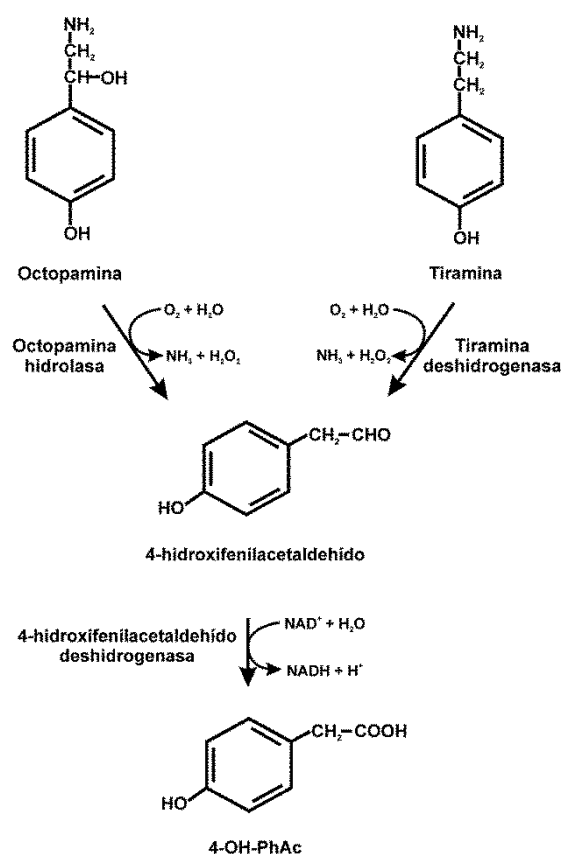


Figura 5. Ruta catabólica responsable de la degradación de octopamina y de tiramina en *P. aeruginosa* PAO1 (Cuskey y Olsen, 1988; Cuskey *et al.*, 1987).

1.9.5.4. Agmatina y putrescina.

La agmatina, molécula producida a partir del aminoácido arginina, es el precursor de muchas poliaminas entre las que se encuentra la putrescina. En *P. aeruginosa* PAO1, este compuesto se degrada por la acción de una agmatina deaminasa, codificada por el gen *aguA*, hasta N-carbamoil-putrescina. El producto final de esta vía metabólica es la putrescina, obtenida mediante una reacción catalizada por una N-carbamoil-putrescina amidohidrolasa (codificada por *aguB*) (Chou *et al.*, 2008) (**Figura 6**). Seguidamente, la putrescina generada a través de esta ruta sufre una desaminación por parte de una aminotransferasa (codificada por el gen *spuC*), que utiliza piruvato para esta reacción, dando lugar a L-alanina y 4-aminobutiraldehído. Este último compuesto se degrada a través de una ruta, en la cual interviene el GABA como intermediario catabólico, que conduce a succinato como producto final del proceso (Chou *et al.*, 2008) (**Figura 6**).

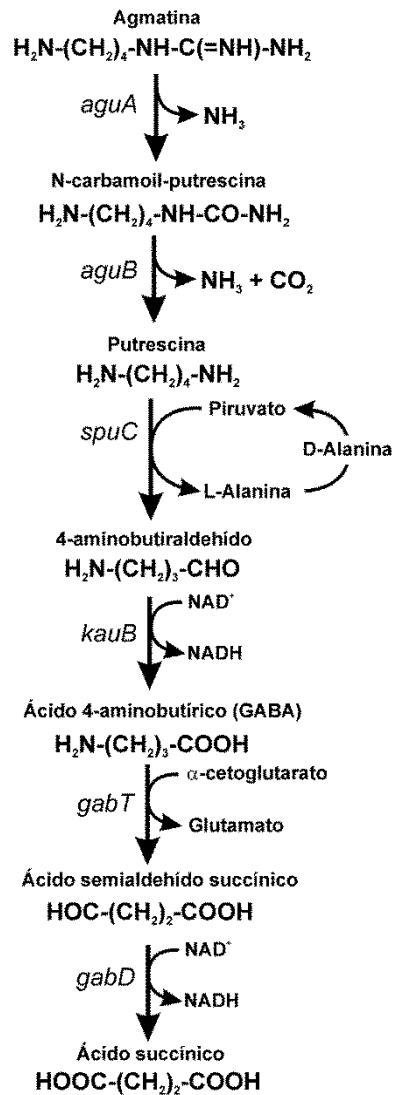


Figura 6. Ruta catabólica responsable de la degradación de agmatina y de putrescina en *P. aeruginosa* PAO1 (Chou *et al.*, 2008).

1.9.5.5. Glutamilación de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina.

Algunas aminas biogénicas se pueden degradar mediante reacciones de γ -glutamilación. Este mecanismo ha sido descrito en *E. coli* (Kurihara *et al.*, 2008) y en *Pseudomonas*, siendo este último mucho más complejo (Chou *et al.*, 2008, 2013; Yao *et al.*, 2011).

En *P. aeruginosa* PAO1 existe un *set* de genes, denominado *pauABCD*, que es esencial para la utilización de aminas biogénicas en la vía de glutamilación. Estos genes incluyen seis *puuA* (*pauA1-pauA6*), cuatro *puuB* (*pauB1-pauB4*), un *puuC* (*pauC*), y dos *puuD* (*pauD1* y *pauD2*) homólogos. En función de la amina biogénica que se vaya a degradar (putrescina, cadaverina, espermidina o espermina), se expresan diferentes combinaciones específicas de estos genes (Chou *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2011) **(Figura 7)**.

Además, se ha comprobado experimentalmente que la aminotransferasa SpuC también puede participar en el catabolismo de putrescina y de cadaverina en *P. aeruginosa* PAO1, una vez que éstas han sufrido un proceso de glutamilación (Chou *et al.*, 2013).

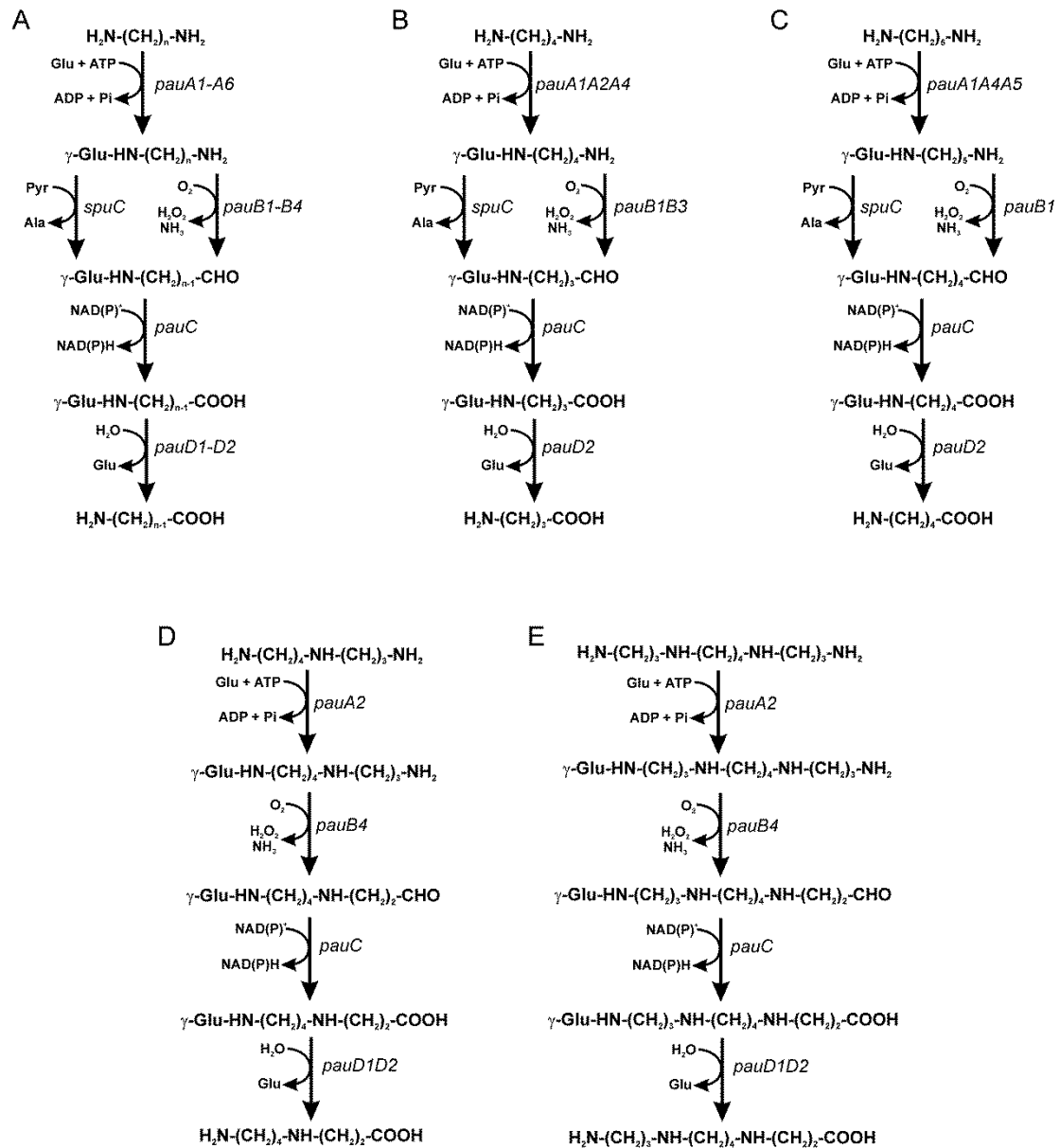


Figura 7. Ruta catabólica general de glutamitación de diferentes aminas biogénicas (A) y rutas catabólicas específicas de glutamitación de putrescina (B), cadaverina (C), espermidina (D) y espermina (E) en *P. aeruginosa* PAO1 (Chou *et al.*, 2013).

1.10. Perspectivas de futuro.

Multitud de alimentos y bebidas fermentadas tienen una alta probabilidad de acumular elevadas concentraciones de aminas biogénicas, lo que es, sin duda, un peligro para la salud de los consumidores. Como ya hemos indicado, existen muchos factores que favorecen la acumulación de aminas biogénicas en estos productos (Linares *et al.*, 2012; Martín-Álvarez *et al.*, 2005) y, por desgracia, no siempre es posible obviarlos. Así, por ejemplo, no se puede evitar la presencia de microorganismos productores de aminas biogénicas en algunos quesos. Tampoco se puede prevenir la acumulación de algunos aminoácidos, y su posterior descarboxilación, debido a que la proteólisis es esencial para las características organolépticas deseadas en la fabricación del queso. Del mismo modo, algunas prácticas enológicas, ampliamente utilizadas para mejorar la calidad del vino, tales como el almacenamiento junto con el sedimento y la maceración del hollejo, influyen de manera importante en la concentración de aminas biogénicas.

Por lo tanto, en la actualidad, en muchas áreas de la manufacturación de alimentos y en muchas de las bodegas del mundo, es muy difícil, o no es viable, encontrar una solución a este problema. Por este motivo, es importante buscar alternativas para la eliminación de estas sustancias en aquellos alimentos y bebidas fermentadas en los que la acumulación de aminas biogénicas parece inevitable. Por ello, el uso de bacterias capaces de degradar aminas biogénicas en la propia matriz del alimento es una alternativa prometedora, como se ha demostrado ya en la producción de queso y en algunos vinos (Cueva *et al.*, 2012; Herrero-Fresno *et al.*, 2012). Sin embargo, aún se precisan estudios encaminados a demostrar la viabilidad y la relevancia biotecnológica de estas aproximaciones experimentales.

En este momento, el principal desafío es identificar las actividades catabólicas responsables de la degradación de aminas biogénicas. Investigaciones recientes han planteado el uso de oxidasas dependientes de cobre, presentes en LAB, para eliminar las aminas biogénicas del vino (Callejón *et al.*, 2013). Del mismo modo, es sumamente importante tener en cuenta los productos resultantes de estas reacciones de eliminación, ya que algunos, tales como el peróxido de hidrógeno, no son deseables y pueden provocar un cambio en las propiedades organolépticas de los alimentos. Por lo tanto, es necesario caracterizar correctamente y completamente las rutas bioquímicas de degradación de aminas biogénicas y, posteriormente, evaluar si pueden ser útiles en las condiciones en las que se realiza la fermentación de los alimentos.

Por todo lo mencionado, sería interesante seleccionar microorganismos que al ser utilizados en los procesos de elaboración de alimentos (fermentaciones, procesos de curación, etc.) no acumulasen aminas biogénicas, o bien que lo hicieran en concentraciones bajas, es decir, aquellas que no son peligrosas para la salud. De este modo, se podría asegurar la permanencia de todas las propiedades organolépticas de los alimentos sin que su ingesta fuese perjudicial para nuestra salud.

2. HISTAMINA.

2.1. Aspectos generales.

La histamina (2-[4-imidazolil] etilamina) es una amina biogénica, descubierta en 1910 por Sir Henry Dale en el hongo *Claviceps purpurea* (Dale y Laidlaw, 1910) y que se sintetiza a partir del aminoácido básico histidina. El nombre histamina proviene del griego *histos* (tejido), debido a que esta amina está presente en multitud de tejidos del organismo (Kovacova-Hanuszkova *et al.*, 2015).

Actualmente, sabemos que la histamina desempeña un papel notable en multitud de procesos patológicos, siendo un mediador importante en las reacciones inflamatorias y alérgicas, y participa en varios procesos fisiológicos, como son los responsables del control del tono vascular, los que alteran la permeabilidad endotelial o aquellos otros que modulan la secreción de ácido gástrico (Kim *et al.*, 2013). Adicionalmente, la histamina actúa como un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central (Hu y Chen, 2017) y participa en el proceso de recuperación de determinadas patologías, como, por ejemplo, la isquemia cerebral (Adachi, 2005). Otros procesos importantes en los que la histamina está implicada son la inmunomodulación, la hematopoyesis, la cicatrización de heridas, la isquemia intestinal, el ritmo circadiano y la inducción de la proliferación celular y la angiogénesis en modelos tumorales (Hungerford, 2010; Luss, 2014). Además, esta amina biogénica desempeña un papel importante en enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer (Cacabelos *et al.*, 1989), el Parkinson (Barbeau, 1962) y la esclerosis múltiple (Murray, 2009).

2.2. Síntesis de histamina: histidina descarboxilasa.

Esta enzima (HDC; E.C. 4.1.1.22) (Recsei y Snell, 1972) fue aislada por Lonvaud-Funel y Joyeux en 1994 a partir de la cepa *Oenococcus oeni* 9204. Es un polipéptido constituido por subunidades α y β que presenta una actividad óptima a pH 4,8. En mamíferos y en bacterias G-, esta enzima utiliza como cofactor al PLP. Sin embargo, algunas HDC pertenecientes a bacterias G+ y, especialmente, a LAB, son dependientes de piruvato.

En humanos, el gen de la histidin descarboxilasa codifica una proteína de 74 kDa que posee muy baja actividad enzimática ya que el paso a la forma activa (53-55 kDa) requiere una modificación postraduccional bastante compleja (Wu *et al.*, 2008; Yatsunami *et al.*, 1994).

Actualmente, se ha encontrado en la cepa *Lactobacillus hilgardii* 0006, utilizada en la fermentación del vino, un plásmido de 80 Kb en el que el gen de la histidin descarboxilasa (*hdc*) se encuentra como parte de un *cluster* de cuatro genes (*hdcP*, *hdcA*, *hisRS* y *hdcB*) que codifican un intercambiador de histidina/histamina, una histidin descarboxilasa, una histidil-ARNt sintetasa y un producto de función desconocida, respectivamente (**Figura 8**). Probablemente, este plásmido puede ser transferido horizontalmente entre las bacterias, lo cual explica la distribución aleatoria de los microorganismos que contienen HDC (Landete *et al.*, 2008).

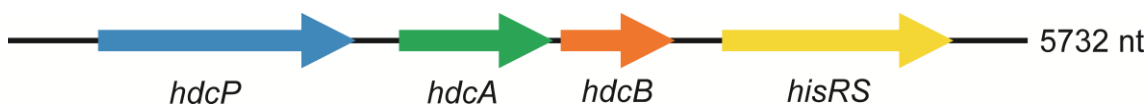


Figura 8. Representación esquemática de la organización genética del locus *hdcA* en *L. hilgardii* 0006.

Recientemente, se han investigado los efectos de la histamina, la histidina y el PLP, así como la cinética de crecimiento, en la producción de histamina por LAB aisladas a partir de vino (Landete *et al.*, 2006). Se observó que la histidina (a una concentración de 1 o 2 g/L) y el PLP (a una concentración de 0,5 g/L) inducen la expresión del gen *hdc*, mientras que la histamina (a una concentración de 1 o 2 g/L) provoca una disminución en la expresión de este gen. Además, la expresión de *hdc* también es dependiente de la cinética de crecimiento bacteriano, siendo la fase exponencial donde se produce su mayor expresión, ya que la descarboxilación de la histidina genera energía. Sin embargo, en la fase estacionaria disminuye, debido a la reducción de la velocidad de crecimiento y a la disminución o ausencia de división celular.

En cuanto a la temperatura requerida para que la actividad descarboxilásica sea óptima, se puede decir que ésta oscila en un rango de entre 30 °C y 40 °C, siendo aún activa a 5 °C, pero inactivándose a 60 °C (Kanki *et al.*, 2007).

En el caso concreto del vino, la actividad óptima de la enzima también depende de la concentración de etanol en el medio. Así, con una concentración de etanol de hasta un 10%, la actividad de HDC es óptima, ya que el transporte de histidina dentro de las células se incrementa debido a la fluidificación de la membrana celular como consecuencia de la presencia de alcohol (Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994). Sin embargo, concentraciones de etanol superiores al 12% pueden reducir esta actividad, ya que las propiedades fisicoquímicas de la membrana se alteran, causando un descenso del transporte de histidina (Rollan *et al.*, 1995).

2.3. Histamina endógena en el ser humano.

La histamina se origina en el organismo por descarboxilación del aminoácido histidina mediante una reacción catalizada por la HDC. Las fuentes de almacenamiento de histamina en el organismo son un grupo concreto de células entre las que se encuentran un tipo de células gástricas, las neuronas histaminérgicas, los mastocitos y los basófilos, que acumulan histamina en vesículas intracelulares, desde donde se libera tras la estimulación.

Muchos factores, químicos y físicos, pueden ser responsables de la liberación de histamina. Así, por ejemplo, las temperaturas extremas, ciertos procesos traumáticos, la ingesta de alcohol, determinados alimentos y algunos medicamentos provocan la liberación masiva de histamina, que juega un papel crucial en la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide (Crisp *et al.*, 1984).

2.4. Histamina exógena.

Como se ha mencionado anteriormente, la histamina está presente en multitud de los alimentos que ingerimos a diario en nuestra dieta, donde esta amina se encuentra a elevadas concentraciones debido a la descarboxilación microbiana causada por algunas bacterias. En el intestino también se puede generar histamina como consecuencia de la actividad de ciertas bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal.

Los alimentos que comúnmente contienen altas concentraciones de histamina son el pescado, algunos alimentos fermentados tales como verduras, quesos, carne, soja, yogur, etc., además de algunas bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino (**Tabla 4**).

Tabla 4. Contenido de histamina (mg/kg) en alimentos de origen animal y en vinos (mg/L) (Schirone *et al.*, 2016).

Alimento	Histamina
Pescado	
Caballa india	13,0
Anchoas frescas	69,0
Sardinas frescas	62,0
Atún fresco	478,0
Hamburguesa de atún	304,0
Caballa en aceite	>720,0
Caballa en salmuera	68,0
Atún en salmuera	146,0
Queso	
Parmesano	38,4
Grana padano	23,9
Provolone	9,7
Pecorino (oveja curado)	19,1
Caciocavallo	42,0
Cabrales	957,6
Gouda	40,0
Gorgonzola	255,3
Roquefort	376,6
Salchichas fermentadas	
Butifarra	6,1
Salchichón	12,5
Salami	192,0
Alemana	6,2
Francesa	2,3
Italiana	1,4
Vino	
Tinto	2,8
Tinto	2,2
Tinto	25,1
Blanco	12,5
Rosado	13,4

2.4.1. Histamina en pescados.

Durante el procesamiento y almacenamiento de productos derivados del mar se producen altas cantidades de aminas biogénicas como resultado de la contaminación microbiana generada, comúnmente, como consecuencia de unas condiciones de almacenamiento inadecuadas (Mohan *et al.*, 2009; Rabie *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012). De hecho, numerosas intoxicaciones producidas al ingerir mariscos y pescados en mal estado, como la ocurrida recientemente con el atún (Septiembre de 2017), tienen que ver con una concentración excesiva de aminas biogénicas (Chen *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2016; Lehane y Olley, 2000; Price y Melvin, 1994). Por lo tanto, su identificación y cuantificación son importantes, debido a que actúan como toxinas presentes en estos alimentos.

La amina biogénica mayoritaria en pescados y mariscos es la histamina, debido a que la histidina representa el 2,1-2,2% del total de los aminoácidos presentes en los productos fermentados derivados de animales marinos (**Tabla 5**) (Ezzat *et al.*, 2015).

Tabla 5. Contenido de histidina libre en el músculo esquelético de algunos peces (Suyama y Yoshizawa, 1973).

Nombre	Histidina (mg/kg)
Melva (<i>Auxius tapeinocephalus</i>)	1.460
Listado (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	1.340
Atún de aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)	1.220
Atún (<i>Euthynnus affinis</i>)	1.090
Atún de aleta zul (<i>Thunnus maccoyii</i>)	667
Atún patudo (<i>Thunnus obesus</i>)	745
Medregal del Japón (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	1.160
Serviola (<i>Seriola aureovittata</i>)	732
Pez timón (<i>Seriola purpurascens</i>)	286
Pez espada (<i>Makaira mitsukurii</i>)	831
Marlín (<i>Makaira mazora</i>)	763

Según Halász y colaboradores (Halász *et al.*, 1994), la actividad de la descarboxilasa de aminoácidos es mayor en medio ácido y la actividad óptima se produce en un rango de pH comprendido entre 4,0 y 5,5. Además, la formación de aminas biogénicas por descarboxilación bacteriana también se ve afectada por la temperatura, ya que entre 20 y 37 °C el crecimiento de microorganismos que contienen descarboxilasas es óptimo (Maijala, 1993). Por lo tanto, las condiciones de almacenamiento es un factor a tener en cuenta, sobre todo para los peces que están expuestos al aire o viven en aguas cálidas (FDA, 2011).

Cabe destacar que, a diferencia de algunos patógenos bacterianos, una vez que la histamina se produce, no puede eliminarse por congelación o cocción (Lehane y Olley, 2000). Sin embargo, un método preventivo para retrasar la producción de esta sustancia es la evisceración y la eliminación de las branquias.

Otros factores que influyen en la formación de aminas biogénicas en el pescado son la presencia de agua, la concentración de sal y la concentración de agentes acidulantes y edulcorantes, ya que éstos pueden influir en el desarrollo de la población microbiana productora de estos compuestos (Chong *et al.*, 2011).

Por otra parte, otras aminas biogénicas, tales como la putrescina, la cadaverina, la espermidina, la espermina y la agmatina, se pueden formar en productos provenientes de la pesca. Éstas son capaces de inhibir las enzimas que metabolizan la histamina intestinal, lo que supone un incremento de sus efectos negativos (EFSA, 2015).

2.4.2. Histamina en quesos.

De todos los alimentos fermentados, el queso es uno de los más comúnmente asociados a altas concentraciones de aminas biogénicas generadas por microorganismos (EFSA, 2011). En algunos casos, el consumo de quesos tales como el gouda, el queso suizo, el cheddar o el gruyere, se ha relacionado con intoxicaciones causadas por histamina.

Algunos quesos pueden contener más de 1.000 mg/kg de histamina, independientemente del origen de la leche que haya sido utilizada para su elaboración (leche de cabra, vaca u oveja), sino, sobre todo, de la calidad microbiológica de la materia prima (Ladero *et al.*, 2008). Hoy día, se acepta de forma unánime que el queso de oveja posee una mayor acumulación de aminas biogénicas que el resto de los quesos analizados (Combarros-Fuertes *et al.*, 2016).

Aunque la concentración de histidina presente en la leche sea baja, el proceso de proteólisis que ocurre durante la maduración del queso puede liberar una gran cantidad de histidina, el precursor de la histamina. Las proteínas retenidas en el cuajo (generalmente caseína) se degradan dando lugar a aminoácidos libres. Este proceso es llevado a cabo por proteasas y peptidasas producidas por microorganismos presentes en la leche y/o en el cuajo. Por este motivo, la disponibilidad de aminoácidos precursores de aminas biogénicas es un problema importante en este tipo de alimentos (Lanciotti *et al.*, 2007). Un ejemplo claro de la relación existente entre los niveles de histamina y la actividad proteolítica se ha descrito en el queso azul, muy rico en proteasas y peptidasas (Ladero *et al.*, 2008).

Por estas razones, con el fin de reducir el número de microorganismos patógenos en el proceso de manufacturación, se lleva a cabo un proceso de pasteurización.

Diversos estudios han demostrado que su aplicación puede reducir la concentración de aminas biogénicas (Ladero *et al.*, 2010). A pesar de ellos, en algunos casos esto no es suficiente debido a la gran resistencia exhibida por ciertas bacterias productoras de aminas a las altas temperaturas (Ladero *et al.*, 2011).

La maduración del queso es otro factor a tener en cuenta. La concentración de aminas biogénicas en quesos curados es, generalmente, entre 10 y 2.000 veces más alta que en quesos con un proceso de maduración más corto (Mayer *et al.*, 2010).

Adicionalmente, algunos procesos de post-maduración, tales como cortar o rallar el queso, pueden aumentar la presencia de histamina, probablemente debido a una contaminación con los microorganismos productores (Ladero *et al.*, 2009). Se ha descrito un caso de intoxicación tras el consumo de queso rallado en España, en el que la concentración de histamina presente oscilaba entre 850 y 1.870 mg/kg.

2.4.3. Histamina en carne fermentada.

Los productos cárnicos fermentados presentan una amplia variabilidad en el contenido de aminas biogénicas. Algunos embutidos secos fermentados son fabricados con tecnologías tradicionales y, por lo tanto, se produce una fermentación espontánea sin cultivos iniciadores (*starters*) seleccionados.

La concentración de histamina en los embutidos crudos curados puede variar considerablemente. Por norma general, suelen encontrarse concentraciones bajas, pero en algunos casos, podemos encontrarnos con valores muy por encima de los 100 mg/kg (Bover-Cid *et al.*, 2001), lo que puede dar lugar a una intoxicación grave.

Ciertos factores (pH, potencial redox, concentración de sal, etc.) pueden tener un efecto importante en la producción de aminas biogénicas de origen microbiano, principalmente cuando se trata de LAB pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Kocuria*, así como de levaduras y mohos. En algunas ocasiones, en la industria cárnica se emplean cultivos iniciadores que contienen mezclas de LAB y cocos sin actividad coagulasa que no producen aminas biogénicas y que inhiben el crecimiento de la microbiota productora de éstas, garantizando, de esta forma, la seguridad de los alimentos (Suzzi y Gardini, 2003).

Naila y colaboradores (Naila *et al.*, 2010) propusieron algunos modelos para reducir o prevenir la formación de histamina en estos alimentos. Todos ellos se basan en una correcta manipulación y procesamiento de los mismos; en mantener unas condiciones de higiene adecuadas; en el uso de cultivos iniciadores que no posean descarboxilasas de histidina, o que posean diamino oxidasas, y, finalmente, en someter los alimentos a alta presión hidrostática, ser irradiados, someterlos a vacío o mantenerlos en una atmósfera de composición gaseosa controlada.

2.4.4. Histamina en vinos.

Los vinos también suelen contener aminas biogénicas derivadas del metabolismo microbiano. Éstas pueden ser constituyentes normales de las uvas, y su concentración depende de factores tan diversos como la variedad de uva, región o tipo de suelo, así como la composición, fertilización, condiciones climáticas y grado de maduración de la uva (García-Villar *et al.*, 2007). Por otro lado, algunas aminas biogénicas pueden formarse durante la manufacturación como resultado del uso de determinadas prácticas enológicas.

Se sabe que la presencia de aminas biogénicas en los vinos puede causar un descenso en la calidad de estos. Sin embargo, su producción es, como en otros casos, difícilmente evitable. La presencia de histamina se considera la causa más importante de intolerancia al vino (Konakovsky *et al.*, 2011), siendo las LAB las principales responsables de su producción. En particular, se ha demostrado que *L. hilgardii* y *Pediococcus parvulus* son los principales productores de histamina en vinos, pudiéndose alcanzar concentraciones superiores a 200 mg/L (Landete *et al.*, 2005). No obstante, la capacidad de producción de esta amina es variable entre distintas cepas pertenecientes a la misma especie (Lonvaud-Funel, 2001).

Se ha sugerido que para reducir al máximo la toxicidad debida a la histamina, debería controlarse cuidadosamente su concentración, no excediendo nunca de 2 mg/L en bebidas fermentadas (Ten Brink *et al.*, 1990). De hecho, algunos países han establecido ya una concentración máxima en el vino con valores tolerables para la salud humana (Canadá y Suiza 10 mg/L, Holanda 5 mg/L). Además, en el año 2011, la Organización Internacional de la Viña y Vino (OIV) publicó el "código de buenas prácticas vitivinícolas" con la pretensión de reducir la presencia de aminas biogénicas en los vinos. Las principales acciones propuestas se referían tanto a los cuidados en los viñedos (tipo de suelo y prácticas agrícolas) como al mantenimiento e higiene en las bodegas (prácticas adecuadas y uso de levaduras y cepas LAB específicamente seleccionadas durante la fermentación).

2.4.5. Histamina en otros alimentos.

Diversos estudios han revelado la presencia de histamina en algunos alimentos de origen vegetal, sobre todo en ciertos productos derivados de la soja (**Tabla 6**) (Torofunes *et al.*, 2015). Así mismo, algunos autores han descrito casos de aparición de

histamina en vegetales frescos tales como espinacas, tomates, habas e incluso en el brócoli (Moret *et al.*, 2005).

Tabla 6. Contenido de histamina (mg/kg) en alimentos de origen vegetal (Schirone *et al.*, 2016).

Alimento	Histamina
Salsa soja	ND*-592
Sufu	730
Miso	ND-221
Natto	ND-457
Leche de soja	17,5
Tempeh	4,1
Tofu	3,5-5,8
Pasta de soja	51,2
Tamari	57,65
Salsa de tomate	2,0-10,1
Ketchup	2,0-18,0
Puré de espinacas	2,1-9,8
Guisante	2,3-3,8

*ND: no detectado.

2.5. Intoxicación por histamina y legislación.

La histamina es la única amina biogénica que tiene unos límites normativos establecidos por la legislación de la Unión Europea, siendo éste de 200 mg/kg en el pescado fresco y de 400 mg/kg en productos derivados de la pesca (Visciano *et al.*, 2014). La Comunidad Europea, en su Directiva del Consejo 91/493/CEE, establece para los pescados pertenecientes al grupo de los escómbridos y de los clupéidos un valor medio de histamina admisible inferior a 100 ppm (salmuera inferior a 200 ppm). La FDA (Food and Drug Administration, USA) propone como nivel máximo un valor medio de 50 mg/kg.

La **escombroidosis**, conocida como síndrome de intoxicación histamínica, es una enfermedad producida por el consumo de pescados y mariscos que contienen elevadas concentraciones de esta amina. El término escombroidosis se utiliza debido a que los primeros peces implicados en este envenenamiento pertenecían al suborden de los escómbridos, que incluye la caballa, el atún, el pez espada o el bonito. Sin embargo, también hay otros peces, no escombroides (dorada, sardinas, arenques, etc.), que pueden contener un alto contenido en histamina (Visciano *et al.*, 2012). Generalmente, la cantidad de histamina presente en el pescado es insignificante (por debajo de 0,1 mg/100 g) (Auerswald *et al.*, 2006), pero, tras su almacenamiento, puede aumentar hasta concentraciones que pueden ser tóxicas para los consumidores. A veces, durante este proceso también se producen otros compuestos que actúan sinérgicamente y que potencian el efecto causado por la histamina. De hecho, los peces escombrotóxicos muestran una toxicidad mayor que la que correspondería a una dosis equivalente de histamina pura administrada por vía oral (Lehane y Olley, 2000).

La Unión Europea establece límites de concentración de histamina en especies de peces pertenecientes a las siguientes familias de escómbridos: *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* y *Scomberesocidae*, tanto en el producto fresco como en el procesado, por ejemplo, la salmuera (Reglamento 2073/2005 /CE).

Por otra parte, como hemos indicado arriba, la toxicidad de la histamina puede ser incrementada (efecto sinérgico) por otras aminas producidas durante la descomposición del pescado, como son la cadaverina y la putrescina (Bulushi *et al.*, 2009), además de ser potenciada por la ingesta de alcohol o de drogas, ya que estos compuestos inhiben las enzimas encargadas de degradar la histamina.

Los efectos de esta intoxicación son múltiples, pudiendo provocar diarrea, dolor de cabeza, congestión nasal, respiración sibilante, hipotensión, arritmia, urticaria, prurito, enrojecimiento, y otros síntomas en estos pacientes, como eritema, sudoración, náuseas, vómitos, sensación de ardor en la boca, hinchazón de la lengua y la cara, angustia y/o palpitaciones (**Figura 9**).

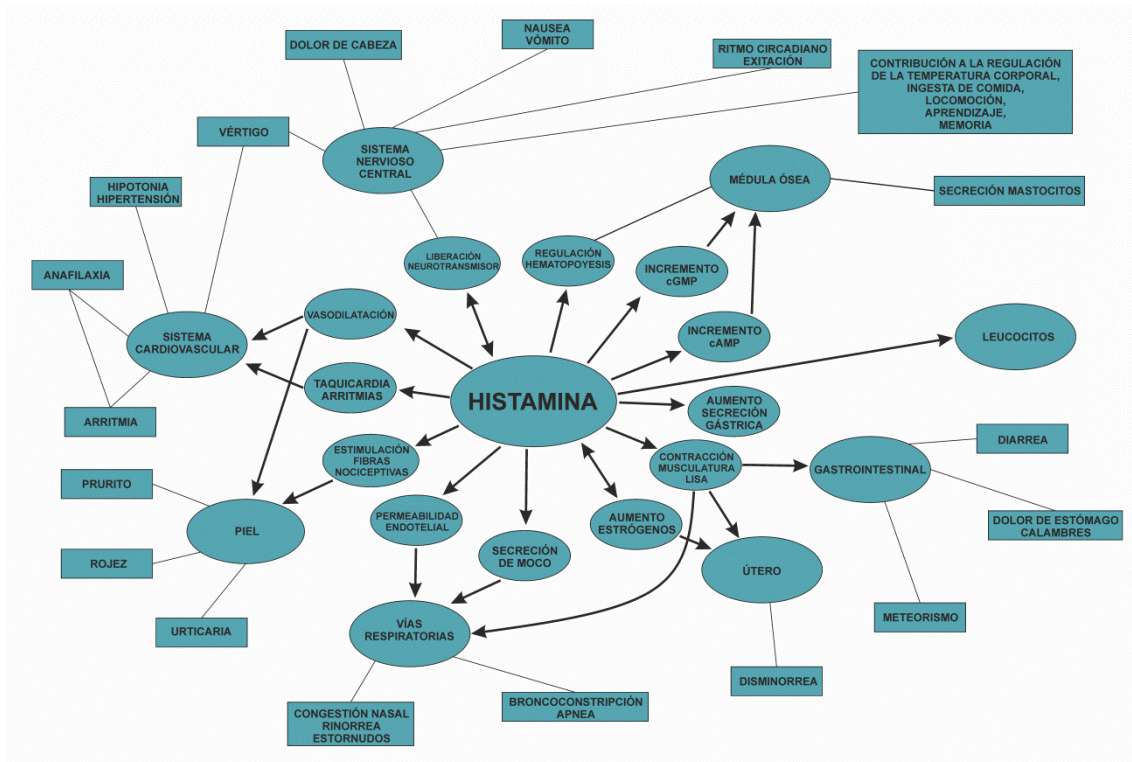


Figura 9. Resumen de los síntomas mediados en intoxicaciones causadas por histamina (Maintz y Novak, 2007).

A pesar de los efectos tóxicos ocasionados por el exceso de histamina, la presencia de esta amina en los alimentos no tiene por qué ser peligrosa. Existen muchos alimentos que contienen pequeñas cantidades de histamina y que, por lo tanto, van a ser fácilmente toleradas por el organismo gracias a la existencia de eficientes sistemas de detoxificación en el tracto digestivo (DAO), los cuales metabolizan tanto la histamina

ingerida como la histamina sintetizada por la propia flora intestinal. Estos sistemas se encargan de transformarla en productos sin actividad biológica y, por lo tanto, inócuos.

2.6. Intolerancia a la histamina.

Los mencionados mecanismos de detoxificación tienen una eficiencia elevada cuando existe un consumo de histamina normal en la dieta. Sin embargo, pierden eficacia si se ingieren grandes cantidades de este compuesto y, además, existen otras aminas que potencian el efecto causado por la histamina, o bien cuando se inhiben los propios sistemas de detoxificación.

La intolerancia a histamina (HIT) es un proceso patológico que se produce por una descompensación entre la absorción (o síntesis) de histamina y la capacidad del organismo para eliminarla, debido a una baja actividad o a una inhibición de las enzimas responsables de su degradación (DAO y HNMT). Aproximadamente el 1% de la población presenta intolerancia a la histamina (Maintz y Novak, 2007), ya que esta baja actividad de la enzima DAO puede deberse a una predisposición genética. Además, la capacidad de metabolizar esta amina también puede estar disminuida en personas que tomen medicamentos que inhiben estas enzimas, así como en pacientes que padezcan diversas afecciones como enfermedades respiratorias o patologías de la piel. Por otro lado, en algunas enfermedades tales como la leucemia mieloide crónica, la mastocitosis o en algunos tumores, está incrementada la síntesis endógena de histamina (Maintz y Novak, 2007; Shahid *et al.*, 2010).

Actualmente, la terapia más efectiva para tratar estos síndromes producidos por la histamina es la limitación tanto de alimentos ricos en este compuesto, como de

fármacos que inhiban la actividad de las enzimas encargadas de su catabolismo. Otra terapia complementaria puede ser el empleo de suplementos tales como el zinc, el cobre o las vitaminas C y B6, ya que actúan como cofactores de la enzima DAO. En los casos más extremos, es necesaria la administración de antihistamínicos H1 y H2, los cuales se explicarán más adelante (Rosell-Camps *et al.*, 2013).

Por todo ello, los avances que permitan incrementar nuestra comprensión sobre los mecanismos implicados en la degradación de histamina en diferentes modelos biológicos, podrían conducir al desarrollo de nuevos sistemas de eliminación de esta amina, así como al diseño de nuevos agentes terapéuticos que puedan ser utilizados como antihistamínicos (Smuda y Bryce, 2011).

2.7. Receptores de histamina.

Los efectos pleiotrópicos de la histamina están mediados por su unión a receptores específicos de membrana. Actualmente, hay cuatro tipos de receptores de histamina descritos: receptor de histamina 1 (H₁R), receptor de histamina 2 (H₂R), receptor de histamina 3 (H₃R) y receptor de histamina 4 (H₄R) (**Tabla 6**). Todos ellos son receptores acoplados a la proteína G (Nakamura *et al.*, 2000).

Tabla 6. Localización y principales efectos biológicos de los receptores de histamina.

Tipo de receptor	Tejido donde se localiza mayoritariamente	Efecto biológico
H₁R	Músculo liso, células endoteliales	Respuestas alérgicas agudas
H₂R	Células gástricas parietales	Secreción de ácido gástrico
H₃R	Sistema nervioso central	Neurotransmisión
H₄R	Mastocitos, eosinófilos, células T, dendrocitos	Regulación respuesta inmune

Estos receptores se expresan en diversos tipos celulares: células endoteliales, células gástricas parietales, células supresoras T, neutrófilos, leucocitos, eosinófilos y mastocitos, hecho que explica los múltiples efectos causados por la histamina en diferentes células y tejidos (Hill *et al.*, 1997).

A continuación, se mencionan algunas de las distintas funciones o procesos mediados por los diferentes receptores de histamina en humanos (Montes *et al.*, 2005):

- **Receptor H1:** Contracción del músculo liso bronquial, prurito, dolor, aumento de la permeabilidad vascular, hipotensión, liberación de mediadores de la inflamación, generación de prostaglandinas, reclutamiento de células inflamatorias, secreción de moco de la mucosa bronquial, cefalea, taquicardia, estimulación de los receptores de la tos.
- **Receptor H2:** Incremento de la permeabilidad vascular, secreción gástrica de HCl, relajación del músculo liso bronquial, producción de moco de las vías aéreas, acción cronotrópica positiva en músculo del atrio, acción inotrópica positiva en músculo ventricular, efecto lipolítico en células sebáceas, estimulación de linfocitos T supresores, quimiotaxis de neutrófilos y basófilos y la liberación de sus enzimas, citotoxicidad y proliferación de linfocitos, actividad de los linfocitos NK, hipotensión, cefalea, taquicardia.
- **Receptor H3:** Previene la broncoconstricción excesiva, inhibe la secreción de ácido gástrico, vasodilatación de vasos cerebrales. Además, funciona como *feedback* negativo para la liberación de neurotransmisores en los nervios periféricos, y participa en el control de la producción de histamina en neuronas histaminérgicas del sistema nervioso central y en el control de la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central.

- **Receptor H4:** Presumiblemente participa en procesos inflamatorios como la alergia y el asma.

Los primeros antihistamínicos bloqueaban competitivamente la unión de la histamina a los receptores H1. No obstante, el hecho de que los antagonistas que actuaban sobre H1 no bloquearan todas las acciones de esta amina, llevó al descubrimiento de nuevos receptores de histamina. Por ejemplo, estos antihistamínicos no actúan modulando la secreción de ácido gástrico, ya que esta respuesta es debida a la unión de la histamina a los receptores de tipo H2.

Del mismo modo, el receptor de tipo H3 surgió al observar que las acciones de la histamina en el cerebro no estaban reguladas por ninguno de los receptores mencionados, sino por un tercero, el cual presentaba muy poca homología tanto con H1 como con H2 (Arrang *et al.*, 1983; Lovenberg *et al.*, 1999).

Finalmente, se descubrió un gen que codificaba una proteína con alta afinidad por la histamina y que presentaba una similitud del 35% con respecto al receptor H3. A este nuevo receptor se le denominó H4 (Thurmond, 2015). Este receptor se localiza en la médula ósea, y, en menor medida, en el colon. Los antagonistas de H4 son efectivos combatiendo el asma bronquial (Deml *et al.*, 2009).

Actualmente, los antagonistas de los receptores H3 y H4 están siendo investigados, debido a su potencial beneficio para la función cerebral y el sistema inmunológico.

2.8. Antihistamínicos.

Generalmente, el término antihistamínico se utiliza para denominar a los antagonistas que actúan sobre los receptores H1. Sin embargo, existen determinados compuestos que ejercen su efecto sobre los receptores H2, H3 y H4 (Faustino-Rocha *et al.*, 2017).

La evidencia de que la histamina tiene un papel activo en las reacciones alérgicas y anafilácticas fue el estímulo para el comienzo de la búsqueda de compuestos capaces de contrarrestar sus efectos patológicos. Este proceso se inició en el Instituto Pasteur de París, en la década de 1930, por Daniel Bovet, galardonado en 1957 con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por su trabajo sobre compuestos antihistamínicos (Bovet, 1950).

El trabajo sobre la búsqueda de antihistamínicos prosiguió en Francia, con Rhône-Poulenc y, de forma independiente, durante los años de guerra (1939-1945), por investigadores en USA (Emanuel, 1999; Loew, 1947). El primer antihistamínico utilizado en humanos fue el Antergant™ (fenbenzamina, RP 2339) en 1942, posteriormente sustituido por el Neoantergant™ (mepiramina, pirilamina, RP 2786), y que todavía se utiliza por vía tópica para contrarrestar los efectos de la liberación de histamina en la piel. A lo largo de la historia, se han descubierto otros muchos antihistamínicos, como la difenhidramina (Benadryl™), la tripelenamina, la clorfeniramina y la prometazina.

A partir de 1945, estos antihistamínicos llegaron a ser ampliamente utilizados en el tratamiento de diversos trastornos alérgicos tales como la fiebre del heno, la rinitis alérgica y la urticaria. Sin embargo, los efectos secundarios producidos eran bastante

frecuentes, lo que supuso un inconveniente para su uso. No obstante, algunos de estos efectos secundarios fueron aprovechados para tratar diversas patologías como es el caso de la Marzina™ (ciclicina) y la Dramamina™, antihistamínicos que se utilizaron, sobre todo, como antieméticos para los mareos (Parsons y Ganellin, 2006).

Los antihistamínicos se pueden clasificar como de primera generación (sedantes, ya que carecen de selectividad por el receptor H₁) o de segunda generación (no sedantes, ya que son más selectivos para los receptores H₁) (Simons y Simons, 2003). Actualmente, podemos hablar ya de antihistamínicos de tercera generación, que son enantiómeros o metabolitos derivados de los de segunda generación y que surgieron en los años 90 (Rico *et al.*, 2009).

3. DEGRADACIÓN DE HISTAMINA.

Como hemos mencionado en repetidas ocasiones, la histamina es un compuesto potencialmente tóxico para nuestro organismo. Por este motivo, existen sistemas capaces de degradar esta amina transformándola en compuestos que no causan efectos nocivos. En vertebrados, la histamina puede ser catabolizada principalmente por dos vías: mediante una desaminación oxidativa, catalizada por la enzima diamino oxidasa (DAO), o bien, a través de una metilación del anillo de imidazol, reacción mediada por la histamina N-metiltransferasa (HNMT) (**Figura 10**).

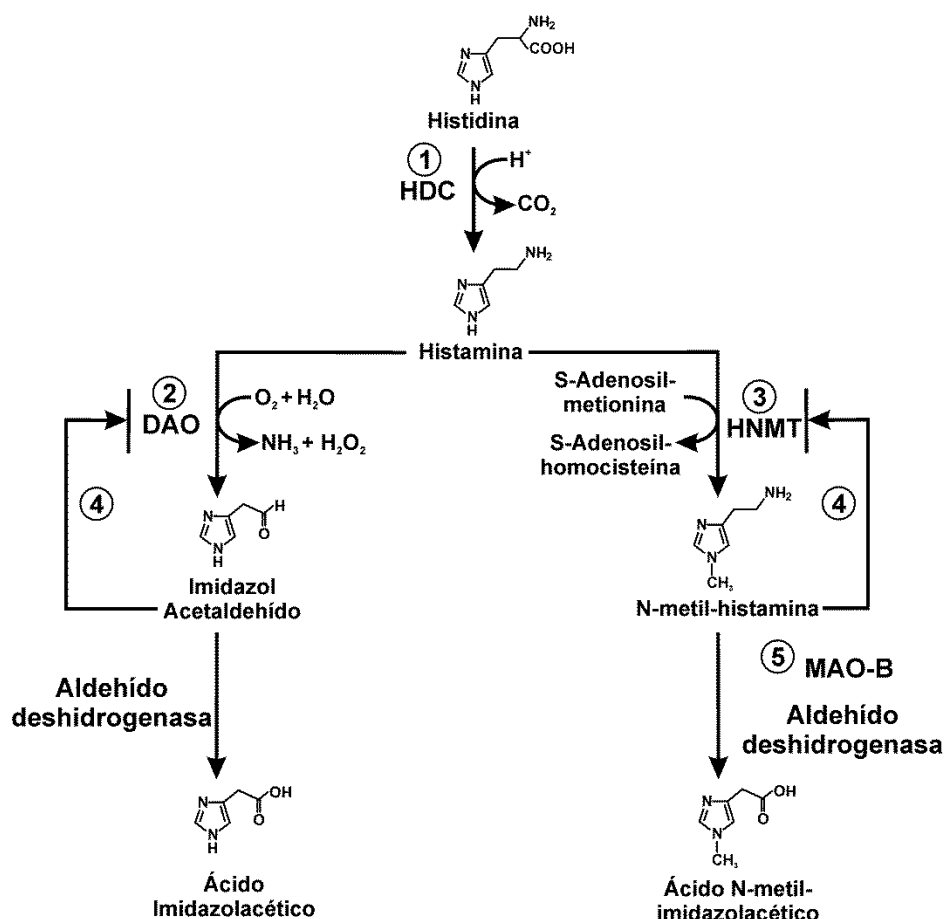


Figura 10. Resumen del metabolismo de la histamina mediado por DAO y HNMT. (1) L-histidina descarboxilasa, HDC; (2) Diamino oxidasa, DAO; (3) Histamina N-metiltransferasa, HNMT; (4) *feedback* negativo; (5) Monoamino oxidasa B, MAO-B.

En la **Figura 10** se muestran esquemáticamente las diferentes etapas del metabolismo de histamina donde actúan estas dos enzimas (DAO y HNMT). En primer lugar, la histamina se sintetiza, como ya hemos indicado, por la descarboxilación del aminoácido histidina, en una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). La histamina generada puede ser catabolizada por dos vías: (i) la que implica la desaminación oxidativa extracelular del grupo amino primario, proceso llevado a cabo por la diamino oxidasa (DAO), o (ii) la que requiere la metilación intracelular del anillo de imidazol, reacción donde participa la histamina-N-metiltransferasa (HNMT). Por lo tanto, cuando hay una disminución de cualquiera de estas actividades enzimáticas (bien por síntesis inadecuada o debido a algún efecto inhibitorio), se puede producir acumulación de histamina. Ambas enzimas pueden ser inhibidas por sus productos de reacción respectivos mediante un *feedback* negativo. La N-metilhistamina se desamina oxidativamente a N-metil-imidazolacetaldehído, reacción catalizada por la monoamina oxidasa B (MAO B) (Maintz y Novak, 2007).

En humanos, entre el 60% y el 80% de la histamina administrada por vía oral es eliminada en la orina como catabolitos resultantes de la acción de ambas enzimas (DAO y HNMT). Sin embargo, una pequeña cantidad de histamina puede ser eliminada por medio de las heces (Emborg *et al.*, 2015).

3.1. Diamino oxidasa.

Esta enzima es la principal barrera en la absorción de histamina en el epitelio intestinal, degradando la histamina proveniente de la dieta y, evitando así, su incursión en el torrente sanguíneo. Además, también se encarga de eliminar la histamina liberada endógenamente.

La enzima diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.6) (Schwelberger, 2004a) utiliza oxígeno molecular para desaminar oxidativamente la histamina, formando imidazolacetaldehído, amoníaco y peróxido de hidrógeno (**Figura 11**). Para su correcto funcionamiento requiere ciertos cofactores tales como vitamina B6, vitamina C y cobre, motivo por el que está incluida en la clase de amino oxidasas dependientes de cobre; esto es, aquellas que contienen en su centro activo un ion de cobre unido a 3 residuos de histidina y el cofactor 2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona, que se forma mediante la modificación post-traducciona a partir de un residuo de tirosina.

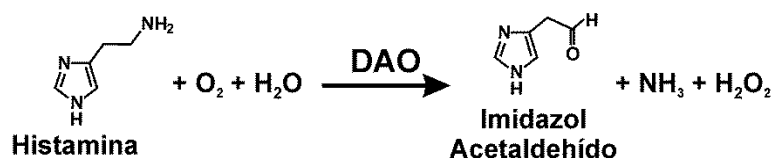


Figura 11. Degradación de histamina mediada por la enzima diamino oxidasa (DAO).

La DAO está codificada por un único gen formado por 5 exones y 4 intrones, localizado en humanos en el cromosoma 7q35. Esta enzima es una glicoproteína homodimérica de 200 kDa, constituida por dos polipéptidos de 750 residuos de aminoácidos. En el extremo N-terminal hay un péptido señal que contiene la diana para su secreción. La estructura primaria de estas proteínas está muy conservada en mamíferos (Schwelberger, 2004a).

Esta enzima se almacena en vesículas secretoras en la membrana plasmática y se libera al espacio extracelular como respuesta a un estímulo para encargarse de la degradación de la histamina extracelular. En mamíferos, la expresión de esta enzima está limitada a algunos tejidos (la mayor actividad de la DAO se ha descrito en el

intestino delgado, en el colon ascendente, en la placenta y en los riñones) (Maintz y Novak, 2007). Tanto es así, que un descenso de la actividad DAO en el organismo es signo de un daño en la mucosa intestinal debido, por ejemplo, a un proceso inflamatorio. Uno de los principales responsables de su liberación es la heparina, que se secreta junto con la histamina por la activación de los mastocitos. La DAO se libera localmente para inactivar el exceso de histamina extracelular y así detener su acción.

La enzima DAO es capaz de reconocer, además de la histamina, otras aminas biogénicas tales como la putrescina, la cadaverina y la espermidina (Taylor y Sumner, 1986; Elmore *et al.*, 2002).

3.2. Histamina N-metiltransferasa.

Esta enzima (HNMT, EC 2.1.1.8) (Schwelberger, 2004b) cataliza la transferencia de un grupo metilo desde S-adenosil-L-metionina (SAM) al grupo amino secundario del anillo de imidazol, formando así N-metilhistamina (**Figura 12**).

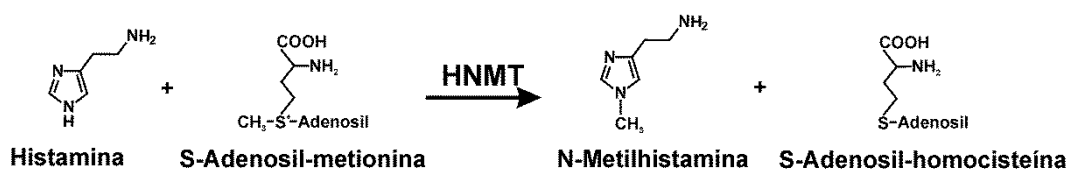


Figura 12. Degradación de histamina mediada por la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT).

HNMT es una pequeña proteína monomérica de 29-34 kDa formada por una cadena polipeptídica de 290 residuos de aminoácidos. Esta enzima no tiene ninguna modificación ni requiere ningún cofactor para desarrollar su actividad. Su estructura

contiene dos dominios, una región de unión a SAM situada en el extremo N-terminal que actúa como una metiltransferasa, y un dominio de unión a histamina en el extremo C-terminal (Horton *et al.*, 2001). La secuencia de aminoácidos de HNMT en mamíferos está altamente conservada y está codificada por un único gen, denominado *hnmt*, que tiene 6 exones. Dicho gen ha sido mapeado en humanos en el cromosoma 2q22.1.

Esta enzima, muy específica para histamina, se encuentra en el citosol de las células y es capaz de degradar solamente la histamina intracelular mediante metilación. Está presente en multitud de tejidos y órganos, encontrándose en los riñones, en el hígado, en el bazo, en la próstata, en los ovarios, en las células de la médula espinal, en los bronquios y en la tráquea. Sin embargo, no se ha detectado en los líquidos corporales.

La HNMT se expresa de forma constitutiva, lo cual indica que muchas células del organismo mantienen contacto con la histamina, hecho que resalta el amplio papel que desempeña esta molécula en el organismo.

3.3. Degradación de núcleos de imidazol mediada por ácido ascórbico.

Una de las vías descritas para explicar el catabolismo de compuestos imidazólicos (como es el caso de la histamina) es aquella en la que se produce una reacción de oxidación mediada por ácido L-ascórbico (Imanaga, 1955). En este mecanismo se produce una hidroxilación del anillo de imidazol, lo que provocará su posterior apertura. Como producto final de la degradación se obtendrá el aminoácido correspondiente (**Figura 13**).

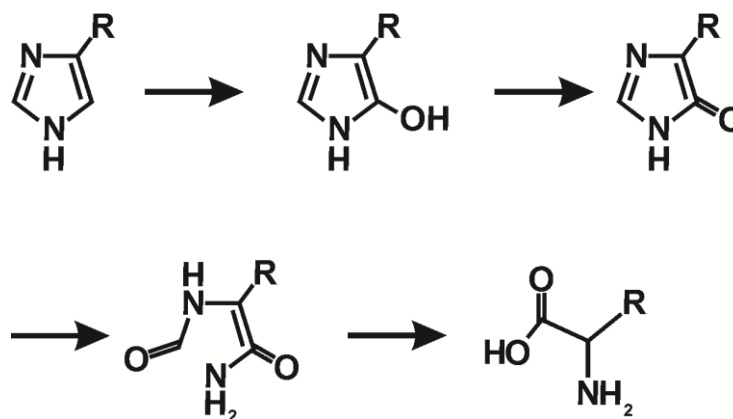


Figura 13. Degradación de compuestos imidazólicos mediada por ácido ascórbico. R representa la cadena lateral para diversos compuestos imidazólicos.

La histamina, molécula constituida por un núcleo de imidazol, es un claro ejemplo de compuesto que puede ser catabolizado de este modo (**Figura 14**). En este mecanismo, el catabolismo de histamina se lleva a cabo en presencia de ácido ascórbico y de cationes Cu^{2+} , los cuales actúan como catalizadores. Así, se obtiene ácido hidantoinacético (HA) como intermediario y ácido aspártico como producto final. En el transcurso de esa vía se produce una hidroxilación del ácido imidazolacético (ImAA), generándose HA. Esta etapa está catalizada por el ácido monodehidro-ascórbico y se sugiere la formación como intermediario del ácido 2,4-dihidroxi-imidazolacético, un tautómero del HA (**Figura 14**) (Chatterjee *et al.*, 1975).

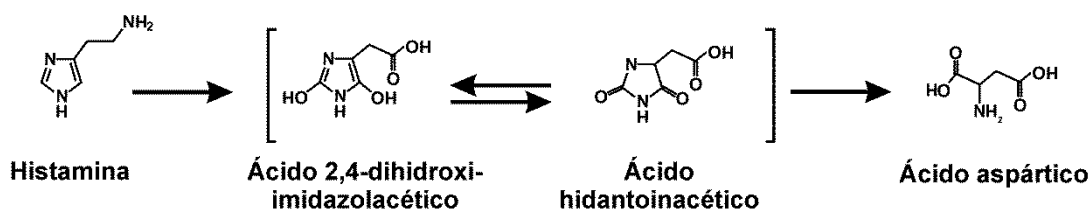


Figura 14. Degradación de histamina mediada por ácido ascórbico (Chatterjee *et al.*, 1975).

3.4. Hidantoinasas microbianas.

Las enzimas denominadas hidantoinasas, también llamadas amidasas cíclicas (EC 3.5.2), son las encargadas de degradar el HA generado tal y como hemos descrito en la **Figura 14**, por lo que también participan en reacciones que conducen a la producción de aminoácidos (como por ejemplo el ácido aspártico) (Syldatk *et al.*, 1999). El producto resultante de la ruptura del anillo de la molécula de HA sería el carbamoilo del aminoácido correspondiente, es decir, el ácido carbamoilaspártico, y su hidrólisis ulterior conduciría a la obtención de ácido aspártico (**Figura 15**).

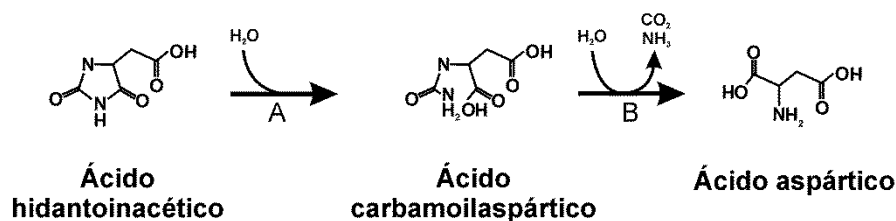


Figura 15. A) Etapa catalizada por las hidantoinasas en la degradación de ácido hidantoinacético. B) Hidrólisis del ácido carbamoilaspártico.

4. DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS.

El catabolismo aerobio de moléculas aromáticas (como es el caso de la histamina) requiere la formación de intermediarios aromáticos mono o dihidroxilados. Con ello se consigue la deslocalización parcial de las nubes electrónicas π , lo que facilita la apertura del anillo. Esta reacción será llevada a cabo por mono o dioxigenasas, respectivamente. Una vez que el anillo ha sido activado, el siguiente paso es proceder a la apertura del mismo y, para ello, se requiere la intervención de enzimas hidrolíticas. Finalmente, se produce la degradación de los diferentes intermediarios hasta ser convertidos en metabolitos generales.

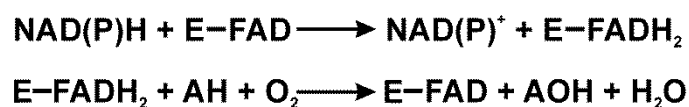
4.1. Hidroxilación del anillo aromático.

Como hemos indicado, la etapa inicial en la degradación microbiana aeróbica de compuestos aromáticos transcurre mediante la introducción de uno o dos grupos hidroxilo en el anillo (Dagley, 1971). Esta hidroxilación está mediada por monooxigenasas o por dioxigenasas que suelen generar compuestos inestables que conducen a la apertura del anillo (Kny y Witkop, 1959).

Las **monooxigenasas**, denominadas también hidroxilasas, incorporan uno de los dos átomos de la molécula de oxígeno al anillo aromático del sustrato que va a ser hidroxilado, mientras que el otro átomo se reduce a agua (Harayama y Timmis, 1992). Las monooxigenasas precisan de un segundo sustrato que ceda electrones para la reducción de la molécula de oxígeno. En la mayoría de estas reacciones, el segundo

sustrato es, en último término, el NADPH o el NADH; no obstante, se emplean diferentes transportadores de electrones para transferirlos desde el NADPH o el NADH hasta el oxígeno.

Las monooxigenasas más simples y, a la vez, las más comunes en bacterias, son flavoproteínas que contienen FAD y catalizan la siguiente secuencia de reacciones:



donde E representa la parte proteica de la monooxigenasa, AH el sustrato aromático, y AOH su producto hidroxilado.

Sin embargo, también existen otras monooxigenasas en las que las subunidades que participan en la transferencia de electrones tienen estructuras similares a las de algunas dioxigenasas de múltiples componentes (Nordlund *et al.*, 1990; Whited y Gibson, 1991).

Las **dioxigenasas** que participan en la hidroxilación del anillo aromático, también llamadas oxigenotransferasas, son dioxigenasas que contienen hierro no hemo y suelen oxidar los sustratos aromáticos generando *cis*-dihidrodiol o *cis*-diolcarboxilatos (Dagley, 1986). La activación de los compuestos aromáticos, para poder ser utilizados como sustratos en las reacciones sucesivas, tiene lugar a través de la introducción de los dos grupos hidroxilo, bien en posición *orto*, o bien en posición *para*.

Estas dioxigenasas requieren, además de oxígeno molecular, diversos cofactores, tales como NADH o NADPH, y en la mayoría de los casos, Fe(II) o Fe(III). En resumen, la reacción que catalizan estas enzimas se lleva a cabo en dos etapas que

implican la oxidación del cofactor primero y, a continuación, la oxidación del sustrato (Mason y Cammack, 1992; Schreuder *et al.*, 1990).

En el catabolismo de compuestos aromáticos con sustituyentes más complejos, suelen ser necesarios pasos adicionales que tienen como finalidad el procesamiento de dichos grupos funcionales con anterioridad a la apertura del anillo. Este es el caso de los compuestos aromáticos halogenados (que requieren de la participación de deshalogenasas) y de los compuestos aromáticos nitrados (Seo *et al.*, 2009).

4.2. Degradación de compuestos formados por un núcleo de imidazol.

En un estudio realizado por Rorije y colaboradores se sugiere que las rutas catabólicas empleadas para degradar compuestos cuya estructura principal es un núcleo de imidazol son similares a la vía de asimilación del ácido urocánico, intermediario generado durante la degradación de histidina (Rorije *et al.*, 2002). Por esta razón, tal y como era de esperar, el catabolismo de los compuestos que contienen un núcleo de imidazol suele estar íntimamente relacionado con el catabolismo del aminoácido histidina.

La degradación de diferentes derivados imidazólicos está esquematizada en la **Figura 16**. En primer lugar se produce una hidratación del compuesto, generando un 5-oxoimidazol derivado. Éste sufre una ruptura hidrolítica (abiótica) que conduce a la apertura del anillo, proceso requerido para la ulterior degradación microbiana (Klepp *et al.*, 1990).

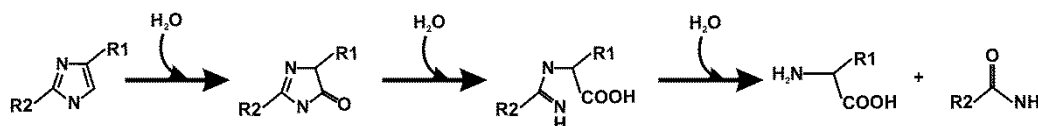


Figura 16. Ruta propuesta para la degradación de compuestos imidazólicos.

4.2.1. Ácido formimino-aspártico como intermediario de la degradación de ácido imidazolacético.

Algunos autores han descrito una vía de degradación para el ácido imidazolacético en *Pseudomonas*, en la cual se describía al ácido N-formimino-aspártico como un intermediario que participaba en la conversión del ácido imidazolacético en ácido N-formil-aspártico. Finalmente, este compuesto era hidrolizado a ácido aspártico mediante una formilasa, activa únicamente en presencia de Fe^{2+} o Co^{2+} (Hayaishi *et al.*, 1957; Ohmura y Hayaishi, 1957; Rothberg y Hayaishi, 1957) (**Figura 17**).

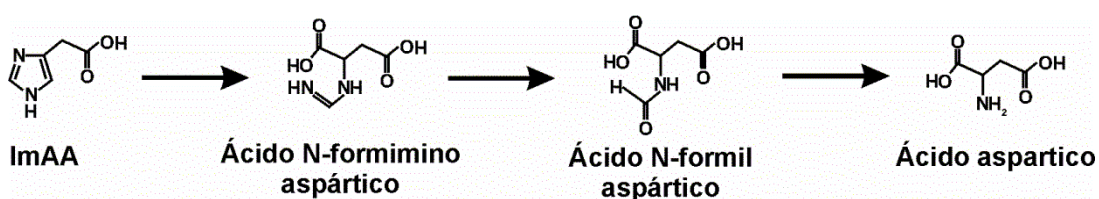


Figura 17. Vía de degradación del ácido imidazolacético en la que aparece el ácido N-formimino-aspártico como intermediario catabólico.

5. FUNCIONES DEL ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO.

En todas las vías propuestas para la degradación de histamina se puede observar que siempre aparece como intermediario catabólico el ácido imidazolacético (o alguno de sus derivados). Este compuesto es un metabolito natural que se encuentra presente en el cerebro y que contiene actividad biológica, por ejemplo, como agonista del receptor GABA_A o como antagonista del receptor GABA_C (Bähre y Kaefer, 2017). De hecho, es capaz de desplazar al ácido γ -aminobutírico (GABA) de sus sitios de unión específicos de una manera muy eficiente (Zukin *et al.*, 1974; Enna y Snyder, 1975, 1977) debido a que el ImAA tiene cierta similitud estructural con el GABA (**Figura 18**), el principal transmisor químico con efecto inhibitor del cerebro (Krnjevic, 1991).

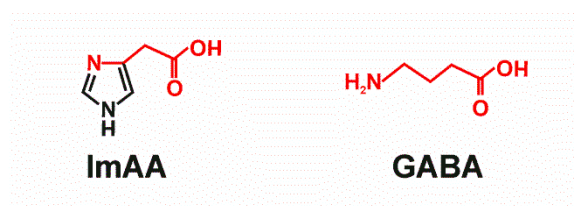


Figura 18. Estructura del ácido imidazolacético (ImAA) y del ácido γ -aminobutírico (GABA).

El hecho de que el ImAA participe en multitud de procesos fisiológicos, hace que su eliminación del medio, así como la de sus derivados (intermediarios catabólicos), sea esencial a fin de evitar los efectos nocivos generados por una elevada concentración de este compuesto.

La administración parenteral de ImAA a animales experimentales conduce a un estado hipnótico similar al sueño que, a menudo, puede ser acompañado de convulsiones. Estos efectos se asemejan a los producidos por los depresores del sistema

nervioso central (SNC), con la excepción de la actividad de tipo convulsivo. En este sentido, el ImAA tiene un efecto similar al descrito para el ácido γ -hidroxibutírico, otro análogo estructural natural del GABA, con propiedades tanto hipnóticas como epileptogénicas (Tunncliff, 1992). La funcionalidad del ImAA a nivel central viene refrendada por su detección en el cerebro, en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma (Tunncliff, 1998). Del mismo modo, el ImAA ejerce un efecto similar al del GABA en el sistema nervioso de invertebrados, donde actúa como inhibidor de los mecanorreceptores en el cangrejo de río (McGeer *et al.*, 1961).

El otro efecto farmacológico sorprendente del ImAA es su capacidad para atenuar la presión arterial. La activación de los receptores GABA_A o de los receptores de imidazolina I₁ podría explicar estas propiedades cardiovasculares (Tunncliff, 1998). Los receptores I₁ reconocen la clonidina, un agente antihipertensivo, y el ImAA es capaz de unirse a estos receptores, actuando, de este modo, como un agente hipotensivo (Ernsberger *et al.*, 1990, 1992).

Además, recientemente, se ha relacionado al ImAA con enfermedades que afectan a la retina y que conducen a una alteración de la visión y, en última instancia, a la ceguera (Valembois *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

El propósito de esta Tesis Doctoral es llevar a cabo la caracterización genética y bioquímica de la ruta responsable de la degradación de histamina y de ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U. Para alcanzar esta meta, se plantean los siguientes objetivos:

1. Aislamiento de mutantes de *Pseudomonas putida* U incapaces de degradar histamina y/o ácido imidazolacético. Este objetivo se abordará mediante un proceso de mutagénesis insercional que implica la utilización del transposón Tn5.
2. Análisis del crecimiento de los diferentes mutantes en distintos medios e identificación mediante HPLC y TLC de los metabolitos acumulados en los caldos de cultivo.
3. Identificación del punto de inserción del Tn5 en cada uno de los mutantes y secuenciación de las zonas de DNA adyacentes.
4. Identificación y análisis de los distintos marcos abiertos de lectura (ORFs) que han sido afectados en cada mutante, así como de aquellos otros localizados en sus inmediaciones.
5. Análisis genético y bioquímico de las proteínas codificadas por los distintos ORFs identificados.
6. Disrupción y/o delección de genes que codifican proteínas susceptibles de participar en la ruta catabólica estudiada y análisis del efecto causado en cada caso.
7. Análisis comparativo de la secuencia de estas proteínas con aquellas otras existentes en las bases de datos y que pertenecen a otros microorganismos.

8. Clonación de los genes responsables de la degradación de histamina y de ácido imidazolacético en plásmidos, y análisis de su expresión en diferentes organismos.

9. Estudio de las posibles aplicaciones biotecnológicas tanto de los diferentes mutantes como de las cepas recombinantes obtenidas en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Para llevar a cabo los experimentos incluidos en el apartado Resultados y Discusión, se emplearon cepas bacterianas aisladas por miembros de nuestro laboratorio o procedentes de diferentes colecciones (Tabla 7).

1.1. Especies bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Palleroni, 2005) son bacterias G- incluidas en el grupo de las γ -proteobacterias. Muchos son organismos saprófitos y se caracterizan por poseer una gran versatilidad metabólica y fisiológica. Están, además, presentes en numerosos ambientes como, por ejemplo, el suelo o los medios acuáticos, y también se encuentran asociados a organismos hospedadores, tales como plantas y animales. Suelen desempeñar un papel muy importante en los procesos de biodegradación y participan muy activamente en los ciclos del carbono y del nitrógeno (Palleroni, 1993). Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* se distribuyen en cinco grupos, en función de los estudios de hibridación de rRNA/DNA (Palleroni *et al.*, 1973; Palleroni, 1993).

1.1.1. *Pseudomonas putida* U.

La cepa silvestre de *P. putida* U, utilizada en este trabajo experimental, pertenece a nuestra colección y está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 4848). Esta bacteria fue aislada a partir del lodo de un arroyo en la ciudad de Urbana, Illinois (Estados Unidos) (Dagley y Gibson, 1965). Teniendo en cuenta la

clasificación mencionada anteriormente, *P. putida* U está incluida en el grupo I de rRNA. El contenido de G + C en su cromosoma oscila entre el 60% y el 62%.

A continuación, se citan algunas de las características fenotípicas y fisiológicas más importantes de esta cepa.

- **Características morfológicas:**

- Son bacilos rectos con un tamaño que oscila entre 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μm .
- No producen prostecas y no se rodean por vainas.
- Poseen varios flagelos polares.

- **Características bioquímicas:**

- Son quimioorganotrofos. No crecen autotróficamente con hidrógeno.
- No son desnitrificantes.
- Dan reacción positiva al test de la oxidasa (citocromo c oxidasa).
- Poseen actividad lipásica, hidrolizan el Tween 80, y tienen actividad arginina hidrolasa.
- No poseen ciclo de las pentosas fosfato funcional.
- No forman levanos a partir de sacarosa.
- No acumulan como material de reserva poli- β -hidroxibutirato, pero sí poli-3-hidroxicanoatos (García *et al.*, 2004).
- No hidrolizan extracelularmente el poli- β -hidroxibutirato.
- No hidrolizan la gelatina ni el almidón.
- No hidrolizan la lecitina. Dan reacción negativa en el test de la yema de huevo.
- Degradan el catecol y el ácido protocatéquico, mediante reacciones de apertura en *orto*.
- Utilizan como fuentes de carbono D-fructosa, glucosa, manitol, y los ácidos glucónico, sacárico, D-glucárico, acético, propiónico, butírico, pentanoico,

hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico, β -hidroxibutírico, succínico, fumárico, cítrico, α -cetoglutarico, hidroximetilglutarico, L-málico, masónico, láctico, pirúvico, γ -aminobutírico (GABA), δ -aminovalérico, benzoico, *p*-hidroxibenzoico, fenilacético (PhAc), 3-hidroxifenilacético (3-OH-PhAc), 4-hidroxifenilacético (4-OH-PhAc), 4-hidroxicinámico, quínico, vanilínico y úrico. Asimila bien betaína, vanillina, glicerol, el *n*-butanol, y los aminoácidos L-alanina, D-alanina, β -alanina, L-aspártico, L-glutámico, L-arginina, L-triptófano, L-prolina, L-tirosina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-fenilalanina, L-ornitina y sarcosina. Utilizan también aminos tales como histamina, tiramina, 2-feniletilamina, dopamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, bencilamina, propilamina, butilamina o pentilamina, algunos alcoholes primarios como, por ejemplo, etanol, 2-feniletanol, alcohol bencílico, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol y decanol; y algunos imidazoles como imidazol, ácido imidazolacético o ácido imidazolacrílico, como fuentes de carbono.

- No catabolizan D-manosa, D-galactosa, D-pseudoheptulosa, D-lactosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-xilosa, D-ribosa, D-arabinosa, D-fucosa, maltosa, celobiosa, lactosa, trehalosa, sacarosa, galactosa, D-rhamnosa, L-rhamnosa, almidón ni los ácidos adípico, cinámico, 3-hidroxicinámico, 3-hidroxibenzoico, sebácico, pimélico, subérico, citracónico, oxálico, maleico, ftálico, pantoteico, levulínico y poli- β -hidroxibutírico. Tampoco son capaces de degradar dodecano, hexadecano, inulina, L-treonina, L-norleucina, heptilamina, octopamina, azelato, adonitol, sorbitol, eritritol, *meso*-inositol, etilenglicol, isopropanol, geraniol y xantina, así como algunos imidazoles tales como imidazol 2-carboxaldehído, ácido 4, (5)-imidazolditiocarboxílico o ácido 4-imidazolcarboxílico.

- Producen algunos pigmentos fluorescentes tales como la pioverdina y moléculas relacionadas.
- **Condiciones de crecimiento:**
 - Es un microorganismo que utiliza como aceptor final de electrones el O₂.
 - Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, aunque esta bacteria es capaz de crecer en un rango de temperaturas situado entre 4 °C y 40 °C.
 - Es incapaz de crecer en condiciones de acidez (valores de pH ≤ 4,5).
 - No requiere factores orgánicos de crecimiento.

1.1.2. *Pseudomonas putida* DOC21 (Merino *et al.*, 2013).

La cepa silvestre de *P. putida* DOC21 pertenece a nuestra colección y está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 8043). Fue aislada por un miembro de nuestro grupo de investigación (Dr. Joaquín Rodríguez), a partir de muestras de suelos próximos a la Universidad de León. Esta cepa puede utilizar varios compuestos esteroideos como única fuente de carbono.

Son bacilos rectos con un tamaño que oscila entre 1,6-2,4 µm de largo y 0,4-0,7 µm de ancho, de aspecto irregular y superficie rugosa cubierta por ranuras similares a cicatrices. Poseen flagelos polares.

Este microorganismo presenta un metabolismo aerobio estricto (metabolismo oxidativo no fermentativo). No forma esporas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, pudiendo crecer a temperaturas muy bajas (4 °C), pero no a aquellas iguales o superiores a 40 °C. Es capaz de crecer en medios en los que el rango de valores de pH oscila entre 5 y 11. Tolerancia de sal (NaCl) del 6% (p/v), viéndose reducido su crecimiento cuando esas concentraciones son superiores al 8%.

Debido a que esta cepa es incapaz de utilizar como única fuente de carbono tanto la histamina como el ácido imidazolacético (ImAA), ha sido utilizada en este trabajo para clonar y expresar genes implicados en el catabolismo de estos compuestos.

1.2. Especies bacterianas de *Escherichia coli*.

1.2.1. *Escherichia coli* HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969).

Genotipo: F⁻, $\Delta(gpt-proA)62$ *leuB6*, *supE44*, *ara-14*, *galK2*, *lacY1*, $\Delta(mcrC-mrr)$, *rpsL20*(Sm^r), *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*.

Esta cepa, transformada con el plásmido pGS9, que incluye el transposón Tn5, se utilizó como bacteria donadora en los experimentos de mutagénesis realizados con este transposón.

1.2.2. *Escherichia coli* DH10B (Grant *et al.*, 1990).

Genotipo: F⁻, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\emptyset 80dlacZ1M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *nupG*.

Cepa empleada en los experimentos rutinarios de clonación utilizando plásmidos. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (superior a 1×10^8 transformantes/ μ g de DNA). Posee una deleción en el gen *lacZ*, lo que hace que sea una cepa idónea para la selección de plásmidos capaces de originar α -complementación (por ejemplo, los de la serie pBlueScript).

A continuación, se indican todas las cepas utilizadas en esta Tesis Doctoral (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas utilizadas en el trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , $\Delta(gpt-proA)62 leuB6, supE44, ara-14, galK2, lacY1, \Delta(mcrC-mrr), rpsL20(Sm^r), xyl-5, mtl-1, recA13$	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , $mcrA, \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC), \emptyset80dlacZ1M15, \Delta lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, \Delta(ara, leu)7697, galU, galK, \lambda, rpsL, nupG$	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>P. putida</i> U CECT 4848	Cepa silvestre, Rf ^r	Dagley y Gibson, 1965
<i>P. putida</i> U::Tn5	Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 2	$hinF::Tn5, hinF$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 3	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 5	$hinI::Tn5, hinI$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 15	$hinJ::Tn5, hinJ$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 16	$hinI::Tn5, hinI$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 17	$hinJ::Tn5, hinJ$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 18	$hinJ::Tn5, hinJ$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 26	$hinG::Tn5, hinG$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 32	$hinI::Tn5, hinI$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 36	$hinI::Tn5, hinI$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 42	$hinJ::Tn5, hinJ$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 45	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 46	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 47	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 48	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 51	$hinK::Tn5, hinK$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 53	$hinF::Tn5, hinF$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 63	$hinG::Tn5, hinG$ debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio

Mutante 68	<i>hinJ::Tn5</i> , <i>hinJ</i> debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 69	<i>hinJ::Tn5</i> , <i>hinJ</i> debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 71	<i>hinI::Tn5</i> , <i>hinI</i> debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
Mutante 72	<i>hinI::Tn5</i> , <i>hinI</i> debido a una inserción del transposón Tn5; mutante de clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
<i>hinF::Tn5</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinF::Tn5</i> pMC-3 <i>hinF</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
Δ <i>hinL</i>	<i>hinL</i> delecionado utilizando la construcción pJQ- <i>hinL</i> (fi); Rf ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i>	<i>hinH</i> disrupto utilizando la construcción pK18:: <i>mob-hinH</i> (fi); mutante clase 2; Rf ^r Km ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i> pMC-3 <i>hinH</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i> pMC-3 <i>hinG</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i> pMC-3 pMC-5	Rf ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
<i>hinH::pK18::mob</i> pMC-3 <i>hinH</i> pMC-5 <i>hinG</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
<i>hinG::Tn5</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinG::Tn5</i> pMC-3 <i>hinG</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinK::Tn5</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinK::Tn5</i> pMC-3 <i>hinK</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinI::Tn5</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinI::Tn5</i> pMC-3 <i>hinI</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinJ::Tn5</i> pMC-3	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinJ::Tn5</i> pMC-3 <i>hinJ</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>hinJ::Tn5</i> pMC-3 <i>hinI</i>	Rf ^r Km ^r Tc ^r	Este estudio
<i>his::Tn5</i>	<i>his</i> ^r debido a una inserción del transposón Tn5, mutantes de clase 3; Rf ^r Km ^r	Este estudio
<i>hutF::pK18::mob</i>	<i>hutF</i> disrupto utilizando la construcción pK18:: <i>mob-hutF</i> (fi); Rf ^r Km ^r	Este estudio
<i>hutG::pK18::mob</i>	<i>hutG</i> disrupto utilizando la construcción pK18:: <i>mob-hutG</i> (fi); Rf ^r Km ^r	Este estudio
<i>PpU_0003::pK18::mob</i>	<i>PpU_0003</i> disrupto utilizando la construcción pK18:: <i>mob-PpU_0003</i> (fi); Rf ^r Km ^r	Este estudio

<i>P. putida</i> DOC21 CECT 8043	Cepa silvestre, Ap ^r	Merino <i>et al.</i> , 2013
pMC-3	Ap ^r Tc ^r	Este estudio
pMC-3 <i>hin2</i>	Ap ^r Tc ^r	Este estudio
pMC-3 pMC-5	Ap ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
pMC-3 <i>hin2</i> pMC-5 <i>hinK</i>	Ap ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
pK18:: <i>mob</i> pMC-3 pMC-5	Ap ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hin2</i> pMC-5 <i>hinK</i>	Ap ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hinF</i> pMC-5 <i>hinK</i>	Ap ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio
pK18:: <i>mobhin1</i> pMC-3 <i>hinFL</i> pMC-5 <i>hinK</i>	Ap ^r Km ^r Tc ^r Gm ^r	Este estudio

2. VECTORES UTILIZADOS.

2.1. pGS9 (Selvaraj e Iyer, 1983).

El plásmido pGS9, que actúa como suicida en *P. putida* U, es el donador del transposón Tn5. Tiene un tamaño de 30,2 Kb y posee el replicón p15A y el sistema de conjugación bacteriana N-*tra*. Posee como marcadores genéticos un gen de resistencia a cloranfenicol y otro de resistencia a kanamicina (codificado en el transposón Tn5, además de otros dos de resistencia a estreptomicina y a bleomicina), lo que permite una rápida selección de las cepas que han incorporado el transposón.

2.2. pRK600

Plásmido auxiliar utilizado en algunos sistemas de conjugación para movilizar plásmidos *mob*⁺ defectivos en la función *tra* (por ejemplo, el plásmido pJQ200KS). Presenta el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* (Herrero *et al.*, 1990).

2.3. pUC18 (Norrander *et al.*, 1983; Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Es un vector plasmídico de clonación con un tamaño de 2,8 Kb que se mantiene en el hospedador en un elevado número de copias. Los plásmidos de esta serie contienen el replicón pMB1 y el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli*. Como marcador genético de selección poseen un gen de resistencia a ampicilina (*bla*, Ap^r). El número 18, que encontramos en su denominación, hace referencia a la orientación de la zona de clonación múltiple (*polylinker*) con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*. La clonación de cualquier fragmento de DNA en este plásmido hará que el gen de la β -galactosidasa no se exprese, lo que permite una fácil y rápida identificación de aquellas colonias en las que se haya insertado en el vector el fragmento de DNA deseado, mediante selección blanco/azul al ser cultivadas en medios conteniendo X-gal. Ha sido utilizado para la realización de la genoteca.

2.4. pGEM[®]-T Easy (Promega Co., USA).

Plásmido comercializado por Promega Co. (USA) como vector linealizado. Se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 3 Kb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos que han sido amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *Taq* polimerasa. Esto es debido a que este plásmido posee timinas libres en los extremos que complementan con las adeninas que incorpora la *Taq* polimerasa en los extremos de los productos amplificados por PCR. Este plásmido presenta el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli* y posee los promotores T7 y SP6 de la RNA polimerasa flanqueando el *polylinker*, que se encuentra situado dentro de la región que codifica el péptido α de la β -galactosidasa. La clonación de cualquier fragmento de DNA (obtenido

por PCR) en este plásmido, hará que el gen de la β -galactosidasa no se exprese y, por lo tanto, permitirá la identificación de las colonias que posean el vector con el inserto mediante simple selección blanco/azul tal y como se ha indicado en otros casos. Dispone del gen que codifica la β -lactamasa (*bla*), por lo que posee resistencia a ampicilina (Ap^r). Esta propiedad es utilizada para la selección y mantenimiento de las células recombinantes de *E. coli*.

2.5. pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA).

Plásmido comercializado por Thermo Fisher Scientific (USA) y de características similares al pGEM[®]-T Easy. Se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 2.886 pb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos que han sido amplificados mediante PCR (utilizando *Taq* polimerasa) al poseer timinas libres en los extremos. Estas timinas complementan con las adeninas que incorpora la *Taq* polimerasa polimerasa en los extremos de los productos amplificados por PCR. Posee el promotor T7 de la RNA polimerasa, bajo el cual se expresa el gen clonado que se encuentra situado dentro de la región que codifica el péptido α de la β -galactosidasa. Este hecho permite que cuando se clonan fragmentos de DNA obtenidos por PCR, el gen que codifica la β -galactosidasa no se exprese, identificando las colonias que posean el vector mediante selección blanco/azul. Dispone del gen que codifica la β -lactamasa (*bla*), por lo que posee resistencia a ampicilina (Ap^r). Esta propiedad es utilizada para la selección y mantenimiento de las células recombinantes de *E. coli*.

2.6. pK18::mob (Schäfer *et al.*, 1994).

Plásmido que se mantiene en alto número de copias, con un tamaño de 3,8 Kb y que posee un origen de replicación ColE1 compatible con los sistemas de *E. coli*, pero que no es reconocido por la maquinaria replicativa de *P. putida* U. Por eso, puede funcionar en esta bacteria como plásmido suicida o como vector de integración, pero nunca como vector con replicación autónoma. Tiene, como marcador genético, un gen de resistencia a kanamicina (Km^r) y, como marcador de selección, el péptido α de la proteína LacZ. También posee la maquinaria de movilización del plásmido RP4, lo que permite que este vector sea transferido mediante conjugación. Debido a ello, ha sido utilizado para llevar a cabo experimentos de disrupción génica (*knock-out*) en *P. putida* U mediante recombinación homóloga.

2.7. pJQ200KS (Quandt y Hynes, 1993).

Plásmido de alto número de copias, con un tamaño de 5,4 Kb, que posee el origen de replicación P15A, compatible con los sistemas de *E. coli*, pero que no es reconocido por gran parte de las bacterias G-, entre las que se incluye el género *Pseudomonas*. Presenta como marcadores de selección un gen de resistencia a gentamicina (Gm^r) y el sistema *lacZ* α que permite, como ya hemos indicado, la selección blanco/azul de los recombinantes que contienen los fragmentos clonados. Además, este plásmido es movilizable e incorpora el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que es inducible por sacarosa y cuya expresión resulta letal en bacterias G-, ya que provoca la acumulación de polímeros (levanos) en el espacio periplásmico. KS indica la orientación del *polylinker* (5'-*Apa*I...*Sst*XI-3', el cual proviene del plásmido pBluescriptII KS) con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*. Este plásmido se utiliza para

obtener mutantes de *P. putida* U en los que se ha delecionado el gen cuya función quiere ser dilucidada.

2.8. pBBR1MCS-3/ pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995).

Plásmidos de bajo número de copias y amplio rango de hospedador. Presentan el origen de replicación *oriBBR1* que les confiere la capacidad de replicarse autónomamente en multitud de cepas bacterianas, incluidas *E. coli*, *P. fluorescens* y *P. putida*. Estos plásmidos son movilizables y compatibles con plásmidos pertenecientes a los grupos IncP, IncQ e IncW, así como con los orígenes de replicación ColE1 y P15a. Permiten la selección directa blanco/azul de los recombinantes en *E. coli* mediante interrupción del péptido LacZ α en presencia de X-gal.

El plásmido pBBR1MCS se obtuvo por modificación del pBBR1, un plásmido aislado de *Bordetella bronchiseptica* S87 al que se incorporó el *polylinker* del plásmido pBluescript[®]. De este modo, la nueva construcción contenía un *polylinker* con 16 sitios únicos de clonación dentro del gen *lacZ α* y mantenía el marcador de selección original (un gen de resistencia a cloranfenicol, Cm^r). Debido a que este marcador de selección limitaba el uso en muchos microorganismos G-, se generaron cuatro plásmidos derivados del pBBR1MCS con resistencias a cuatro antibióticos diferentes (pBBR1MCS-2 -Km^r-; pBBR1MCS-3 -Tc^r-; pBBR1MCS-4 -Ap^r- y pBBR1MCS-5 -Gm^r-).

El pBBR1MCS-3 (5,2 Kb), plásmido con resistencia a Tc, se utiliza habitualmente para la expresión en *P. putida* U de genes en *trans*. En otras ocasiones se ha utilizado el plásmido pBBR1MCS-5 (4,8 Kb), con resistencia a Gm.

En la **Tabla 8** se recogen todos los plásmidos, vectores y construcciones genéticas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Tabla 8. Plásmidos, vectores y construcciones genéticas utilizadas en este trabajo.

Plásmidos, vectores y construcciones	Descripción	Referencia
pGS9	Cm ^r , Km ^r , plásmido conjugativo que contiene el transposon Tn5	Selvaraj e Iyer, 1983
pRK600	Cm ^r , <i>oriColE1</i> , <i>oriV</i> , Mob ⁺ , plásmido auxiliar utilizado en los experimentos de conjugación	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pUC18	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor <i>lac</i> , vector de clonación	Norrande <i>et al.</i> , 1983
pGEM [®] -T Easy	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , SP6 T7, promotor <i>lac</i> , vector utilizado para clonar directamente los productos de PCR	Promega (USA)
pTZ57R/T	Ap ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor T7, vector utilizado para clonar directamente los productos de PCR	Thermo Fisher Scientific (USA)
pK18:: <i>mob</i>	Km ^r , <i>oriColE1</i> , Mob ⁺ , promotor <i>lac</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , utilizado para disrumpir genes mediante eventos de recombinación simple	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pJQ200KS	Gm ^r , <i>oriP15A</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , <i>sacB</i> , utilizado para deleccionar genes mediante eventos de recombinación doble	Quandt y Hynes, 1993
pBBR1MCS-3	Tc ^r , <i>oriBBR1</i> , Mob ⁺ , promotor <i>lac</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , vector de expresión y clonación de genes de amplio rango de hospedador	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-5	Gm ^r , <i>oriBBR1</i> , Mob ⁺ , promotor <i>lac</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , vector de expresión y clonación de genes de amplio rango de hospedador	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pJQ200KS-Tn5	Inserto en pGEM-T Easy desde la posición +57 a la +1.269 de la secuencia IS50L del transposón Tn5, clonado en el pJQ200KS usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SaI</i>	Arcos <i>et al.</i> , 2010
pMC-3 <i>hinF</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -410 a la +1.381 desde el ATG de <i>hinF</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>XhoI</i> y <i>XbaI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinFL</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -410 a la +1.974 desde el ATG de <i>hinF</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>XhoI</i> y <i>SpeI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinH</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -157 a la +848 desde el ATG de <i>hinH</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>KpnI</i> y <i>SmaI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinG</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -160 a la +1.367 desde el ATG de <i>hinG</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio

pMC-5 <i>hinG</i>	Inserto de pMC-3 <i>hinG</i> , clonado en el pBBR1MCS-5 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio
pJQ200K <i>Shin2</i>	Inserto de 4.562 pb (obtenido por recombinación simple) que contiene los genes <i>hinGHFL</i> (<i>cluster hin2</i>) de <i>P. putida</i> U desde la posición +1.860 a la +654 desde el ATG de <i>hinG</i> y de <i>hinL</i> , respectivamente, clonado en el pJQ200KS usando el corte de restricción <i>SalI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hin2</i>	Inserto de pJQ200K <i>Shin2</i> , clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>XhoI</i> y <i>SpeI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinK</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -351 a la +1.020 desde el ATG de <i>hinK</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio
pMC-5 <i>hinK</i>	Inserto de pMC-3 <i>hinK</i> , clonado en el pBBR1MCS-5 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinI</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -392 a la +1.743 desde el ATG de <i>hinI</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio
pMC-3 <i>hinJ</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -292 a la +1.358 desde el ATG de <i>hinJ</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pBBR1MCS-3 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i>	Este estudio
pK18:: <i>mob-hinH</i> (fi)	Inserto en pTZ57R/T desde la posición +64 a la +585 desde el ATG de <i>hinH</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	Este estudio
pK18:: <i>mob-PpU_0003</i> (fi)	Inserto en pTZ57R/T desde la posición +437 a la +959 desde el ATG de <i>PpU_0003</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	Este estudio
pK18:: <i>mob-hutF</i> (fi)	Inserto en pTZ57R/T desde la posición +188 a la +911 desde el ATG de <i>hutF</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	Este estudio
pK18:: <i>mob-hutG</i> (fi)	Inserto en pTZ57R/T desde la posición +168 a la +623 desde el ATG de <i>hutG</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i>	Este estudio
pJQ200K <i>ShinL</i>	Inserto en pTZ57R/T desde la posición -57 a la +654 desde el ATG de <i>hinL</i> de <i>P. putida</i> U, clonado en el pJQ200KS usando los cortes de restricción <i>SalI</i> y <i>SpeI</i>	Este estudio
pJQ200KS Δ <i>hinL</i> (fi)	Dos insertos en pTZ57R/T desde la posición -420 a la +66 y desde +388 a la +869 desde el ATG de <i>hinL</i> de <i>P. putida</i> U, ligados en un solo fragmento que fue clonado en el pJQ200KS usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>XbaI</i>	Este estudio

3. REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.

La histidina, histamina, imidazol, imidazol 2-carboxaldehído, ácido imidazolacético, ácido 4,5 imidazoldicarboxílico, ácido 4-imidazolcarboxílico, ácido 4,(5)-imidazolditiocarboxílico, ácido imidazolacrílico, ácido imidazol-láctico, cadaverina, PhAc, 4-OH-PhAc, tiramina, dopamina, triptamina, 2-feniletilamina, espermidina, octopamina, lisina, ornitina, GABA, asparragina, glutamina, D-alanina, metionina, triptófano, ácido L-aspártico, carbonato de plata y formamidina hidroc lorada fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (USA); la espermina y la putrescina por Alfa Aesar (USA) y la L-alanina por Panreac (España).

Los reactivos utilizados en los experimentos de Biología Molecular procedían de Promega Co. (USA), Roche (Alemania) y Takara (Japón). La DNA polimerasa termoestable de *Thermus thermophilus* y la *Taq* polimerasa las suministró Biotools (España); La *Pfu* DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* se obtuvo de Promega Co. (USA); la DNA ligasa del fago T4 y las enzimas de restricción procedían de Takara (Japón). El marcador de peso molecular, *1 Kb DNA ladder plus*[®], se adquirió de Invitrogen Co. (USA).

Los cebadores utilizados para la amplificación génica mediante técnicas de PCR fueron sintetizados por Roche (Alemania) y Biomers (Alemania).

Los diferentes reactivos comerciales (*kits*) utilizados para la extracción de DNA plasmídico y cromosómico, para la extracción de RNA, para la síntesis de cDNA, para la limpieza de las reacciones enzimáticas o de los productos obtenidos mediante PCR, así como los empleados para la recuperación de DNA de geles de agarosa, fueron

suministrados por las casas comerciales GE Healthcare (Gran Bretaña), Promega Co. (USA), Roche (Alemania), Quiagen (Alemania) y Thermo Fischer Scientific (USA).

3.1. Síntesis química de compuestos que podrían actuar como intermediarios catabólicos de la ruta de degradación de histamina en *P. putida* U.

3.1.1. Síntesis de ácido N-formimino-aspártico (FIA).

Para la síntesis química del ácido N-formimino-aspártico (FIA) se siguió el protocolo descrito por Hayaishi y colaboradores (Hayaishi *et al.*, 1957):

-En primer lugar, en un matraz esférico de tres bocas, de 250 mL de capacidad, añadimos 3,5 mL de formamidina y, posteriormente, acoplamos a la boca central un serpentín de reflujo conectado a una atmósfera de nitrógeno.

-Añadimos al matraz, secuencialmente, 1,33 g de ácido L-aspártico, 3 g de carbonato de plata y 1,6 g de formamidina hidroclicorada.

-Cerramos las dos bocas restantes y dejamos la mezcla en agitación durante 48 horas.

-Una vez transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente en un rotavapor durante 30 minutos y el residuo obtenido se disolvió en 100 mL de HCl 0,06 N.

-Esta disolución se filtró bajo vacío y, posteriormente, centrifugamos a 3.220 x g durante 5 minutos, conservando el sobrenadante.

-A continuación, este volumen se filtró a través de una columna (47,5 x 3 cm) que contenía 81 mL de resina aniónica fuerte (Dowex 1X 200, Sigma, USA) en forma cloruro, equilibrada previamente con 2-3 volúmenes de NaOH 1M.

-Se llevó a cabo una elución con 150 mL de ácido acético a una concentración de 0,3 M, de los que se recogieron 3 fracciones de 50 mL, y, posteriormente, se volvió a eluir con 150 mL de ácido acético 0,5 M, recogándose también 3 fracciones de 50 mL.

-Se analizaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) las 6 fracciones obtenidas para observar en cuál de ellas se encontraba el compuesto sintetizado.

-Las fracciones de interés se congelaron a -80 °C durante 2 horas y, posteriormente, se liofilizaron.

-Las diferentes fracciones se cristalizaron con etanol al 50%. Finalmente, se procedió a realizar los correspondientes análisis mediante TLC, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopía de infrarrojo (IR), espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN).

-Mediante este procedimiento se obtuvieron 1,1 g de ácido N-formimino-aspártico. El rendimiento del proceso fue del 69%.

3.1.2. Síntesis de ácido N- formil-L-aspártico (FAsp).

Para la síntesis de este compuesto seguimos el protocolo descrito por Takemoto y colaboradores (Takemoto *et al.*, 2004).

-En un tubo de vidrio se añadieron, secuencialmente, 1,2 gramos de ácido L-aspártico, 0,91 mL de formamida y 0,77 mL de agua. Seguidamente, se incorporaron 0,61 g de hidróxido sódico para ajustar el pH de la reacción a 11,2.

-A continuación, se incubó la reacción a 55 °C durante un tiempo de 22 horas y, una vez transcurrido ese tiempo, se ajustó el pH del producto final a 7.

-El producto obtenido se congeló a -80 °C durante 2 horas y posteriormente fue liofilizado, tras lo cual se analizó mediante TLC, HPLC, IR, MS y RMN.

-Siguiendo este procedimiento, se obtuvieron 1,2 g de ácido N-formil-L-aspártico (FAsp) (el rendimiento fue del 94,4%).

4. MEDIOS DE CULTIVO.

4.1. Medio Luria Bertani (LB) (Miller, 1972).

Medio Luria Bertani (LB)	
Bacto-triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Añadir agua destilada hasta 1 L y ajustar el pH a 7,5 con KOH. Para preparar medio sólido LB se añadió agar purificado al 2,3% (p/v).

4.2. Medio Φ .

Medio Φ	
Bacto-triptona	20,0 g/L
Extracto de levadura	5,0 g/L
KCl	7,5 g/L
MgSO ₄	4,0 g/L

Añadir agua destilada hasta 1 L y ajustar el pH a 7,6 con KOH.

4.3. Sales del medio mínimo (MM) de *Pseudomonas* (Martinez-

Blanco *et al.*, 1990).

Sales del medio mínimo (MM) de <i>Pseudomonas</i>	
KH ₂ PO ₄	13,60 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 mg/L

Añadir agua destilada hasta 1 L y ajustar el pH a 7 con KOH. Para la preparación de medio sólido se añadió agar purificado al 2,3% (p/v). Este medio se suplementó con la fuente de carbono adecuada a la concentración necesaria.

4.4. Suplementos a los medios de cultivo.

Cuando fue necesario, se suplementaron los medios de cultivo con antibióticos a las concentraciones necesarias. Concretamente, ampicilina (Ap, 100 µg/mL); kanamicina (Km, 25 µg/mL en medio sólido y 12,5 µg/mL en medio líquido),

rifampicina (Rf, 20 µg/mL en medio sólido y 5 µg/mL en medio líquido); estreptomicina (Str, 10 µg/mL); cloranfenicol (Cm, 30 µg/mL); tetraciclina (Tc, 37,5 µg/mL) y/o gentamicina (Gm, 30 µg/mL). Todos los antibióticos utilizados fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (USA).

Para la inducción de los sistemas basados en promotores del tipo *lac*, que reconocen la lactosa como inductor natural, se utilizó un análogo no metabolizable de éste, el isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), servido por la casa comercial Bachem AG (Suiza). La concentración final de IPTG en el medio de cultivo fue de 70 µM.

Cuando se utilizaron vectores en los que la presencia del péptido α de la proteína LacZ permitía una selección blanco/azul, se añadió a los medios de cultivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal), obtenido de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (USA). La concentración final en el medio de cultivo fue de 34 µg/mL.

5. MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Para cultivar las bacterias en medio sólido se utilizó normalmente LB con agar purificado al 2,3% (p/v), y como medio líquido LB, salvo que el microorganismo o el experimento hiciesen necesaria la utilización de un medio químicamente definido. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C y se conservaron en placas con medio LB sólido. Sin embargo, las cepas de *P. putida* U y sus diferentes mutantes se cultivaron a 30 °C y se conservaron en placas con MM suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM) como única

fuelle de carbono. Esta estrategia facilitaba el crecimiento posterior en MM conteniendo otras fuentes de carbono ya que este medio, por sí mismo, actúa como selectivo, minimizando así los riesgos de contaminación de las cepas y los cultivos.

Una vez que habían crecido en LB o en MM, las cepas bacterianas se mantuvieron a 4 °C en placas de Petri selladas con Parafilm™ durante un mes como máximo. Para conservar las cepas durante largos periodos, los cultivos en LB ($Abs_{540nm}=2,5$) se diluyeron al 50% (p/v) con glicerol, se repartieron en alícuotas de 1 mL en criotubos y éstos se mantuvieron a -80 °C.

Para la realización de cultivos en medio líquido y la elaboración de curvas de crecimiento, se partió de placas de medio sólido crecidas en las condiciones anteriormente descritas (30 °C o 37 °C, 24 h) y a partir de las cuales se procedió a inocular *P. putida* o *E. coli* en los diferentes medios líquidos. A cada matraz de vidrio, que contenía el medio deseado (1/5 del volumen del matraz), se añadió el volumen necesario de esta suspensión bacteriana para que la absorbancia (a 540 nm) inicial del cultivo fuese 0,05. Los matraces se incubaron en un agitador orbital *Innova* 4330 (New Brunswick Scientific) a 250 rpm y 30 °C o 37 °C durante el tiempo requerido para cada experimento. La determinación de la cinética del crecimiento bacteriano se llevó a cabo midiendo el incremento de la absorbancia del medio de cultivo a 540 nm periódicamente. La medición de la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro *Jasco* V730. Para la medición de valores de absorbancia superiores a 0,8 se realizaron diluciones pertinentes de los diferentes cultivos bacterianos con el objeto de mantener la relación lineal entre el valor de absorbancia a la longitud de onda de 540 nm y la concentración de células del cultivo. Este criterio fue utilizado en todas las curvas de crecimiento realizadas en esta Tesis Doctoral.

6. MÉTODOS GENERALES PARA EL ANÁLISIS Y/O TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE DNA.

Los procesos realizados con muestras que contenían ácidos nucleicos se llevaron siempre a cabo en condiciones de esterilidad intentando minimizar la presencia de nucleasas a fin de evitar la contaminación de los materiales y los reactivos, y la consiguiente degradación de las muestras.

6.1. Determinación de la concentración y pureza del

DNA/RNA.

El procedimiento utilizado consistió en la medida directa de la concentración de 1 μ L de muestra en un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000. El cálculo de la concentración y la estimación de la pureza de las muestras se realizaron determinando la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La pureza de la muestra viene determinada por la relación entre los valores de las absorbancias medidas a 260 y 280 nm, siendo una muestra de DNA o RNA más pura cuanto más próxima sea esta relación a 1,8 o a 2, respectivamente (Sambrook *et al.*, 1989).

6.2. Digestión del DNA.

Las digestiones de fragmentos de DNA con enzimas de restricción se llevaron a cabo utilizando las soluciones amortiguadoras y siguiendo los protocolos recomendados por las diferentes casas comerciales para cada enzima.

Mezcla de reacción:

1/10 del volumen total de reacción de tampón de digestión (10X).

1 µg de DNA disuelto en H₂O milliQ.

1-3 unidades de la endonucleasa de restricción/µg de DNA.

H₂O milliQ estéril hasta completar el volumen de digestión.

La mezcla de reacción se incubó a la temperatura óptima de la enzima, indicada por el fabricante, durante 2 h.

6.3. Desfosforilación del DNA.

- El DNA (0,5 µg) se disolvió en 45 µL de H₂O milliQ con 1/10 del volumen total de tampón utilizado para la fosfatasa (10X), se calentó a 65 °C durante 10 min para asegurar la completa disolución y la relajación del DNA y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 min.
- Se añadieron 5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) y la mezcla de reacción se incubó durante 60-90 min a 37 °C.
- La fracción proteica se separó del DNA mediante fenolización. El DNA se precipitó a -20 °C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 5,7, y con 2,5 volúmenes de etanol frío.

6.4. Ligación de fragmentos de DNA.

- Se midieron las concentraciones (ng/μL) del DNA vector y del DNA utilizado como inserto, mediante un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.
- Se mezclaron cantidades del DNA vector y del DNA utilizado como inserto atendiendo a la siguiente ecuación:

$$\text{(longitud del inserto/longitud del vector) x ng vector x 3 = ng inserto}$$

- Se añadió 1 μL de tampón de ligasa (10X), 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 y H₂O milliQ hasta alcanzar un volumen final de 10 μL.
- La mezcla de reacción se incubó a 16 °C durante toda la noche. Cuando las ligaciones se llevaron a cabo en el plásmido pTZ57R/T, estas reacciones se incubaron a 22 °C durante 1 h y luego a 4 °C durante toda la noche.

6.5. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa.

El análisis de las muestras de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración del gel se estableció en función del tamaño del fragmento de DNA que se pretendía analizar. Generalmente, se utilizaron geles al 0,8% que nos permitían separar y visualizar fácilmente fragmentos de entre 600 pb y 3.000 pb. Cuando se analizaban fragmentos más grandes (más de 10 Kb) la concentración de agarosa empleada fue del 0,6%. Para fragmentos inferiores a los 600 pb el porcentaje utilizado fue del 2%.

- **Preparación de las muestras:** Las muestras se mezclaron con 1/10 del volumen total de tampón de carga (10X) antes de proceder a depositarlas en el gel.

Como marcadores de tamaño se utilizó el *1 Kb DNA ladder plus*[®] (Invitrogen Co.) a razón de unos 0,7 µg por carril.

Tampón de carga: azul de bromofenol al 0,25%, azul de xileno al 0,25% y sacarosa al 40%.

- **Preparación de los geles:** La preparación de los geles se llevó a cabo disolviendo, mediante calentamiento, la agarosa en tampón de electroforesis (TAE, ver composición abajo) y añadiendo aproximadamente 0,5 µg/mL de bromuro de etidio para visualizar las bandas de DNA mediante iluminación con un transiluminador de luz ultravioleta.

TAE 50X: Tris base 242 gramos; ácido acético glacial 57,1 mL; EDTA 0,5 M pH 8 100 mL; agua destilada hasta 1 L.

Bromuro de etidio: Solución 10 mg/mL en H₂O milliQ; se conserva protegido de la luz a 4 °C.

- **Desarrollo de la electroforesis:** La electroforesis se realizó en buffer TAE, utilizando una fuente de alimentación BIO-RAD PowerPac Basic[™] y aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante el tiempo adecuado para obtener una correcta resolución de las bandas de DNA.

6.6. Recuperación del DNA desde los geles de agarosa.

Rutinariamente, se utilizó el *kit* comercial QIAquick[®] Gel Extraction Kit de Quiagen (Alemania) de extracción de DNA a partir de geles de agarosa. Como otros sistemas de purificación, se basa en la interacción hidrofóbica del DNA con una resina específica que se suministra empaquetada en minicolumnas. Estos métodos son más

rápidos que los que se basan en la extracción por congelación y permiten obtener un mayor rendimiento.

6.7. Aislamiento de DNA genómico de *Pseudomonas putida* U.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se inocularon 50 mL de medio LB líquido suplementado con Rf y con la cepa *P. putida* U (con una absorbancia inicial de 0,05). Este cultivo se incubó toda la noche a 30 °C.
- Las células se recogieron por centrifugación (4.000 x g, 10 min a 4 °C) y el precipitado bacteriano así obtenido se resuspendió en 20 mL de solución GTE. A continuación, se añadieron 20 mg de lisozima y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min.

Disolución GTE: Tris-HCl 25 mM pH 8; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM pH 8.

- Se añadieron 2 mL de SDS (10%) de modo que la solución final fuera del 1%. Esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (25 °C).
- Transcurrido este período de tiempo, se añadieron 300 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y la mezcla se incubó a 37 °C durante, al menos, 30 min.
- A continuación, se añadieron 550 µL de NaCl 4 M, de modo que la concentración final fue 0,1 M.
- El DNA se extrajo dos veces con un volumen de fenol neutro. A continuación, se extrajo otras dos veces con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y, por último, con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), conservando la fase acuosa en todos los casos.

Fenol neutro: antes de utilizar el fenol para extraer los ácidos nucleicos, debe ser equilibrado a pH 7,8, para lo cual, se siguió el siguiente protocolo:

1. Fundir el fenol a 68 °C y añadir hidroxiquinoleína a una concentración final de 0,1%.
2. Añadir 1 volumen de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 8 y mezclar durante 15 min. Dejar reposar y cuando las dos fases se hayan separado, eliminar la mayor cantidad posible de tampón.
3. Añadir 1 volumen de tampón Tris HCl 0,1 M pH 8 y proceder como en el paso anterior.
4. Añadir 1/10 de volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8 conteniendo 0,2% de β -mercaptoetanol y conservar a 4 °C.

Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico: Mezcla de fenol (equilibrado con tampón Tris-HCl pH 8), cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1.

Cloroformo:alcohol isoamílico (CIA): Mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.

- Se añadieron lentamente 2,5 volúmenes de etanol frío (100%; -20 °C). Las dos fases se mezclaron suavemente, hasta que se apreció la aparición de un ovillo de DNA. Este ovillo se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur previamente cerrada en su extremo más fino.
- El DNA se lavó con etanol frío (70%; -20 °C) para eliminar el exceso de sales y posteriormente se dejó secar al aire.
- Una vez evaporado el agua, el DNA fue resuspendido en 5 mL de tampón TE o en agua milliQ.

TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8.

Cuando se empleó el *kit* comercial Puregene Yeast/Bacteria Kit B de Quiagen (Alemania) para el aislamiento de DNA genómico, se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante.

6.8. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando *kits* comerciales (QIAprep[®] Spin Miniprep Kit de Quiagen o GeneJET Plasmid Miniprep Kit de Thermo Fisher Scientific) que permiten la purificación de DNA plasmídico de forma sencilla y rápida, tanto a pequeña como a gran escala. Para ello, con la ayuda de un palillo estéril, se inocularon, con una única colonia, 10 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado. Los tubos se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm) durante un mínimo de 8 h. Las células fueron recogidas por centrifugación a 3.220 x g durante 10 min. Después, se siguieron las instrucciones descritas por el fabricante en función del *kit* utilizado. El fundamento del proceso se resume a continuación:

- Recolección de las células y resuspensión de las mismas en un tampón que contiene RNAsa.
- Lisis alcalina de las células en presencia de SDS.
- Neutralización del lisado con acetato potásico (4-6 M) ajustado a pH 6-6,5.
- Eliminación de los restos celulares, del DNA genómico y de las proteínas por centrifugación (1 min, 18.500 x g).
- Retención específica del DNA, mediante interacciones de tipo hidrofóbico, sobre la resina contenida en el interior de una columna. La elevada fuerza iónica de la solución favorece el establecimiento de estas interacciones hidrofóbicas.
- Lavado del sistema resina-DNA plasmídico con una solución de etanol.
- Secado de la columna por centrifugación (1 min, 18.500 x g).
- Elución del DNA mediante la adición de agua milliQ.

7. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

Para que las bacterias admitan DNA exógeno (proceso de transformación) han de estar en un estado de receptividad denominado *competencia*. Se han descrito varios métodos para obtener células competentes, alguno de los cuales se detalla a continuación.

7.1. Obtención de células competentes de *E. coli*: método del cloruro de rubidio.

Este método ha sido el empleado para obtener células competentes de la cepa *E. coli* DH10B. Con este protocolo se consigue una elevada eficiencia de transformación (hasta 10^8 transformantes por μg de DNA) (Hanahan, 1983, 1985). El procedimiento citado consiste en:

- Cultivar la cepa de *E. coli* DH10B en medio LB sólido suplementado con Str 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 12-14 h.
- Preparar un preinóculo en 100 mL de medio Φ líquido suplementado con Str, sembrando éste con una colonia aislada. Incubar el cultivo a 37 °C en agitación (250 rpm) hasta que alcance un crecimiento adecuado (4-5 horas) para proceder a inocular dos matraces de 2,5 L conteniendo 500 mL de medio Φ cada uno.
- Incubar los matraces a 37 °C hasta que el cultivo alcance un valor de densidad óptica medida a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,4-0,5.
- Enfriar el cultivo durante 30 min a 4 °C (hielo).
- Recoger las células por centrifugación (5 min, 5.000 x g, 4 °C).

- Resuspender el sedimento celular resultante en una solución TFB1 (1/3 del volumen inicial) y mantener las bacterias en hielo durante 30 min.

Disolución TFB1: RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl₂ 10 mM; glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.

- Centrifugar la suspensión bacteriana en TFB1 (5 min, 5.000 x g, 4 °C).
- Resuspender el sedimento bacteriano en solución TFB2 (1/12,5 del volumen inicial) y mantenerlo en hielo durante 15 min.

Solución TFB2: MOPS 10 mM pH 7; RbCl 10 mM; CaCl₂ 75 mM; glicerol al 15% (v/v). Ajustar el pH a 6,8 con NaOH y esterilizar por filtración.

- Las células competentes resultantes pueden ser usadas inmediatamente o bien conservarse (convenientemente repartidas en alícuotas de 200 µL) a -80 °C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

7.2. Procedimiento de transformación: choque térmico.

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* DH10B se ha seguido el método descrito por Hanahan y colaboradores (Hanahan, 1983):

- El DNA (en un volumen no superior a 10 µL) se añadió a 200 µL de células competentes y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min.
- A continuación, las células se sometieron a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a una temperatura de 37 °C durante 2 min. Se enfriaron en hielo 2 min y, posteriormente, se añadieron 800 µL de medio LB fresco.
- Las células se incubaron durante 1 h con agitación en un baño de agua a 37 °C, con el fin de restituir las membranas.

- Por último, se sembraron alícuotas de 200-250 μL en placas de LB-agar que contenían el antibiótico usado para la selección. Las placas se mantuvieron a 37°C durante 12 h o durante el tiempo necesario para observar la aparición de colonias, las cuales, bajo la presión selectiva del correspondiente antibiótico, expresan el marcador de selección existente en el plásmido que han incorporado. La eficacia de transformación obtenida por este método fue del orden de 10^6 transformantes/ μg de DNA plasmídico.

8. TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por K. Mullis (Mullis *et al.*, 1986) permite amplificar un fragmento de DNA a partir de dos oligonucleótidos que hibridan en los extremos (3' y 5') del fragmento a amplificar y que actúan como cebadores en una reacción de síntesis de DNA catalizada por una DNA polimerasa termoestable.

Para la reacción de PCR se usaron tres DNA polimerasas termoestables:

Taq polimerasa procedente de *Thermus aquaticus* (Biotools). Es una polimerasa termoestable, de alta procesividad, pero que carece de actividad correctora de copia. Los productos de PCR generados al amplificar utilizando esta enzima pueden ser directamente clonados en los plásmidos comerciales pGEM[®]-T Easy y pTZ57R/T. Esto se debe a que los productos de PCR generados por la *Taq* polimerasa poseen una

adenina terminal no apareada colgando de su extremo 3' y los vectores de clonación mencionados poseen una timina en el extremo 3', la cual es utilizada para complementar la adenina del producto de PCR, permitiendo, de esta forma, ligar el producto de PCR dentro del plásmido.

***Pfu* polimerasa** procedente de *Pyrococcus furiosus* (Promega). Esta enzima posee actividad correctora de copia, pero no deja restos de adenina en los fragmentos amplificados por PCR, lo que imposibilita la clonación de los fragmentos obtenidos en el plásmido pGEM[®]-T Easy o pTZ57R/T. Además, esta enzima no tiene una procesividad tan elevada como la *Taq* polimerasa.

FideliTaq[™] polimerasa (GE Healthcare). Se trata de una mezcla comercial de polimerasas que contiene una *Taq* polimerasa recombinante de alta fidelidad y termoestable, y una polimerasa con capacidad correctora de copia. Los productos amplificados con esta enzima sí pueden clonarse directamente en el vector pGEM[®]-T Easy y pTZ57R/T al poseer los productos de PCR los restos de adenina.

A continuación, se indica la composición de la mezcla de reacción de PCR empleada (volumen final de 50 μ L), aunque en algunas ocasiones fue necesario modificar las condiciones de la reacción en función de la longitud del fragmento a amplificar, de la temperatura de anillamiento de los cebadores, de la presencia de estructuras secundarias, etc.

Mezcla de reacción:

	<u>Concentración final</u>
5 µL tampón (10X) de la polimerasa -----	1X
4 µL de Cl ₂ Mg (50 mM) -----	4,0 mM
2 µL de desoxinucleótidos (10 mM) -----	0,4 mM
10 µL del oligonucleótido 5' (2 µM) -----	0,4 µM
10 µL del oligonucleótido 3' (2 µM) -----	0,4 µM
5 µL DNA (25 ng/µL) -----	2,5 ng/µL
2 unidades de DNA polimerasa	

Rutinariamente, la PCR se realizó durante 35 ciclos (**Figura 19**) en los que la temperatura de desnaturalización del DNA (95 °C) se mantuvo durante 30 s. El anillamiento de los oligonucleótidos se realizó a una temperatura que dependía de la naturaleza de los cebadores específicos, es decir, de la temperatura de melting (T_m) específica (utilizando siempre la menor T_m de los pares de oligonucleótidos). La extensión se realizó a 72 °C, temperatura óptima de la *Taq* polimerasa (a 68 °C en el caso de la *Pfu* y la FidelityTaq). El tiempo de extensión se determinó en cada caso, considerando que la *Taq* polimerasa sintetizaba una molécula de 1 Kb de longitud en un minuto (en el caso de la *Pfu*, 0,5 Kb de longitud en un minuto). Así mismo, en el protocolo seguido, se agregó una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C (2 min) y una etapa final de extensión a 72 °C (10 min). Los termocicladores utilizados fueron: el modelo Gene Amp PCR Sistema 2400 (suministrado por la casa comercial Perkin Elmer, USA); el modelo 2720 de Applied Biosystems (USA) y el modelo MJ MiniTM Gradient de Bio-Rad (USA).

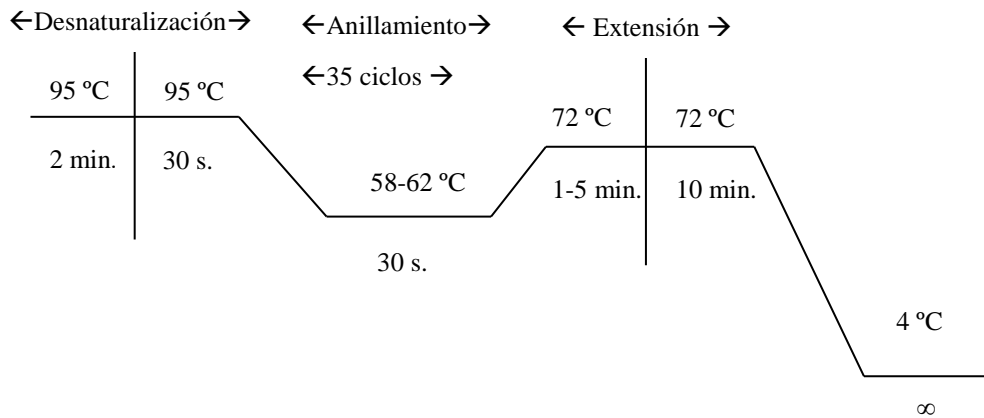


Figura 19. Representación esquemática de un ciclo de reacción de PCR. Se indican las temperaturas de desnaturalización, de anillamiento y de extensión, así como los tiempos empleados en cada uno de los procesos.

9. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA.

La secuenciación de DNA fue llevada a cabo por la empresa Secugen, S.L. (Sequencing and Molecular Diagnostic, Madrid, España). Las secuencias obtenidas experimentalmente fueron comparadas frente a otras depositadas en las bases de datos públicas de GenBank (National Center for Biotechnology Information) (Benson *et al.*, 2000; NCBI Resource Coordinators, 2017), EMBL/EBI Nucleotide Sequence Database (Stoesser *et al.*, 2001) y DNA Data Bank of Japan (Tateno *et al.*, 1998), utilizando los programas BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990, 1997) y Fasta3 (Pearson y Lipman, 1988; Pearson, 1990). Para ensamblar las secuencias obtenidas se utilizó el programa CAP3 (Huang y Madan, 1999). Para el cálculo de la masa molecular de las distintas proteínas a partir de secuencias de aminoácidos se utilizó el servidor de Biología Molecular del Instituto de Bioinformática de Suiza (ExPASy) (Hochstrasser *et al.*, 1995). Los alineamientos múltiples se realizaron con los programas ALING (Wilbur y Lipman, 1983), Clustal X (Thompson *et al.*, 1994) y Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011).

Las secuencias de aminoácidos fueron analizadas empleando las herramientas disponibles en el servidor de Biología Molecular del Instituto de Bioinformática de Suiza (ExPASy) (Hochstrasser *et al.*, 1995).

10. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE *P. putida* U.

La selección de los mutantes de *P. putida* U se llevó a cabo mediante disrupción genética causada por la inserción del Tn5 o del plásmido pK18::*mob*, o por la delección de un fragmento de un gen en particular. Los mutantes obtenidos se denominarán como *P. putida* U *gen*::Tn5, *P. putida* U *gen*::pK18::*mob* o *P. putida* U Δ *gen*, respectivamente.

10.1. Mutagénesis con el transposón Tn5 (Norrander *et al.*, 1983).

Las cepas bacterianas utilizadas en este proceso fueron *E. coli* HB101 (portadora del plásmido pGS9) como cepa donadora del transposón Tn5 (Cm^r, Km^r) (**Figura 20**), y *P. putida* U como cepa receptora (Rf^r).

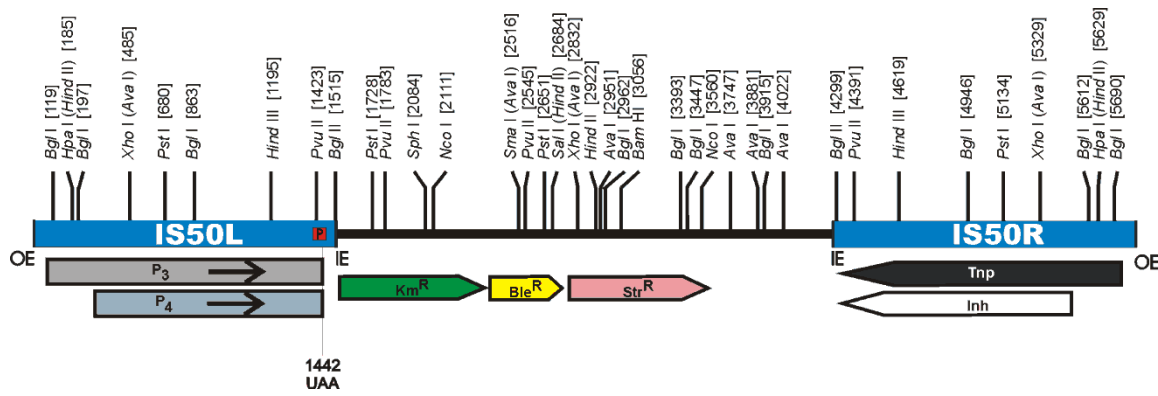


Figura 20. Mapa genético y de restricción del transposón Tn5. Se observan las secuencias de inserción IS50L e IS50R flanqueando la zona central, en la que se encuentran los marcadores genéticos de este transposón (un gen de resistencia a kanamicina -Km^r-, un gen de resistencia a bleomicina -Ble^r- y un gen de resistencia a estreptomicina -Str^r-). También se observan los genes codificados en las secuencias IS50 (transposasa, *tnp*; inhibidor de la transposasa, *inh*; *p3* y *p4*).

Este método ofrece ventajas tales como que: (i) en pseudomonádidos, el Tn5 se integra una única vez y al azar en el genoma de la bacteria receptora; (ii) causa una mutación estable; y (iii) el punto de inserción puede ser identificado fácilmente.

El procedimiento que se siguió es el que se indica a continuación:

- La cepa *E. coli* HB101 (pGS9) se sembró en medio sólido LB suplementado con Km y Cm y se incubó a 37 °C durante 24 h. El mismo proceso se llevó a cabo con la cepa *P. putida* U, pero en un medio LB suplementado con Rf e incubando a 30 °C.
- Se inocularon 10 mL de medio líquido LB suplementado con Km y Cm con *E. coli* HB101 (pGS9). Del mismo modo, se inocularon 10 mL de medio líquido LB, suplementado con Rf, con *P. putida* U. Ambas cepas se incubaron durante 8 h a 37 °C y 30 °C, respectivamente. Previsiblemente, al cabo de 8 h, la Abs_{540nm} del cultivo diluido 1/10 será= 0,25 (2,5 en valor absoluto).

- Se centrifugó una alícuota con el mismo número de células de cada una de las cepas (proporción final de cada una de las cepas 1:1), en un tubo Eppendorf a 18.500 x g durante 3 min y se desechó el sobrenadante. La mezcla de bacterias precipitada se resuspendió en 1 mL de medio LB estéril, y se volvió a centrifugar (18.500 x g, 3 min), repitiendo este proceso dos veces. A continuación, se desechó de nuevo el sobrenadante y la mezcla de células se resuspendió en 40 µL de medio LB.
- En una placa de medio LB sólido se dispuso un filtro bacteriológico (Millipore) estéril (tamaño de poro 0,22 µm) sobre el que se depositó la mezcla de bacterias resuspendida (*E. coli* HB101 (pGS9) y *P. putida* U). La placa se incubó durante 24 h a 30 °C.
- Una vez que las células habían crecido sobre el filtro, éste se retiró de la placa y se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de medio LB, sin antibióticos, en los que se resuspendieron las bacterias.
- A partir de esta suspensión bacteriana se hicieron las diluciones necesarias (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) con medio LB fresco y con ellas se inocularon placas de LB suplementado con Km y Rf a razón de 200 µL de cada dilución por placa. En esas placas no pueden crecer las cepas parentales, ya que no tienen la resistencia a alguno de los dos antibióticos; sin embargo, sí lo hacen los mutantes de *P. putida* U ya que, además de la resistencia a Rf que presentan *per se*, poseen la resistencia a Km adquirida a través del transposón Tn5.
- Los transconjugantes que aparecieron en estas placas tras 24-48 h de incubación a 30 °C, fueron seleccionados por crecimiento en MM + Rf + Km que se había suplementado con la fuente de carbono requerida para cada experimento (**Figura 21**).

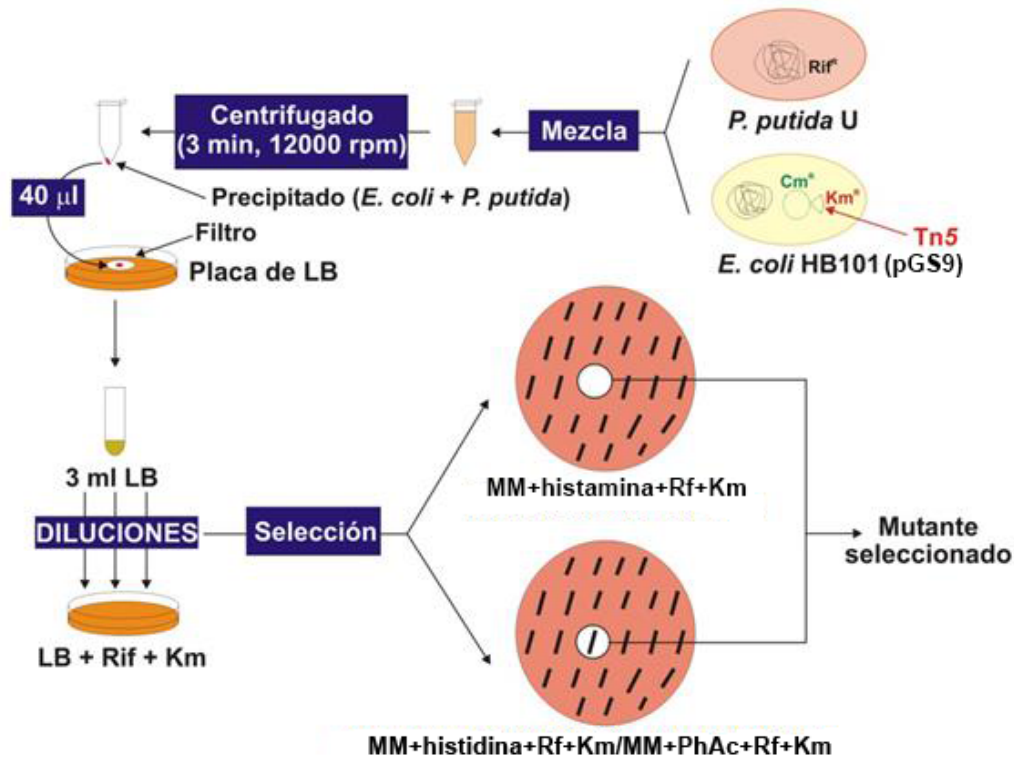


Figura 21. Esquema del proceso de mutación mediante conjugación e inserción del transposón Tn5 en *P. putida* U. En este ejemplo se seleccionaría un mutante en el que el Tn5 se ha insertado en un gen implicado en el catabolismo de histamina.

10.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico.

Una vez obtenidos los diferentes mutantes por la inserción del transposón Tn5, era necesario conocer qué gen había sido interrumpido. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- Se obtuvo DNA genómico del mutante objeto de estudio.
- Este DNA se digirió con una endonucleasa de restricción que tuviera una frecuencia de corte no muy elevada en el genoma de *P. putida* U y que no

actuara dentro de la resistencia de Km en el transposón, ya que esta resistencia será utilizada como marcador de selección. Algunas de las enzimas que cumplían ambos requisitos eran *Bam*HI y *Sal*I (**Figura 22**), aunque también se hicieron combinaciones utilizando estas enzimas junto con *Eco*RI.

- Una vez digerido el DNA con *Sal*I/*Eco*RI o *Bam*HI/*Eco*RI, se procedió a purificar la reacción de digestión con el *kit* comercial GeneJET DNA Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit de Thermo Fisher Scientific y, posteriormente, se ligó en el plásmido pUC18 previamente cortado con las mismas enzimas con las que se había digerido el DNA.
- La reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 12 h y, posteriormente, se utilizó para transformar la cepa *E. coli* DH10B.
- La selección de los transformantes se llevó a cabo en medio LB suplementado con los antibióticos Ap y Km. De este modo, sólo serían capaces de crecer aquellas cepas que hubieran incorporado el plásmido pUC18 que llevase el fragmento de DNA directamente unido al transposón, pues serían los únicos que poseerían la resistencia a Km (Tn5) y Ap (pUC18).
- Una vez seleccionados estos transformantes, se obtuvo el DNA plasmídico y se secuenció el inserto que había sido clonado en el *polylinker* del vector pUC18. Para esta secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos directo (F24) y reverso (R24) universales del vector pUC18 y un oligonucleótido específico del brazo de transposón, denominado Tn5-2 (**Figura 22, Tabla 9**). El análisis de la secuencia obtenida nos permitió identificar el punto exacto en el que se había integrado el transposón Tn5.

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en los diferentes mutantes.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
R24	AGCGGATAACAATTTACACACAGGA
Tn5-2	CCGCCGAAGAGAACAGGC

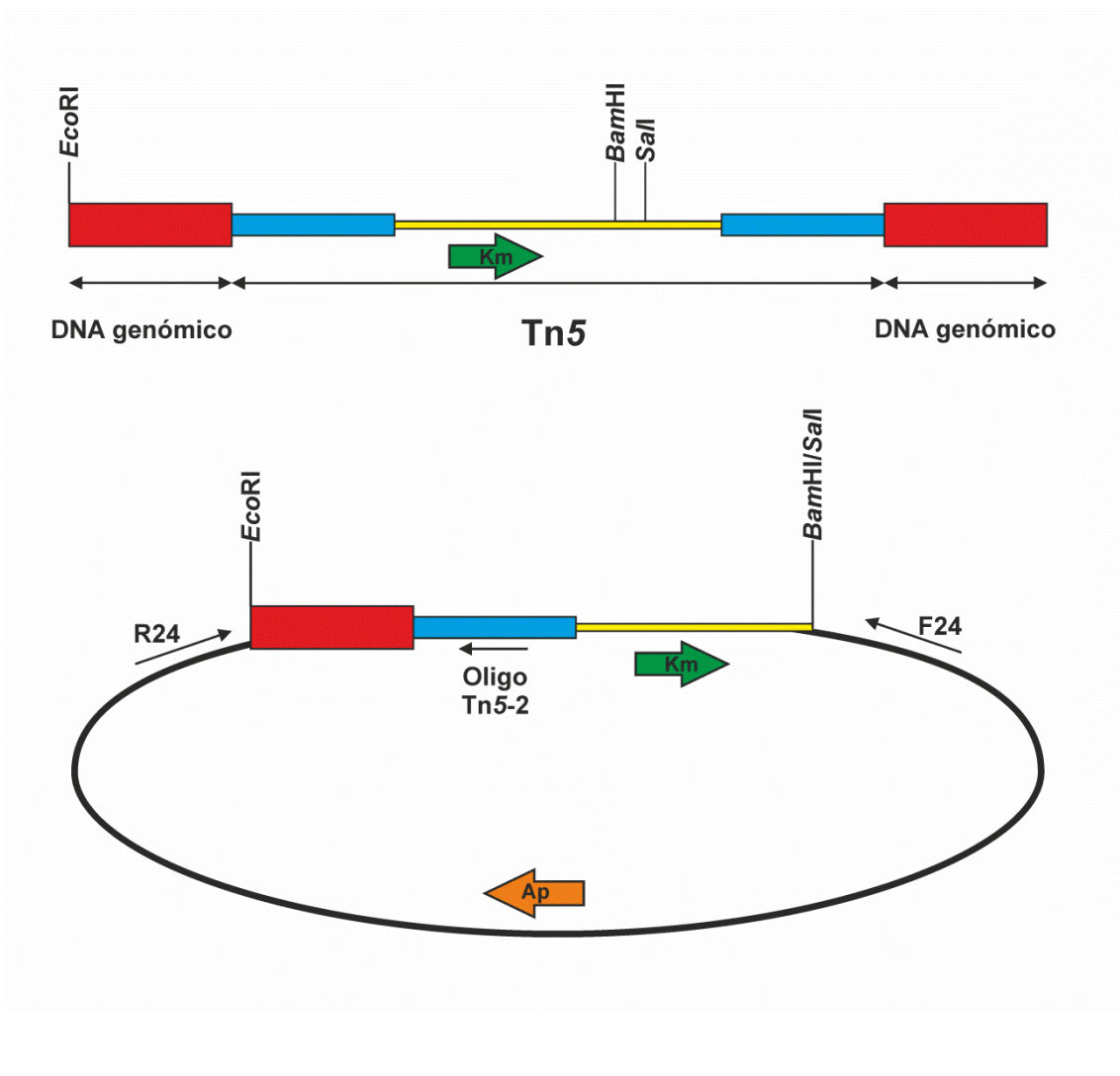


Figura 22. Procedimiento esquemático requerido para la identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico de *P. putida* U.

10.1.2. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”.

Mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”, desarrollada en nuestro laboratorio (Arcos *et al.*, 2010), se ha identificado el punto de inserción del transposón Tn5 en algunos de los mutantes obtenidos en este trabajo. En términos generales, esta técnica se basa en la recombinación homóloga de un vector de clonación no replicativo en *Pseudomonas* sobre una de las secuencias repetidas e invertidas (**Figura 23**) (secuencias IS50, “brazos” del transposón) presentes en ambos extremos del Tn5 (Reznikoff, 1993). Teniendo en cuenta que ambas secuencias son idénticas (salvo en un nucleótido), un plásmido suicida que contenga una secuencia homóloga a la de estas secuencias, tendría las mismas posibilidades de insertarse, mediante un fenómeno de recombinación homóloga, sobre cualquiera de los dos extremos del transposón. Esto implicaría que, estadísticamente, la mitad de las colonias que se obtuvieran habrían recombinado sobre la secuencia IS50R y la otra mitad de las colonias lo harían sobre la secuencia IS50L. Utilizando un proceso de restricción con endonucleasas específicas sobre el DNA de la cepa recombinante, se podrán obtener las secuencias adyacentes al punto de inserción del transposón Tn5, tanto las que se encuentran corriente arriba, como aquellas que se encuentren en dirección 3' respecto a dicho punto de inserción.

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el plásmido pJQ200KS en el que se clonó un fragmento de 1.113 pb correspondiente a un fragmento interno de una de las secuencias de inserción (“brazos”) del transposón Tn5. Este plásmido, denominado pJQ200KS-Tn5, poseía, flanqueando al brazo del Tn5, las siguientes dianas de

restricción (que no estaban presentes en el interior del brazo ni en el plásmido): *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I y *Sal*I. El proceso seguido se detalla a continuación.

- La construcción que contenía el fragmento del brazo del transposón se transfirió por conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a los diferentes mutantes de *P. putida* U. Para ello se utilizó como cepa donadora una *E. coli* DH10B, previamente transformada con la construcción pJQ200KS-Tn5. Para permitir la conjugación entre ésta y *P. putida* U, se utilizó una cepa auxiliar (*E. coli* HB101, conteniendo el plásmido pRK600) que facilita la movilización de aquellos plásmidos que contengan los genes *mob*. Para llevar a cabo esta conjugación triparental, se mezclaron distintas cantidades de cada una de estas tres cepas (receptora, auxiliar y donadora en proporción 1:0,5:0,75) en un tubo Eppendorf estéril. La mezcla de bacterias se centrifugó (3.800 x g, 1 min) desechándose el sobrenadante. Las bacterias así precipitadas se lavaron con 0,5 mL de medio LB estéril, volviéndose a centrifugar (3.800 x g, 1 min). Se desechó de nuevo el sobrenadante y la mezcla de células se resuspendió en 30-50 µL de medio.
- En una placa que contenía medio LB sólido sin suplemento de antibióticos se dispuso un filtro bacteriológico (Millipore) estéril sobre el que se depositó la mezcla de bacterias. La placa se incubó durante 12 h a 30 °C.
- Tras este tiempo de incubación, se procedió a la selección, utilizando los marcadores de resistencia a antibióticos del plásmido, de aquellos transconjugantes de *P. putida* U que hubieran integrado en el cromosoma la construcción pJQ200KS-Tn5 (ya que este plásmido carece de origen de replicación autónomo en *Pseudomonas*). Para ello se resuspendió el filtro bacteriológico en 2 mL de LB y se inocularon placas de LB suplementadas con Rf, Km y Gm.

- Hay que tener en cuenta que en esta conjugación triparental se pueden producir dos fenómenos de recombinación diferentes debido a que los brazos del Tn5 son secuencias repetidas e invertidas. Por lo tanto, la construcción pJQ200KS-Tn5 podrá recombinar en cualquiera de los dos brazos del transposón (**Figura 23**), y este hecho es el que nos va a permitir conocer ambas secuencias genéticas adyacentes al punto de inserción del Tn5.
- Una vez que se obtuvieron los transconjugantes de *P. putida* U, se extrajo DNA genómico de varios de ellos sin olvidar el hecho de que estamos trabajando con dos poblaciones distintas de transconjugantes (según en qué brazo del transposón haya recombinado el plásmido). Dicho DNA se digirió en su totalidad con endonucleasas de restricción que cortaban en el *polylinker* del plásmido y que no lo hacían en el interior del brazo del transposón, como es el caso de *Bam*HI, *Xba*I, *Sma*I y *Sal*I.
- A continuación, se purificó la reacción de restricción con el *kit* comercial GeneJET DNA Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit de Thermo Fisher Scientific y se realizó una religación del DNA obtenido.
- La reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 12 h y, posteriormente, se empleó para transformar *E. coli* DH10B. La selección de estos transformantes de *E. coli* DH10B se realizó en medio LB suplementado con Gm, de tal forma que sólo crecieran aquellas colonias que hubieran incorporado el plásmido pJQ200KS con el inserto (brazo del Tn5 + DNA genómico).
- Se obtuvo DNA plasmídico de las dos poblaciones de transformantes y se secuenció el inserto de dichas construcciones utilizando para ello los oligonucleótidos que figuran en la **Tabla 9**. El inserto resultante consta de la secuencia del brazo del Tn5 más una secuencia de mayor o menor tamaño

correspondiente al DNA genómico de *P. putida* U que codifica funciones implicadas en el catabolismo de histamina. La nueva secuencia corresponde al lado izquierdo o al derecho del punto de inserción del transposón Tn5, dependiendo del brazo en el que se hubiera llevado a cabo la recombinación.

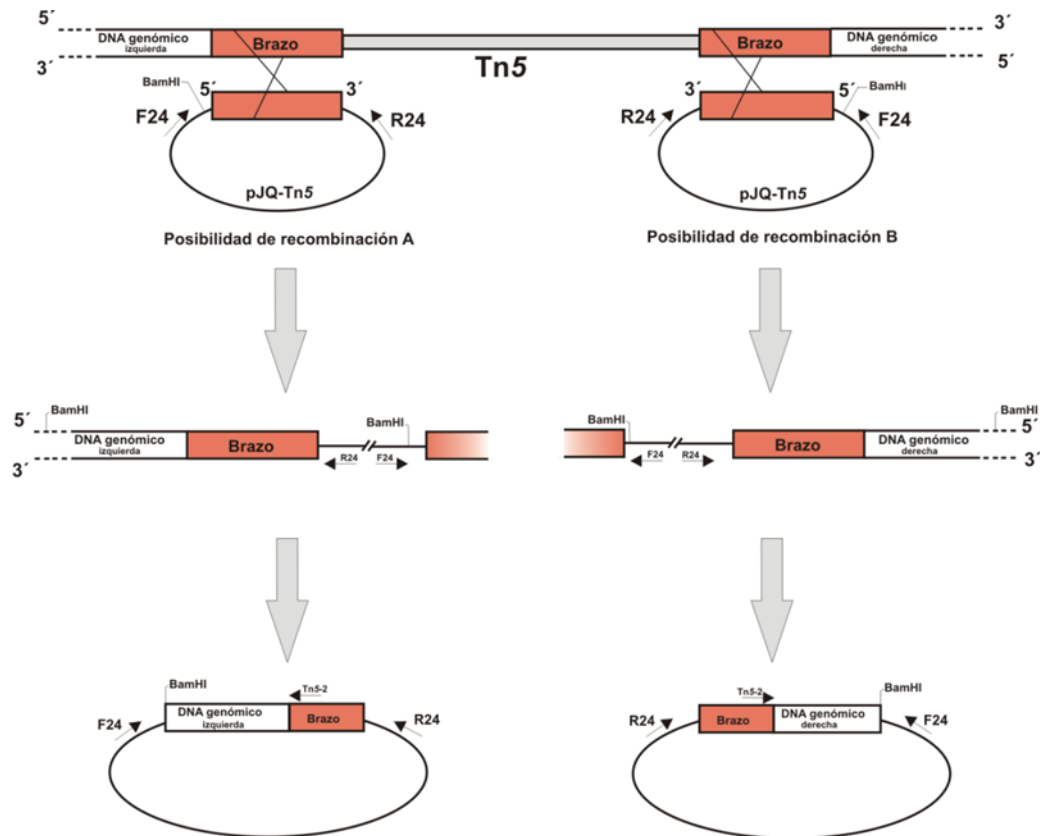


Figura 23. Representación esquemática del proceso de aislamiento y secuenciación de la zona adyacente al punto de inserción del transposón Tn5 mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”. En el esquema aparecen reflejadas las dos posibilidades de recombinación de la construcción pJQ200KS-Tn5 en los brazos del transposón Tn5 que se ha insertado previamente en el genoma de *P. putida* U. En el ejemplo esquematizado aquí se ha utilizado el corte *Bam*HI.

10.1.3. Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.

Una vez conocida la secuencia adyacente al punto de inserción, se buscó, en función de una elevada conservación de secuencia a nivel de proteína, las secuencias homólogas a las obtenidas sobre el genoma publicado de *P. putida* KT2440. Sobre las secuencias homólogas identificadas se diseñaron oligonucleótidos para ser utilizados en reacciones de PCR frente al oligonucleótido Tn5-2, específico del transposón Tn5, utilizando en esas reacciones, como DNA molde, el DNA genómico aislado de los distintos mutantes. Estas reacciones de PCR se purificaron utilizando el *kit* comercial GeneJET DNA Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit de Thermo Fisher Scientific, y se secuenciaron. Cuando el experimento así lo requería, se ligaron en los plásmidos pGEM[®]-T Easy o pTZ57R/T.

10.2. Obtención de mutantes mediante disrupción.

Para analizar la función de un gen en particular, éste fue interrumpido mediante recombinación homóloga. Para ello, se utilizó un fragmento interno del gen que se deseaba mutar (aproximadamente 1/3 del tamaño del gen) obtenido mediante amplificación con oligonucleótidos específicos. El procedimiento que se siguió se detalla a continuación:

- Mediante amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos (**Tabla 10**) se obtuvo un fragmento interno del gen (200-900 pb dependiendo del tamaño del gen) que se quería interrumpir. Se clonó en pGEM[®]-T Easy o en pTZ57R/T y desde aquí, mediante la utilización de alguna de las endonucleasas que cortan en

el *polylinker*, se clonó en el plásmido pK18::*mob*, un plásmido cuyo origen de replicación no es reconocido por *Pseudomonas*.

- La construcción resultante se introdujo en *P. putida* U mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990), un método que supone ciertas modificaciones sobre la técnica empleada para la obtención de mutantes mediante transposición conjugacional. En este caso se utilizaron como cepas donadoras del plásmido distintos transformantes de *E. coli* DH10B que contenían las construcciones deseadas y como cepa auxiliar en el proceso de conjugación, la cepa *E. coli* HB101 (pRK600). Esta última cepa facilita la movilización de las construcciones realizadas en el plásmido pK18::*mob* desde el donador (*E. coli* DH10B) hasta la cepa receptora (*P. putida* U).
- Ante la presión ejercida por el antibiótico Km durante la selección de los transconjugantes, el sistema de recombinación de la célula receptora inserta el plásmido en el genoma mediante un proceso de recombinación homóloga a través del inserto clonado, permitiendo, de este modo, la supervivencia de la cepa (**Figura 24**).

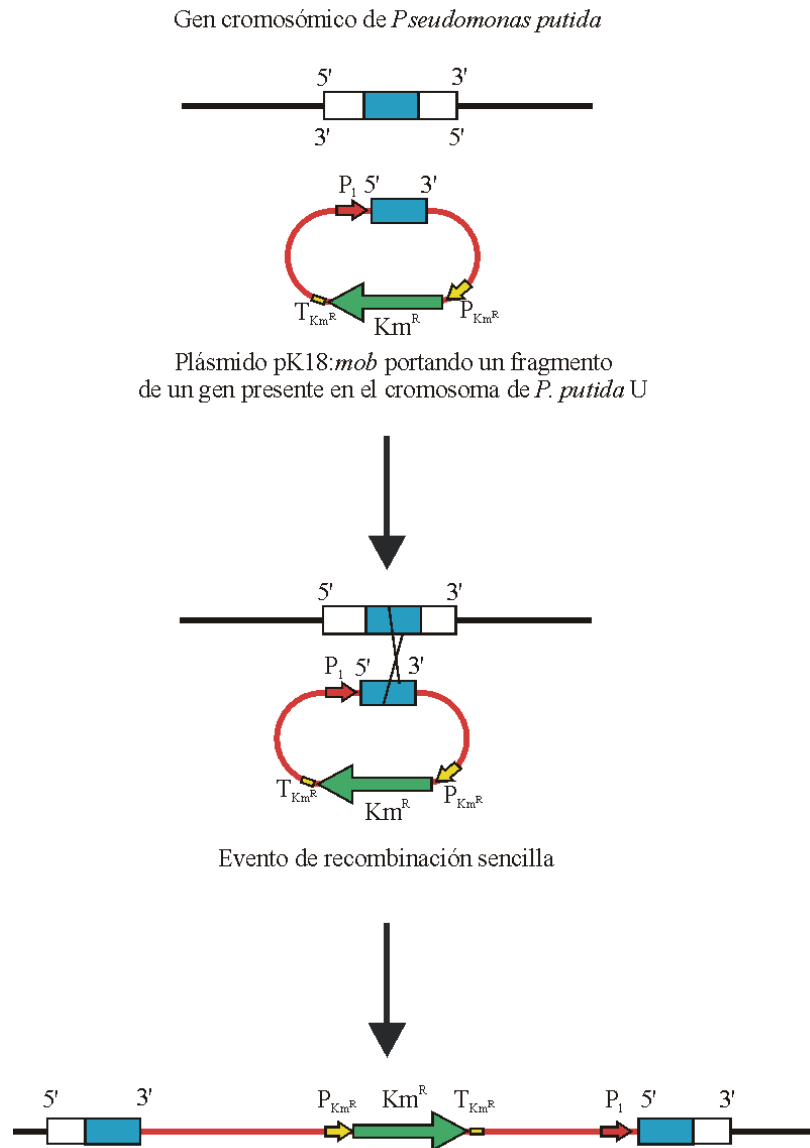


Figura 24. Esquema del evento de recombinación genética mediante recombinación homóloga. Se utiliza un fragmento interno del gen diana que se pretende mutar, clonado en un plásmido integrativo (pK18::*mob*).

- La comprobación de la correcta inserción del plásmido en el gen diana se llevó a cabo mediante amplificación (PCR), utilizando para ello oligonucleótidos específicos (externos al fragmento utilizado para la recombinación), frente a los oligonucleótidos universales F24 y R24 propios del plásmido.

Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación del fragmento interno del gen que se quería interrumpir en los mutantes disruptos *P. putida* U *hinH*::pK18::mob y PpU_0003::pK18::mob.

Oligonucleótido	Secuencia
HinH.Dis.F	CAGGCCATCGAGCACACCGATCGGGTTCG
HinH.Dis.R	CGAGCATCGCCGTGGGGGCCCGCTGCCC
PpU_0003.Dis.F	CAAGCTGGGCTACATGGCCATGG
PpU_0003.Dis.R	ATACCACTTGGTGAACGGCGAGG

10.3. Obtención de mutantes mediante delección.

Para analizar la función de un gen concreto se utilizó un sistema de edición del genoma de la cepa diana mediante delección total o parcial del mismo. En primer lugar, se tienen que clonar en el plásmido pJQ200KS los fragmentos adyacentes a la zona del gen que se desea eliminar (en el mismo sentido que poseen en el genoma). El procedimiento seguido fue:

- Los fragmentos adyacentes a la región que se quería deleccionar se obtuvieron mediante digestiones con endonucleasas de restricción, o bien se amplificaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 11**); se clonaron en el plásmido pGEM®-T Easy o en el plásmido pTZ57R/T y, desde aquí, mediante digestión con alguna de las enzimas que cortan en el *polylinker*, se liberaron los fragmentos y se clonaron en el pJQ200KS. Generalmente, todas estas construcciones se clonaron utilizando el corte de restricción *NotI* que está presente en el *polylinker* del pGEM®-T Easy y que se localiza a ambos lados del inserto clonado, o utilizando los cortes de restricción *ApaI* y *XbaI* que están en el *polylinker* del pTZ57R/T, localizados uno a cada lado del inserto clonado.

- Una vez obtenida la construcción en el plásmido pJQ200KS, se procedió a transferirla a *P. putida* U por conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990).
- La selección de transformantes se llevó a cabo en medio LB suplementado con los antibióticos Rf y Gm. La única posibilidad para que los transconjugantes sobrevivieran en presencia de la gentamicina era que se llevara a cabo una recombinación homóloga a través de una de las dos regiones de DNA clonadas en el pJQ200KS, puesto que este vector no es replicativo en *Pseudomonas*.
- Con ayuda de un palillo estéril se seleccionó una colonia aislada de los diferentes transconjugantes obtenidos tras la primera recombinación; se resuspendió en 1 mL de agua milliQ estéril y se sembraron alícuotas de 200 μ L en placas de Petri con LB suplementado con Rf y sacarosa al 10%. Este vector expresa el gen *sacB*, que codifica una proteína que hidroliza la sacarosa presente en el medio, dando lugar a levanos (polímeros de fructosa), los cuales se acumulan en el espacio periplásmico de las bacterias y causan su muerte por estrés osmótico. Para evitar el efecto provocado por la acción de la sacarasa, en presencia de sacarosa se fuerza una segunda recombinación que puede producirse de dos maneras diferentes (**Figura 25**) dando como resultado, bien la restauración del gen completo, es decir, la vuelta a la situación original, o bien causando la delección de parte del mismo (25% de los casos).

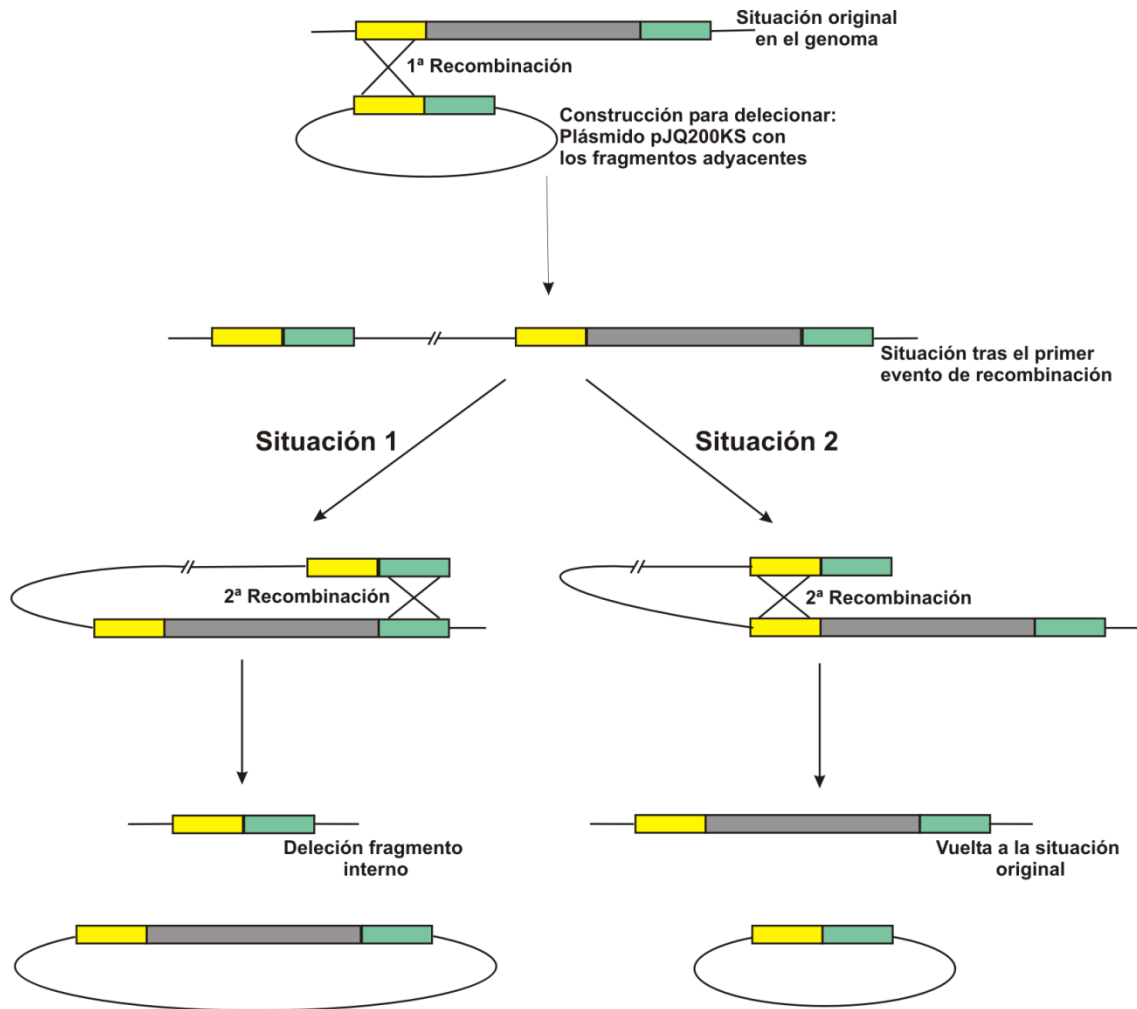


Figura 25. Evento de mutación de un gen mediante deleción de un fragmento interno del mismo. La primera recombinación aparece en la parte superior de la figura, y la segunda se indica en la parte inferior. Pueden darse dos situaciones: Situación 1, la segunda recombinación ocurre por el fragmento distinto al implicado en la primera recombinación dando lugar a la deleción de la región de DNA entre ambos fragmentos y a la liberación del plásmido, que arrastra la región del genoma delecionada y que se pierde por dilución. Situación 2, la segunda recombinación ocurre por el mismo fragmento implicado en la primera. En este caso se recupera la situación original y el plásmido, que se libera tal y como se insertó, se pierde por dilución.

- Para analizar si los transconjugantes tenían o no el gen delecionado, se realizaron amplificaciones (PCR) sobre el DNA genómico de los mismos utilizando oligonucleótidos específicos que corresponden a las regiones exteriores a aquellas que habían sido utilizadas para realizar la construcción en el vector pJQ200KS (**Tabla 12**).

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar los fragmentos adyacentes a la zona del gen que se desea eliminar (*hinL*).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
HinL.Del.F	AAGCCTCGAGCTGGACCTGCCGGAAGAACCCG
HinL.Del.R	GTCGGATCCCTGGTTGGGGTAGGTTTCCTTGGTG
HinL.Del.F'	TGAGGATCCTCGACGTGATCGCCGTGGTACCGG
HinL.Del.R'	CGACTAGTTGGCCTGCGTGTGGACCTGGAG

Tabla 12. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para la comprobación en los mutantes delecionados (*P. putida* U Δ *hinL*).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
HinL.F1	GCCACACCGTGGACTTCCGTGCCC
HinL.R1	GGCGGCAGGTGCCGAGTTGGGCGC

11. EXPRESIÓN DE LOS GENES EN “*trans*”.

Para determinar si los mutantes obtenidos por la integración del transposón Tn5 recuperaban su función original, esto es, eran de nuevo capaces de crecer en histamina y en ImAA, se llevó a cabo la clonación de los genes silvestres (correspondientes a los que habían sido mutados) en el plásmido pBBR1MCS-3/pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995). El protocolo seguido se describe a continuación:

- En primer lugar, se amplificó por PCR el gen que va a ser expresado en *trans* utilizando los oligonucleótidos específicos necesarios en cada caso, indicados en la **Tabla 13**. Se ligó el producto de amplificación en un plásmido comercial (pGEM[®]-T Easy o pTZ57R/T), y se clonó (en el sentido adecuado para que tenga lugar su expresión) en el plásmido pBBR1MCS-3/pBBR1MCS-5

(replicativos tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas*). Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* DH10B con este plásmido.

- El plásmido que contenía el gen de interés, se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a los mutantes de *P. putida* U.
- La selección de transconjugantes que habían incorporado el plásmido se realizó en medio LB sólido suplementado con Rf, Km (marcadores de resistencia de los mutantes) y Tc (marcador de resistencia del plásmido pBBR1MCS-3) y/o Gm (marcador de resistencia del plásmido pBBR1MCS-5).
- Una vez que se obtuvieron los transconjugantes, se extrajo el plásmido y se secuenció para comprobar su integridad.
- Los transconjugantes obtenidos se cultivaron en MM líquido o sólido suplementado con histamina o con ImAA para comprobar si el mutante había incorporado el gen, es decir, si había revertido la mutación y si, por tanto, crecía satisfactoriamente en medios que contenían histamina o ImAA como única fuente de carbono.

En algunos casos (ver Resultados y Discusión) la expresión en *trans* del gen mutado no revertía el fenotipo silvestre. Esto podría deberse a un efecto polar que impedía la expresión de genes corriente abajo del mutado, aunque en la mayoría de los casos indicaba que el gen mutado y el gen o los genes adyacentes constituían una unidad transcripcional (operón).

Tabla 13. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* de los genes del catabolismo de histamina y de ImAA en los distintos mutantes.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
HinF.F	GATGCTCGAGGAGCTGATGGCGATAACC
HinF.R	GCTCTAGAGGGTCTGGTTGGGGTAGGTTTCC
HinL.F	ACGCGTCGACGTGGCGGATGAGCACCAAACCAACACGATCAGC
HinL.R	GGACTAGTCCGCTGGCGCCTGCAGAGGCGCTGATCATCGC
HinH.F	GGACTAGTCCCGATGGTGGCGAACAGGTTGGC
HinH.R	CCGCTCGAGCGGTTTTTTGGGGGCGGAAATCGAG
HinG.F	GCTATGGCTACCAGGCGACGCCATGG
HinG.R	GAGCTGACCTGGCCATTGGTGGACCTGC
HinI.F	CCCGCTCGAGAATTTTCGCTCAACTGGTCGAC
HinI.R	GTCTAGAAGACGTTGAGGATCAGCGAAAC
HinJ.F	CCGGAGAGGTGGAAGTTGTTGGC
HinJ.R	GGCAGGTGGGTCTTGCCGGCG
HinK.F	GGGGCCGCGGTCGGTGGCATGCG
HinK.R	CCGAGTACGTAGTGGTAGAAAGCCAG

12. MÉTODOS PARA MUESTRAS DE PROTEÍNAS.

12.1. Obtención de extractos libres de células: disrupción celular mediante homogeneización mecánica.

Las células de *P. putida* U o alguno de los mutantes crecidas en medio líquido (MM + 4-OH-PhAc 10 mM) durante 14 horas, o el tiempo requerido para cada experimento, se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 10 min a 4 °C. Las bacterias se lavaron dos veces con solución salina estéril y se resuspendieron en tampón de rotura (1/5 p/v).

Tampón de rotura: Tris-HCl 0,5 M pH=8,2; mercaptoetanol (MSH), 5 mM; EDTA, 4 mM; fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 1 mM.

Las células recolectadas se homogeneizaron en un desintegrador mecánico o *molino de bolas* Braun, modelo MSK, utilizando perlas de vidrio Ballotini de 0,17-0,18 mm de diámetro (en una proporción bolas/suspensión celular de 1:3), durante 3 ciclos de 4 segundos, con 15 segundos entre cada ciclo, refrigerando con nieve carbónica. El homogeneizado se dejó reposar en hielo durante 15 minutos y, una vez decantadas las perlas de vidrio en el fondo del tubo, se recuperó el extracto celular, las perlas se lavaron con un volumen de solución amortiguadora de homogeneización y la fase líquida se reunió con la anterior para proceder a la centrifugación (Martinez-Blanco *et al.*, 1990).

Las perlas de vidrio y las células no rotas se separaron por decantación y el extracto se centrifugó a 17.000 x g durante 10 minutos a 2 °C en una centrífuga Beckman modelo J2-21 M.

12.2. Determinación de la actividad imidazolacetato monooxigenasa.

La actividad de esta enzima se observó siguiendo el método descrito por Maki y colaboradores (Maki *et al.*, 1969). La enzima imidazolacetato monooxigenasa requiere, aparte de oxígeno molecular, NADH + H⁺ para su funcionamiento. Este nucleótido presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Debido a esto, la reacción puede ser cuantificada midiendo la velocidad de desaparición de dicho cofactor a lo largo del proceso de reacción.

Los ensayos enzimáticos contenían, en 1 mL de tampón Tris-HCl (50 mM, pH 9), los siguientes componentes: NADH, 0,2 µmol; ImAA, 2,5 µmol y el extracto enzimático (3 mg de proteína, determinado por el método de Bradford). Las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C durante 5 minutos, realizándose las mediciones en un espectrofotómetro Beckmann modelo 85 a 340 nm frente a un blanco al cual no se añadió el sustrato.

13. PCR A TIEMPO REAL (RT-QPCR).

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-QPCR) fue utilizada para llevar a cabo la medida de los niveles de expresión de algunos de los genes *hin* en distintas condiciones de crecimiento de las cepas bacterianas utilizadas. La medida de la expresión de los genes seleccionados se realizó mediante un método de cuantificación relativa respecto a los niveles de expresión de un gen *housekeeping*, es decir, un gen que actúa como referencia interna para la normalización de los datos obtenidos en cada una de las muestras (Livak y Schmittgen, 2001). Para ello, la cepa *P. putida* U y los mutantes *P. putida* U *hinK*::Tn5 y *P. putida* U *hinJ*::Tn5 se incubaron en MM suplementado con 4-OH-PhAc (15 mM) y los correspondientes antibióticos (Rf para *P. putida* U y Rf, Km para los mutantes) en un incubador orbital a 30 °C y a 250 rpm. Tras 14 h de crecimiento y una vez alcanzado un valor de absorbancia de 2,65 a 540 nm, se añadió 10 mM de histamina (inductor) y se incubó durante 30 min adicionales. Transcurrido este tiempo, se recogieron 10 mL del medio de cultivo (de la cepa silvestre o de los mutantes) y se centrifugaron (7 min, 3.220 x g, 4 °C). El precipitado obtenido se congeló a -80 °C. A partir de él, se obtuvo el RNA utilizando el *kit* High Pure RNA Isolation (Roche, Alemania) siguiendo las instrucciones descritas

por el fabricante y se trató con el *kit* DNA-freeTM (Invitrogen) para eliminar cualquier resto de DNA. La concentración del RNA obtenido en cada muestra se determinó en un espectro NanoDrop[®] ND-1000.

A continuación, se procedió a sintetizar el cDNA correspondiente al RNA total aislado de las diferentes cepas bacterianas. Para ello, se tomó el volumen correspondiente a 1 µg de RNA de cada una de las muestras y se realizó la síntesis del cDNA correspondiente con el *kit* Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis with dsDNase comercializado por Thermo Fisher Scientific (USA), utilizando Thermo Scientific Maxima H Minus Reverse Transcriptase como retrotranscriptasa y hexanucleótidos al azar como cebadores en la reacción de retrotranscripción.

Como control de la calidad de las muestras, en este experimento se realizaron reacciones de PCR utilizando como cebadores los mismos que se utilizaron posteriormente en los experimentos de RT-QPCR y utilizando como molde de la amplificación las muestras de RNA a partir de las que se realizó la retrotranscripción y el cDNA obtenido a partir de las mismas. La obtención del amplicón específico sobre las muestras de cDNA y la no amplificación sobre las muestras de RNA indicaba que la muestra era óptima para las siguientes determinaciones, así como la ausencia de DNA genómico contaminante que pudiera falsear las mismas.

La cuantificación se realizó en un termociclador a tiempo real StepOne[®] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mediante el protocolo de unión de un colorante fluorescente (SYBR Green) al DNA amplificado, para lo cual se utilizó el *kit* Power SYBR Green Master Mix comercializado por Applied Biosystems. El tamaño de los amplicones analizados fue de entre 150 y 200 pb. La eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos utilizados (**Tabla 14**) se encontraba entre 0,96 y 0,98 de acuerdo a

la fórmula descrita por Rasmussen (Rasmussen, 2001), aplicada sobre los datos obtenidos en las respectivas curvas de calibrado.

Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado, utilizando para cada una de las muestras un gradiente de concentración de los oligonucleótidos específicos entre 0,01 y 0,05 μM en reacciones independientes. La fiabilidad de los resultados obtenidos se confirmó a través del análisis de las respectivas curvas de disociación, observándose un único pico en la primera derivada de fusión de las curvas (Ririe *et al.*, 1997). Como referencia interna de expresión (gen *housekeeping*) se utilizó el rDNA 16S de *P. putida* U (Tabla 14). Los cambios de los niveles de expresión relativa de los distintos genes se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 14. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la RT-QPCR.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Gen control (<i>Housekeeping</i>)	
16S.F	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
16S.R	TGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
Genes del catabolismo de histamina	
hinF.PCR.F	TGAACAACCTCGAAATCGACACGCTC
hinF.PCR.R	GGCCACCAGCGAGTCCCAGC
hinL.PCR.F	TGGACAACGACCTGTGCCAGGCCG
hinL.PCR.R	ATCGGGAACACGCCCTTCAGCCAC
hinH.PCR.F	CAGCAAGCGGTTCGCCAGGTGCC
hinH.PCR.R	CGAGTACCGGCAGGTCACAGTG
hinG.PCR.F	CCATGCTGCCAGGCCCGCACACC
hinG.PCR.R	AATGCGGCCAGTGACATCCGCC
hinI.PCR.F	AGGCGACTTGGTTGACGGCTTCC
hinI.PCR.R	CCGGCATGCTCAAGCGTACC
hinJ.PCR.F	CGTCACGGCGCGCACTGTTGTGCG
hinJ.PCR.R	GCATCTCCGACGTTAGTCGC
hinK.PCR.F	GGTTTCGAAACAGCCGATGTGCG
hinK.PCR.R	GTTTCGGCGTGCAGCTGTTTCATTCG

14. ANÁLISIS DE LOS CALDOS DE CULTIVO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Para determinar el consumo de histamina y de ImAA, así como para observar la aparición de metabolitos durante la asimilación de éstos o intermediarios metabólicos en los puntos de bloqueo de los diferentes mutantes, se utilizó la técnica cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC). Se tomaron muestras de los caldos de cultivo (1 mL) a diferentes tiempos. Éstas se centrifugaron (18.500 x g, 1 min) para eliminar los restos celulares y se filtraron a través de filtros Millipore (tamaño de poro de 0,22 µm). Las diferentes alícuotas (10 µL) se analizaron mediante un equipo de HPLC (Waters 600 Controller acoplado a un Autosampler Waters 717plus) dotado con un detector de longitud de onda variable UV/visible (Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector), un integrador con el sistema de análisis informático Empower y una columna de fase reversa Gemini 5µm C18 110Å (250 x 4,6 mm) (Phenomenex, USA). La fase móvil que se empleó contenía (A) H₃PO₄ 59,4 mM, H₂SO₄ 5,4 mM (pH 1,0) y (B) acetonitrilo. El eluido se monitorizó a 210 nm. El gradiente de flujo utilizado se indica a continuación **(Tabla 15)**.

Tabla 15. Gradiente de flujo.

Tiempo (min)	% fase móvil	Flujo (mL/min)
0	100% A + 0% B	0,5
13	100% A + 0% B	0,5
14	0% A + 100% B	1,0
19	0% A + 100% B	1,0
20	100% A + 0% B	1,0
30	100% A + 0% B	1,0
31	100% A + 0% B	0,5
40	100% A + 0% B	0,5

15. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).

Para la identificación de intermediarios del catabolismo de la histamina y del ImAA se utilizó también un sistema de cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, se tomaron alícuotas de los caldos de cultivo a distintos tiempos y se centrifugaron a 18.500 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células y se depositaron 5 µL de las mismas en la placa de TLC. Para este método se utilizaron placas de Silica-Gel (TLC Silica gel 60, Millipore).

15.1. Determinación de ácido aspártico.

Como sistema de desarrollo (fase móvil) se empleó etanol al 96% y agua en proporciones relativas 70:30 (v/v), y como revelador se utilizó una solución de ninhidrina-colidina (Moffat y Lytle, 1959). Con este reactivo, el ácido aspártico adquiere una coloración violeta.

16. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS CATABÓLICOS EN DIFERENTES MUTANTES.

Los intermediarios acumulados por los diferentes mutantes se extrajeron de los caldos de cultivo siguiendo el siguiente protocolo:

- Las cepas mutantes se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 2 L/500 mL de MM modificado, en el que las concentraciones de KH_2PO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se habían reducido 20 y 4 veces, respectivamente, a fin de que el exceso de sales no interfiriese en el proceso final de extracción. Este medio se suplementó con 4-OH-PhAc (20 mM) como fuente de carbono y energía para soportar el crecimiento bacteriano, e histamina o ImAA (20 mM) como precursor de metabolitos intermediarios.
- Una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, y tras haber observado el agotamiento de la histamina y del ImAA (intermediario metabólico de la degradación de histamina, ver Resultados y Discusión) del medio de cultivo, se procedió a centrifugar el caldo de cultivo durante 10 min a 14.000 rpm a 4 °C (centrífuga analítica Beckman Avanti J-25 utilizando el rotor JA-14). El sobrenadante se filtró a vacío utilizando una bomba (Bio-Rad) y filtros Millipore® (0,22 μm de diámetro de poro) y el filtrado, una vez congelado (2 h a -80 °C), se liofilizó en un equipo Telstar Cryodos-50.
- El sólido obtenido tras la liofilización de los caldos de fermentación se resuspendió en 150 mL de agua milliQ y el pH de la solución se ajustó a 8,3. Esta solución se sometió a un proceso cromatográfico de filtración en columna

(27,5 x 16 cm) utilizando como fase estacionaria 43 mL de resina aniónica fuerte (Purolite[®] A500Splus en forma cloruro) (Asia Pacific, China) que había sido equilibrada previamente con 2-3 volúmenes de NaOH 2M.

- En el caso de que los compuestos de interés no fueran retenidos por la columna, se ajustó el pH del eluido a 7, se liofilizó el mismo y se almacenó para su posterior análisis. Aquellos compuestos retenidos por la resina cromatográfica fueron eluidos con HCl 0,5M, y la fracción que contenía los compuestos de interés fue ajustada a pH 7 y, posteriormente, liofilizada. Ambos tipos de muestras fueron analizados por distintas técnicas, tales como HPLC, TLC, IR, MS y RMN.

17. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR).

Para la determinación de la estructura de algunos compuestos se empleó la espectroscopía de infrarrojo (IR). En esos casos se usó un equipo Jasco FT/IR-4700. La obtención de espectros IR se llevó a cabo a través de dos técnicas:

- Cuando se aplicó la espectroscopia de transmisión en el infrarrojo con transformadas de Fourier, se mezclaron 1 mg de muestra con 200 mg de bromuro de potasio, se homogeneizaron ambos compuestos (sólidos), se introdujeron en el molde y, posteriormente, se prensaron durante 10 min. Por último, la pastilla obtenida se colocó en el lector del equipo IR.
- Cuando se empleó la espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) en el infrarrojo medio y cercano con transformadas de Fourier, la muestra sólida del producto de interés se colocó directamente en el detector y se realizó el espectro.

18. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Las determinaciones de espectrometría de masas (MS) se realizaron en el Servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Salamanca, España, utilizando el equipo Applied Biosystems QSTAR XL, con ionización por electrospray (ESI), o un espectrómetro Waters ZQ 567 4000.

19. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Para determinar la estructura molecular de algunos compuestos se utilizó la resonancia magnética nuclear (RMN), cuyos análisis fueron realizados en el servicio de Resonancia Magnética Nuclear en la Facultad de Ciencias Químicas (Departamento de Química Orgánica) de la Universidad de Salamanca, España. Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando los espectrómetros Bruker WP-200-SY, Varian Mercury VS. 2000 o Bruker Advance DRX, con agua deuterada (D_2O). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios (Hz) y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) empleando la señal del disolvente como estándar interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido la caracterización bioquímica, genética y biotecnológica de la ruta catabólica responsable de la degradación de histamina en la bacteria *Pseudomonas putida* U.

Como se ha expuesto en la Introducción de este trabajo, la histamina desempeña multitud de funciones fundamentales para nuestro organismo (Hu y Chen, 2017; Kim *et al.*, 2013; Kovacova-Hanuszkova *et al.*, 2015) (**Tabla 1**). Esta amina biogénica se encuentra presente en alimentos tales como el pescado, la carne, el queso o las verduras, y en bebidas fermentadas tales como la cerveza y el vino (Naila *et al.*, 2010). Debido a sus múltiples funciones y a su importancia, la concentración de histamina en el cuerpo debe controlarse estrictamente. De ahí que su acumulación pueda ser perjudicial para la salud. Además, la variación en las concentraciones de esta amina puede ser la causa de diversas patologías. Por otro lado, el ImAA, intermediario catabólico de esta ruta (Gómez-Bostrán, 2017), posee también actividad biológica (Bähre y Kaefer, 2017) ya que es un análogo estructural del ácido 4-aminobutírico (GABA), el principal transmisor químico con efecto inhibitor del cerebro. Este hecho implica que este intermediario esté relacionado con determinados procesos patológicos tales como la aparición de un estado hipnótico similar al sueño, el descenso de la presión arterial e incluso con la participación en enfermedades que afectan a la retina y que conducen a una alteración de la visión (Tunncliffe, 1998; Valembois *et al.*, 2017).

Por lo tanto, conocer la ruta de degradación de estos compuestos podría suponer un gran avance para evitar los problemas de salud derivados de intoxicaciones alimentarias. La descripción de esos genes y enzimas podría facilitar la búsqueda de organismos GRAS (*generally recognised as safe*) que, potencialmente, podrían ser capaces de eliminar la histamina y el ImAA de la matriz de los alimentos.

El estudio de esta ruta catabólica se ha llevado a cabo en *P. putida* U, una bacteria que posee una gran versatilidad metabólica. Esta cepa ha sido utilizada en nuestro laboratorio para abordar el estudio del catabolismo de otras aminas biogénicas tales como la 2-feniletilamina (Arias *et al.*, 2008), la tiramina y la dopamina (Arcos *et al.*, 2010), así como el de muchos otros compuestos (Olivera *et al.*, 1998).

El primer abordaje experimental tuvo como finalidad determinar la asimilación tanto de histamina como de ImAA en *P. putida* U. Para ello, se elaboró un medio de composición química definida -MM- (Martinez-Blanco *et al.*, 1990) con histamina o ImAA (10 mM) como únicas fuentes de carbono. El crecimiento de *P. putida* U en él se determinó midiendo la evolución de la turbidez de los cultivos (longitud de onda de 540 nm) a lo largo del tiempo de incubación. Los resultados obtenidos indican que esta cepa es capaz de degradar ambos compuestos con una alta eficiencia (**Figura 26**).

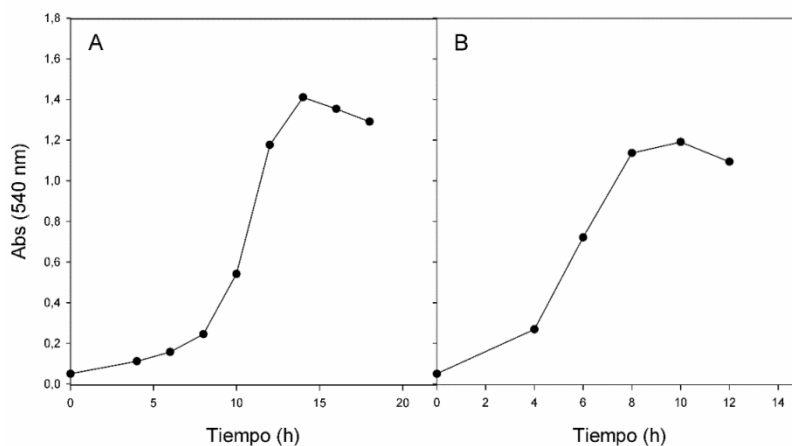


Figura 26. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM) y B) MM + ImAA (10 mM) como únicas fuentes de carbono. Los valores representados en estas gráficas, y en todas aquellas posteriores en las que se mida crecimiento bacteriano, corresponden a los resultados absolutos. En cada uno de los casos se realizaron las diluciones apropiadas a fin de que los valores de absorbancia se mantuvieran dentro del intervalo de linealidad (0,2-0,8).

El siguiente abordaje consistió en comprobar si *P. putida* U era capaz de utilizar la histamina como fuente de nitrógeno o, incluso, como fuente simultánea de carbono y de nitrógeno. Para ello, se suplementó un MM, al cual se le eliminó la fuente de nitrógeno $-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4-$, con ácido 4-hidroxifenilacético (4-OH-PhAc, 10 mM) como fuente de carbono e histamina (10 mM) como fuente de nitrógeno, o bien exclusivamente con histamina (10 mM) como fuente simultánea de carbono y de nitrógeno. Los resultados obtenidos evidencian la capacidad de esta cepa para utilizar la histamina como fuente de nitrógeno y como fuente simultánea de carbono y de nitrógeno (**Figura 27**).

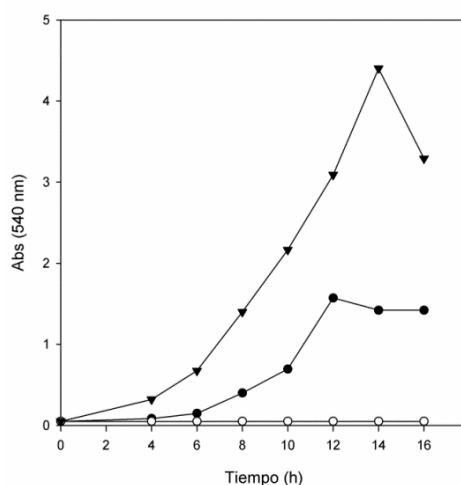


Figura 27. Curva de crecimiento (medida como $\text{Abs}_{540\text{nm}}$) de *P. putida* U cuando se cultivaba en MM sin fuente de nitrógeno suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM) (○), 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM) (▼) o histamina (10 mM) (●).

1. AISLAMIENTO DE MUTANTES INCAPACES DE DEGRADAR HISTAMINA Y ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO.

Como estrategia fundamental para abordar el estudio de la ruta responsable de la degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U procedimos a aislar mutantes incapaces de degradar ambos compuestos.

La técnica empleada fue la mutagénesis con el transposón Tn5 (ver el apartado 10.1 de Materiales y Métodos). Tras el proceso de conjugación, se llevó a cabo la selección de los diferentes transconjugantes replicando cada una de las colonias en placas que contenían MM suplementado con histamina como única fuente de carbono y, paralelamente, en otras que contenían MM suplementado con histidina, ácido fenilacético (PhAc) o medio LB. En todos los casos, se suplementó el medio con los antibióticos requeridos (Km, el marcador genético del Tn5, y Rf, resistencia natural cromosómica de *P. putida* U). Todas las fuentes de carbono se añadieron a una concentración final de 5 mM.

En *P. putida* U, la histamina se degrada a través del intermediario catabólico ImAA (Gómez-Bostrán, 2017), por lo que, a su vez, todos aquellos transconjugantes que eran incapaces de degradar la histamina como única fuente de carbono, pero que, sin embargo, asimilaban tanto la histidina como el PhAc, se replicaron en MM sólido suplementado con ImAA (5 mM) como única fuente de carbono con el objetivo de establecer una clasificación de los mutantes afectados en esta ruta catabólica. De este modo, se aislaron 93 mutantes a los que clasificamos en tres grupos:

- Clase 1: Incluye 30 mutantes incapaces de degradar la histamina pero que sí asimilaban el ImAA con la misma eficacia que la cepa silvestre. En estos mutantes, el transposón Tn5 estaba insertado en genes que codifican proteínas responsables de la transformación de la histamina en ImAA. Este grupo de mutantes ha sido estudiado y descrito en la Tesis Doctoral de mi compañero el Dr. José Luis Gómez Botrán (Gómez-Botrán, 2017).
- Clase 2: Agrupa 22 mutantes incapaces de asimilar ni la histamina ni el ImAA (**Tabla 7**). En estos mutantes, el transposón Tn5 estaba insertado en genes que codifican proteínas responsables de la conversión del ImAA en intermediarios del metabolismo general.
- Clase 3: La integran 41 mutantes incapaces de degradar la L-histidina pero que sí asimilaban la histamina y el ImAA del mismo modo que lo hacía la cepa silvestre (**Tabla 7**). La existencia de este grupo específico de mutantes, junto con el hecho de que los mutantes pertenecientes a los otros dos grupos eran incapaces de degradar la histamina y mostraban un crecimiento semejante al de la cepa silvestre cuando eran cultivados en MM conteniendo L-histidina como única fuente de carbono, sugería que no existía ninguna relación entre la ruta responsable del catabolismo del aminoácido y de la amina biogénica en la cepa objeto de estudio.

En esta Tesis Doctoral se han estudiado los mutantes de la clase 2, es decir, aquellos que son incapaces de asimilar la histamina y el ImAA. En primer lugar, analizamos la cinética de crecimiento de cada uno de estos mutantes, así como la de la cepa silvestre, midiendo la absorbancia alcanzada en MM líquido suplementado con histamina, ImAA o histidina como únicas fuentes de carbono (10 mM) (**Figura 28**).

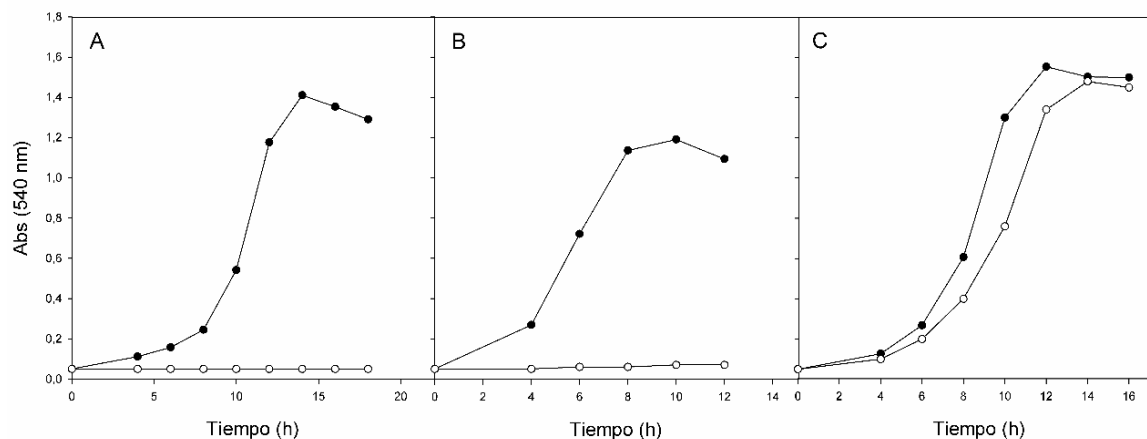


Figura 28. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y de un mutante representativo de la case 2 (○) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

De este modo, se confirmó la incapacidad de todos los mutantes para catabolizar tanto la histamina como el ImAA. Además, se comprobó que todos estos mutantes eran capaces de crecer en MMs que contenían otras fuentes de carbono (histidina, PhAc o 4-OH-PhAc), lo que indicaba que la inserción del transposón en estos genes no afectaba al funcionamiento de procesos metabólicos generales.

A su vez, el hecho de que todos estos mutantes fueran capaces de crecer en MM suplementado con histidina como única fuente de carbono, indicaba que en *P. putida* U los genes responsables de la degradación de la histamina y del ImAA no son los mismos que los requeridos para el catabolismo de la histidina o de alguno de sus intermediarios (caso del ácido imidazolacrílico -ácido urocánico-) (**Figura 29**).

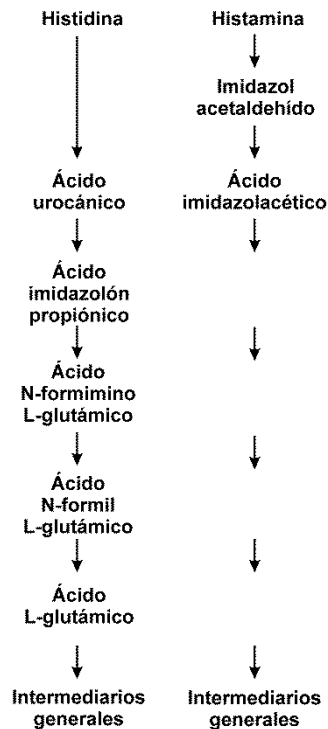


Figura 29. Comparación de las rutas catabólicas de la histidina y de la histamina en *P. putida* U.

A pesar de este resultado experimental, y ante la existencia en la literatura de referencias bibliográficas que planteaban la posibilidad de que, en las bacterias, la vía de asimilación de la histamina fuera similar a la de la histidina (Martí-Arbona *et al.*, 2006), el siguiente abordaje experimental consistió en disrumpir algunos genes que codifican proteínas involucradas en la degradación de histidina en bacterias, y, posteriormente, observar si esas cepas recombinantes eran capaces o no de asimilar la histamina.

Disrupción del gen *hutF* de *P. putida* U.

En primer lugar, procedimos a interrumpir, mediante una disrupción génica (ver apartado 10.2 de Materiales y Métodos), el gen *hutF*, que codifica la enzima formimino-glutamato deiminasa, la cual es responsable de la eliminación del grupo formimino del

ácido N-formimino-glutámico en la ruta de degradación de la histidina (**Figura 30**) (Nelson *et al.*, 2002; Tabor y Mehler, 1954; Tabor *et al.*, 1952).

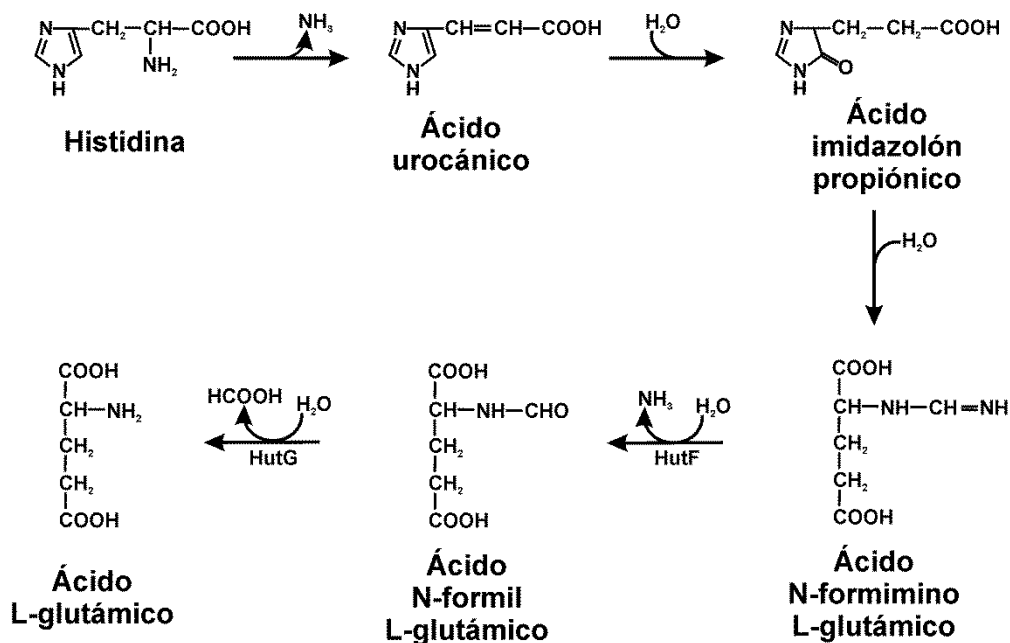


Figura 30. Ruta de degradación de la histidina (Lessie y Neidhardt, 1967; Tabor y Mehler, 1954). Modificado de Coote y Hassall, 1973.

El resultado obtenido reveló que la cepa *P. putida* U a la que se le había interrumpido el gen *hutF* (*P. putida* U *hutF*::pK18::mob) (**Tabla 7**) era capaz de crecer en histamina como única fuente de carbono, pero no en histidina, lo que indicaba que este gen codificaba una proteína exclusiva de la ruta catabólica del aminoácido.

Disrupción del gen *hutG* en *P. putida* U.

Del mismo modo, procedimos a disrupir el gen *hutG*, que codifica una N-formil-glutamato deformilasa, la cual cataboliza el paso de ácido formil-glutámico a

ácido glutámico en la degradación de la histidina (**Figura 30**) (Nelson *et al.*, 2002; Tabor y Mehler, 1954; Tabor *et al.*, 1952).

El resultado obtenido fue similar al anterior, ya que la cepa *P. putida* U *hutG::pK18::mob* (*hutG* disrupto) (**Tabla 7**) no era capaz de asimilar la histidina, pero sí la histamina. Por lo tanto, concluimos que ambas enzimas, HutF y HutG, son dos enzimas diferentes a las que hipotéticamente catalizan un proceso similar (eliminación del grupo formilo) en la degradación de la histamina.

Por último, en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se ha descrito un gen que presuntamente codifica una formimidoil glutamasa (*Pa3175*) y que degradaría directamente el ácido N-formimino-glutámico a ácido glutámico (Martí-Arbona *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha encontrado ningún análogo de este gen en el genoma de *P. putida* U, por lo que desechamos la posibilidad de su participación en la ruta de degradación de la histamina en *P. putida* U.

2. ANÁLISIS MEDIANTE HPLC DEL CONSUMO DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO, ASÍ COMO DEL ACÚMULO DE INTERMEDIARIOS METABÓLICOS EN LOS CALDOS DE CULTIVO DE *Pseudomonas putida* U Y DE LOS DISTINTOS MUTANTES.

Para identificar y separar tanto la histamina como el ImAA (**Figura 31**) empleamos un sistema de separación por HPLC mediante la aplicación de un gradiente con una fase móvil compuesta por (A) H_3PO_4 59,4 mM, H_2SO_4 5,4 mM (pH 1,0) y (B) acetonitrilo, utilizando una columna de fase reversa Gemini $5\mu\text{m}$ C18 110\AA (250 x 4,6 mm) y monitorizando las muestras a 210 nm mediante un detector de longitud de onda variable UV/visible (ver apartado 14 de Materiales y Métodos).

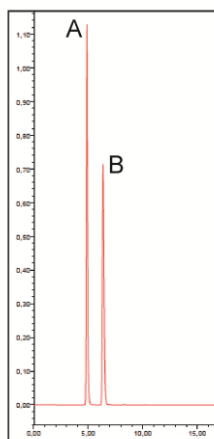


Figura 31. Detección mediante HPLC de A) histamina ($R_t = 4,9$ min) y B) ImAA ($R_t = 6,1$ min) a una concentración de 0,1 mg/mL.

Además, mediante la utilización de este sistema se pudieron detectar y resolver cromatográficamente otras aminas biogénicas, algunos aminoácidos (**Figura 32**) y diferentes compuestos imidazólicos (**Figura 33**).

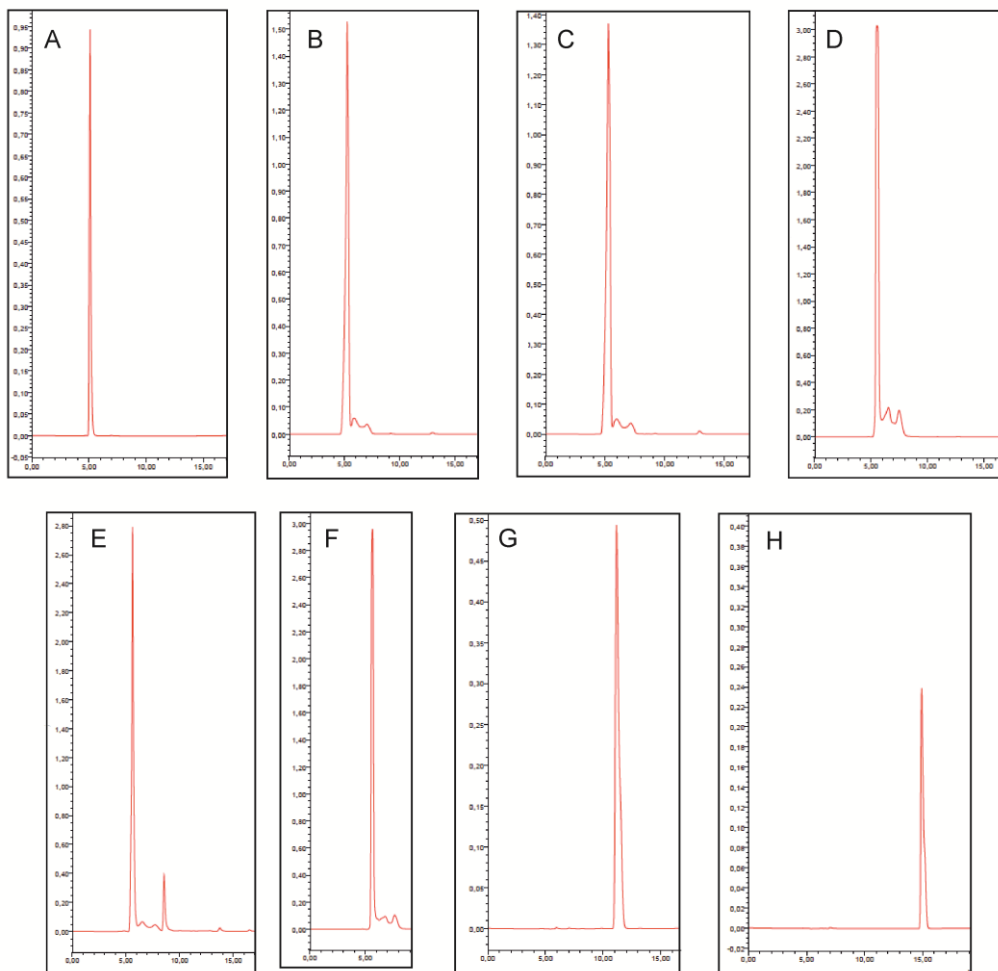


Figura 32. Detección mediante HPLC de A) histidina ($R_t= 5,1$ min), B) lisina ($R_t= 5,2$ min), C) ornitina ($R_t= 5,3$ min), D) asparagina ($R_t= 5,5$ min), E) GABA ($R_t= 5,6$ min), F) glutamina ($R_t= 5,7$ min), G) dopamina ($R_t= 11,2$ min) y H) tiramina ($R_t= 15,0$ min), a una concentración de 0,1 mg/mL.

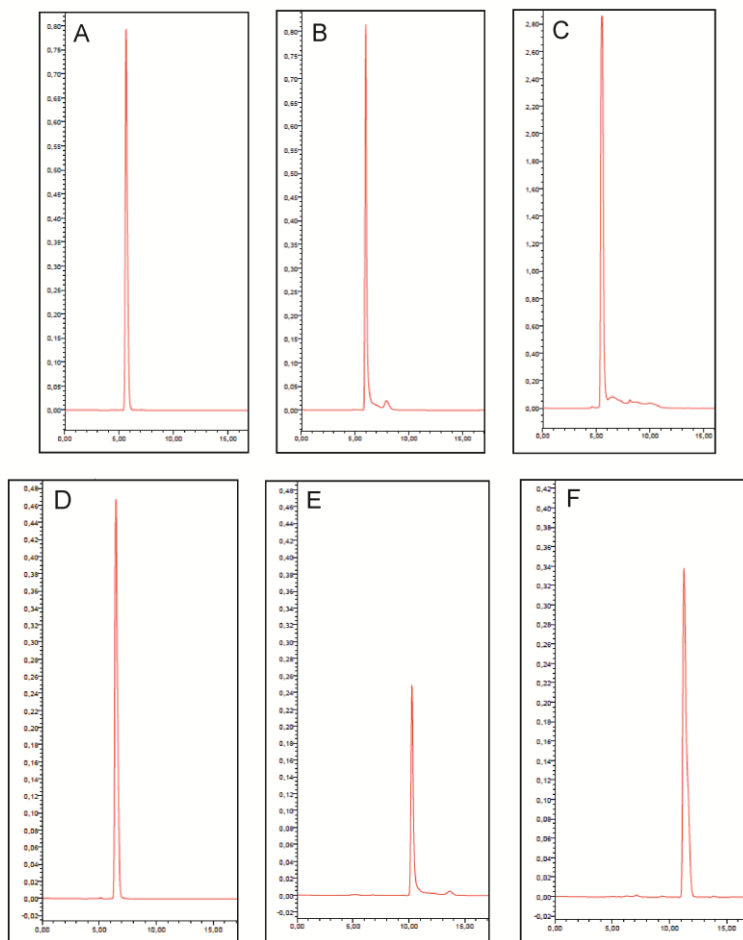


Figura 33. Detección mediante HPLC de A) imidazolcarboxaldehído ($R_t= 5,7$ min), B) ácido imidazolcarboxílico ($R_t= 5,9$ min), C) ImAA ($R_t= 6,1$ min), D) ácido imidazol-láctico ($R_t= 6,3$ min), E) ácido imidazoldicarboxílico ($R_t= 10,3$ min) y F) ácido urocánico ($R_t= 11,5$ min), a una concentración de 0,1 mg/mL.

Con el objetivo de estudiar el consumo de histamina en *P. putida* U, se cultivó dicha cepa en MM suplementado con este compuesto (10 mM) como única fuente de carbono y energía (en adelante nos referiremos a este medio como MMH). Se tomaron muestras del caldo de fermentación a diferentes tiempos, se centrifugaron para eliminar tanto las células como los restos celulares, y el sobrenadante fue filtrado a través de filtros Millipore® (tamaño de poro 0,22 μm). 1 mL de la muestra obtenida fue analizado mediante HPLC en las condiciones descritas anteriormente. En la **Figura 34**

observamos cómo entre las 9 y las 13 horas (**Figura 34A**) aparece un pico, el cual desaparece a las 14 horas, con un tiempo de retención que corresponde al ImAA (**Figura 34B**). Este hecho ponía de manifiesto que este compuesto no sólo participaba como intermediario del catabolismo de la histamina en *P. putida* U, sino que era excretado al caldo de cultivo por parte de la bacteria para luego tomarlo y proseguir con su degradación.

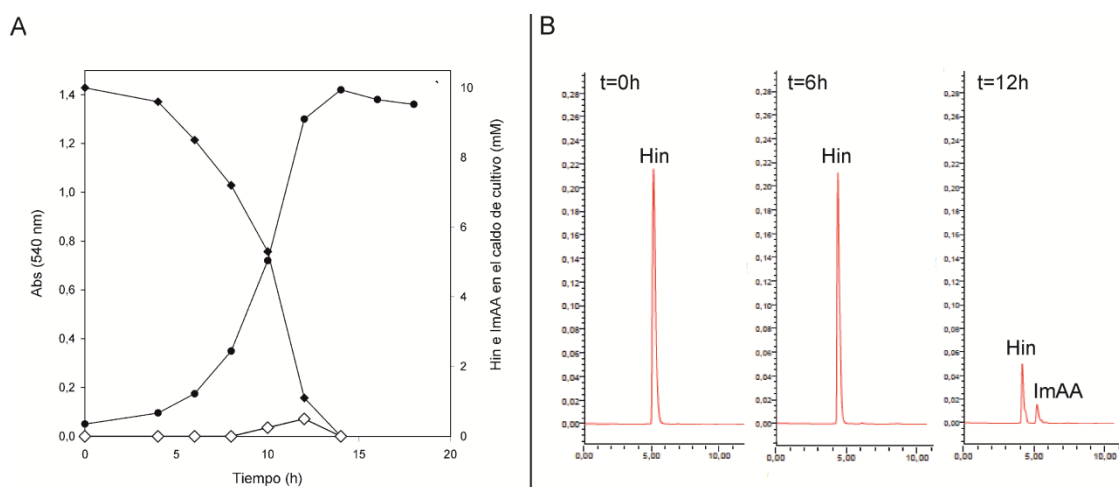


Figura 34. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) cuando se cultivaba *P. putida* U (●) en MMH (10 mM), consumo de histamina (Hin) (◆) y aparición de ImAA (◇). La concentración de Hin y de ImAA se calcula a partir del área de los picos de los cromatogramas. B) Detección mediante HPLC de la histamina y del ImAA en el caldo de cultivo a diferentes tiempos.

Del mismo modo, analizamos la asimilación del ImAA por parte de la cepa silvestre cultivándola en MM suplementado con 10 mM de este compuesto como única fuente de carbono y energía (MMI), observando que el ImAA era fácilmente metabolizado por la bacteria (**Figura 35**).

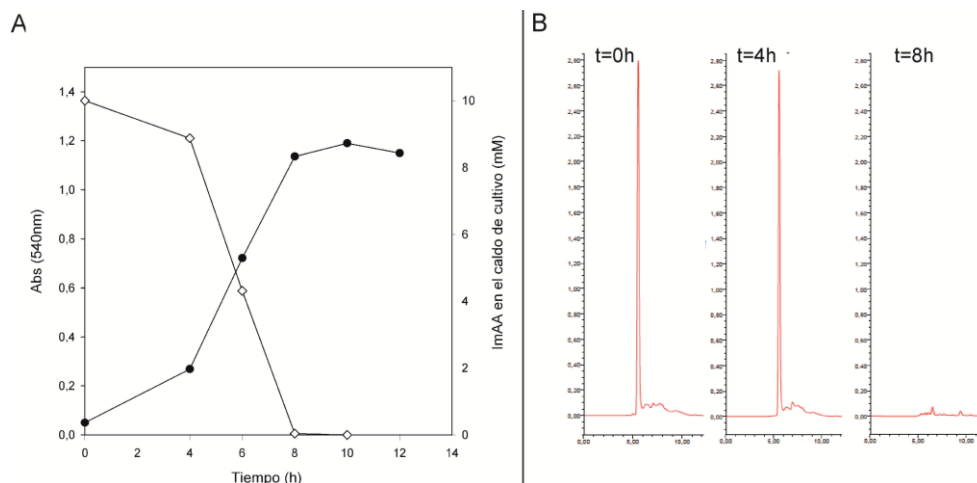


Figura 35. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) cuando se cultivaba *P. putida* U (●) en MMI (10 mM) y consumo de ImAA (◇). B) Detección mediante HPLC de ImAA en el caldo de cultivo a diferentes tiempos.

Finalmente, y con el objetivo de identificar los intermediarios catabólicos de la ruta, así como de dilucidar las actividades enzimáticas responsables de la degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U, se procedió a cultivar los diferentes mutantes obtenidos en MM suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM), para soportar el crecimiento bacteriano, además de histamina (10 mM) como fuente de los posibles intermediarios catabólicos que fuesen excretados al medio. Se procesaron, como se indicó anteriormente, las muestras obtenidas a distintos tiempos de cultivo de los diferentes caldos y se analizaron mediante HPLC usando la estrategia previamente indicada y, cuando fue necesario, mediante cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como fase móvil etanol al 96% y agua en proporciones relativas 70:30 (v/v) y ninhidrina-colidina como agente revelador (ver apartado 15 de Materiales y Métodos).

Mediante este estudio observamos que en las muestras analizadas de los caldos de cultivo de los distintos mutantes se acumulaban tres compuestos característicos, lo que nos permitió agrupar los mutantes en tres grupos diferenciados.

El primer grupo estaría compuesto por los mutantes 2, 3, 45, 46, 47, 48, 51 y 53. Estos mutantes, cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), eran capaces de transformar la histamina en ImAA (**Figura 36**), el cual era excretado al caldo y permanecía inalterado en el medio de cultivo.

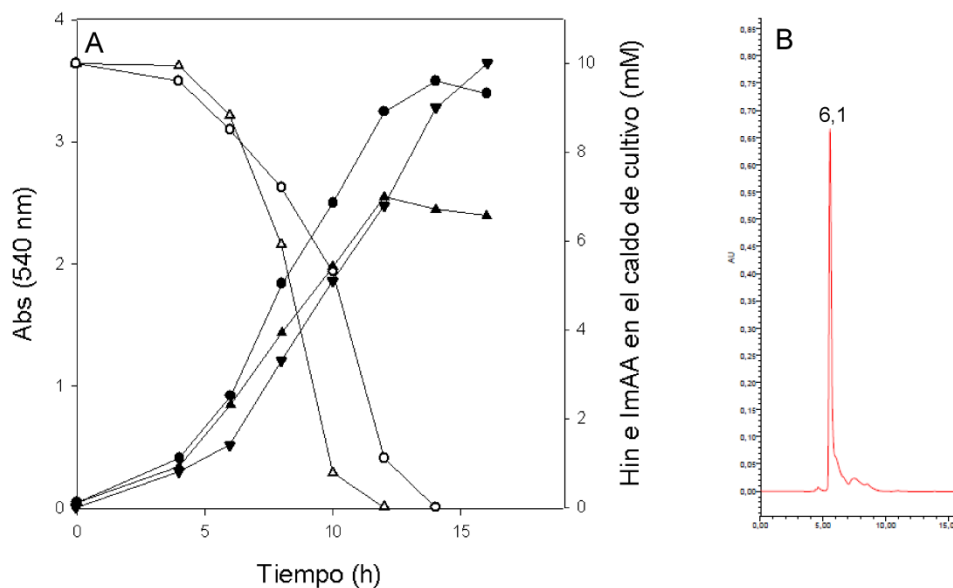


Figura 36. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y de un mutante representativo del primer grupo (▲) cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM). Concentración residual de histamina en los cultivos de la cepa *P. putida* U (○) y en los cultivos de los mutantes pertenecientes al primer grupo (Δ). Aparición de ImAA en los cultivos de los mutantes pertenecientes al primer grupo (▼). B) Cromatograma correspondiente al intermediario acumulado al final de la curva de crecimiento mediante HPLC ($R_t = 6,1$ min) (ImAA).

El segundo grupo era el formado, exclusivamente, por los mutantes 26 y 63. Del mismo modo, estos mutantes degradaban la histamina cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), aunque lo hacían de un modo mucho más lento en comparación con los otros mutantes. Posteriormente, ambos excretaban el

ImAA al medio para tomarlo de nuevo y, finalmente, acumulaban en el caldo de cultivo un catabolito desconocido con un tiempo de retención de 8,0 min (**Figura 37**).

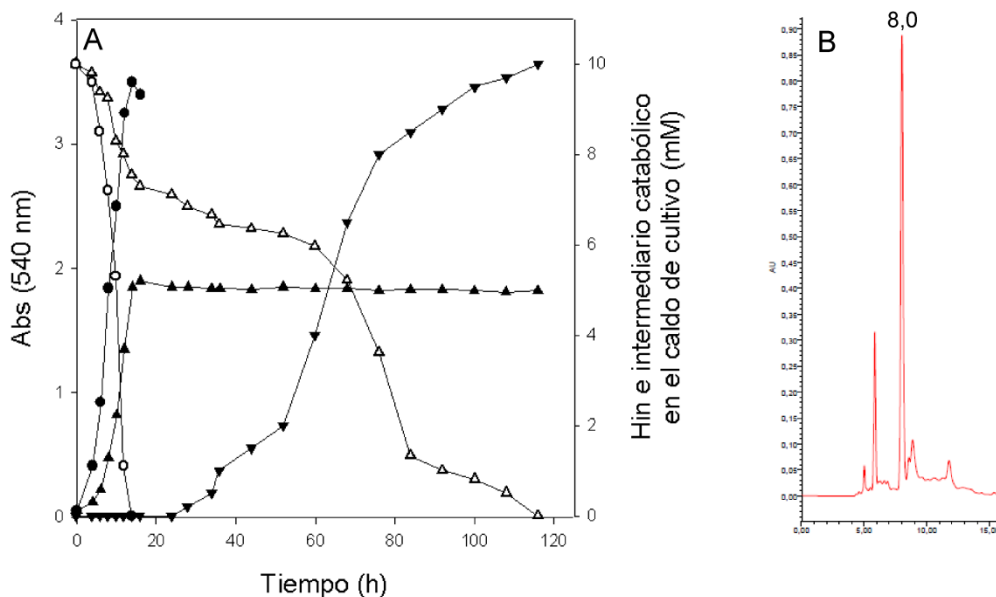


Figura 37. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y de un mutante representativo del segundo grupo (▲) cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM). Concentración residual de histamina en los cultivos de la cepa *P. putida* U (○) y en los cultivos de los mutantes pertenecientes al segundo grupo (△). Aparición del intermediario catabólico en los cultivos de los mutantes pertenecientes al segundo grupo (▼). B) Cromatograma correspondiente al intermediario acumulado al final de la curva de crecimiento mediante HPLC ($R_t=8,0$ min).

Finalmente, el tercer grupo correspondía al compuesto por los mutantes 5, 15, 16, 17, 18, 32, 36, 42, 68, 69, 71 y 72. Todos ellos, cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), transformaban la histamina en ImAA, el cual era expulsado al caldo y tomado de nuevo para proseguir su degradación. Sin embargo, no se detectaba ningún intermediario mediante HPLC, por lo que para estos mutantes empleamos la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), comprobando que el intermediario acumulado en el caldo correspondía al ácido aspártico (**Figura 38**).

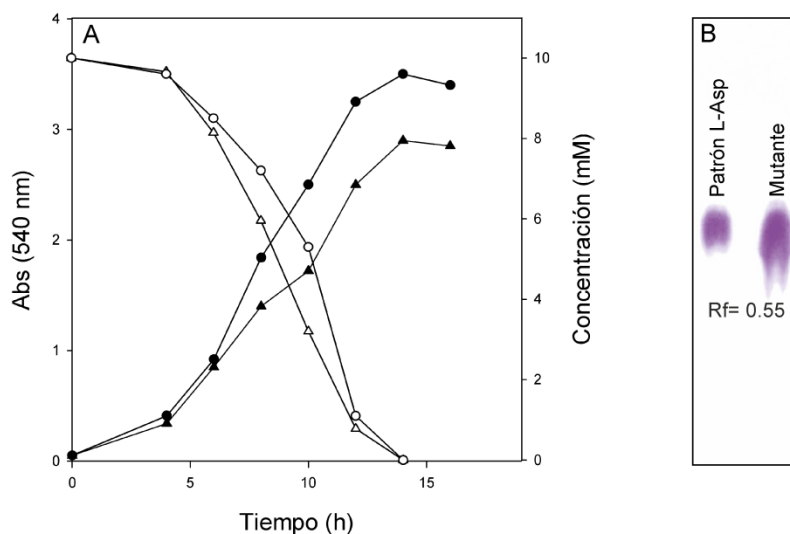


Figura 38. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y de un mutante representativo del tercer grupo (▲) cuando se cultivaban en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM). Concentración residual de histamina en los cultivos de la cepa *P. putida* U (○) y en los cultivos de los mutantes pertenecientes al tercer grupo (Δ). B) Placa de TLC del ácido aspártico acumulado al final de la curva de crecimiento ($R_f = 0,55$).

Haciendo un breve resumen de la información obtenida con los estudios realizados sobre las cinéticas de crecimiento de los distintos mutantes y tras el análisis de los caldos de cultivo, pudimos afirmar que:

- En *P. putida* U, la degradación de la histamina transcurre a través del intermediario catabólico ImAA. De hecho, tanto la cepa silvestre como todos los mutantes excretaban al caldo el ImAA para luego tomarlo y proseguir con su degradación.
- Los mutantes 2, 3, 45, 46, 47, 48, 51 y 53 podrían presentar una mutación que afectase al gen, o genes, que codifica(n) la(s) proteína(s) responsable(s) del

primer paso en la degradación del ImAA, o bien a algún regulador transcripcional positivo (activador) de los mismos.

- Los mutantes 26 y 63 presentaban una mutación que afecta al gen, o genes, que codifica(n) la(s) proteína(s) responsable(s) de un paso posterior de la degradación del ImAA, cuyo intermediario era desconocido pero detectable por HPLC.
- En los mutantes 5, 15, 16, 17, 18, 32, 36, 42, 68, 69, 71 y 72 la mutación se había producido en un gen, o genes, que codifica(n) la(s) proteína(s) implicada(s), probablemente, en la transformación del ácido aspártico en metabolitos generales, indicando que este aminoácido podría ser el producto final de la degradación de ImAA.

3. IDENTIFICACIÓN DEL PUNTO DE INSERCIÓN DEL TRANSPOSÓN Tn5 Y SECUENCIACIÓN DE LAS ZONAS ADYACENTES.

Una vez determinado el comportamiento de los diferentes mutantes afectados en el catabolismo de la histamina y del ImAA, se procedió a identificar el punto de inserción del transposón empleando una estrategia diseñada en nuestro laboratorio, denominada recombinación del brazo del Tn5 (ver apartado 10.1.2 de Materiales y Métodos) (Arcos *et al.*, 2010). De esta manera, se pudo determinar qué gen estaba interrumpido en cada uno de los mutantes.

Una vez localizado el punto de inserción del transposón Tn5, se llevó a cabo la secuenciación de las zonas adyacentes (ver apartado 10.1.3 de Materiales y Métodos), lo que nos permitió la identificación de 3 organizaciones genéticas que se describirán a continuación.

4. ANÁLISIS DE LOS DIFERENTES *CLUSTERS* IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE LA HISTAMINA Y DEL ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN *P. putida* U.

En este apartado se va a describir la organización genética de los *clusters* implicados en la degradación de la histamina y, en concreto, del ImAA en *P. putida* U. Se realizará un análisis de los distintos marcos de lectura identificados (ORFs) y, posteriormente, se procederá a estudiar genética y bioquímicamente las proteínas codificadas. Además, se llevará a cabo la expresión *in trans* de determinados genes, utilizando para ello vectores derivados del plásmido pBBR1, replicativo en *Pseudomonas* (Kovach *et al.*, 1995). Finalmente, se realizará un estudio comparativo de la organización genética de los diferentes *clusters* implicados en otros microorganismos.

4.1. Cluster *hin2* en *P. putida* U y análisis comparativo en otros microorganismos.

El análisis de los mutantes 2, 26, 53 y 63, incapaces de crecer en MM suplementado con histamina ni con ImAA como únicas fuentes de carbono, permitió identificar un fragmento de DNA de 5701 pb donde se localiza el *cluster hin2* de *P. putida* U (**Figura 39**). En esta figura se muestra la secuencia de nucleótidos de este fragmento, así como las proteínas codificadas en él.

A continuación, se analizarán los distintos ORFs secuenciados, las proteínas codificadas en ellos y su posible función en la ruta catabólica. Así mismo, se compararán éstas con otras proteínas existentes en diferentes microorganismos.

1 TGCTGGCGGGCGCCCGCCAGTCGACTGACCGCGGGCGACTACGTGATTTCTTACGCCTTGCC
ACGACCGCCGCGGGCGGTTCAGCTGACTGGCGCCGCTGATGACTAAAGAATGCGGAACGG

61 GTAAGAGCGCGTCGCCCCCTTCGCGGGTGAACCCGCTCCCACAAGGTCAGCACTGGCCAT
CATTCTCGCGCAGCGGGGAAGCGCCACTTGGGGCAGGGTGTTCAGTCGTGACCGGTA

PpU_0003 → M P

121 GCGGGCGCGGGTTCAGCCGTGAATGGCCCTGAATAACAACCCGAGACAGCAATGCCAT
CGCCCGCGCCCAAGTCGGCACTTACCGGGACTTATTGTTGGGCTCTGTGTCGTTACGGTA

S A I R I T P T L L L A L A S T T A L A

181 CCGCAATTTCGATTACCCCTACCCTGCTGCTGGCCTTGGCCAGCACCACCGCCCTGGCCG
GGCGTTAAGCGTAATGGGGATGGGACGACACCGGAACCGGTCGTGGTGGCGGGACCGG

D G D L M T R S T L T G D W G G L R H Q

241 ACGGCGACCTGATGACCCGACGACCCCTCACCGGTGACTGGGGCGGCCCTGCGCCACCAGC
TGCCGCTGGACTACTGGGCGTCGTGGGAGTGGCCACTGACCCCGCCGACGCGGTGGTGC

L E D D G V K F T G D Y S G E T A Y N A

301 TTGAAGACGACGGCGTGAAGTTCACCGGCGACTACAGCGGGCGAAACCGCCTACAACGCC
AACTTCTGCTGCCCACTTCAAGTGGCCGCTGATGTGCGCCGCTTTGGCGGATGTTGCGGG

H G G L H R S A R Y S Q N L K L G V Q F

361 ACGGCGCCCTGCACCGCTCGGCGCGCTATTTCGAGAACCTGAAGCTGGGCGTGCAGTTTCG
TGCCCGCCGACGTGGCGAGCCGCGGATAAGCGTCTTGGACTTCGACCCGCACGTCAAGC

D L S K L Y G L D N G G K V Q L T I N D

421 ACCTGTGCAAACTGTACGGCCTGGACAACGGCGGCAAGGTCCAGCTGACCATCAACGACC
TGGACAGCTTTGACATGCCCGACCTGTTGCCGCCGTTCCAGGTCGACTGGTAGTTGCTGG

R R G N S A S E D L V G N R L P I Q E N

481 GCCGTGGTAACAGTGCTTCGGAAGACCTGGTAGGCAACCGCCTGCCGATCCAGGAAAAC
CGCACCATTTGTCACGAAGCCTTCTGGACCATCCGTTGGCGGACGGCTAGGTCCTTTTGA

F G G L Y T R L T E L S Y E R T L F T P

541 TCGGTGGCCTGTACACCCGCTGACCGAGCTGAGCTACGAGCGCACCCCTGTTACCCCGG
AGCCACCGGACATGTGGGCGGACTGGCTCGACTCGATGCTCGCGTGGGACAAGTGGGGCC

A L N V K L G Y M A M G N D L G G L D S

601 CGCTCAACGTCAAGCTGGGCTACATGGCCATGGGTAACGACCTGGGCGGCCTGGACAGCG
GCGAGTTGCAGTTCGACCCGATGTACCGGTACCCATTGCTGGACCCGCCGACCTGTGCG

G I L C N F M N A G F C G H P L N M S G

661 GCATCCTGTGCAACTTCATGAACGCCGGCTTCTGCGGCCACCCGCTGAACATGTCCGGTG
CGTAGGACACGTTGAAGTACTTGGCGCCGAAGACGCCGGTGGGCGACTTGTACAGGCCAC

G S G W T N Y P N A H L G V R V K Y D L

721 GCAGCGGCTGGACCAACTACCCCAACGCTCACCTGGGCGTGGGGTGAAGTACGACCTGT
CGTCGCCGACCTGGTTGATGGGGTTGCGAGTGGACCCGCACGCCCACTTCATGCTGGACA

S P A W Q L R V A A F N V D P E S N G N

781 CGCCTGCCTGGCAATTGCGCGTGGCGGCGTTCAACGTGACCCCGAAAGCAATGGCAACT
GCGGACGGACCGTTAACCGCGCACCGCCGCAAGTTGCAGCTGGGGCTTTCGTTACCGTTGA

S S R A W H L G P K H T T G T V V P V E
 841 CCAGCCGCGCCTGGCACCTGGGCCCAAGCACACCACCGGCACCGTGGTACCGGTGGAGC
 GGTCGGCGCGGACCGTGGACCCGGGGTTCGTGTGGTGGCCGTGGCACCATGGCCACCTCG

 L V Y K L Q G E L S G E Y K L G Y Y Y D
 901 TGGTGTACAAGCTACAGGGTGAACGTGCCGGCAGTACAAGCTGGGCTACTACTACGACA
 ACCACATGTTTCGATGTCCCACTTGACAGGCCGCTCATGTTTCGACCCGATGATGATGCTGT

 S S D V K R I G S D D E V S G R G G H Y
 961 GCTCCGACGTGAAACGCATCGGCAGCGATGACGAAGTATCCGGCCGTGGCGGCCACTACC
 CGAGGCTGCACTTTGCGTAGCCGTGCTACTGCTTCATAGGCCGGCACCGCCGGTGATGG

 L L I D Q A V W N D Q S S P G R S L H A
 1021 TGCTGATCGACCAGGCCGTGTGGAACGACCAAAGCTCGCCAGGCCGCGAGCCTGCATGCCT
 ACGACTAGCTGGTCCGGCACACCTTGCTGGTTTTCGAGCGGTCCGGCGTCGGACGTACGGA

 F G Q Y S A S S K A A S P F T K W Y G A
 1081 TCGGCCAGTACTCGGCATCCAGCAAGGCCGCTCGCCGTTACCAAGTGGTATGGCGCCG
 AGCCGGTCATGAGCCGTAGGTGCTTCCGGCGGAGCGGCAAGTGGTTCACCATAACCGCGG

 G V V L Y K P F E G R P K D T V A L G Y
 1141 GCGTGGTGTGTACAAGCCGTTCGAAGGCCGCCGAAAGATACGGTGGCGCTGGGTTACG
 CGCACCACGACATGTTTCGGCAAGCTTCCGGCGGGCTTTCATGCCACCGCGACCCAATGC

 G R A V P N P R S R D V L E D A A F N A
 1201 GCCGTGCCGTGCCTAACCCGCGTAGCCGCGATGTGCTGGAAGACGCCGCTTCAACGCTG
 CGGCACGGCACGGATTGGGCGCATCGGCGCTACACGACCTTCTGCGGCGGAAGTTGCGAC

 G Q Q F P D I D S A E Q L I E L S Y G Y
 1261 GCCAGCAGTTCCCCGACATCGACAGCGCCGAGCAGTTGATCGAACTGAGCTATGGCTACC
 CGGTGCTCAAGGGGCTGTAGCTGTCGCGGCTCGTCAACTAGCTTGACTCGATAACCGATGG

 Q A T P W L N L R P D V Q Y I I E P G A
 1321 AGGCGACGCCATGGTTGAACCTGCGCCCGGATGTGCAGTACATCATCGAGCCGGGGGCGT
 TCCGCTGCGGTACCAACTTGGACGCGGGCCTACACGTCATGTAGTAGCTCGGCCCCCGCA

 F S G K K I D N A L V V G L Q V K A S F
 1381 TCTCGGGGAAGAAGATCGACAACGCGTTGGTGGTTGGCCTGCAGGTCAAGGCCAGCTTCT
 AGAGCCCCCTTCTTAGCTGTTGCGCAACCACCAACCGGACGTCCAGTTCGGTTCGAAGA

 ■
 1441 AACCTGAAGCAGACACCGATCCCTGAAGGAGCGACACAAGGTCGCTCCTGCATACGTTCT
 TTGGACTTCGTCTGTGGCTAGGGACTTCCCTCGTGTGTTCCAGCGAGGACGTATGCAAGA

 1501 TTACCCTGTCAGACGGGAGCCTGCCGAGGTAATCCACCAACCTCAGCAGCATGGCATCA
 AATGGGACAGTCTGCCCTCGGACGGCGTCCATTAGGTGGTTGGAGTCGTCGTACCGTAGT
 ■ V P A Q R L Y D V L R L L M A D

 1561 CACCCCGTAACTGCTCGACACTGACGAATTCATCCGGCTTGTGCCCTGGTCCATGCTG
 GTGGGGGCATTGACGAGCTGTGACTGCTTAAGTAGGCCGAACACGGGGACCAGGTACGAC
 C G R L Q E V S V F E D P K H G Q D M S

 1621 CCAGCCCCGCACACCACGGTCCGGATCCCTGCCTGGTTCGAACAGGCCGCTTCGGTACCA
 GGTCCGGGCGTGTGGTGCCAGCCCTAGGGACGGACCAGCTTGTCCGGCGGAAGCCATGGT
 G P G C V V T P I G A Q D F L G G E T G

 1681 AACGCCACCGTGCCGAATTCATCCGTGCCACTGAGCAACGCCACCAGCCGCGCAGCCTCG
 TTGCGGTGGCACGGCTTAAGTAGGCACGGTGACTCGTTGCGGTGGTCCGGCGCGTCGGGAGC
 F A V T G F E D T G S L L A V L R A A E

1741 CTGTCTGCCGATGTCGCCAGCCCTGGGTAGGCGCTCAACGGTTGCAGGCGGATGTCACTG
GACAGACGGCTACAGCGGTCTGGGACCCATCCGCGAGTTGCCAACGTCCGCCTACAGTGAC
S D A S T A L G P Y A S L P Q L R I D S

1801 GCCGCATTGACCTTGCGCATAACGCGGCAGCAGCTCGGCCTCTGCATAAGTCTGCAACTGG
CGGCGTAACTGGAACGCGTATGCGCCGTCGTCGAGCCGGAGACGTATTCAGACGTTGACC
A A N V K R M R P L L E A E A Y T Q L Q

1861 TCGGCCACTGCCTGTGCCTCGAAACCTGGCAGCGCGCACTTCGAAATCGAACTCACAC
AGCCGGTGACGGACCGGAGCTTTGGACCGTCGCGCGCGTGAAGCTTTAGCTTGAGTGTG
D A V A Q A E F G P L A R V E F D F E C

1921 TCTGCCGGCAGCAGATATTCAGCGCCCTGCCCCCTTTGATCACCCCGGTCTGCACCGTGGAG
AGACGGCCGTGCTATAAGTCGCGGGACGGGGGAAACTAGTGGGGCCAGACGTGGCACCTC
E A P V I N L A R G G K I V G T Q V T S

1981 AACGGTGGGTCTGAAGCGCACGTCGTGATGCACCGCAATGCCAGCGCGTCACCGATGTCA
TTGCCACCCAGCTTCGCGTGCAGCACTACGTGGCCGTTACGGTTCGCGCAGTGGCTACAGT
F P P D F R V D H H V P L A L A D G I D

2041 CCCAACTTGCCGATCAGCTTCGCCGCATACTCGATGGCATTACCCCATACGGCGCATAAC
GGGTTGAACGGCTAGTCGAAGCGGCGTATGAGCTACCGTAAGTGGGGTATGCCGCGTATG
G L K G I L K A A Y E I A N V G Y P A Y

2101 GCCGAATGGCAGGCCGCACCCTGCACCTGGCAGCGCATTGCCAGCTTGCCCTTTGTGCCCC
CGGCTTACCGTCCGGCGTGGGACGTGGACCGTCGCGTAACGGTTCGAACGGAAACACGGGG
A S H C A A G Q V Q C R M A L K G K H G

2161 AGCACCGGTTTTACGCCCCGGTGGGTTTCGCCAATCAGGCACAGGCGTGGCTTGTGCGGGCGC
TCGTGGCCAAAAGTCGGGGCCACCCAAGCGGTTAGTCCGTGTCCGCACCGAACACGCCCGCG
L V P K L G T P E G I L C L R P K H P R

2221 TGTTTCGAGCGCGGCCAGCATCGACCGCACACCCAGGCAACCCACTTCCTCGTCGTAGGAA
ACAAGCTCGCGCCGGTCTGAGCTGGCGTGTGGGTCCGTTGGGTGAAGGAGCAGCATCCTT
Q E L A A L M S R V G L C G V E E D Y S

2281 AATGCCAGGTGCACCGGCAGGTGCAACGGCTGGGCAAGGAACGCGGGCACCGCGCCAGC
TTACGGTCCACGTGGCCGTCCACGTTGCCGACCCGTTCCCTTGCGCCCGTGGCGCCGGTGC
F A L H V P L H L P Q A L F A P V A A L

2341 ACCGACGCGATGAAGCCTTTCATGTTCGGCCGTGCCGCGGCCATACAGGCGCCCGTACGTC
TGGCTGCGCTACTTCGAAAAGTACAGCCGGCACGGCGCCGGTATGTCCGCGGGCAGTGCA
V S A I F G K M D A T G R G Y L R G D R

2401 TCGCTCAGGGCAAACGGCTCGACGGTCCAGGCCTGGCCGTCCACCGGCACCACATCGGTA
AGCGAGTCCCGTTTTGCCGAGCTGCCAGGTCCGGACCGGCAGGTGGCCGTGGTGTAGCCAT
E S L A F P E V T W A Q G D V P V V D T

2461 TGCCCCGACAGCACCCACGCCGCCAACGCCCTGGGGGGCCGATGGTGGCGAACAGGTTGGCT
ACGGGGCTGTCGTGGTGCGGCGGTTGCGGGACCCCGGCTACCACCGCTTGTCCAACCGA
H G S L V V G G V G Q P G I T A F L N A

2521 TTGGTGCCTTCGGGGTTATGGAACAGTTCACCTTCCACCCCTGCTCGGCCAGGTAATCA
AACCACGGAAGCCCAATACCTTGTCAAGTGAAGGTGGGGGACGAGCCGGTCCATTAGT
K T G E P N H F L E S E V G Q E A L Y D

2581 CGGATAAAGCCGATCAGCTCAAGGTTGGAGTCCCGGCTGACCGTTGCAAAGCCGACCAGC
GCCTATTTCCGCTAGTCGAGTTCCAACCTCAGGGCCGACTGGCAACGTTTCGGCTGGTGC
R I F G I L E L N S D R S V T A F G V L

2641 CGGGCCAGCAGCGCGGGCTGGCAAATCACTCATCGCCCGGCACCCCGTAGCTGGGCGC
 GCCCGGTCGTGCGCGCCGACCGTTTTAGTGAGTAGCGGGCGTGGGGCATCGACCCGCG
 R A L L A R S A F D S M ← **hinG**

2701 GGCCGTCGGGTTTCAGGGCGCGGGTAACGTAATCCTGCATCTGCGGGCGGTACGCCTGCCA
 CCGGCAGCCCAAGTCCCGCGCCCATTTGCATTAGGACGTAGACGCCCGCCATGCGGACGGT
 A T P N L A R T V Y D Q M Q P R Y A Q W

2761 CAGCCATCGAGCACACCGATCGGGTCGGTATCGGCCAGTCCACGCGCAGGTCCACCAA
 GTCCGGTAGCTCGTGTGGCTAGCCAGCCATAGCCGGGTCAGGTGCGCGTCCAGGTGGTT
 L G D L V G I P D T D A W D V R L D V L

2821 TGGCCAGGTCAGTCTGCCAGCGATCTTCAACGCTGCCGAGTGCACCGGCCCGGCCTCGCC
 ACCGGTCCAGTTCGAGCGGTCGCTAGAAGTTGCGACGGCTCACGTGGCCGGGCGGAGCGG
 P W T L E G A I K L A A S H V P G A E G

2881 ACCTGCGCCATCGCCGCATGCATGGCAGCCAGCAAGCGGTCGGCCAGGTGCCCGCCGGC
 TGGACCGCGTAGCGGCGTACGTACCGTCGGTCGTTTCGCCAGCCGGTCCACGGGCGGCCG
 G A A M A A H M A A L L R D A L H G G A

2941 CTCTTCAAAGGCCAGGACCATCGCTTCGATCACCTGGGTTCGAGGACAACAGGTTACCCGC
 GAGAAGTTTCCGGTCTGGTAGCGAAGCTAGTGGACCCAGCTCCTGTTGTCCAATGGGCG
 E E F A L V M A E I V Q T S S L L N G A

3001 CGCCGCGCATTGCTCACCGGCCACGGCATTGTGCGTGCCCAATGCCTCACGACCGGTGAA
 GCGGCGGTAACGAGTGGCCGGTGCCGTAACACGCACGGGTTACGGAGTGCCTGGCCACTT
 A A C Q E G A V A N H T G L A E R G T F

3061 CAGTGCCACCTGGCCTTGGCTGTGATCACTGTGACCTGCCGGTACTCGCTCCAGCCATT
 GTCACGGTGGACCGGAACCGACAGCTAGTGACACTGGACGGCCATGAGCGAGGTTCGGTAA
 L A V Q G Q S D I V T V Q R Y E S W G N

3121 GCGCTCAGTACCCGGTCCAGCGCAGCCGACGGCGCAACTGGCCCTGCTCCAGGGCATC
 CCGGAGTCATGGGCCAGGTGCGTTCGGCGTCCGCCGTTGACCGGGACGAGGTCCCCTAG
 A S L V R D L A A A P P L Q G Q E L A D

3181 GAGAACTGCGGGCCAGTGCCGGCAAGGTGATGTTCTGGGTGGAAACAGCGCCAACACC
 CTCTTAGACGCCCCGGTTCACGGCCGTTCCACTACAAGACCCACCTTTGTGCGGTTGTGG
 L I Q P G L A P L T I N Q T S V A G V G

3241 CGCACGTACCAAGGGCAGCGGGCCCCACGGCGATGCTCGACGAACTGATGGCGATGCC
 GCGTGCATGGGTTCCCGTCGCCCCGGGGTGCCGCTACGAGCTGCTTGACTACCGCTACGG
 A R V W P C R A G V A I S S S S I A I G

3301 GACCTGGCCGGTTTCTGGCAGCGCCAATGATGGAGAAGGTCATGGTAATGCTCCTGTT
 CTGGACCGGCCAAAAGGACCGTCGCCGGTTACTACCTCTTCCAGTACCATTACGAGGACAA
 V Q G T E Q C R G I I S F T M ← **hinH**

3361 GTCTGTGCGATGCAGGGCATTCTGGGCGCAACCTTCTAGCCACGAAACCAACATTTTC
 CAGGACACGCTACGTCCCGTAAGACCCGCGTTGGAAGATCGGGTGCTTTGGTTGTAAAAG

3421 CGAGGGGTTAGGCAGGAAAAAATTTGCTGTGGCAGAGATCGCGCGCCGCGCGGGCGGGCG
 GCTCCCAATCCGTCTTTTTTGAACGACACCGTCTCTAGCGCGCGGGCGCGCCCGCCG

3481 CTCGATTTCCGCCCCAAAAAGCCACGACATACACGGGATCAACACACCTACAAGCCAC
 GAGCTAAAAGCGGGGGTTTTTTTCGGTGTGTATGTGCCCTAGTTGTGTGGATGTTCCGGT

3541 AGAATCAAGGCCTTCGCCGTTTTATCGGCAAGCACCAGCTAAATACTATTTTCGCCATT
 TCTTAAGTCCGGAAGCGGCAAAATAGCCGTTTCGTGGTCGATTTATGATAAAAAGCGGTAA

3601 TGTGCAGTATCCCTAGTCTGGCTCCAGGCAACGGCGGTCCCTCCAAACCGACCTTACAAAA
 ACACGTCATAGGGATCAGACCGAGGTCCGTTGCCGCCAGGAGGTTTGGCTGGAATGTTTT

hinF → M T L N N L E I D T L V

3661 ACCGCCTGAACAAGGGCTCGGACATGACACTGAACAACCTCGAAATCGACACGCTCGTCCG
 TGGCGGACTTGTTCCTCCGAGCCTGTACTGTGACTTGTGGAGCTTTAGCTGTGCGAGCAGC

V G A G Q A G V A M S E H L N K L G V P

3721 TCGGCGCCGGCCAGGCCGGCGTGGCCATGAGCGAACACCTGAACAAGCTTGGCGTGCCGC
 AGCCGCGGCCGGTCCGGCCGCACCGGTACTCGCTTGTGGACTTGTTCGAACCGCACGGCG

H L V L E R N R I A E A W R T G R W D S

3781 ACCTGGTGTGAGCGCAACCGCATCGCCGAGGCCTGGCGCACCGGCCGCTGGGACTCGC
 TGGACCACGACCTCGCGTTGGCGTAGCGGCTCCGGACCAGCGTGGCCGGCGACCCTGAGCG

L V A N G P V W H D R F P G L E F N L D

3841 TGGTGGCCAACGGCCCGTCTGGCAGACCGCTTCCAGGCCCTGGAATTCAACCTCGACG
 ACCACCGTTGCCGGCCAGACCGTGTGGCGAAGGGTCCGGACCTTAAGTTGGAGCTGC

A D A F A G K D Q V A D Y F E Q Y V R K

3901 CCGACGCCTTCGCGGGCAAGGACCAAGTGGCCGACTACTTCGAGCAGTACGTACGTAAGT
 GGCTGCGGAAGCGCCCGTTCTTGTTTCCACCGGCTGATGAAGCTCGTCATGCATGCATTCA

Y N L P V R T G I E V K R V V R N S D R

3961 ACAACCTGCCAGTGCACCGGCATCGAAGTGAAGCGCGTGGTGCGCAACAGCGACCGCC
 TGTGGACGGTCACGCGTGGCCGTAGCTTCACTTCGCGCACACGCGTTGTTCGCTGGCGG

P G F T I E T N E G V I R A N R V V A A

4021 CTGGCTTCAACATCGAAACCAATGAAGGGGTGATCCGCGCCAACCGTGTGGTTCGCTGCCA
 GACCGAAGTGGTAGCTTTGGTTACTTCCCCTAGGCGCGGTTGGCACACCAGCGACGGT

T G P F Q K P V I P A I A P K D S N L H

4081 CCGGCCCGTTCAGAAAGCCGGTATCCCGGCCATCGCACCGAAAGACAGCAACCTGCACC
 GGCCGGGCAAGGTCTTCGGCCACTAGGGCCGGTAGCGTGGCTTTCTGTCTGGACGTGG

Q I H S A A Y F N P G Q L P E G A V L V

4141 AGATCCACTCCGCGCCTACTTCAACCCCGGCAGTTGCCTGAGGGCGCAGTGTGGTGG
 TCTAGGTGAGGCGGCGGATGAAGTTGGGGCCCGTCAACGGACTCCCAGCTCACGACCACC

V G A G S S G V Q I A E E L M R A G R Q

4201 TGGGCGCAGGCTCCTCCGGCGTGAGATTGCCGAAGAACTGATGCGCGCAGGCCGCCAGG
 ACCCGGTCCGAGGAGGCCGCACGTCTAACGGCTTCTTGACTACGCGCGTCCGGCGGTC

V Y L S V G A H D R P P R A Y R N R D F

4261 TGTACCTGTTCGGTTCGGTGGCCACGACCGCCCGCCACGGGCTTACCGCAACCGCGATTTCT
 ACATGGACAGCCAGCCACGGGTGCTGGCGGGCGGTGCCCGGATGGCGTTGGCGCTAAAGA

C W W L G V L G E W D A E I A K P G R E

4321 GCTGGTGGCTGGGTGTGCTGGGTGAGTGGGACGCAGAAATCGCCAAGCCCGGTTCGCGAGC
 CGACCACCGACCCACAGACCCACTCACCTGCGTCTTTAGCGGTTCCGGGCCAGCGCTCG

H V T I A V S G A R G G H T V D F R A L

4381 ACGTCACCATCGCCGTCAGCGGCGCCCGTGGCGGCCACACCGTGGACTTCCGTGCCCTCG
 TGCAGTGGTAGCGGCAGTCGCCGCGGGCACCGCCGGTGTGGCACCTGAAGGCACGGGAGC

A H Q G M T L V G L T Q S F E N G V A R

4441 CCCATCAAGGCATGACCTTGGTCCGGCTTACCCAGTCGTTTCGAGAACGGCGTGGCGCGTT
 GGGTAGTTCCGTACTGGAACCAGCCGGAATGGGTGAGCAAGCTTTCGCCGCACCGCGCAA

F Q D N L V E N I N R G D E N Y L A L L
4501 TCCAGGACAACCTGGTCGAGAACATCAACCGCGGCGATGAAAACCTACCTGGCCCTGCTGG
AGGTCCTGTTGGACCAGCTCTTGTAGTTGGCGCCGCTACTTTTGTATGGACCGGGACGACC

D A A D A Y I E S N G L D L P E E P E A
4561 ATGCCGCGATGCCTACATCGAAAGCAACGGCCTGGACCTGCCGGAAGAACCCGAAGCCC
TACGGCGGCTACGGATGTAGCTTTCGTTGCCGGACCTGGACGGCCTTCTTGGGCTTCGGG

R T R L A D P A C M S N P L R E L D L A
4621 GCACTCGCCTGGCCGACCCGGCCTGCATGAGCAACCCGCTGCGCGAAGCTGGACCTGGCCA
CGTGAGCGGACCGGCTGGGCGGACGTAAGTTCGTTGGGCGACGCGCTTGACCTGGACCGGT

K A G V T S I I W A T G Y G V D F S W L
4681 AGGCCGGCGTTACCAGCATCATCTGGGCCACCGGTTATGGCGTGGACTTCAGCTGGCTGC
TCCGGCCGAATGGTTCGTAGTAGACCCGGTGGCCAATACCGCACCTGAAGTCGACCGACG

Q V D T F D A N G K P Q H Q R G V A R E
4741 AGGTGGACACCTTCGATGCCAACGGCAAGCCCCAGCACCAGCGCGGCGTTGCCCGCGAAC
TCCACCTGTGGAAGCTACGGTTGCCGTTCCGGGTCGTGGTTCGCGCCGAACGGGCGCTTG

P G V Y F L G L P W L S R R G S S F I W
4801 CTGGCGTGTACTTCCTTGGCCTGCCGTGGTTGTGTCGCGCCGTGGTTTCGTCTCATCTGGG
GACCGCACATGAAGGAACCGGACGGCACCAACAGCGCGGACCAAGCAGCAAGTAGACCC

G V W H D A K H V A G H I A T Q R T Y L
4861 GCGTGTGGCAGCAGCCAAGCACGTCGCCGGCCACATCGCCACGCAACGCACCTACCTGG
CGCACACCGTGTGCGGTTTCGTGCAGCGGCCGGTGTAGCGGTGCGTTGCGTGGATGGACC

A Y R D R E Q R E A D E H Q T N T I S N
4921 CCTACCGCGACCGCGAACAGCGCGAGGCGGATGAGCACCAACCAACACGATCAGCAACG
GGATGGCGCTGGCGCTTGTGCGGCTCCGCCACTCTGTGGTTTGGTTGTGCTAGTCGTTGC

V S T L G A H █
hinL → M P T H T R I R M F N T K
4981 TCAGCACCTCGGAGCCACTGATGCCTACCATACTCGCATCCGCATGTTCAACACCAA
AGTCGTGGGAGCCTCGGGTACTACGGATGGGTATGAGCGTAGGCGTACAAGTTGTGGTT

E T Y P N Q T L D N D L C Q A V R A G N
5041 GGAAACCTACCCCAACCAGACCCCTGGACAACGACCTGTGCCAGGCCGTGCGGGCCGGTAA
CCTTTGGATGGGGTTGGTCTGGGACCTGTTGCTGGACACGGTCCGGCACGCCCCGGCCATT

T I Y V R G Q V G T D F E G K L V G L G
5101 CACTATTTATGTGCGCGCCAGGTCCGTTACCGACTTCGAAGGCAAGCTGGTGGCCCTGGG
GTGATAAATACACGCGCCGGTCCAGCCATGGCTGAAGCTTCCGTTCCGACCCCGGACCC

N P Q A Q T E Q A M K N V K Q L L E E A
5161 TAACCCCGAGGCGCAGACCGAACAGGCGATGAAGAAGCTCAAGCAACTGCTTGAAGAAGC
ATTGGGGTCCGCGTCTGGCTTGTCCGCTACTTCTTGCAGTTCGTTGACGAACTTCTTCG

G S D L S H I V K T T T Y I T D P R F R
5221 GGGCTCCGACCTTTCGCACATCGTCAAGACCACCACCTACATCACCGACCCACGCTTCCG
CCCAGGCTGGAAAGCGTGTAGCAGTTCTGGTGGTGGATGTAGTGGCTGGGTGCGAAGGC

E P V Y K E V G K W L K G V F P I S T G
5281 CGAACCGGTGTACAAGGAAGTGGGCAAGTGGCTGAAGGGCGTGTCCCGATCTCCACCGG
GCTTGGCCACATGTTCCCTTACCCGTTTACCGACTTCCCGCACAAAGGGCTAGAGGTGGCC

L V V A G L A Q A E W L M E I D V I A V
5341 GCTGGTGGTCCCGGGTTGGCTCAGGCCGAGTGGCTGATGGAGATCGACGTGATCGCCGT
CGACCACCGAGCGGCCAACCAGTCCGGCTCACCAGTACTCTAGCTGCACTAGCGGCA

V P D Q Q ■

5401 GGTACCGGATCAGCAGTGACCGGCAACCTGCACAGCGGGTGACACAGGTGCGCCTGCCGTG
CCATGGCCTAGTTCGTCCTACTGGCCGTTGGACGTGTGCGCCACTGTGTCCAGCGGACGGCAC

5461 CAGCCAGGCGTGGGTTACCTGTGCCGCCGCTTGCAGCCGCTGCTCGGCGGGCAAGCCGGC
GTCGGTCCGCACCCAATGGACACGGCGGCGAACGTGCGGCGACGAGCCGCCCGTTCCGGCCG

5521 GCACGGCACCTCCACACTGATCTCCACGTCCCCCGGCAACGCCGCCAGCAACGTTGCCAG
CGTGCCGTGGAGGTGTGACTAGAGGTGCAGGGGGCCGTTGCGGCGGTTCGTTGCAACGGTC

5581 CGGCAGCTGCCCTTCGCCCGGCAGCAAGCGGCCCTCGCGCGCTTCCGCGATGATCAGCGC
GCCGTCGACGGGAAGCGGGCCGTCGTTTCGCCGGGAGCGCGCGAAGGCGCTACTAGTCGCG

5641 CTCTGCAGGCGCCAGCATCGGTGCATCACACAGTTGCACCGCACGCAGCAAATGCGGGTC
GAGACGTCCGCGGTTCGTAGCCACGTAGTGTGTCAACGTGGCGTGCCTGCTTTACGCCACG

Figura 39. Secuencia de los 5701 pb secuenciados del DNA de *P. putida* U donde se localiza el *cluster hin2*, así como la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas en él.

4.1.1. Gen *hinF*.

Localización del punto de inserción.

Como se ha descrito anteriormente, mediante la mutagénesis con el transposón Tn5 se obtuvieron distintos mutantes incapaces de degradar ni la histamina ni el ImAA. Mediante la identificación del punto de inserción del transposón, se comprobó que los mutantes 2 y 53 (**Tabla 16**), los cuales acumulaban ImAA en el caldo cuando se cultivaban en MM que contenía 4-OH-PhAc (10 mM) e histamina (10 mM) (**Figura 36**), se encontraban interrumpidos en el gen *hinF*, por lo que los denominamos *P. putida* U *hinF*::Tn5 (**Tabla 7**).

Tabla 16. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U *hinF*::Tn5. El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 39**.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinF</i>	
Mutante 2	<p>4621 R T R L A D P A C M S N P L R E L D L A</p> <p>GCAC TCGCCTGGCCGACCCGGCCTGCATGAGCAACCCGCTGCGCGAA -Tn5- CTGGACCTGGCCA</p> <p>CGTGAGCGGACCCGGCTGGGCCGGACGTACTCGTTGGGCGACGCGCTT GACCTGGACCGGT</p>
Mutante 53	<p>4921 A Y R D R E Q R E A D E H Q T N T I S N</p> <p>CCTACCGCGACCCGGAACA -Tn5- GCGCGAGGCGGATGAGCACCAAACCAACGATCAGCAAACG</p> <p>GGATGGCGCTGGCGCTTGT CGCGCTCCGCCTACTCGTGGTTTGGTTGTGCTAGTCGTTGC</p>

Expresión heteróloga del gen *hinF*.

Con el fin de esclarecer si el hecho de que los mutantes afectados en el gen *hinF* no asimilaban ni la histamina ni el ImAA se debía a una alteración de este gen, o bien a un efecto polar causado por el Tn5 sobre la expresión de algún gen situado corriente abajo, se llevó a cabo la expresión heteróloga de dicho gen en los distintos mutantes en que éste estaba afectado. Para ello, se amplificó el gen *hinF* sobre el genoma de *P. putida* U mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos HinF.F y HinF.R, y se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *XhoI/XbaI*. La construcción así obtenida (pMC-3*hinF*) (**Tabla 8**) se transfirió mediante conjugación triparental a los distintos mutantes (Herrero *et al.*, 1990). Este transformante (*P. putida* U *hinF*::Tn5 pMC-3*hinF*) (**Tabla 7**), en el que el gen *hinF* se estaba expresando bajo el promotor del plásmido, recuperaba su capacidad para crecer en MM suplementado tanto con histamina como con ImAA como únicas fuentes de carbono. Sin embargo, la misma cepa mutante transformada con el plásmido sin inserto seguía siendo incapaz de crecer en dichos medios (**Figura 40**). Este hecho ponía de manifiesto que la construcción pMC-3*hinF* era funcional y que el crecimiento observado en la cepa transformada no se debía a la presencia del plásmido por sí solo. A su vez, el hecho de que los mutantes afectados en el gen *hinF* asimilaban el aminoácido histidina con la misma eficiencia que el control, indicaba que la inserción del transposón no estaba afectando a funciones celulares generales.

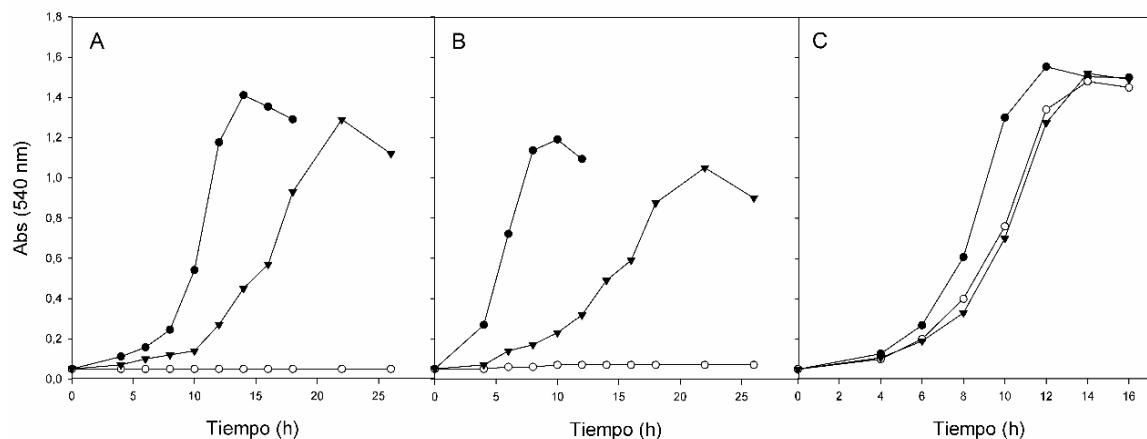


Figura 40. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinF*::Tn5 (○) y del mutante complementado con el gen *hinF* (*P. putida* U *hinF*::Tn5 pMC-3*hinF*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

El hecho de que la expresión en *trans* del gen *hinF* restaurase la expresión del gen cromosómico interrumpido por el transposón, dando como resultado la recuperación de la capacidad de asimilar tanto la histamina como el ImAA, indicaba que no se había producido un efecto polar sobre la expresión de algún gen corriente abajo del mutado, o que, en caso de haberlo, dicho gen no tenía un efecto directo sobre la degradación de estos compuestos. Al mismo tiempo, la recuperación del fenotipo degradador indicaba, sin lugar a dudas, que la proteína codificada por *hinF* cumple una función imprescindible e insustituible en la ruta degradativa, tanto de la histamina como del ImAA.

Enzima codificada por el gen *hinF*.

La secuencia de aminoácidos de HinF, la proteína codificada por el gen *hinF*, se expone a continuación:

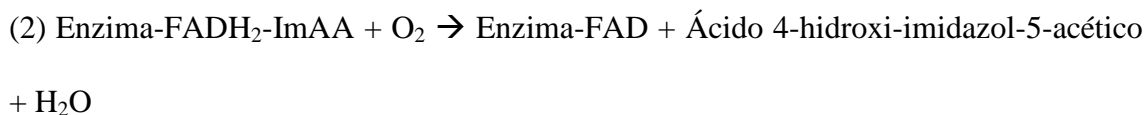
HinF			
MTLNNLEIDTLVVGAGQAGVAMSEHLNKLGVF HLVLERNRIAEAWRTGRWDSLIVANGPVWHDRF PGLFENLDADAFAGKDQVADYFEQYVRKYNLP VRTGIEVKRVRNSDRPGFTIETNEGVIKRN VVAATGPFQKPVIPAIAPKDSNLHQIHSAAFY NPGQLPEGAVLVVGAGSSGVQIAEELMRAGRQ VYLSVGAHDRPPRAYRNRDFCWVWLVGLGEWDA EIAKPGREHVTIAVSGARGGHTVDFRALAHQG MTLVGLTQSFENGVARFQDNLVENINRGDENY LALLDAADAYIESNGLDLPEEPEARTRLADPA CMSNPLRELDLAKAGVTSIIWATGYGVDFSWL QVDTFDANGKPKHQHQRGVAREPGVYFLGLPWLS RRGSSFIWGVWHDAAKHVAGHIATQRTYLAYRD REQREADEHQNTISNVSTLGAH	439 aminoácidos		
	Mw: 48482,38		pI: 5,93
	Ala (A)	48	Leu (L)
Arg (R)	34	Lys (K)	10
Asn (N)	23	Met (M)	5
Asp (D)	26	Phe (F)	15
Cys (C)	2	Pro (P)	21
Gln (Q)	17	Ser (S)	19
Glu (E)	27	Thr (T)	20
Gly (G)	41	Trp (W)	11
His (H)	15	Tyr (Y)	12
Ile (I)	18	Val (V)	38

Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de HinF con las descritas en diferentes microorganismos, se observó que presentaba una elevada identidad con las oxidoreductasas, también denominadas monooxigenasas, dependientes de FAD de *Pseudomonas putida* NBRC 14164 (99%), de *Pseudomonas putida* S13.1.2 (99%) y de *Stenotrophomonas rhizophila* (99%), entre otras (NCBI Resource Coordinators, 2017). Estas enzimas se dividen en 6 clases (A-F) y HinF pertenece, concretamente, a las monooxigenasas de clase A (EC 1.14.13), las cuales presentan las siguientes características (Van Berkel *et al.*, 2006):

- Están codificadas por un único gen.
- Contienen FAD.
- Son dependientes de NADH o NADPH.
- La molécula de NAD(P)⁺ se libera inmediatamente después de la reducción enzimática.
- Están estructuralmente compuestas por un dominio de unión de dinucleótidos (plegamiento de Rossmann) (Wierenga *et al.*, 1986) donde se une el FAD.

Los sustratos típicos sobre los que actúan las monooxigenasas de clase A son compuestos aromáticos que contienen un grupo hidroxilo o un grupo amino activador. Esta es una diferencia importante con las monooxigenasas P450, que también pueden hidroxilar compuestos alifáticos o aromáticos no activados. Los miembros pertenecientes a esta familia, usualmente, están involucrados en la degradación microbiana de compuestos aromáticos mediante una hidroxilación del anillo (Moonen *et al.*, 2002) y, además, muestran una alta especificidad por el sustrato.

Dado que la interrupción de HinF provoca la acumulación de ImAA a partir de histamina en los caldos de cultivo, manteniéndose éste inalterado, le hemos atribuído la función de imidazolacetato monooxigenasa (EC 1.14.13.5), enzima que cataliza la hidroxilación del ImAA en una reacción que transcurre en dos pasos:



Esta reacción requiere oxígeno molecular como agente oxidante y NADH como agente reductor (**Figura 41**). Los electrones pueden transferirse del NADH al 2,6-dicloroindofenol en presencia de esta enzima (Maki *et al.*, 1969). El ácido 4-hidroxi-imidazol-5-acético, producto resultante de la acción de HinF, evolucionaría a la forma ceto (equilibrio ceto-enólico), dando lugar al ácido 4-imidazolón-5-acético.

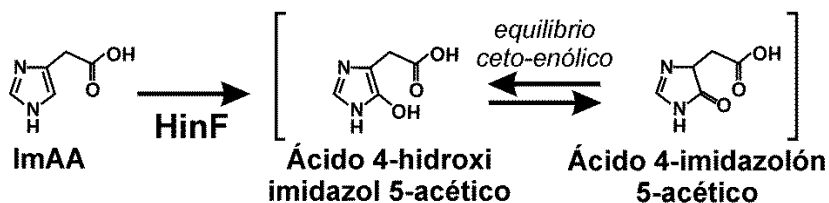


Figura 41. Reacción catalizada por HinF en *P. putida* U.

HinF	-----INR GD -----NYLALLDAA----DAYI-ESNGLD	305
PHBH	SDER----FWTELKARLPSEVAEKLVTGPSLEK-----SIAPLRSFV	272
PgaE	PQRRETPPSWHEVA-----DAWKRLTGDDIAHAEPVWVSAFGNATRQVTEYR-----	266
PHHY	VDRTKFTPE-VVIA-----NAKKIFHPYTFDVQQLDWFTAYHIGQRVTEKFSK-----	349
MHBH	VASRNITVE-QLIA-----TAQRVLHPYKLEVKNPVWWSVYEIGQRICAKYDDVVDVA	335
HinF	LPPEPEARTRLADPACMSNPLRE---LDLAKAGVTSIIWATGYGVDFSWLQVDTFDANGK	362
PHBH	VEPMQHGRFLA GD AAHIVPPTGAKGLNLAASDVSTLYR-LL-----LKAYREGR	321
PgaE	-----RGRVILA GD SAHIHLPAAGGQGMNTSIQDAVNLGWKLG-----AVVNGTAT	311
PHHY	-----DERVFIA GD ACHTHSPKAGQGMNTSMMDTYNLGWKLG-----LVLTGRAK	394
MHBH	TPDSPLPRVFA GD ACHTHSPKAGQGMNFSMQDSFNLGWKLA-----AVLRKQCA	385
	* :* . : . : : . : :	
HinF	PQHQRGVAREPGVYFLGLPWLSRRGSSFIWGVVHDA--KHVAGHIATQRT-YLAYRDREQ	419
PHBH	GELLERYSAICL---RRIWKAERFSWWMTSVLHRFPDPTDAFSQR-IQQTELEYLSEA	376
PgaE	EELDSYHSEERHAVGKRLLMNTQAQGLLF---LSGPEVQPLRDVLTTELIQYGEVARHLA	367
PHHY	RDILKTYEEERHAFQAALIDFDHQFSRLF---SGRPAKDVADEMGVSMDFKEAFVKGN	450
MHBH	PELLHTYSSERQVVAQQLIDFDREWAKMF---SDPAKE--GGQGGVDPKEFQKYFEQHG	439
	: . . :	
HinF	REA-----DE-HQTNTISNVSTLGAH-----	439
PHBH	GLATIAENYVGLPYEEIE-----	394
PgaE	GMV----SGLEITYDVGTSHPPLLGKRMPALELTATRETSSSTELLHTARGVLLDLADN-	422
PHHY	EFA----SGTAINYDENLVTDKSSKQELAKNCVVGTRFKS-QPVVRHSEGLWMHFGDRL	505
MHBH	RFT---AGVGTHYAPSLLTGQ-AKHQALASGFTVGMRFHS-APVVRVCDAKPVQLGHCG	493
	.	
HinF	-----	439
PHBH	-----	394
PgaE	-----PRLRARAASWS---DRVDIVTAVP	443
PHHY	VTDGRFRIIVFAGKATDATQMSRIKKFSAYLDSE-NSVISLYTPKVSDRNSRIDVITIHS	564
MHBH	KADGRWRLYAFAAQNDLAQPESGLLALCRFLEGDAASPLRRFTPAGQDIDSIFDLRAVFP	553
HinF	-----	439
PHBH	-----	394
PgaE	GEVSATSGLRDTTAVLIRPDGHVAWA-----APGSHHDLPMALERW-----	484
PHHY	CH-RDDIEMHDFPAPALHPKWQYDFIYAD---CDSWHHPKSYQAWGVDKGAVVVVR	620
MHBH	QA-YTEVALETLPALLLPPKGQLGMIDYEVFSPDLKNAGQDIFELRGIDRQQGALVVVR	612
HinF	-----	439
PHBH	-----	394
PgaE	-----FGAPLTG-----	491
PHHY	PDGYTSLVTDLEGTAEIDRYFSGILVEPKEKSGAQTEADWTKSTA	665
MHBH	PDQYVAQVLPGLGDHAALSAYFESFMRA-----	639

Figura 42. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinF de *P. putida* U y de las proteínas PHBH de *P. aeruginosa* (AAA88455.1), PgaE de *Streptomyces* sp. PGA64 (AAK57522.1), PHHY de *T. cutaneum* (AAA34202.1) y MHBH de *C. testosteroni* (BAF34928.1). Los signos de puntuación localizados debajo de las secuencias de aminoácidos indican: (*) los residuos son idénticos, (:) sustituciones conservadas que no afectarían al comportamiento de la proteína, (.) sustituciones menos conservadas y () sustituciones nada conservadas que indican un cambio importante en el aminoácido, ya que son muy diferentes entre ellos. Las líneas entre residuos (*gaps*) dentro de las secuencias, representan la ausencia de un aminoácido; esto puede ser debido a un proceso de delección, translocación, etc. Entre paréntesis se indica el número de acceso de GenBank de cada proteína. Esta simbología es aplicable para todas las comparaciones entre secuencias que se indican a lo largo de esta Tesis Doctoral. Este

alineamiento y los sucesivos se han realizado con el Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011). En este alineamiento en concreto, la secuencia N-terminal conservada GxGxxG se indica en color verde. El motivo DG aparece señalado en azul cian. El motivo GD está indicado en color rosa. El ácido glutámico E37 está señalado en color rojo y la glutamina Q136 en color violeta.

HinF contiene una secuencia N-terminal GxGxxG, típica en esta familia de enzimas, en la cual las 2 primeras glicinas participan en la unión del NADH, y la tercera facilita el empaquetamiento de la hélice. Esta secuencia es indicativa del plegamiento $\beta\alpha\beta$, también denominado plegamiento de Rossmann (Wierenga *et al.*, 1986). En HinF esta secuencia está conservada (GAGQAG) y se encuentra comprendida entre el aminoácido 14 y el 19. El NADH forma un complejo transitorio para reducir el cofactor flavonoide (FAD) y el NAD^+ formado se libera rápidamente. Este sitio de reconocimiento del NADH es muy específico.

Eppink y colaboradores (1997) describieron un dominio conservado adicional para esta subclase de monooxigenasas, un motivo DG altamente conservado (RG en HinF, en el aminoácido 241 y 242) (**Figura 42**), que está implicado en la unión de los restos de pirofosfato tanto del FAD como del NADH. Un tercer motivo implicado en la unión del FAD sería el GD, localizado en las posiciones 284 y 285 en HinF (**Figura 42**).

Por otro lado, el ácido glutámico E37 y la glutamina Q136 (**Figura 42**), considerando los residuos conservados descritos en PHBH, indican zonas de unión del FAD. Los residuos de color rojo (R38) y los sombreados amarillos adyacentes (R49) (**Figura 42**) también participan en la fijación de la flavina a la enzima. Los demás residuos sombreados en amarillo se proponen como sitios críticos que participan tanto en la unión del NADH como en la estabilización conformacional de la flavina.

Ensayo enzimático de la actividad imidazolacetato monooxigenasa.

La actividad de HinF fue ensayada *in vitro* en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Maki y colaboradores (Maki *et al.*, 1969). La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente midiendo el descenso de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm (máximo de absorbancia del NADH), tal cual se describe en el apartado 12 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se realizó el ensayo en la cepa silvestre, *P. putida* U, para corroborar que, efectivamente, poseía la actividad imidazolacetato monooxigenasa. Como podemos apreciar en el **panel A** de la **Figura 43**, se observaba un gran descenso de la absorbancia, lo que indicaba la existencia de una elevada actividad enzimática. Por otro lado, se observó que el extracto enzimático perdía actividad con el transcurso del tiempo cuando éste se conservaba a -20°C (**Figura 43**).

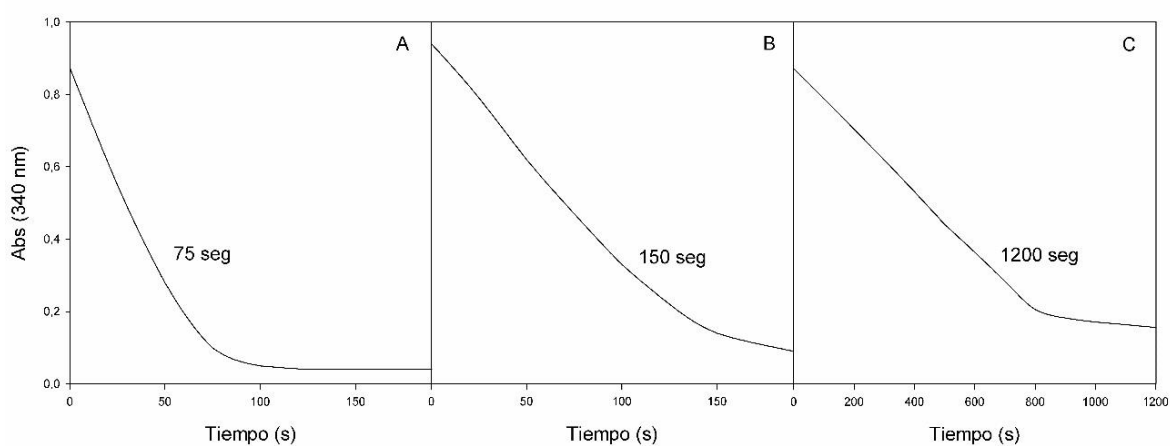


Figura 43. Ensayo enzimático de la enzima HinF de *P. putida* U (imidazolacetato monooxigenasa) a distintos tiempos: A) Ensayo enzimático inicial; B) Ensayo enzimático después de 3 días; C) Ensayo enzimático después de 22 días.

Seguidamente, se procedió a realizar el ensayo en el mutante *P. putida* U *hinF::Tn5*. Para ello se empleó (i) un control positivo, es decir, una cepa en la que el

transposón se había insertado en alguna región del genoma que no intervenía en el crecimiento de la cepa ni en histamina ni en ImAA (*P. putida* U::Tn5), y (ii) el mutante *P. putida* U *hinF*::Tn5, en el que en Tn5 estaba interrumpiendo la expresión del gen *hinF* que, presuntamente, codificaba la enzima imidazolacetato monooxigenasa, en el cual esperábamos que no hubiese actividad.

Estas dos cepas se cultivaron en MM suplementado con histidina (10 mM) como única fuente de carbono y, posteriormente, se realizó una inducción con histamina (20 mM) durante 6 horas. Para este ensayo se emplearon 100 μ L de extracto enzimático y como sustrato el ImAA. El resultado reveló que el extracto enzimático de la cepa afectada en el gen *hinF* (*P. putida* U *hinF*::Tn5) no poseía actividad alguna, y, por el contrario, la cepa control (*P. putida* U::Tn5) sí que presentaba actividad (**Figura 44**). Este resultado confirmó que la proteína codificada por el gen *hinF* no es otra que la imidazolacetato monooxigenasa.

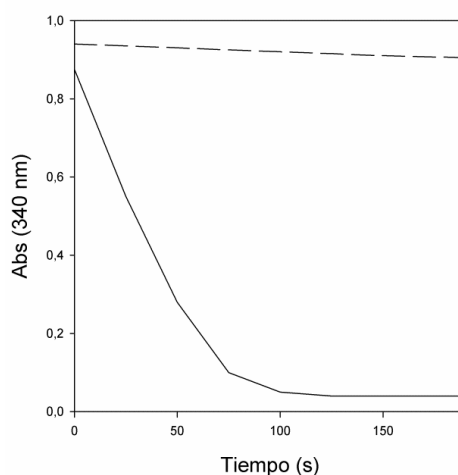


Figura 44. Ensayo enzimático de la enzima HinF de *P. putida* U en las cepas *P. putida* U::Tn5 (—) y *P. putida* U *hinF*::Tn5 (---).

Por otro lado, se determinó si en la cepa silvestre había actividad enzimática al utilizar como sustrato diferentes compuestos tales como el ácido imidazol láctico, la

histidina, la histamina y el imidazol. El resultado fue negativo en todos los casos, lo que indicaba que esta enzima poseía una alta especificidad por el sustrato (ImAA).

Finalmente, con el fin de refutar la hipótesis de que esta monooxigenasa pudiera ser también la encargada de llevar a cabo la hidroxilación del anillo del ácido urocánico en la degradación de la histidina, se cultivó la cepa *P. putida* U en MM suplementado con histidina (10 mM) como única fuente de carbono y, a continuación, se llevó a cabo el ensayo enzimático, utilizando, en este caso, el ácido urocánico como sustrato. El resultado obtenido fue la ausencia total de actividad, descartando, por lo tanto, la participación de esta enzima en la hidroxilación de ese compuesto. De nuevo, llegamos a la conclusión de que HinF era una enzima con una alta especificidad por el sustrato (ImAA) y, por lo tanto, parecía, como hemos sugerido anteriormente, que era utilizada exclusivamente en la degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U.

4.1.2. Gen *hinL*.

Al secuenciar la zona adyacente al transposón Tn5 en los mutantes afectados en el gen *hinF*, se identificó un pequeño ORF (414 pb) localizado corriente abajo de *hinF* y que se transcribía en el mismo sentido que éste. A este ORF lo hemos denominado *hinL*.

Delección del gen *hinL*.

Con el fin de determinar si este gen codificaba una proteína que pudiera participar en la ruta de asimilación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U, se procedió a delecionarlo siguiendo el protocolo detallado en el apartado 10.3 de Materiales y Métodos. Para ello, se amplificaron dos fragmentos de DNA situados en ambos extremos del gen utilizando los oligonucleótidos HinL.Del.F y HinL.Del.R; y

HinL.Del.F' y HinL.Del.R', respectivamente. Posteriormente, ambos fragmentos se ligaron utilizando el sitio de restricción *Bam*HI y se clonaron en el plásmido integrativo pJQ200KS (Quandt y Hynes, 1993) utilizando los sitios de restricción *Apa*I/*Xba*I (Tabla 8). Mediante una conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) y un proceso de doble recombinación homóloga, se obtuvo la cepa recombinante *P. putida* U Δ *hinL* (Tabla 7) en la que se había eliminado un fragmento interno del gen *hinL*. Esta cepa era capaz de asimilar tanto la histamina como el ImAA, aunque lo hacía con un retraso de 4-6 horas con respecto a la cepa silvestre (Figura 44).

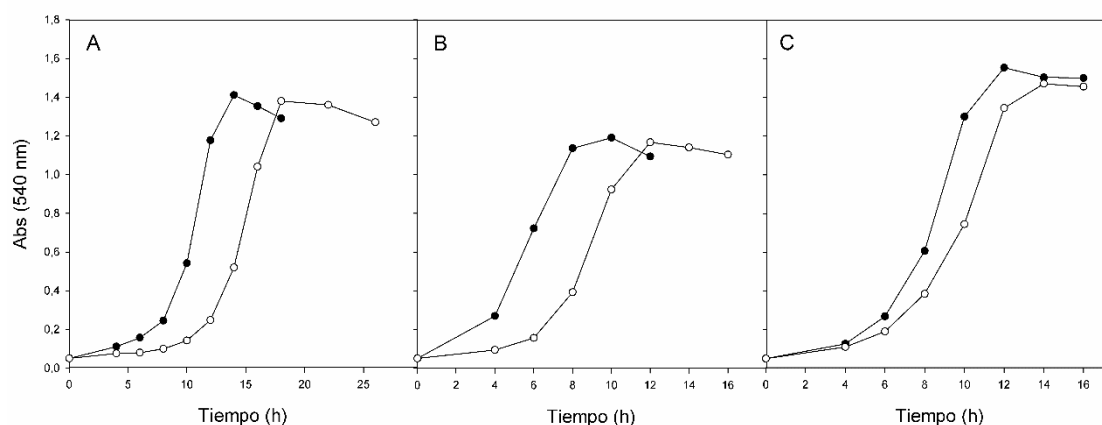


Figura 44. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U Δ *hinL* (○) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

Este resultado indicaba que aunque *hinL* codificaba una enzima que no era esencial para el catabolismo de la histamina y del ImAA en *P. putida* U, sí podría contribuir a una apertura más eficiente del anillo de imidazol.

Enzima codificada por el gen *hinL*.

Este gen codifica una proteína, HinL, de la cual se muestra, a continuación, la masa molecular, el punto isoelectrónico teórico y su secuencia y composición.

HinL			
MPTHTRIRMFNTKETYPNQTLDNLDLCQAVRAG NTIYVRGQVGTDFEGKLVGLGNPQAQTEQAMK NVKQLLEEAGSDLSHIVKTTYITDPRFREPV YKEVGKWLKGVFPISSTGLVVAGLAQAEWLMEI DVIAVVPDQQ	138 aminoácidos		
	Mw: 15377,57		pI: 5,66
	Ala (A)	9	Leu (L)
Arg (R)	6	Lys (K)	8
Asn (N)	6	Met (M)	4
Asp (D)	7	Phe (F)	4
Cys (C)	1	Pro (P)	7
Gln (Q)	10	Ser (S)	3
Glu (E)	9	Thr (T)	13
Gly (G)	11	Trp (W)	2
His (H)	2	Tyr (Y)	4
Ile (I)	7	Val (V)	14

La comparación de la secuencia de aminoácidos de HinL con las proteínas cuyas secuencias están depositadas en la base de datos (NCBI Resource Coordinators, 2017), reveló que esta esta proteína muestra homología con una familia de deaminasas (YjgF) de *Pseudomonas putida* (100% de identidad) o de *Marinobacterium lutimaris* (93% de identidad), las cuales hidrolizan enaminas e iminas. Por ello, podríamos atribuir a esta enzima la actividad hidrolásica requerida para romper el anillo imidazólico propuesta por Kny y Witkop (Kny y Witkop, 1959).

Las proteínas pertenecientes a esta familia, denominadas RidA (deaminasa A de intermediario reactivo/imino), poseen una actividad muy conservada, además de participar en multitud de procesos metabólicos. Actúan posicionando una molécula de agua en el sitio activo de la enzima y acelerando la liberación del grupo amino de intermediarios metabólicos reactivos evitando, de este modo, la acción de éstos.

En la **Figura 45** podemos observar la comparación de la secuencia de aminoácidos de HinL con respecto a otras 3 proteínas pertenecientes a esta familia (YjgF de *Salmonella enterica*, YabJ de *Bacillus subtilis* y RutC de *Escherichia coli*), donde se indican los residuos conservados implicados en la catálisis de esta enzima.

HinL	MPTHTRIRMFNTKETYPNQTLDNLDLCQAVRAGNTIYVRGQVGTDFEGKLVGLGNPQAQTE	60
YjgF	MSKT-I-----ATENAPAAIGPYVQGVDLGSMVITSGQIPVDPKTGA-VAEDVSAQAR	51
YabJ	MTKA-V-----HTKHAPAAIGPYSQGIIVNNMFYSSGQIPLTPSGEM-VNGDIKEQTH	51
RutC	MPKSVI-----IPAGSSAPLAPFVPGTLADGVVYVSGTLAFDQHNNVLFADDPKAQTR	53
	* . : . . . * :	: . *..
HinL	QAMKIVKQLLEEAGSDDLSHIVKTTTYITDPRFEPVYKEVGKWLKGV---FPISTGLVVA	117
YjgF	QSLENVKAIVEAAGLKVGDIVKTTVFVKDLNDFATVNATYEAFSTEHNATFPARSCV-EV	110
YabJ	QVFSNLKAVLEEAGASLETVVKATVFIADMEQFAEVNEVYGGYFDTH---KPARSCV-EV	107
RutC	HVLETIRKVIETAGGTMDVTFNSIFITDWKNYAAINEIYAEFFPGD---KPARFCI-QC	109
	: :...: ::* ** : .. : : * . :	: : * :
HinL	GLAQAEWLMIDVIAVVPDQQ	138
YjgF	ARLPKDKVKTIEAIAVRR---	128
YabJ	ARLPKDALVEIEVIALVK---	125
RutC	GLVKFDALVEIATIAHIAK--	128
	. : : ** . **	

Figura 45. Comparación de las secuencias de aminoácidos de HinL de *P. putida* U y de las proteínas YjgF de *S. enterica* (NP_463318.1), YabJ de *B. subtilis* (KFK77411.1) y RutC de *E. coli* (NP_415530.1). Los residuos marcados en verde participan en la estructura del sitio activo o en la catálisis.

Lambrecht y colaboradores (Lambrecht *et al.*, 2012) propusieron una configuración del sitio activo para la actividad de estas enzimas. En el caso de HinL, el residuo de arginina **R93** formaría un puente salino bidentado con el sustrato. Además, el grupo hidroxilo de la tirosina **Y16** estabilizaría el nitrógeno del sustrato, activando al mismo para el ataque nucleofílico posterior mediante una molécula de agua. Esta molécula estaría estabilizada previamente por el residuo de ácido glutámico **E127** y por un residuo de cisteína que, en el caso de HinL, sería el residuo de glicina **G113** (Figura 46) (Burman *et al.*, 2007). La hipótesis propuesta podría reflejar la necesidad de orientar de manera óptima la molécula de agua en el sitio activo para que se produjera el ataque nucleofílico. Diversos estudios realizados con cepas mutadas en el residuo **E127** indicaron que éste jugaba un papel más significativo cuando los valores de pH eran más altos, situación en la que la estabilidad de las enaminas/iminas es más elevada (Datta y Bhadra, 1978; Feldberg y Datta, 1971).

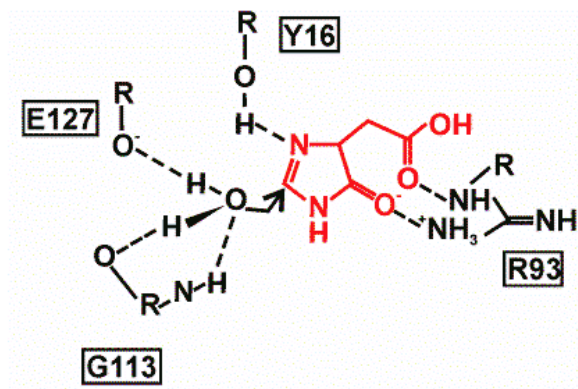


Figura 46. Esquema acerca de la hipotética actuación de HinL sobre el ácido 4-imidazolón-5-acético basado en el modelo propuesto por Lambrecht *et al.*, 2012.

En multitud de microorganismos, estas proteínas tienen la función de desaminar un intermediario metabólico inestable y de “vida corta”, como en nuestro caso sería el ácido 4-hidroxi-imidazol-5-acético (o su forma ceto, el ácido 4-imidazolón-5-acético). Por ejemplo, en *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, YjgF desamina el ácido 2-aminomucónico durante la degradación del nitrobeneno (He y Spain, 1998) y en *Bordetella* sp., otra proteína perteneciente a esta familia desamina el semialdehído-2-amino-5-carboximucónico (Orii *et al.*, 2004; Takenaka *et al.*, 2009). En el caso concreto de *E. coli*, RutC, otra deaminasa perteneciente a esta familia, está codificada como parte de un operón implicado en la ruta de degradación de pirimidinas, vía que transcurre a través del 3-aminoacrilato, un intermedio de enamina inestable (Kim *et al.*, 2010).

Además de RutC, otros miembros de la familia YjgF están codificados dentro de operones implicados en una vía metabólica específica. Por ejemplo, el operón *tdc* de *E. coli* (Sawers, 1998) y un operón biosintético en *Streptomyces clavuligerus* (Zelyas *et al.*, 2008) poseen genes que codifican una treonina/serina deshidratasa y proteínas homólogas de la familia YjgF. Estas organizaciones genéticas apoyan el modelo que

preconiza que las proteínas YjgF actúan sobre reactivos de vida corta generados durante procesos metabólicos específicos.

En resumen, se puede suponer que, ya sea independientemente o en conjunto, HinF y HinL podrían ser las responsables de la hidroxilación del ImAA y de la posterior apertura del anillo imidazólico. Sin embargo, hemos observado que, aunque con cierto retraso (4-6 horas), la cepa mutante *P. putida* U Δ *hinL* puede crecer en MM suplementado con histamina y con ImAA como únicas fuentes de carbono y energía, sugiriendo que el producto generado por HinF (ácido 4-hidroxi-imidazol-5-acético o su forma ceto, ácido 4-imidazolón-5-acético) podría sufrir una hidrólisis no enzimática debido a la inestabilidad de dicho intermediario generando un compuesto de apertura del anillo que podría ser tanto el ácido N-formimino-aspártico como la N₂-formil-isoasparagina (Kny y Witkop, 1959). El ácido 4-hidroxi-imidazol-5-acético (o su tautómero el ácido 4-imidazolón-5-acético) es un compuesto muy inestable (tiene una vida media de una hora a pH=8) debido, principalmente, a que posee un enlace con mucha energía interna asociada. A pesar de que la degradación enzimática del ácido 4-imidazolón-5-acético es significativamente más rápida que la hidrólisis espontánea (existiendo dos sitios diferentes para la apertura del anillo de imidazol) (Kny y Witkop, 1959), la gran labilidad de esta molécula podría facilitar la apertura espontánea del anillo. Sin embargo, la existencia de HinL aseguraría una velocidad de flujo más alta a través de la ruta catabólica, asegurando, de este modo, una utilización más eficiente de la histamina y del ImAA.

4.1.3. Gen *hinG*.

Localización del punto de inserción.

Cuando se identificó el punto de inserción del Tn5 en los mutantes 26 y 63 (Tabla 17), ambos incapaces de asimilar la histamina y el ImAA, se descubrió que el transposón se encontraba interrumpiendo el gen *hinG* (Figura 39). A estos mutantes los denominaremos conjuntamente *P. putida* U *hinG*::Tn5 (Tabla 7).

Tabla 17. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U *hinG*::Tn5. El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la Figura 39.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinG</i>	
Mutante 26	2041 CCCAACTTGCCGATCAGCTTCGCCG -Tn5- CATACTCGATGGCATTACCCCCATACGGCGCATAAC GGGTTGAACGGCTAGTCTGAAGCGGC GTATGAGCTACCGTAAGTGGGGTATGCCCGGTATG G L K G I L K A A Y E I A N V G Y P A Y
Mutante 63	2581 CGGATAAAGCCGATCA -Tn5- GCTCAAGGTTGGAGTCCCGGCTGACCGTTGCAAAGCCGACCAGC GCCTATTTTCGGCTAGT CGAGTTCCAACCTCAGGGCCGACTGGCAACGTTTCGGCTGGTTCG R I F G I L E L N S D R S V T A F G V L

Expresión en *trans* del gen *hinG*.

Para corroborar el hecho de que la incapacidad de estos mutantes para degradar la histamina y el ImAA se debía a una alteración de la secuencia del gen *hinG* producida por la inserción del transposón, se llevó a cabo la expresión en *trans* de dicho gen en ambos mutantes. En primer lugar, se realizó la amplificación del gen *hinG* de *P. putida* U mediante PCR utilizando los cebadores HinG.F y HinG.R. Seguidamente, el amplicón se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *ApaI/SacI*. Finalmente, esta construcción (pMC-3*hinG*) (Tabla 8) se transfirió mediante conjugación triparental a los mutantes (Herrero *et al.*, 1990). Esta cepa transformante (*P. putida* U *hinG*::Tn5 pMC-3*hinG*) (Tabla 7), en la que el gen se estaba expresando bajo el control del promotor del plásmido, era capaz de crecer en MM suplementado tanto con histamina como con ImAA (10 mM) como únicas fuentes

de carbono. El mutante transformado solamente con el plásmido seguía siendo incapaz de utilizar dichos compuestos para soportar el crecimiento (**Figura 47**). Además, todos los mutantes afectados en el gen *hinG* asimilaban la histidina con la misma eficiencia que la cepa silvestre, lo que demostraba que la mutación no estaba afectando a ningún proceso metabólico general.

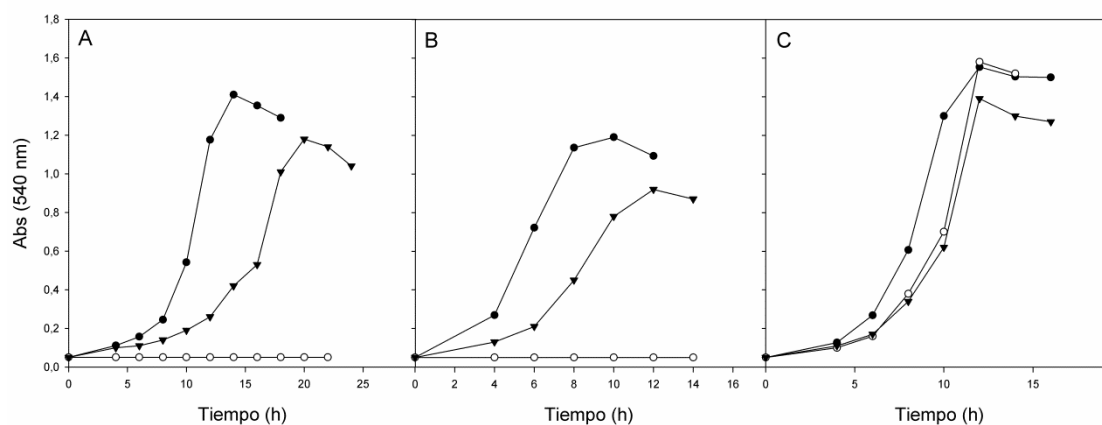


Figura 47. Curva de crecimiento de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5 (○) y del mutante complementado con el gen *hinG* (*P. putida* U *hinG*::Tn5 pMC-3*hinG*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

El hecho de que la expresión en *trans* del gen *hinG* revirtiera la capacidad para degradar la histamina y el ImAA, indicaba que no se producía un efecto polar sobre la expresión de algún gen corriente abajo del mutado, o que, en caso de haberlo, dicho gen no tenía un efecto directo sobre la degradación de estos compuestos. A su vez, esto indicaba, sin lugar a dudas, que la proteína codificada por *hinG* desempeñaba una función imprescindible e insustituible en la ruta degradativa, tanto de la histamina como del ImAA.

Enzima codificada por *hinG*.

Este gen codifica una proteína (HinG) cuya descripción se muestra a continuación.

HinG			
MSDFASRALLARLVGFATVSRDSNLELIGFIR DYLAEQGVESELFHNPETKANLFATIGPQGV GGVVLSGHTDVVPVDGQAWTVEPFALSERDGR LYGRGTADMKGFIASVLAAPFAFLAQPLHLPV HLAFSYDEEVGCLGVRSMLEALEQRPHKPRLC LIGEP TGLKPV LGHKGLAMRCQVQGAACHSA YAPYGVNAIEYAAKLIGKLGDIGDALALPVHH DVRFDPPFSTVQTGVIKGRALNIVPAECEFD FEVRALPGFEAQAVADQLQTYAEAEELLPRMRK VNAASDIRLQPLSAYPGLATSADSEEARLVAL LSGTDEFVGTVAFGTEGGLFDQAGIPTVVCVCGPG SMDQGHKPDEFVSVEQLRGCDAMLLRLVDYLR QAPV	388 aminoácidos		
	Mw: 41276,21		pI: 5,24
	Ala (A) 48	Leu (L) 45	Arg (R) 21
Asn (N) 6	Met (M) 7	Asp (D) 22	Phe (F) 18
Cys (C) 7	Pro (P) 24	Gln (Q) 16	Ser (S) 19
Glu (E) 23	Thr (T) 15	Gly (G) 40	Trp (W) 1
His (H) 10	Tyr (Y) 9	Ile (I) 12	Val (V) 34

Al comparar la secuencia de aminoácidos de esta proteína con las secuencias depositadas en las bases de datos, comprobamos que HinG mostraba un elevado porcentaje de identidad con N-acetilornitina desacetilasas presentes en algunos microorganismos como *Pseudomonas putida* S13.1.2 (98%) o *Burkholderia* sp. GAS332 (84%) (NCBI Resource Coordinators, 2017).

Las N-acetilornitina desacetilasas descritas contienen un sitio activo dinuclear de Zinc (II) en el cual un ión actúa como ión catalítico, mientras que el segundo tiene una función estructural. Sin embargo, también son activas en presencia de una amplia variedad de metales de transición, incluyendo el Cobalto (II) o el Manganeso (II) (McGregor *et al.*, 2005). En cuanto a la conformación, estas metaloproteínas están formadas por dos subunidades idénticas, cual es el caso de la N-acetilornitina desacetilasa de *E. coli*, un homodímero formado por 2 subunidades de 42.350 Da (Javid-Majd y Blanchard, 2000) y cuya masa molecular es similar a la de HinG.

En *E coli*, estas proteínas (ArgE) están codificadas por el gen *argE* y participan en la ruta de biosíntesis de la arginina. Sin embargo, en *P. putida* U existe un gen específico (*argE*) encargado de codificar la proteína ArgE. Además, cuando se comparan las proteínas ArgE y HinG se observa que ambas poseen un porcentaje de identidad inferior al 30% (Figura 48).

```

HinG  -----MSDFASRALLARLVGFATVSRDSNLELIGFIRDYLAEQGVESLHFNPEGTKAN 54
ArgE  MPLPTLKDQFAALIAAPSVSCTQPALDQSNRQVIDLLAGWLGDLGFKCDIQQVSPG-KFN 59
      .:**:      :      .      **: **:*.:: :*.:. *.:::: : * * *

HinG  LFATIGPQGVGGVVLGHTDVPVDGQAWTVEPFALSERDRGRYGRGTADMKGFIASVLA 114
ArgE  LLAS-RGTGPGGLVLAGHSDTVPYDEQLWASDPLKLIETDGRWVGLGSCDMKGFALVIE 118
      *.:      * **:**:**:*.** * * * : *.: * * *** * *.:*****:* *:

HinG  AVPAFLAQPLHLPVHLAFSYDEEVGCLGVRSMPLAALQRPKPRCLIGEPTGLKPVLGH 174
ArgE  AVIPLLEHDFKEPLLILATCDEESSMSGARALAE---AGQPLGRAAILGEPTGLRPIRMH 175
      ** *.: : : *.: : : *** . *.:*.: * .:*****:*.: *

HinG  KGKLAMRCQVQGAACHSAYAPYGVNAIEYAAKLIKGLGDIGDALALPVHHDVRFDPFST 234
ArgE  KGILMDRIDILGRSGHSSDPSLGRSAMEAMHAVMGELMGLRQQWQQ-TYNSNPQFTVPTPT 234
      ** * * :.: * : **.: * *.:* :*: * : : : : : * * *

HinG  VQTGVIKGGRALNIVPAECEFDVEVRALPGFEAQAVADQLQTYAEAEELLPRMRKVNAASD 294
ArgE  MNFGCIHGDNPNRICGQCALEFDLRPLPGMDVDQLRAAIREK-----LVLVAERHE 286
      :.: * **:** * : :*. * :*: * ***:::: : : : : : * :

HinG  IRLQPLSAYPGL---ATSADSEEARLVALLSGTDEFGTVAFGTEGGLFDQAGIPTVVCGP 351
ArgE  VRIDYAPLFPPEVPPFEQAADVLELVQVAERLTG-HRAEAVAFGTEAPYLQQLGCQTIVLGP 345
      :*.: : * : : ** * :.:. *:* .. :*****. :*: * *:* **

HinG  GSMDQGHKPDEFVSVEQLRGCDAMLLRLVDYLRQAPV 388
ArgE  GDIAHAHQPEYLEMSRIEPTVRLRLDLIRHYCLH-- 380
      *.: *:*.*:~::~:~: :* *.: :

```

Figura 48. Comparación de las secuencias de aminoácidos de HinG y ArgE de *P. putida* U.

Estos resultados indican que (i) en *P. putida* U existe una enzima ArgE específica para el metabolismo de la arginina, y que (ii) HinG participa en otro proceso, a pesar de pertenecer a esta superfamilia de peptidasas de Zinc. Este hecho se pone de manifiesto en la **Figura 49** donde se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de HinG con diferentes enzimas hidrolíticas pertenecientes a esta superfamilia y en la que se observa una conservación total de los residuos que intervienen en la catálisis, lo que indica que todas ellas comparten un origen común.

```

HinG  -----MSDFA--SRALL--ARLVGFATVSRDSNLELIGFIRDYLAEQGVSESELFHNP 48
NAO   ----MKNKLPPFIEIYRALIATPSISATEEALDQSNADLITLLADWFKDLGFNVVEVQVVP 56
DAP   -----MSCPVIELTQQLIRRPSSLSPD-----DAGCQALLIERLQAIQFTVERMDFA 46
ACYI_c MASKGREGEHPSVTLFRQYLRIQVQPEP-----DYGAAVAFLEERARQLGLGCQKVEVV 55
ACYI_h MTSKGPEEEHPSVTLFRQYLRIQVQPKP-----DYGAAVAFFEETARQLGLGCQKVEVA 55
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
HinG  EGT-K-ANLFATIGPQGVGGVVLSGHTDVPVP-DGQAWTVEPFAL-SERDGRLYGRGTAD 104
NAO   GTR-NKFNMLASI-GQGAGLLLAGHTDTPVPF-DDGRWTRDPFTL-TEHDGKLYGLGTAD 112
DAP   DTQ-N---FWA-WRQGQ-ETLAFAGHTDVPVPPGADRWINPPFEP-TIRDGMLFGRGAAD 99
ACYI_c PGHVVTVLTPWGT-NPTLSSILLNSHTDVPVP-FKEHWSHDPFEGFKDADGYIYGRGAQD 113
ACYI_h PGYVVTVLTPWGT-NPTLSSILLNSHTDVPVP-FKEHWSHDPFEAFKDGSEGYIYARGAQD 113
      :   :   .***.**   *   **   .   :*   :.   .:*
HinG  MKGFIVASVLAAPAFLAQPLHLPVHL--AFSYDDE-VGCLGVRSMMLAALEQRPHKPRCL 161
NAO   MKGFFAFILDALRDVDVTKLKKPLYI--LATADDE-TSMAGARYFAE---TTALRPDCAI 166
DAP   MKGSLAAMVVAERFVAQHPNHTGRLAFLITSDEEASAHNGTVKVVREALMARNERLDYCL 159
ACYI_c MKCVSIQYLEAVRRLKVEGHHFPRTIHMTFVPDEEVGGHQGMELFVKRPEFQALRAGFAL 173
ACYI_h MKCVSIQYLEAVRRLKVEGHRFPRTIHMTFVPDEEVGGHQGMELFVQRPEFHALRAGFAL 173
      **   :   *   .   .   .   :   **   .   *   .   :   .:
HinG  -IGFPTGLKPV-----LGHKGKLAMRCQVQGAACHSAYAPYGVNAIEYAAKLIGKLDIG 215
NAO   -IGFPTSLQPV-----RAHKGHISNAIRIQGQSGHSSDPARGVNAIELMHDAIGHILQLR 220
DAP   -VGFPSIEVVDVVKNGRRGSLTCNLTIHGVQGHVAYPHLADNPVHRAAPFLNELVAIE 218
ACYI_c D--EGLASPTDAFTVFYSERSPPWLRVTSTGKPGHGSR-FIEDTAAEKLHKVINSILAFR 230
ACYI_h D--EGIANPTDAFTVFYSERSPPWVRVTSTGRPGHASR-FMEDTAAEKLHKVVNSILAFR 230
      *   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .
HinG  DALALPVHHDVRFD-PPFSTVQTGVIKGGRA-LNIVPAECEFDFFVRALPGFEAQAVADQ 273
NAO   DNLKERYH-YEAFV-VPYPTLNLGHIHGDA-SNRICACCELHMDIRPLPGMTLNELNGL 277
DAP   -----WDQGNF--PATSMQIANIQAGTGSNNVIPGELFVQFNFRFSTELTDEMIKAQ 270
ACYI_c EKEKQRLQSN-QLKPGAVTSVNLTMLEGGVA-YNVVPATMSACFDFRVAPDVLKAFEEQ 288
ACYI_h EKEWQRLQSNPHLKEGSVTSVNLTKLEGGVA-YNVIPATMSASFDFRVAPDVFKAFAEEQ 289
      .   :   :   :   :   .   *   .   *   :   .   :   :   .   .   .
HinG  LQTYAEAEALLPRMRKVNA--ASDIRL-----QPL-SAYPGLATSADSEARLVAL 321
NAO   LNDA----LAPVSRWPGRLTVDELH-----PP----IPGYECPNHQLVEVVEKL 320
DAP   -----VLALLEKHQLRYTVDWLWLSG-----QPF-LTARGKLVDA---VVNAVEHY 311
ACYI_c LQSWCQAAG---EGVTTFEFVQKWMETQVTSTDDSDPWAAAFSGV-----FKDM 333
ACYI_h LQSWCQAAG---EGVTLEFAQKWMHPQVTPPTDDSNPWAAAFSRV-----CKDM 334
      .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .
HinG  SGTDEFGTVAFGTEGGLFDQ-AGIPTVVCVPGSMDQ--GHPKDEFVSVEQLRGCDAMLLR 378
NAO   LGAK-TEVVNYCT-EAPFIQ-TLCPTLVLGPGSINQ--AHQPDEYLETRFIKPTRELITQ 375
DAP   NEIKPQLLTGGTSDGRFIARMGAQVVELGPVNA-T--IHKINECVNAADLQLLARMYQR 368
ACYI_c KLALELEI-CPASTDARYIRAAGVPALGFSPMNHTPVLLHDHDERLHEAVFLRGVDIYTR 392
ACYI_h NLTLEPEI-MPAATDNRYIRAAGVPALGFSPMNHTPVLLHDHDERLHEAVFLRGVDIYTR 393
      :   :   .   :   .*   .   *   .:*   :   :   :   :
HinG  LVDYLRQAPV----- 388
NAO   VIHHFCWH----- 383
DAP   IMEQLVA----- 375
ACYI_c LLSALASVPALPSES 407
ACYI_h LLPALASVPALPSDS 408
      ::   :

```

Figura 49. Comparación de las secuencias de aminoácidos de HinG de *P. putida* U con la N-acetilornitina desacetilasa de *E. coli* str. K12 substr. MG1655 (NAO, NP_418392.1), DapE de *E. coli* (DAP, AAB22798.1 N), AcyI de cerdo (ACYI_c, BAA76403.1) y AcyI de humano (ACYI_h, NP_000657.1). Los aminoácidos marcados en verde son los residuos de unión al metal. El residuo con el asterisco sombreado en rojo se postula para actuar como un ácido general en el sitio activo de enzima.

La especificidad por el sustrato de este grupo de enzimas es relativamente amplia, incluyendo una gran cantidad de α -N-acetil-L-aminoácidos. Sin embargo, los mejores sustratos sobre los que actúa la desacetilasa, evaluados por los valores de k_{cat}/K_m , son la α -N-acetil y la α -N-formil-L-metionina, es decir, la enzima hidroliza tanto la forma N-acetilada como la N-formilada de la L-metionina, siendo ambas mejores sustratos que la propia N-acetilornitina (Javid-Majd y Blanchard, 2000). Este dato sugiere que HinG podría ser la enzima responsable de la hidrólisis del grupo formilo presente en el ácido formilaspártico (FAsp), que actúa como intermedirario en la ruta de degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U (Kny y Witkop, 1959; Rothberg y Hayaishi, 1957).

Análisis del intermediario acumulado por los mutantes afectados en el gen *hinG*.

Cuando el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5 se cultivó en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), acumuló en el caldo un intermediario metabólico de naturaleza desconocida. Con el objetivo de identificar dicho intermediario, éste se extrajo de los medios de cultivo siguiendo el protocolo detallado en el apartado 16 de Materiales y Métodos y, posteriormente, se analizó mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) (**Figura 50**) y espectrometría de masas (MS) (**Figura 51**).

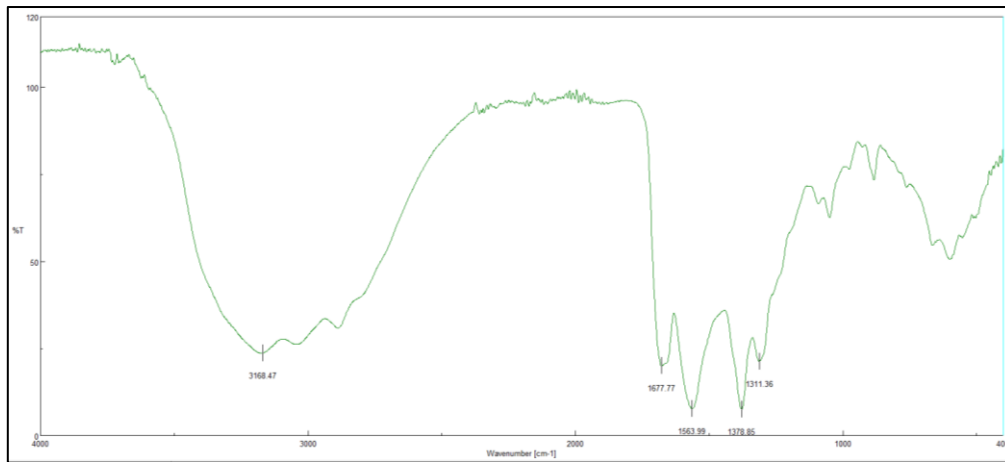


Figura 50. Espectro de IR del intermediario catabólico acumulado por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5.

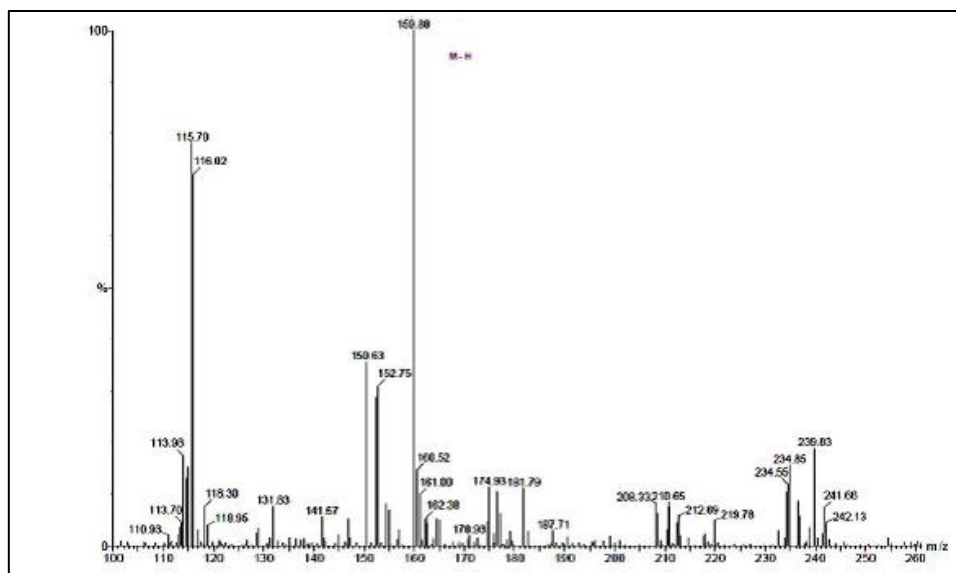


Figura 51. MS del intermediario acumulado por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5. ESI-MS: m/z 159,80 [M-H].

El análisis de los resultados obtenidos, junto con las hipótesis propuestas (Kny y Witkop, 1959; Rothberg y Hayaishi, 1957), hacía sospechar que el intermediario acumulado por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5 era el ácido N-formil-aspártico (FAsp).

Síntesis química del FAsp.

El FAsp no es un compuesto comercial, de tal modo que procedimos a sintetizarlo en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo descrito por Takemoto y colaboradores, detallado en el apartado 3.1.2 de Materiales y Métodos (Takemoto *et al.*, 2004). Para comprobar que la reacción había transcurrido de un modo correcto, el producto de síntesis obtenido se analizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca (**Figura 52**)

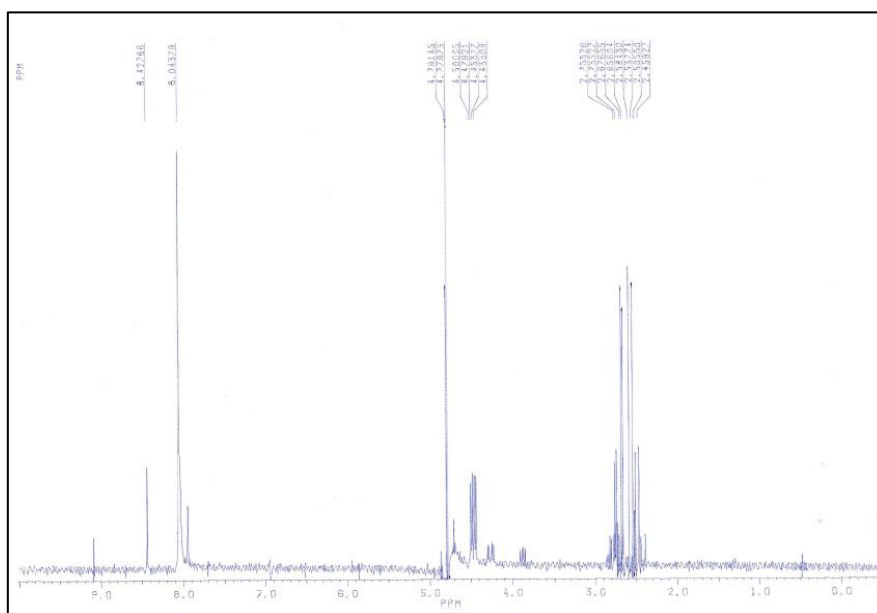


Figura 52. ^1H -RMN del FAsp sintetizado. ^1H -RMN (D_2O): d: 2,64 (ddd, $J_1= 4\text{Hz}$; $J_2= 9\text{Hz}$, $J_3= 16\text{ Hz}$; 2H); 4,43 (dd, $J_1= 4\text{Hz}$; $J_2= 9\text{Hz}$; 1H); 8,0 (s, 1H) ppm.

Además, dicho producto también se analizó mediante ^{13}C -RMN, obteniéndose los siguientes resultados: ^{13}C -RMN (D_2O): d= 42,57 (t); 54,58 (d); 166,53 (d); 180,97 (s); 181,57 (s) ppm.

Seguidamente, para corroborar que el FAsp era el compuesto acumulado en el caldo de fermentación por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5, se realizaron análisis de HPLC (Figura 53) y de IR (Figura 54).

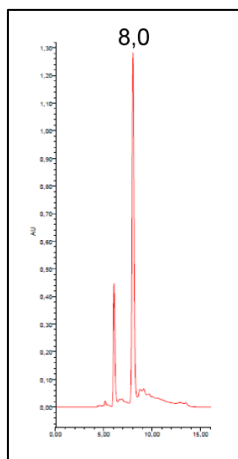


Figura 53. Perfil de elución mediante HPLC del FAsp sintetizado (Rt= 8,0 min).

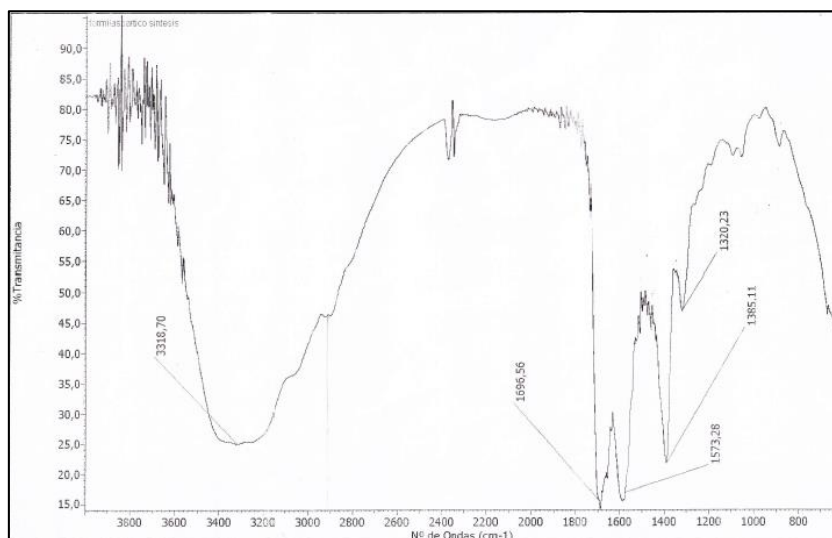


Figura 54. Espectro de IR del FAsp sintetizado.

Comparando los resultados obtenidos en los distintos análisis, observamos que el FAsp sintetizado y el intermediario acumulado por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5

poseen idénticas señales en dichos análisis, por lo que, efectivamente, el intermediario acumulado por el mutante *P. putida* U *hinG*::Tn5 era el FAsp.

4.1.4. Gen *hinH*.

La secuenciación de la zona adyacente al gen *hinG* condujo a la identificación de un ORF de una longitud de 675 pb, localizado corriente arriba de *hinG*, y que se transcribía en el mismo sentido que éste. A este ORF le denominamos *hinH*.

Disrupción del gen *hinH*.

Con el propósito de determinar si este ORF codificaba una proteína implicada en la degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U, se llevó a cabo la disrupción del gen *hinH* mediante un procedimiento de recombinación homóloga (ver apartado 10.2 de Materiales y Métodos) utilizando una construcción que contenía, en el plásmido integrativo pK18::*mob* (Schäfer *et al.*, 1994), un fragmento interno de *hinH* (**Tabla 8**) amplificado por PCR sobre el genoma de *P. putida* U utilizando los cebadores HinH.Dis.F y HinH.Dis.R. La cepa mutante obtenida, *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* (**Tabla 7**), resultó ser incapaz de crecer utilizando ni histamina ni ImAA como únicas fuentes de carbono y energía. Este hecho puso de manifiesto que este gen codificaba una proteína esencial para el catabolismo de ambos compuestos.

Expresión en *trans* del gen *hinH*.

Para llevar a cabo la expresión heteróloga de este gen se amplificó por PCR el gen *hinH* con los cebadores HinH.F y HinH.R y se clonó en el vector pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *KpnI/SmaI*, dando lugar a la construcción pMC-3*hinH* (**Tabla 8**). Esta construcción se transfirió mediante

conjugación triparental al mutante disrupto (Herrero *et al.*, 1990) y se observó que la mutación no se revertía, siendo la cepa transformante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob pMC-3*hinH* (**Tabla 7**) incapaz de degradar ni la histamina ni el ImAA (**Figura 55**). Este hecho sugería la posibilidad de que este ORF pudiera transcribirse conjuntamente con el gen *hinG*, que, como hemos mencionado, se encontraba corriente debajo de *hinH*. De hecho, las secuencias de las proteínas codificadas en ambos ORFs se encontraban solapadas en 2 aminoácidos, como se puede observar en la **Figura 39**. Para determinar si la no recuperación del fenotipo degradador se debía a un efecto polar de la inserción del plásmido pK18::mob que impedía la expresión del gen *hinG*, se llevó a cabo la expresión heteróloga del mismo en el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob. Para ello, se transformó el mutante disrupto con la construcción pMC-3*hinG* (**Tabla 8**) mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990). La cepa transformante (*P. putida* U *hinH*::pK18::mob pMC-3*hinG*) (**Tabla 7**), en la que se está expresando el gen *hinG* bajo el promotor del plásmido, continuaba siendo incapaz de catabolizar ni la histamina ni el ImAA. Este hecho sugería la necesidad de que ambos ORFs (*hinH* y *hinG*) se estuvieran expresando conjuntamente para la asimilación de estos compuestos.

El experimento definitivo para demostrar esa hipótesis consistió en transformar el mutante disrupto *P. putida* U *hinH*::pK18::mob con ambos genes clonados individualmente en dos plásmidos replicativos en *Pseudomonas*. Para ello, se transfirió el gen *hinG* desde el plásmido pBBR1MCS-3 al plásmido pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995), utilizando los sitios de restricción *ApaI/SacI*, dando lugar a la construcción pMC-5*hinG* (**Tabla 8**). Seguidamente, se transformó el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob con ambas construcciones, pMC-3*hinH* y pMC-5*hinG*. De esta forma, se observó que la cepa transformante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob pMC-3*hinH*

pMC-5*hinG* (Tabla 7) era capaz de degradar tanto la histamina como el ImAA (Figura 55).

El hecho de que la expresión en *trans* de los genes *hinH* y *hinG* en el mutante diese como resultado la recuperación del fenotipo degradador de histamina y de ImAA, indicaba que (i) las proteínas codificadas en *hinH* y *hinG* desempeñan funciones imprescindibles e insustituibles en la ruta catabólica de la histamina y del ImAA, y que (ii) ambos genes se transcriben bajo el mismo promotor, es decir, como un operón.

Además, el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* era capaz de metabolizar la histidina del mismo modo que lo hacía la cepa silvestre, hecho que demostraba que la interrupción de este gen no estaba afectando al metabolismo general de la bacteria.

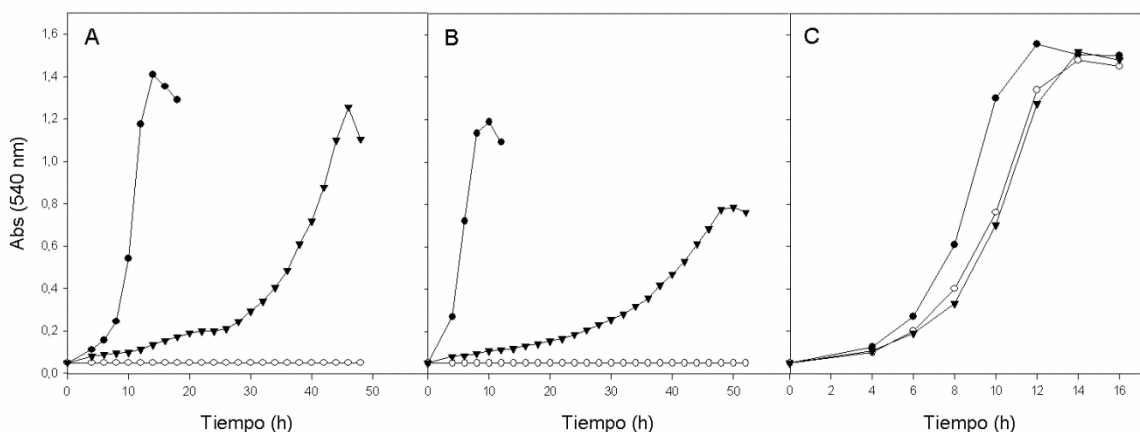


Figura 55. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob*, del mutante complementado con el gen *hinH* (*P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* pMC-3*hinH*) o con el gen *hinG* (*P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* pMC-3*hinG*) (○) y del mutante complementado con los genes *hinH* y *hinG* (*P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* pMC-3*hinH* pMC-5*hinG*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

Enzima codificada por *hinH*.

Este gen codifica una proteína (HinH) cuya secuencia proteica, masa molecular teórica, composición, número de aminoácidos y punto isoelectrico teórico se pueden observar a continuación.

HinH				
MTFSIIIGRCQETGQVGIAISSSSIAVGARCPW VRAGVGA VSTQNI TLPALGPQILDAL EQQQLP PAAALDRVLSANGWSEYRQVTVIDSQGQVALF TGREALGTHNAVAGEQCAAAGNLLSSTQVIEA MVLAFEEAGGHLADRLLAAMHAAMAAGGEAGP VHSAALKIAGELTWPLVLDLRVDWADTDPIGVL DGLWQAYRPMQDYVTRALNPTAAPSYGVPGD E	225 aminoácidos			
	Mw: 23326,39		pI: 4,59	
	Ala (A)	37	Leu (L)	22
	Arg (R)	10	Lys (K)	1
Asn (N)	5	Met (M)	5	
Asp (D)	11	Phe (F)	3	
Cys (C)	3	Pro (P)	12	
Gln (Q)	14	Ser (S)	13	
Glu (E)	11	Thr (T)	12	
Gly (G)	24	Trp (W)	5	
His (H)	4	Tyr (Y)	4	
Ile (I)	11	Val (V)	18	

Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de HinH con las secuencias depositadas en la base de datos, observamos que nuestra proteína presentaba una elevada identidad con proteínas de la superfamilia de las hidrolasas N-terminales de *Pseudomonas putida* NBRC 14164 (100%) y de *Pseudomonas putida* GB1 (98%) (NCBI Resource Coordinators, 2017). Todas estas enzimas poseen actividad amidásica (Oinonen y Rouvinen, 2000).

En los miembros de esta superfamilia la conservación de aminoácidos en sus secuencias es muy baja, con lo que su comparación no ofrece una información muy útil. Sin embargo, al analizar su estructura se ha comprobado que todas las enzimas comparten un plegamiento similar. Así, HinH presenta una estructura terciaria similar a la que presentan los miembros pertenecientes a esta superfamilia. Al comparar la secuencia de aminoácidos de HinH con la de una proteína perteneciente a dicha superfamilia, vimos que 211 residuos (94% de la secuencia) podrían ser modelados con el 100% de confianza (siendo ésta la probabilidad de que la secuencia analizada y la

modelo sean homólogas). Como se puede observar en la **Figura 56**, la proteína HinH se adapta al plegamiento típico de esta superfamilia, que consiste en un núcleo de cuatro capas con estructura $\alpha\beta\beta\alpha$ que alojan un centro catalíticamente activo. Este núcleo está formado por dos láminas β antiparalelas, empaquetadas una contra la otra, las cuales están cubiertas por una capa de hélices α antiparalelas (Artymiuk, 1995; Brannigan *et al.*, 1995).

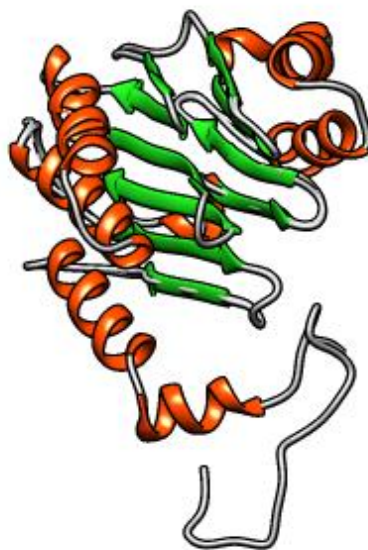


Figura 56. Modelo teórico de la estructura terciaria de la proteína HinH de *P. putida* U, donde se puede observar el plegamiento típico de la superfamilia de las hidrolasas N-terminales ($\alpha\beta\beta\alpha$). Se realizó por modelado de homología a través del servidor PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015) utilizando como plantilla la estructura cristalina de una proteína perteneciente a la superfamilia de hidrolasas N-terminales de *Silicibacter pomeroyi*, obteniéndose un 100% de confianza en el modelado de 211 residuos (94% de la secuencia). Las láminas β están representadas en verde y las hélices α en rojo.

La maquinaria catalítica de estas enzimas se encuentra conservada en los mismos elementos que componen la estructura terciaria y, por lo tanto, los mecanismos catalíticos de todas ellas son, probablemente, similares. Sin embargo, los residuos

implicados en la unión al sustrato difieren parcialmente y, en consecuencia, también difiere su ubicación.

El mecanismo de reacción de las hidrolasas N-terminales fue descrito por primera vez por Duggleby y colaboradores (Duggleby *et al.*, 1995). Es semejante al de las serín-proteasas, aunque en lugar de poseer una tríada catalítica, en estas hidrolasas solamente hay un centro catalítico que funciona como nucleófilo y como base catalítica. Éste está formado por una treonina, una serina o una cisteína que se activa autocatalíticamente y se encuentra localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La reactividad de este nucleófilo se ve afectada por los residuos de aminoácidos adyacentes con los que interacciona (Oinonen y Rouvinen, 2000). Así, durante la reacción se forma un intermediario covalente que se estabiliza gracias a la acción de 2 residuos de aminoácidos que se localizan principalmente en la región $\alpha 4 \rightarrow \beta 6$ de la proteína (Peräkylä y Kollman, 1997; Peräkylä y Rouvinen, 1996).

En la **Figura 57** se muestra el mecanismo catalítico hipotético que proponemos para HinH y que se basa en el descrito para otras amidohidrolasas N-terminales:

1. La reacción comienza cuando el oxígeno/azufre nucleófilo del centro activo Thr/Ser/Cys dona su protón a su propio grupo α -amino y, posteriormente, ataca al carbono carbonílico del sustrato.
2. El intermediario tetraédrico formado, cargado negativamente, se estabiliza mediante puentes de hidrógeno.
3. El grupo α -amino del centro activo dona el protón al nitrógeno del enlace amida que se va a romper.
4. Se libera el grupo amino del sustrato.

5. El grupo hidroxilo del agua ataca al carbono carbonílico del complejo acil-enzima, y el grupo α -amino básico del nucleófilo acepta el protón de la molécula de agua.

6. El intermediario cargado negativamente se estabiliza del mismo modo que en el paso 2, mediante puentes de hidrógeno.

7. La reacción se completa cuando el grupo α -amino dona el protón al nucleófilo.

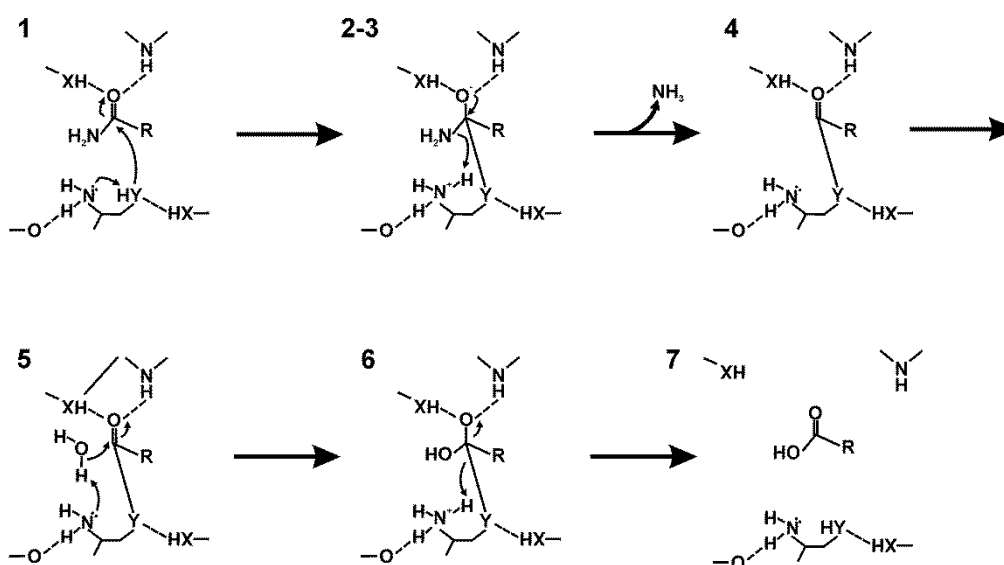


Figura 57. Mecanismo catalítico hipotético propuesto para explicar la actividad de las hidrolasas N-terminales ejemplificado sobre HinH de *P. putida* U. En el residuo que actúa como centro catalítico (Thr, Ser o Cys), Y representa oxígeno o azufre. En los residuos que actúan estabilizando el grupo α -amino, X representa nitrógeno u oxígeno.

Análisis del intermediario acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*.

Con el objetivo de determinar el intermediario catabólico acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*, se procedió a cultivar la cepa *P. putida* U

hinH::pK18::mob en MM suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM), compuesto que sirve para soportar el crecimiento bacteriano, además de histamina (10 mM), que es utilizada como fuente de metabolitos que van a ser excretados al medio. Este mutante transformaba la histamina en ImAA, el cual excretaba al caldo para volver a tomarlo y ser degradado hasta un intermediario catabólico de estructura desconocida cuyo tiempo de retención en el sistema de HPLC descrito anteriormente era de 6,7 min (**Figura 58**).

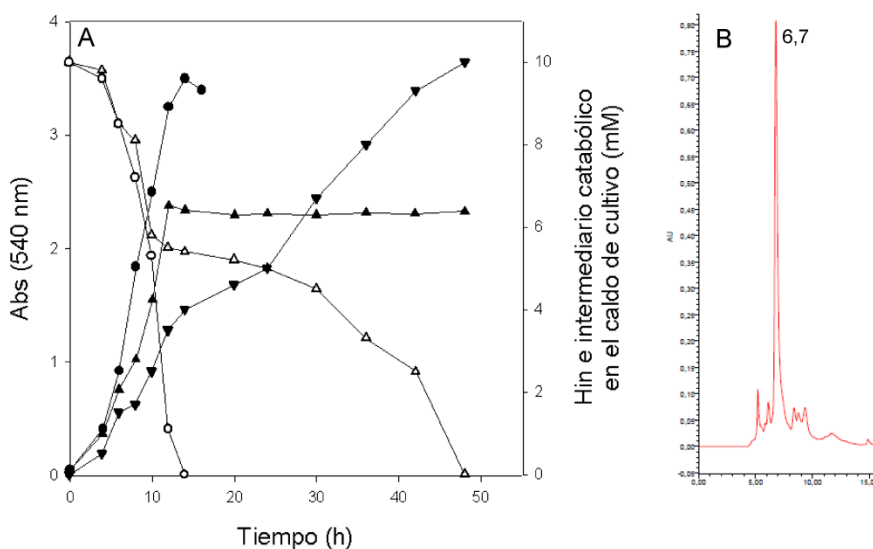


Figura 58. A) Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y del mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* (▲) cuando se cultivaba en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM). Concentración residual de histamina en los cultivos de la cepa *P. putida* U (○) y en el del mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* (Δ). Aparición del intermediario catabólico en los cultivos del mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* (▼). B) Cromatograma del intermediario acumulado al final de la curva de crecimiento mediante HPLC ($R_t=6,7$ min).

Para determinar la naturaleza de dicho intermediario catabólico, se realizó la extracción del mismo de los caldos de cultivo siguiendo el protocolo explicado en el apartado 16 de Materiales y Métodos. Posteriormente, se analizó el compuesto mediante

MS (Figura 59) y RMN (Figuras 60 y 61) en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca.

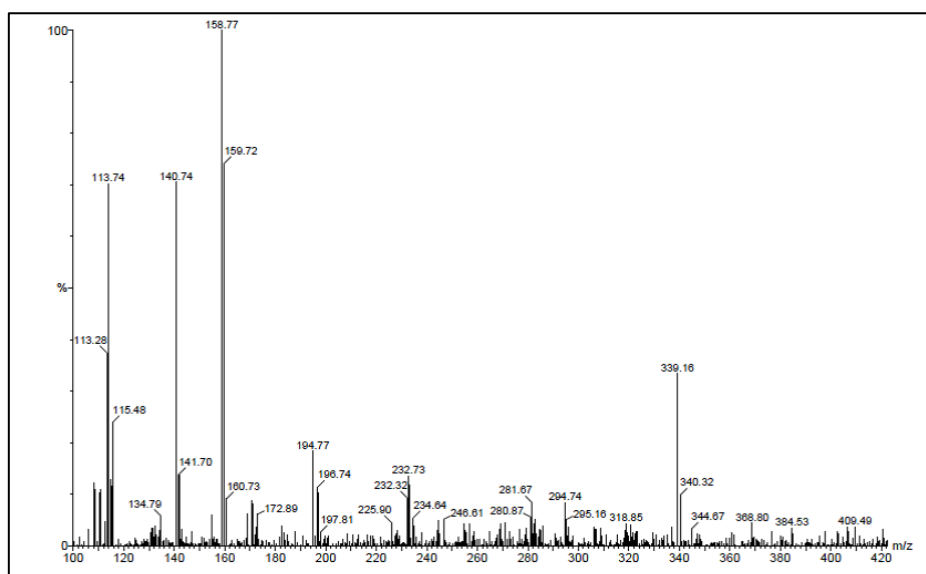


Figura 59. MS del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob. ESI-MS: m/z 158,77 [M-H].

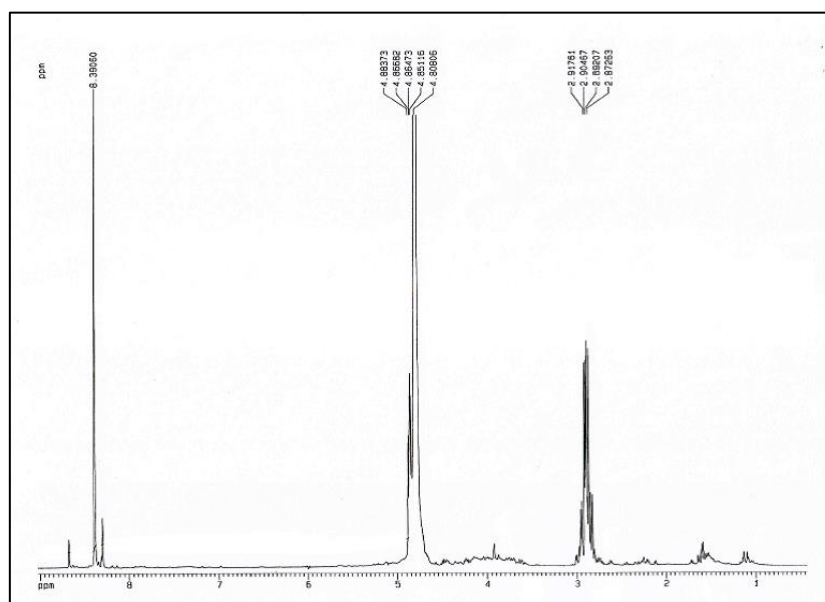


Figura 60. ^1H -RMN del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob. ^1H -RMN (D_2O): d: 2,89 (ddd, $J_1=4\text{Hz}$; $J_2=10\text{Hz}$, $J_3=16\text{Hz}$; 2H); 4,86 (dd, $J_1=4\text{Hz}$; $J_2=10\text{Hz}$; 1H); 8,39 (s, 1H) ppm.

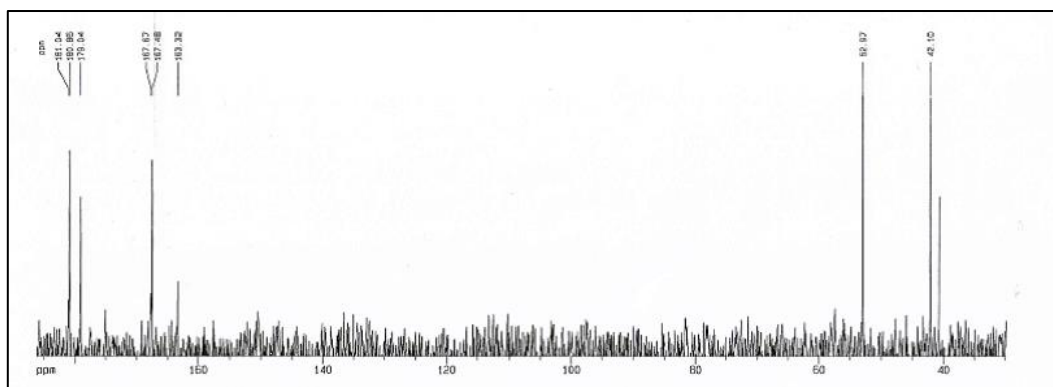


Figura 61. ^{13}C -RMN del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob*. ^{13}C -RMN (D_2O): d: 42,10 (t); 52,97 (d); 167,48 (d); 179,04 (s); 180.86 (s) ppm.

Reuniendo los resultados obtenidos de los diferentes análisis junto con el hecho de que las hidrolasas N-terminales actúan rompiendo enlaces amida, se llegó a la conclusión de que existía una alta probabilidad de que el compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* fuese la N_2 -formil-isoasparagina (FiAsn).

Síntesis química de FiAsn.

La confirmación de la estructura del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::*mob* se llevó a cabo mediante la síntesis de la FiAsn (ya que éste no es un compuesto comercial), siguiendo el procedimiento propuesto por McKennon y colaboradores (McKennon *et al.*, 1993), en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca. Mediante esta reacción química, se obtuvo una mezcla N_2 -formil-isoasparagina: N_2 -formil-asparagina (3:1) (**Figura 62**), cuyo espectro de ^1H -RMN corresponde a la **Figura 64C**.

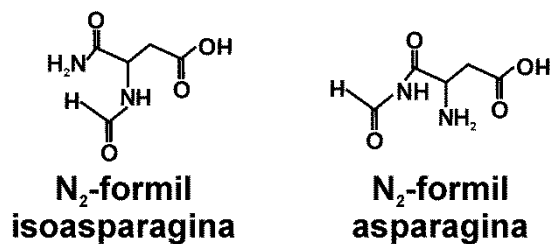


Figura 62. Fórmulas químicas de N₂-formil-isoasparagina y N₂-formil-asparagina.

El compuesto sintetizado se analizó mediante HPLC, observándose una única señal con un tiempo de retención de 6,7 min (**Figura 63**), idéntico al obtenido al analizar el compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*.

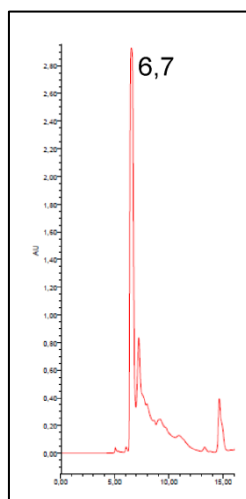


Figura 63. Perfil de elución mediante HPLC de la mezcla de síntesis.

Posteriormente, se realizaron ensayos de adición del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* a la disolución de los dos candidatos finales de síntesis especificados anteriormente. La adición a esta mezcla de N₂-formil-asparagina pura corresponde a la **Figura 64B**, donde se observaba el incremento del pico a $\delta=7,83$ ppm, por lo que esta señal era la correspondiente a la N₂-formil-asparagina. Por

otro lado, la adición del compuesto acumulado por el mutante a la mezcla (**Figura 64A**) supuso un incremento del pico a $\delta=7,88$ ppm, que era el correspondiente a la FiAsn.

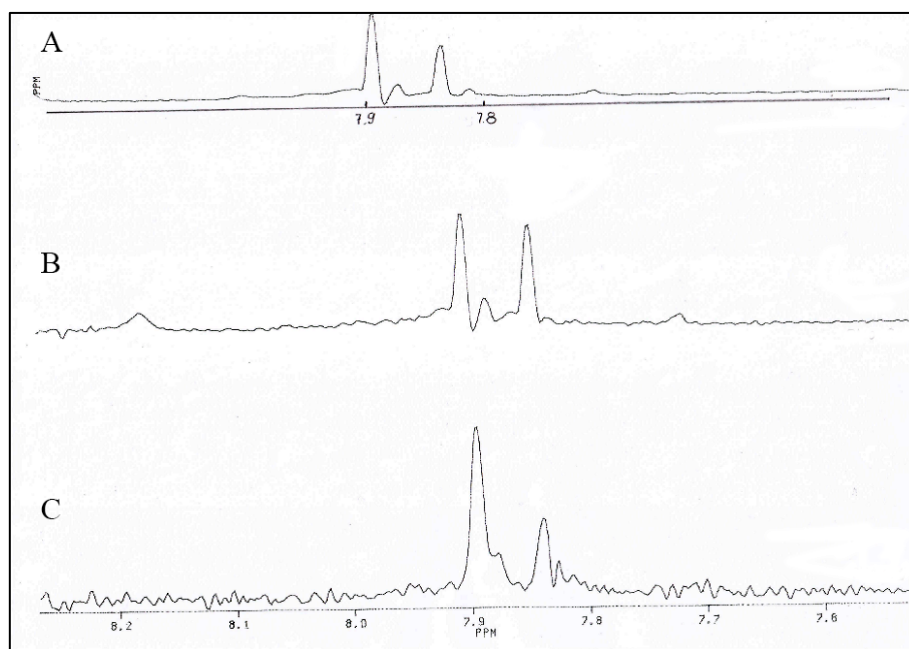


Figura 64. ¹H-RMN de A) adición del compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* a la mezcla de síntesis; B) Mezcla de síntesis + N₂-formil-asparagina y C) mezcla de N₂-formil-asparagina y de FiAsn obtenidas durante la síntesis.

Los datos obtenidos permitieron concluir que el compuesto acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* no es otro que la FiAsn. Por lo tanto, HinH sería la responsable de hidrolizar el enlace amida de la FiAsn generando ácido formilaspártico (FAsp).

4.1.4.1. Posibles intermediarios catabólicos.

Ácido N-formimino-aspártico.

Como se ha expuesto en este trabajo, algunos autores habían descrito una vía catabólica para el ImAA en *Pseudomonas* según la cual el ácido N-formimino-aspártico (FIA) era un intermediario perteneciente a la ruta que participaba en la conversión de

ImAA en FAsp, reacción llevada a cabo por una hidrolasa (**Figura 65**) (Hayaishi *et al.*, 1957; Kny y Witkop, 1959; Ohmura y Hayaishi, 1957; Rothberg y Hayaishi, 1957).

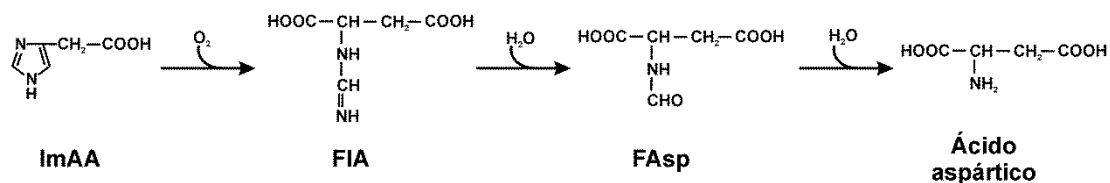


Figura 65. Ruta responsable de la degradación de ImAA en la que aparece el FIA como intermediario catabólico (Hayaishi *et al.*, 1957; Kny y Witkop, 1959; Ohmura y Hayaishi, 1957; Rothberg y Hayaishi, 1957).

Esta hidrolasa podría ser la enzima codificada por el mutante afectado en el gen *hinH*. De ser así, se debería haber encontrado FIA acumulado en el caldo cuando los mutantes eran cultivados en un medio que contenía una fuente de carbono que soportaba el crecimiento bacteriano (4-OH-PhAc 10 mM) e histamina o ImAA (10 mM) como precursores de intermediarios catabólicos. Sin embargo, dicho compuesto no se identificó en los caldos de fermentación. Aún así, con el objetivo de descartar definitivamente al FIA como un posible intermediario de la ruta, procedimos a sintetizarlo en nuestro laboratorio (ya que no es un compuesto comercial) siguiendo el método empleado por Hayaishi y colaboradores (Hayaishi *et al.*, 1957). El producto obtenido mediante la síntesis química se analizó empleando diferentes técnicas.

En primer lugar, se realizó un análisis mediante HPLC (en las mismas condiciones que el resto de valoraciones) para comprobar que la síntesis había transcurrido correctamente y que se había obtenido un único producto resultante. En este análisis se observó una única señal correspondiente al FIA y que tenía un tiempo de retención de 5,5 min (**Figura 66**). Cuando se analizaban los caldos de cultivo del

mutante afectado en el gen *hinH*, cuando era cultivado en 4-OH-PhAc como fuente de carbono y energía (10 mM) e histamina como fuente de catabolitos (10 mM), se observaba el acúmulo de un compuesto con un tiempo de retención de 6,7 min en este sistema de HPLC, por lo que descartamos al FIA como el intermediario catabólico acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob.

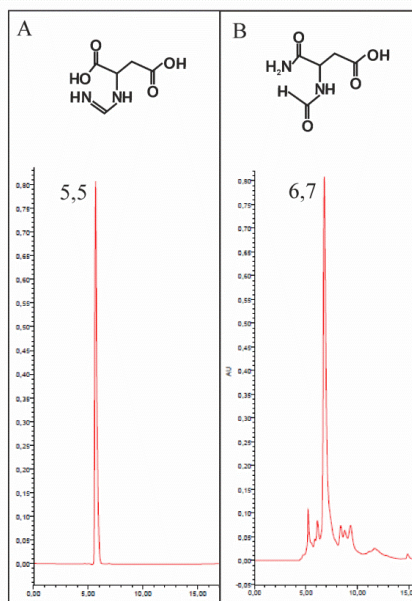


Figura 66. Fórmula química y perfil de elución mediante HPLC de A) FIA sintetizado y B) FiAsn, intermediario catabólico acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH*::pK18::mob.

Seguidamente, se realizaron diversos análisis de IR (**Figura 67**), MS (**Figura 68**) y RMN (**Figura 69 y 70**) donde se observó, de nuevo, que el FIA no era el intermediario catabólico acumulado por ninguno de los mutantes.

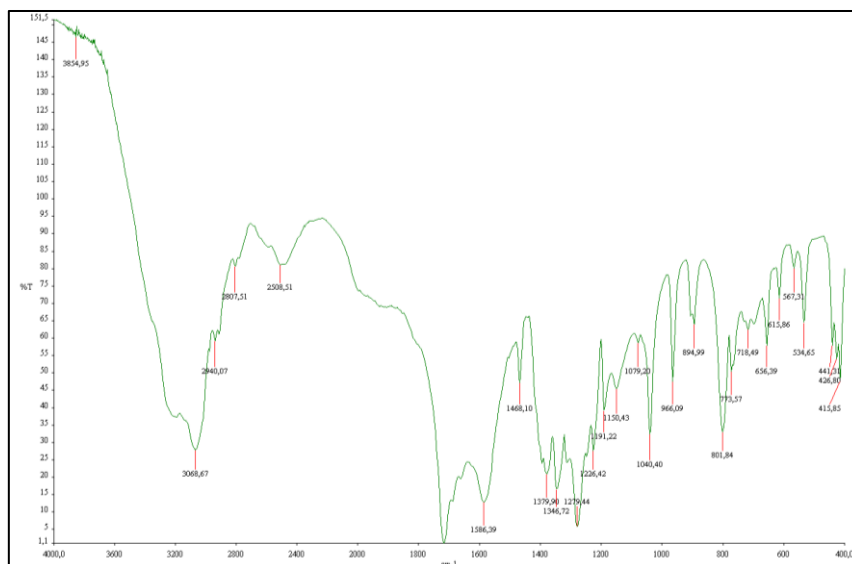


Figura 67. Espectro IR del FIA sintetizado.

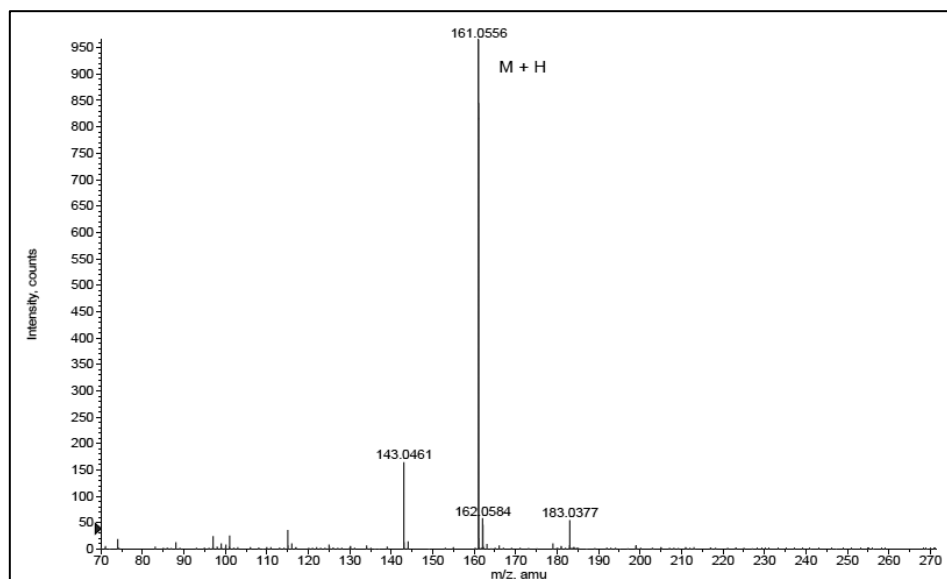


Figura 68. MS del FIA sintetizado. ESI-MS: m/z 161,0556 [M+H].

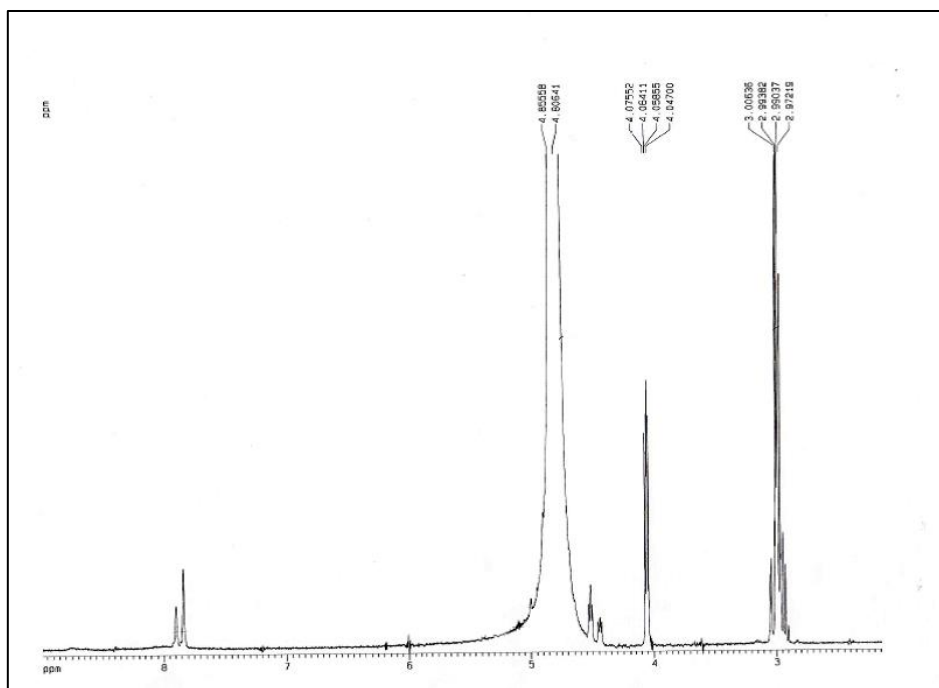


Figura 69. ^1H -RMN del FIA sintetizado. ^1H -RMN (D_2O): δ : 2,99 (ddd, $J_1=4\text{Hz}$; $J_2=9\text{Hz}$, $J_3=16\text{Hz}$; 2H); 4,06 (dd, $J_1=4\text{Hz}$; $J_2=9\text{Hz}$; 1H); 4,80 (s, broad); 7,84 (s, 1H) ppm.

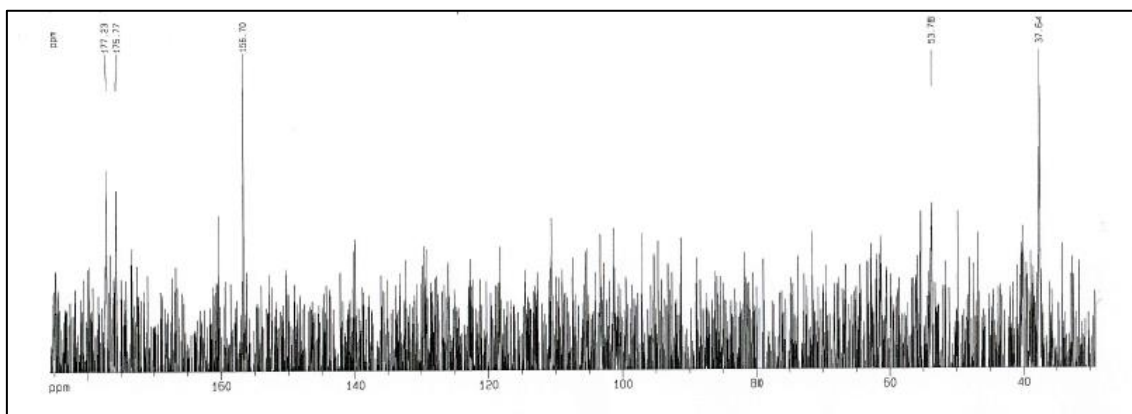


Figura 70. ^{13}C -RMN del FIA sintetizado. ^{13}C -RMN (D_2O): δ : 37,64 (t); 53,78 (d); 156,70 (s); 175,77 (s); 177,23 (s) ppm.

Por último, y con el fin de demostrar definitivamente que el FIA no se correspondía con el compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*, se realizó una adición del FIA sintetizado a una muestra del compuesto acumulado por el

mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob* y se analizó mediante RMN (**Figura 71**), observando que se entremezclaba el multiplete a $\delta = 2,6$ ppm y aparecía un triplete nuevo a $\delta = 4,5$ ppm. Evidentemente, no eran los mismos compuestos.

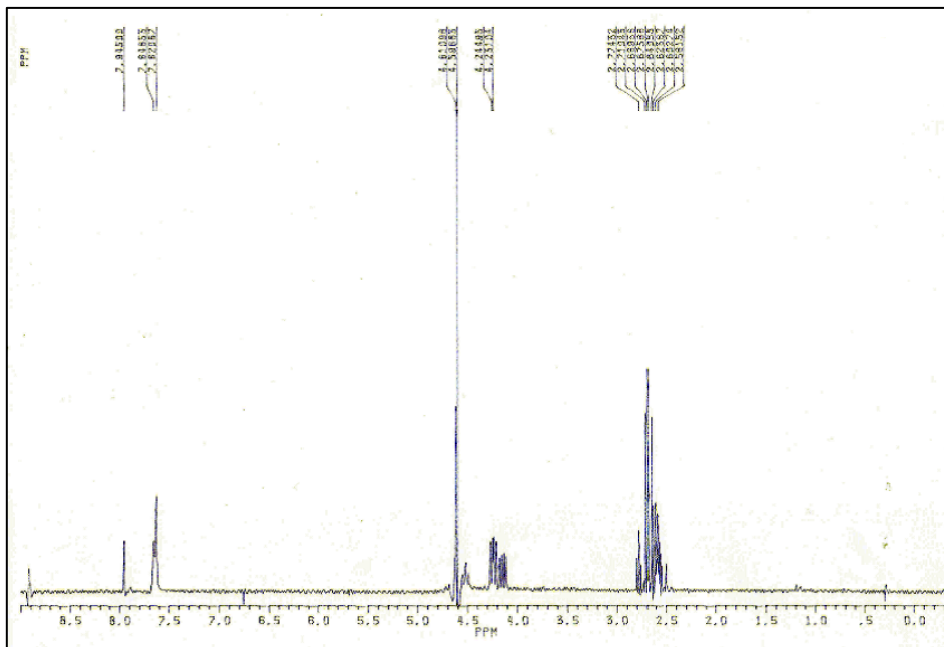


Figura 71. ^1H -RMN de la adición del FIA sintetizado a una muestra del compuesto acumulado en el caldo por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob*.

De hecho, ni en *P. putida* U ni en ninguno de los mutantes que se estudiaron, afectados en cada uno de los genes descritos, se pudo detectar FIA. Además, *P. putida* U no era capaz de crecer en MM suplementado con FIA como única fuente de carbono (10 mM), por lo que se descartó que en el catabolismo de la histamina y del ImAA en esta cepa interviniese este compuesto como intermediario.

Ácido hidantoín-5-acético.

Otra de las rutas propuestas para el catabolismo de la histamina se basaba en la degradación de este compuesto en presencia de ácido ascórbico (Chatterjee *et al.*, 1975).

En este caso, uno de los intermediarios catabólicos que se produciría sería el ácido hidantoinacético (HA) (**Figura 72**).

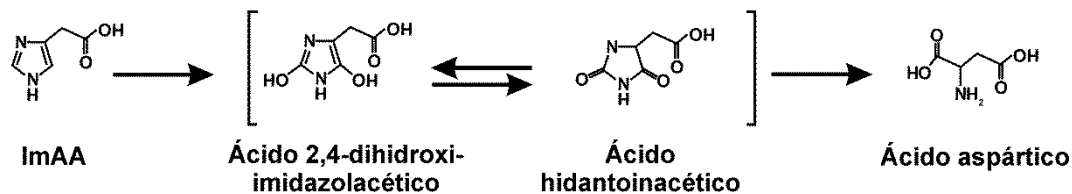


Figura 72. Ruta responsable de la degradación de ImAA en la que aparece el HA como intermediario catabólico.

Por las razones expuestas, pudiera ser que el ImAA generado a partir de la histamina se hidroxilara en las posiciones 2 y 4 del anillo dando lugar a un compuesto dihidroxilado, que evolucionaría (equilibrio ceto-enólico) a HA, el cual sería acumulado en el caldo por alguno de los mutantes (probablemente por el mutante afectado en el gen *hinH*). Con objeto de comprobar si este compuesto se generaba en *P. putida* U a partir de ImAA, se procedió a caracterizar el HA comercial (98% de pureza) mediante distintas técnicas analíticas (HPLC, IR, RMN).

Mediante el análisis por HPLC (en las condiciones descritas anteriormente) observamos que el perfil de elución del HA no se correspondía con el intermediario acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH* (FiAsn), ya que cada uno de estos poseía un tiempo de retención diferente (FiAsn, 6,7 min y HA, 9,2 min) (**Figura 73**).

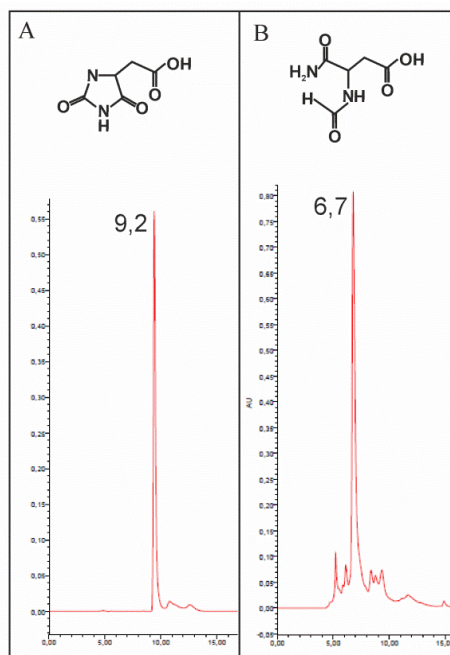


Figura 73. Fórmula química y perfil de elución mediante HPLC de A) HA comercial y B) FiAsn, intermediario catabólico acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob*.

Quando se llevó a cabo el análisis de IR del HA comercial, el espectro de IR (**Figura 74**) no se asemejaba al espectro de ninguno de los intermediarios acumulados por los distintos mutantes.

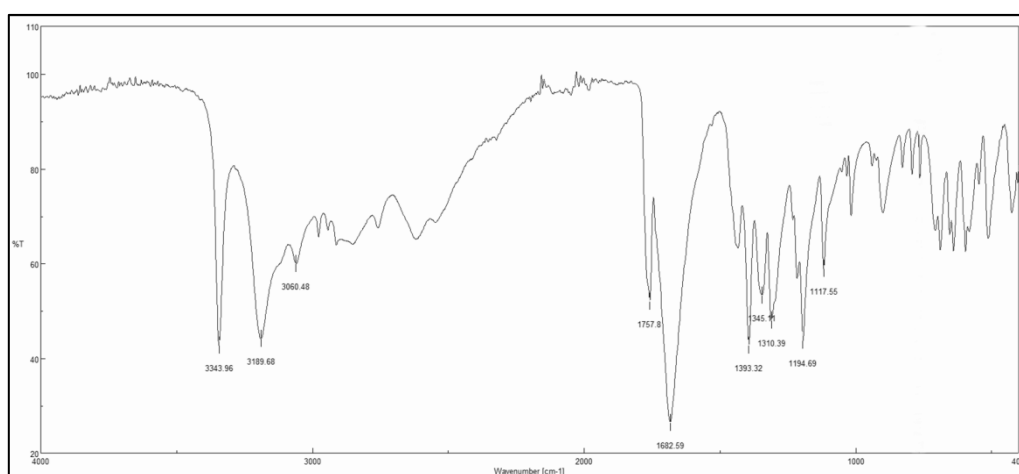


Figura 74. IR del HA comercial.

Por otro lado, cuando se adicionó HA a una muestra del compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*, observamos una modificación de las señales, tanto las que aparecen a d: 2,8 ppm como las que aparecen a d: 4,5 ppm, siendo la yuxtaposición más evidente a d: 4,5 ppm (**Figura 75**).

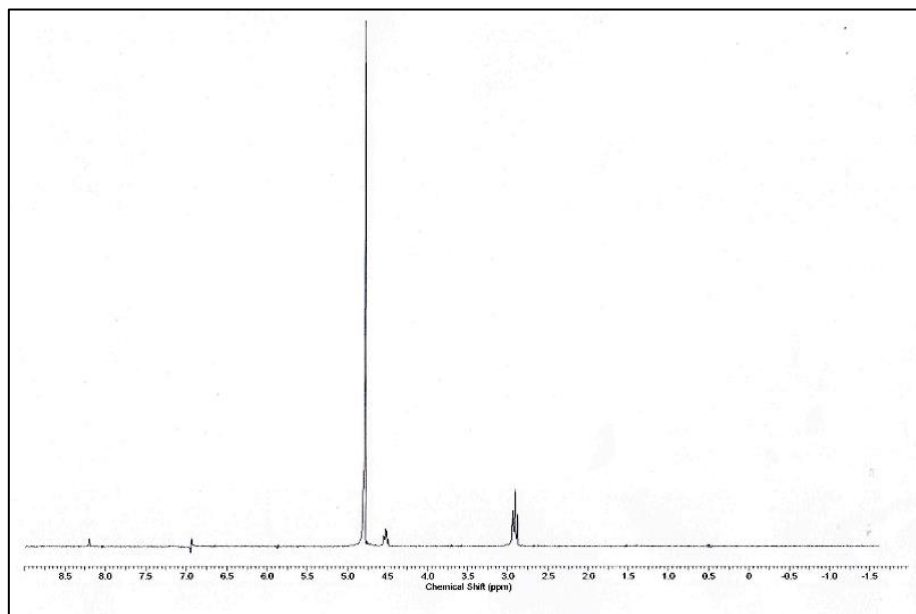


Figura 75. ^1H -RMN de la adición de ácido hidantoinacético a una muestra del compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*.

En resumen, ni en *P. putida* U ni en el mutante afectado en el gen *hinH* ni en ninguno de los mutantes se pudo detectar HA en los caldos de fermentación cuando eran cultivados en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM). Además, *P. putida* U no era capaz de crecer en MM suplementado con HA (10 mM) como única fuente de carbono, por lo que se descartó que, al menos en *P. putida* U, la histamina se degradara a través de este intermediario metabólico.

Ácido N-carbamoil-DL-aspártico.

Continuando con la hipótesis propuesta por Chatterjee y colaboradores (Chatterjee *et al.*, 1975), el producto resultante de la apertura del anillo del HA sería el carbamoilo del aminoácido correspondiente, es decir, el ácido carbamoilaspártico (CA) (Figura 76).

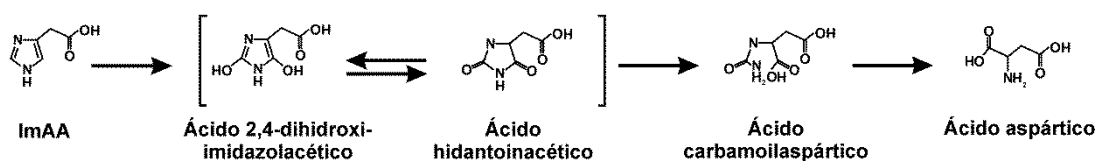


Figura 76. Ruta responsable de la de degradación de ImAA en la que aparece el CA como intermediario catabólico.

De nuevo, con el objetivo de determinar si este compuesto aparecía como intermediario de la ruta de degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U, se llevó a cabo la determinación de ciertas características físico-químicas del CA comercial (98% de pureza) mediante HPLC (Figura 77) e IR (Figura 78).

En cuanto al análisis mediante HPLC, realizado en las mismas condiciones empleadas anteriormente, observamos que el perfil de elución del CA no coincide con el del intermediario acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH* (ni con ninguno perteneciente a otros mutantes), el cual poseía un tiempo de retención diferente (CA: 7,8 min; FiAsn: 6,7 min) (Figura 77).

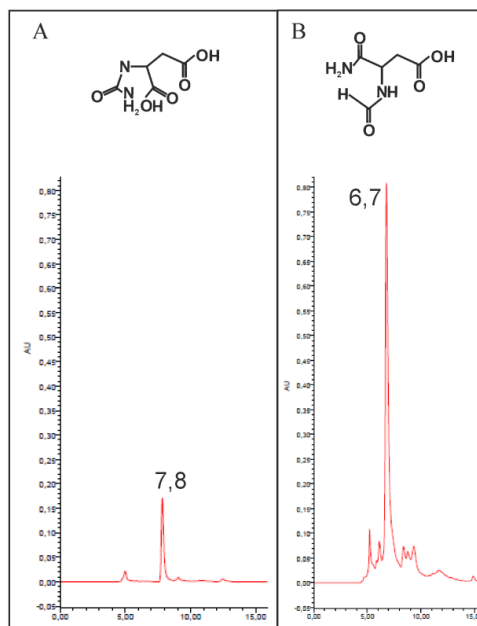


Figura 77. Fórmula química y perfil de elución mediante HPLC de A) CA comercial y B) FiAsn, intermediario catabólico acumulado por el mutante *P. putida* U *hinH::pK18::mob*.

Un hecho similar sucedió al analizar el CA mediante IR (**Figura 78**), ya que el espectro obtenido no correspondía con ninguno de los intermediarios analizados previamente.

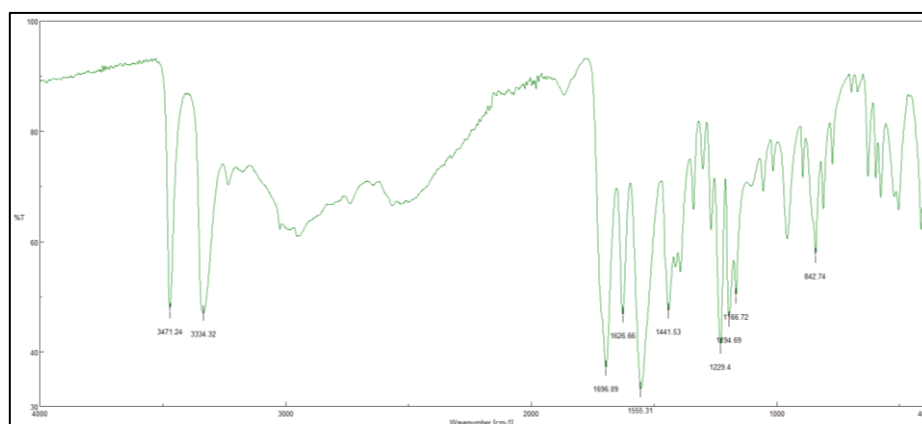


Figura 78. IR del CA comercial.

Al igual que en el caso anterior, se llevó a cabo una adición de CA comercial al compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH* y se analizó la mezcla mediante RMN (**Figura 79**). Observamos un incremento del multiplete a δ : 2,8 ppm, aunque la señal del compuesto acumulado por el mutante permanece en su sitio sin modificarse. Por consiguiente, el compuesto acumulado por el mutante no es CA. En caso contrario, habríamos observado un incremento de ambas señales. En este caso, lo que se observa, de nuevo, es una yuxtaposición de señales, no un incremento de las ya existentes.

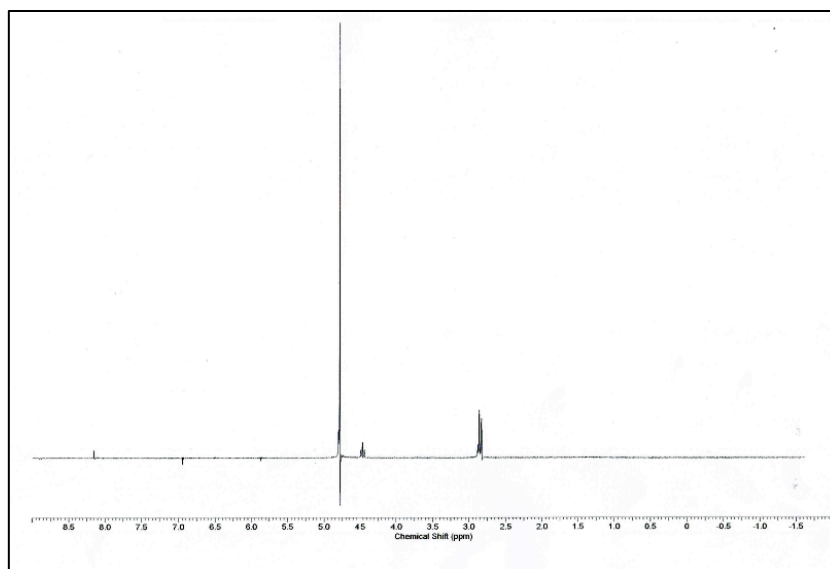


Figura 79. ^1H -RMN de la adición de CA comercial al compuesto acumulado por el mutante afectado en el gen *hinH*.

Por lo tanto, como en los casos anteriores, ni en *P. putida* U ni en ninguno de los mutantes incapaces de degradar histamina ni ImAA se detectó CA como intermediario catabólico. Asimismo, *P. putida* U no era capaz de crecer en MM suplementado con CA (10 mM) como única fuente de carbono, por lo que se descartó a este compuesto como intermediario metabólico de la ruta de degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U.

4.1.5. Análisis del ORF *PpU_0003* adyacente al *cluster hin2*.

La secuenciación de la zona adyacente al punto de inserción del transposón Tn5 en el mutante *P. putida* U *hinG::Tn5* permitió identificar un ORF, denominado *PpU_0003* en la **Figura 39**, que se transcribía en sentido contrario a *hinG* y que poseía una elevada homología con una porina selectiva de carbohidratos (NCBI Resource Coordinators, 2017). El análisis de esta proteína sugirió la posibilidad de que participase en la ruta catabólica como un sistema de exclusión y toma del ImAA, ya que este compuesto es liberado al caldo de cultivo, como se ha observado en los análisis realizados por HPLC.

Por este motivo, se procedió a interrumpir este gen mediante una disrupción génica (ver apartado 10.2 de Materiales y Métodos). Para ello, amplificamos mediante PCR un fragmento interno del gen en *P. putida* U utilizando los cebadores *PpU_0003.Dis.F* y *PpU_0003.Dis.R*. Posteriormente, se clonó dicho fragmento en el plásmido replicativo *pK18::mob* (Schäfer *et al.*, 1994) en los sitios de restricción *BamHI/EcoRI*. Finalmente, mediante una conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990), se transfirió la construcción (*pK18::mob-PpU_0003*) (**Tabla 8**) a la cepa silvestre y, a través de un evento de recombinación homóloga, se produjo la disrupción específica del gen.

El mutante *PpU_0003::pK18::mob* (**Tabla 7**) era capaz de degradar tanto la histamina como el ImAA con la misma eficiencia que la cepa silvestre (**Figura 80**). Este resultado determinaba que el ORF *PpU_0003* no codificaba ninguna proteína esencial en el catabolismo de estos compuestos.

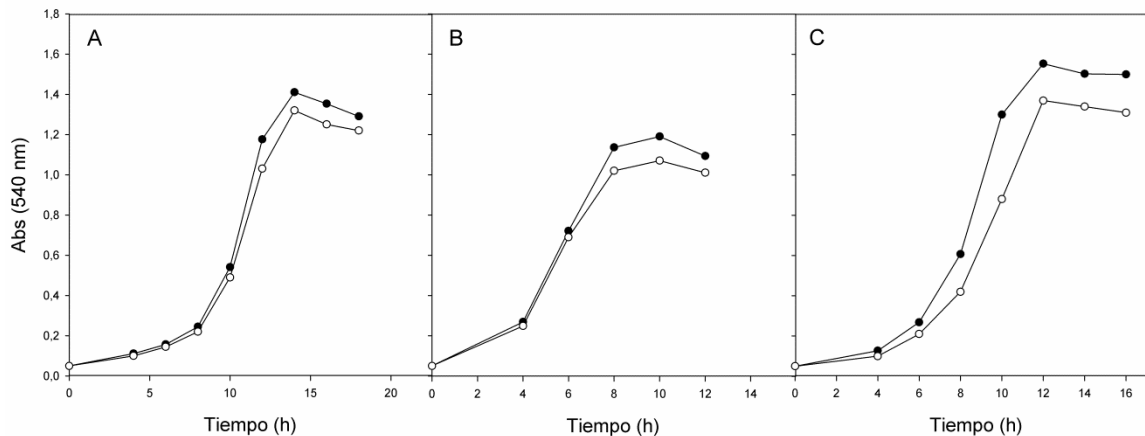


Figura 80. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●) y de la cepa *PpU_0003::pK18::mob* (○) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM) como únicas fuentes de carbono.

4.2. Cluster *hin3* en *P. putida* U y análisis comparativo en otros microorganismos.

Como ya se indicó previamente, en algunos mutantes (5, 15, 16, 17, 18, 32, 36, 42, 68, 69, 71 y 72) incapaces de crecer en histamina y en ImAA como únicas fuentes de carbono, se acumulaba ácido aspártico en el caldo de cultivo, identificado mediante TLC (**Figura 38**). Al analizar el punto de inserción del Tn5 en estos mutantes se observó que el transposón había anidado en una región genómica de la cual se han secuenciado los 2540 pb dentro de los cuales se encontraba el transposón. A esta región la denominaremos *cluster hin3* (**Figura 81**).

A continuación, se analizarán los distintos ORFs secuenciados (*hinI* y *hinJ*), las proteínas codificadas en ellos y su posible función en la ruta catabólica. Así mismo, se compararon éstas con otras proteínas existentes en diferentes microorganismos.

1 GGGTTACGCCTTCAGCGAACCAGACGTGGAGCGATCATGTTTTCCGGACGCAGGATGTC
 CCAATGCGGAAGTCGCCTTGGTCTGCACCTCGCTAGTACAAAAGGCCTGCGTCTACAG
 █ A K L P V L R P A I M N E P R L I D

61 GTTGAGCATCTCTTCGTCCAGCAGCTTCTCTTCGCGCACCAGTTCCAGTACGCCGCGGCC
 CAACTCGTAGAGAAGCAGGTCGTGCGAAGAGAAGCGCGTGGTCAAGGTCATGCGGCGCCGG
 N L M E E D L L K E E R V L E L V G R G

121 GGTTTCCAGGGCAACGCGGGCGATACGGGTGGCGTTTTTCGTAGCCGATGTACGGGTTTCAG
 CCAAAGGTCCCGTTGCGCCCGCTATGCCACCGCAAAGCATCGGCTACATGCCCAAGTC
 T E L A V R A I R T A N E Y G I Y P N L

181 GGCGGTGACCAGGCCGATCGAGTGCTCGACCAGTTCACGGCAGCGCTGTTGCTGGCAGT
 CCGCCACTGGTCCGGCTAGCTCACGAGCTGGTCAAGTGCCGTGCGGACAAGCAACCGTCA
 A T V L G I S H E V L E R C R Q E N A T

241 GATGCCGACGATGCAGTGCTCGCGCAGCATGTCCATGGCGCGTTGCAGCAGGCGGATCGA
 CTACGGCTGCTACGTCACGAGCGCTGCTACAGGTACCGCGCAACGTCGTCCGCCTAGCT
 I G V I C H E R L M D M A R Q L L R I S

301 ATCGAAGATCTTGTAGGCGATCAGCGGCTCCATCACGTTTCAGCTGCAGCTGGCCACCTTC
 TAGCTTCTAGAACATCCGCTAGTCGCCGAGGTAGTGCAAGTCGACGTCGACCGGTGGAAG
 D F I K Y A I L P E M V N L Q L Q G G E

361 GGCGGCGACGGTCAGGGCCAGGTCGTTGCCCATGATGGCGAAGGCGACTTGGTTGACGGC
 CCGCCGCTGCCAGTCCCGGTCCAGCAACGGGTACTACCGCTTCCGCTGAACCAACTGCCG
 A A V T L A L D N G M I A F A V Q N V A

421 TTCCGGGATAACCGGGTTGACCTTGCCTGGCATGATCGAGCTGCCTGGCTGACGCGCTGG
 AAGGCCCTATTGGCCCAACTGGAACGGACCGTACTAGCTCGACGGACCGACTGCGCGACC
 E P I V P N V K G P M I S S G P Q R A P

481 CAGGTTGATCTCGTTGATACCGGTGCGCGGGCCGCTGGACAGCAGGCGCAGGTCGTTGCA
 GTCCAAGTACGCAACTATGGCCACGCGCCCGGCGACCTGTCGTCGCGCTCCAGCAACGT
 L N I E N I G T R P G S S L L R L D N C

541 GATCTTCGACAGCTTGACCGCGGTACGCTTGAGCATGCCGGAGAACAGTACGAAGGCGCC
 CTAGAAGCTGTGCAACTGGCGCCATGCGAAGTTCGTACGGCCTCTTGTGTCATGCTCCGCGG
 I K S L K V A T R K L M G S F L V F A G

601 CATGTCGGAGGTGGCTTCGATCAGGTCGGCAGCCGGTACCAGCGGCTGGCCGCTGATGGT
 GTACAGCTCCACCGAAGCTAGTCCAGCCGTCGGCCATGGTCCCGACCGGCGACTACCA
 M D S T A E I L D A A P V L P Q G S I T

661 TGCCAGGCGCTGTACGGCGAGCATCTGGTAGCCCGGGTTCGGCGTTGATGCCGGTACCGAT
 ACGGTCCGCGACATGCCGCTCGTAGACCATCGGGCCAGCCGCAACTACGGCCATGGCTA
 A L R Q V A L M Q Y G P D A N I G T G I

721 GGCAGTACCACCCAGGTTGATTTTCGGTTCAGCAGCTCAGGCGCCAGCGAACGCAGACGGTT
 CCGTCATGGTGGGTCCAATAAGCCAGTCGTGAGTCCGCGGTGCTTGCCTCTGCCAA
 A T G G L N I E T L L E P A L S R L R N

781 GAGGTCTTCGGTCATGGTGGTGGCGAAGGCGCGGAATTCCCTGGCCAGGGTCATCGGCAC
 CTCCAGAAGCCAGTACCACCACCGCTTCCGCGCCTTAAGGACCGGGTCCAGTAGCCGTG
 L D E T M T T A F A R F E Q G L T M P V

841 GGCGTCTGCAGCTGGGTACGGCCCATCTTCAGTACGTGGTTCGAACTCTTTACCTTTGGC
 CCGCAGGACGTCGACCCATGCCGGGTAGAAGTCATGCACCAGCTTGAGAAATGGAAACCG
 A D Q L Q T R G M K L V H D F E K G K A

901 AGCGAAGGCCTGGATCAGGCTGTCGAGGCTGGCCAGCAGGGCATCGTGACCCAGCAGCAG
 TCGCTTCCGGACCTAGTCCGACAGCTCCGACCGGTCGTCCCCTAGCACTGGGTCGTGTC
 A F A Q I L S D L S A L L A D H G L L L

961 GCCCAGGCGGATAGCGGTCTGGGTAGGCGTCGTTGGTGCAGTGCGCCATGTTACATCGTT
 CGGGTCCGCTATCGCCAGCCCATCCGCAGCAACCAGCTGACGCGGTACAAGTGTAGCAA
 G L R I A T P Y A D N T S Q A M N V D N

1021 GTTCGGGTGCAGGTAAGTACTGACTCACCCTTCTGGTGGCCCATGGCCTCCAGCGCGATGTT
 CAAGCCACGTCCATGACCATGAGTGGGAAGACCACCGGTACCGGAGGTGCGCTACAA
 N P H L Y Q Y E G K Q H G M A E L A I N

1081 GGCGATGACTTCGTTGGCGTTCATGTTGGTAGAAGTACCAGCACCGCCTTGAATCATGTC
 CCGTACTGAAGCAACCGCAAGTACAACCATCTTCATGGTTCGTGGCGGAACCTAGTACAG
 A I V E N A N M N T S T G A G G Q I M D

1141 CACCACGAAGTCTCGTGGTAGTCGCCCTTGATCAGTCGTGCGCAGGCTGCGCTGATCGC
 GTGGTGCTTGACGAGCACCATCAGCGGGAACCTAGTCAGCACGCGTCCGACGCGACTAGCG
 V V F Q E H Y D G K I L R A C A A S I A

1201 GCGTGCTTGGCATCGCTCAAGTGCCCCAGCTCACGGTGGCGTCAGCAGCTGCCTGCTT
 CCGCACGAACCGTAGCGAGTTCACGGGGTCGAGTGCCAACCGCAGTCGTGACGGACGAA
 A H K A D S L H G L E R N A D A A A Q K

1261 GACCATCGCCAGGCCACTACCAGTTTTCGGGTAGTGCAGCAGCGGAACCGCGGAGAGGTG
 CTGGTAGCGGTCCGGCTGATGGTCAAAGCCCATCACGCTGTCGCCCTTGGCGCCTCTCCAC
 V M A L G V V L K P Y H S L P V G S L H

1321 GAAGTTGTTGGCAGCGCGCAGGGTCTGGATGCCGTAGTAGGCATCAGCAGGAACCTCAAG
 CTTCAACAACCGTGCAGCGTCCCAGACCTACGGCATCATCCGTAGTCGTCTTGAAGTTC
 F N N A A R L T Q I G Y Y A D A P V E L

1381 GGTACCCAACAGATCTTTTTCGACGCGGAACGATGCAGCGGAGGACATGATGTATATCAT
 CCATGGGTGTCTAGAAAAAGTGCAGCCTTGCTACGTGCGCTCCTGTACTACATATAGTA
 T G L L D K E V R F S A A S S M I Y I M

1441 CTCGATATTGACCCGGCACATGCCGGAATGGCGCCAATCCTAGGCCTGAAGGTGATTTTG
 GAGCTATAACTGGGCCGTGTACGGCCTTACCGCGGTTAGGATCCGGACTTCCACTAAAAC
 E I N V R C M ← *hinI*

1501 CGGCCAATGCTGTTGCACGCTAACCTATGCACAAACGGCATAGTGTTCATGTGACGCCA
 GCCGGTTACGACAACGTGCGATTGGATAAGTGTTCGCGTATCACAAGTACACTGCGGT

hinJ → M C F V N L E

1561 ATTGACATTCGAGCGTGTTCATTTTGGTGCACGCCGGGAGATGTGCTTCGTGAACCTTG
 TAACTGTAAGCTCGCACAAGGTAACCACGTGCGGCCCTTACACGAAGCACTTGAAC

S K W L E D F S A L A S T R S F S Q A A

1621 AAAGCAAATGGCTGGAAGATTTTCAGTGCAGTGGCTTCTACCCGAGTTTTTCCAGGCCG
 TTTCGTTTACCGACCTTCTAAAGTCACGCGACCGAAGATGGGCGTCAAAAAGGGTCCGGC

E R R F V T Q P A F S R R I R S L E A A

1681 CAGAGCGGCGTTTCGTCACCAACCGGCCCTTACGCCGGCGTATCCGCAGCCTCGAAGCGG
 GTCTCGCCGAAAGCAGTGGGTGGCCGGAAGTCGGCCGCATAGGCGTCGGAGCTTCGCC

L G L Q L V N R S R T P I E L T E A G Q

1741 CGTTGGGGCTGCAACTGGTGAATCGTTCGCCGACGCCATCGAACTGACAGAGGCCGGCC
 GCAACCCCGACGTTGACCACTTAGCAAGGGCGTGGGGTAGCTTGACTGTCTCCGGCCGG

L F L V T A R T V V D Q L S E I L R H L
 1801 AGCTTTTCTCGTCACGGCGCGCACTGTTGTGACCGAGTTGAGCGAAATTCTCCGCCATT
 TCGAAAAAGAGCAGTGCCGCGCGTGACAACAGCTGGTCAACTCGCTTTAAGAGGCGGTAA

 H H L E G G Q G E V V Q V A A A H S L A
 1861 TGCATCATCTTGAGGGCGGGCAGGGCGAGGTGGTGCAGGTGGCTGCGGCACACTCCCTGG
 ACGTAGTAGAACTCCCGCCGTCCCGCTCCACCAGTCCACCGACGCCGTGTGAGGGACC

 S G F F P R W V A Q L R N D G L N I A T
 1921 CGTCGGGCTTCTTCCCCCGTGGGTGGCCAGTTGCGCAACGACGTTTGAACATCGCCA
 GCAGCCCGAAGAAGGGGGCCACCCACCGGGTCAACGCGTTGCTGCCAAACTTGTAGCGGT

 R L V A T N V G D A V H A L R E G G C D
 1981 CCCGCTGGTTGCGACTAACGTCCGAGATGCCGTGCATGCATTACGTGAAGGTGGCTGCG
 GGGCGACCAACGCTGATTGCAGCCTCTACGGCACGTACGTAATGCACCTCCACCGACGC

 L M L A F Y D P D A A L Q M D A E I F P
 2041 ACCTGATGCTGGCCTTCTATGACCCGGACGCGGCCCTGCAGATGGATGCCGAGATCTTCC
 TGGACTACGACCCGAAGATACTGGGCCTGCGCCGGGACGTCTACCTACGGCTCTAGAAGG

 S L H M G N T E M L P V C A V D G E G K
 2101 CGTCGTTGCACATGGGCAACACCGAAATGTTGCCGGTGTGCGCCGTGGATGGCGAGGGCA
 GCAGCAACGTGTACCCGTTGTGGCTTTACAACGGCCACACGCGGCACCTACCGCTCCCGT

 P L F D L E G E G S V P L L A Y T A G A
 2161 AGCCGTTGTTGACCTGGAAGGTGAGGGCAGCGTGCCGTTGTTGGCCTATACCGCTGGCG
 TCGGCAACAAGCTGGACCTTCCACTCCCGTGCACGGCAACAACCGGATATGGCGACCGC

 F L G R S V N L L L R Q R N L R Y T T V
 2221 CCTTCTGGGCGGTGCGTCAATTTGCTGCTGCGTCAGCGCAACCTGCGCTATAACCACGG
 GGAAGGACCCGCGCCAGCCAGTTAAACGACGACGCAGTCGCGTTGGACGCGATATGGTGCC

 Y E T A M A D S L K S M A L E G M G I A
 2281 TCTATGAAACCGCCATGGCCGACAGCCTCAAGAGCATGGCGCTTGAGGGCATGGGTATTG
 AGATACTTTGGCGGTACCGGCTGTGCGAGTTCTCGTACCGGCAACTCCCGTACCCATAAC

 W V P R L S M R G E L E R G E L A V C G
 2341 CCTGGGTACCGCGCCTGTGATGCGTGGCGAGCTGGAACGGGGCGAGCTGGCCGTCTGCG
 GGACCCATGGCGCGGACAGCTACGCACCGCTCGACCTTGCCCCGCTCGACCGGCAGACGC

 G S Q W H V P L E I R L Y R C A L V R K
 2401 GCGGCAGCCAGTGGCACGTGCCACTGGAAATTCGCCGTGACCGCTGCGCCCTGGTGGCA
 CGCCGTGCGTACCGTGCACGGTGACCTTTAAGCGGACATGGCGACGCGGGACCACGCGT

 A N V R L L W R K L E G T A T V D P K V
 2461 AGGCCAACGTCAGGCTGTTGTGGCGCAAGCTCGAGGGTACGGCGACGTTGACCCAAAAG
 TCCGGTTGCAGTCCGACAACACCGCGTTTCGAGCTCCCATGCCGCTGCCAACTGGGTTTTTC

 S Q S P E K ■
 2521 TCAGCCAAAGCCCCGAAAAATAAGGC 2546
 AGTCGGTTTCGGGGCTTTTTATTCCG

Figura 81. Secuencia de nucleótidos del *cluster hin3* de *P. putida* U, donde se localizan los genes *hinI* y *hinJ*, así como la secuencia de aminoácidos correspondiente a las proteínas que codifican cada uno de esos genes.

4.2.1. Gen *hinI*.

Localización del punto de inserción.

Al estudiar el punto de inserción del transposón en los mutantes 5, 16, 32, 36, 71 y 72, observamos que en todos ellos se había interrumpido el gen *hinI* (**Tabla 18**) y, por lo tanto, denominaremos a estos mutantes como *P. putida* U *hinI*::Tn5 (**Tabla 7**).

Tabla 18. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U *hinI*::Tn5. El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 81**.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinI</i>	
Mutante 5, 32 y 72	181 GGCGGTGACCAGGCCGATCGAGTGCACGAGTTCACGGC - Tn5 - AGCGCTGTTGTTGGCAGT CCGCCACTGGTCCGGCTAGCTCACGAGCTGGTCAAGTGCCG TCGCGACAAGCAACCGTCA A T V L G I S H E V L E R C R Q E N A T
Mutante 16	181 GGCGGTGACCAGGCCGATCGAGTG - Tn5 - CTCGACCAGTTCACGGCAGCGCTGTTGTTGGCAGT CCGCCACTGGTCCGGCTAGCTCAC GAGCTGGTCAAGTGCCGTCGCGACAAGCAACCGTCA A T V L G I S H E V L E R C R Q E N A T
Mutante 36	1381 G - Tn5 - GTACCCAACAGATCTTTTTTCGACGCGGAACGATGCAGCGGAGGACATGATGTATATCAT C CATGGGTGTCTAGAAAAAGCTGCGCCTTGCTACGTCGCCTCCTGTACTACATATAGTA T G L L D K E V R F S A A S S M I Y I M
Mutante 71	721 GGCAGTACCACCCAGGTTGATTTTCGGTCAGCA - Tn5 - GCTCAGGCGCCAGCGAACGCAGACGGTT CCGTCATGGTGGGTCCAACCTAAAGCCAGTCGT CGAGTCCGCGGTCGCTTGCGTCTGCCAA A T G G L N I E T L L E P A L S R L R N

Expresión en *trans* del gen *hinI*.

Para determinar si la incapacidad de los mutantes afectados en el gen *hinI* para asimilar tanto la histamina como el ImAA se debía a una alteración de este gen o bien a un efecto polar causado por la inserción del transposón Tn5, se llevó a cabo, como en casos anteriores, la expresión heteróloga de dicho gen en estos mutantes. Para ello, se amplificó el gen *hinI*, empleando el DNA genómico de *P. putida* U como DNA molde, mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos HinI.F y HinI.R, y se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) en los sitios de restricción *ApaI/SacI*. La construcción obtenida, pMC-3*hinI* (**Tabla 8**), se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a los distintos mutantes. Esta cepa transformante (*P. putida* U *hinI*::Tn5 pMC-3*hinI*) (**Tabla 7**) recuperaba su capacidad para asimilar

tanto la histamina como el ImAA a una concentración en el medio de cultivo de 10 mM. Sin embargo, la misma cepa mutante transformada únicamente con el plásmido seguía siendo incapaz de crecer en dichos medios (**Figura 82**). Por lo tanto, se pudo concluir que la construcción pMC-3*hinI* era funcional y que el crecimiento observado en la cepa transformante se debía específicamente a la presencia del gen clonado en el plásmido. A su vez, el hecho de que los mutantes afectados en el gen *hinI* asimilaran el aminoácido histidina con la misma eficiencia que la cepa silvestre indicaba que la inserción del transposón no estaba afectando a funciones celulares generales.

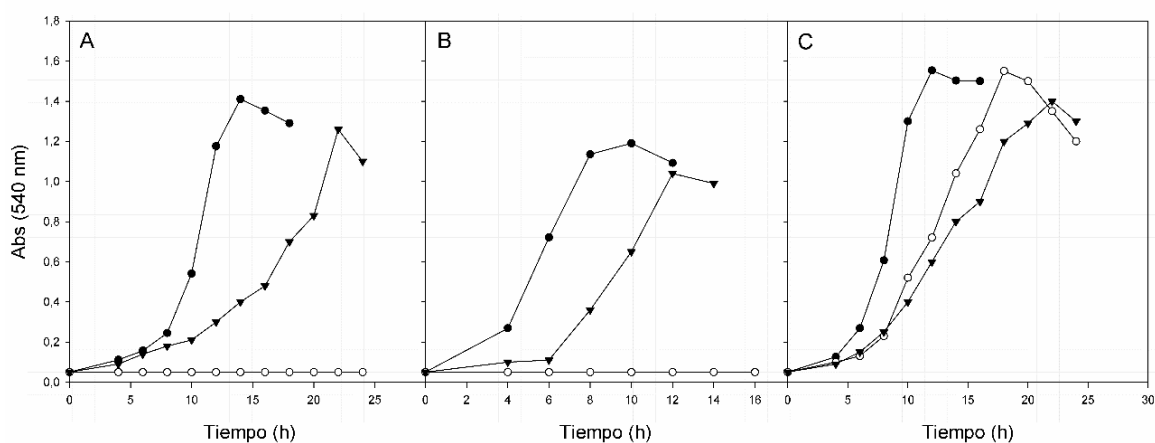


Figura 82. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinI*::Tn5 (○) y del mutante complementado con el gen *hinI* (*P. putida* U *hinI*::Tn5 pMC-3*hinI*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM).

Al expresar en *trans* el gen *hinI*, comprobamos que se restauraba la expresión del gen cromosómico interrumpido por el transposón, es decir, se recuperaba la capacidad para degradar histamina e ImAA. Esto indicaba que no se había producido un efecto polar sobre la expresión de algún gen corriente abajo del mutado, o que, en caso de que se hubiese producido, dicho gen no tenía un efecto directo ni sobre la

degradación de histamina ni sobre la de ImAA. Además, este hecho suponía que, sin duda alguna, la proteína codificada en *hinI* desempeñaba una función imprescindible e insustituible en la ruta degradativa, tanto de histamina como de ImAA.

Enzima codificada por *hinI*.

A continuación, se detalla la secuencia de la proteína codificada (HinI), así como la composición y número de aminoácidos, la masa molecular y el punto isoelectrónico.

HinI			
MCRVNIEMIYIMSSAASFRVEKDLLGTLEVPA DAYYGIQTLRAANNFHLSGVPLSHYPKLVVGL AMVKQAAADANRELGHLSDAKHAAISAACARL IKGDYHEQFVVDMIQGGAGTSTNMNANEVIAN IALEAMGHQKGEYQYLHPNNDVNMAQSTNDAY PTAIRLGLLLGHDALLASLDSLIIQAFAAKKE FDHVLKMGRTQLQDAVPMTLGQEFRAFATMT EDLNRLRSLAPELLTEINLGGTAIGTGINADP GYQMLAVQRLATISGQPLVPAADLIEATS DMG AFVLFSGMLKRTAVKLSKICNDLRLSSGPR GINEINLPARQPGSSIMPGKVNPIPEAVNQV AFAIMGNDLALTVAEEGQLQLNVMEPLIAYK IFDSIRLLQRAMDMLREHCIVGITANEQRCRE LVEHSIGLVTALNPYIGYENATRIARVALETG RGVLELVREEKLLDEEMLNDILRPENMIAPRL VPLKA	485 aminoácidos		
	Mw: 52560,76		pI: 5,63
	Ala (A)	59	Leu (L)
Arg (R)	26	Lys (K)	16
Asn (N)	27	Met (M)	21
Asp (D)	22	Phe (F)	11
Cys (C)	5	Pro (P)	21
Gln (Q)	20	Ser (S)	22
Glu (E)	30	Thr (T)	23
Gly (G)	36	Trp (W)	0
His (H)	11	Tyr (Y)	12
Ile (I)	32	Val (V)	30

Al comparar la secuencia de aminoácidos de HinI con otras existentes en la base de datos, se observó que esta proteína presentaba homología con una aspartato amonio liasa o aspartasa de *Pseudomonas putida* NBRC 14164 (100% de identidad) o de *Bacillus* sp. YM55-1 (92% de identidad). HinI pertenece a la superfamilia de las liasas, en concreto, forma parte de la familia de las liasas de clase I. Los miembros de esta familia, en su mayoría, catalizan reacciones de beta-eliminación en las que un enlace CN o CO se rompe, con la consiguiente liberación de fumarato como uno de los productos (NCBI Resource Coordinators, 2017). Por este motivo, también se las denomina fumarato hidratatasas.

En *P. putida* U, HinI sería la responsable de la conversión de ácido aspártico en ácido fumárico y amoniaco (Takagi *et al.*, 1985) (**Figura 83**).

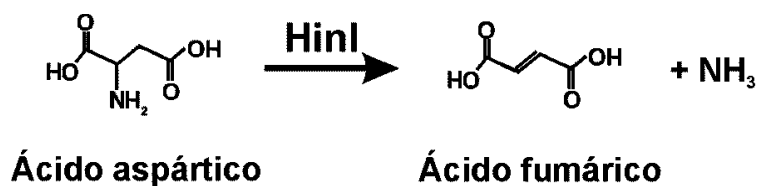


Figura 83. Reacción catalizada por HinI (aspartato amonio liasa o aspartasa) en *P. putida* U.

La desaminación del ácido aspártico catalizada por HinI se produciría a través de un mecanismo en el que interviene un carbanión, y en el cual participan iones metálicos divalentes actuando como activadores. La presencia de éstos contribuye a la estabilidad de la enzima (Ichihara *et al.*, 1955). Cabe destacar que las aspartasas bacterianas poseen una especificidad prácticamente absoluta por el sustrato, sin embargo, estas enzimas son bastante inespecíficas en lo que se refiere a los iones metálicos, los cuales se unen a un sitio activador separado del sitio activo de la enzima (Falzone *et al.*, 1988). Además, algunos estudios han demostrado que la cinética enzimática no lineal, que se observa bajo ciertas condiciones, es el resultado de la existencia de un sitio regulador separado de la enzima, en el cual, el sustrato puede desempeñar el papel de activador (Viola, 2000).

En un principio, se asignó a la aspartasa un rol meramente degradativo, mediante el cual se produciría amonio y fumarato que se incorporaría al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Halpern y Umbarger, 1960). Más tarde, se demostró que esta enzima puede catalizar la formación de aminoácidos mediante la aminación del fumarato (Vender y Rickenberg, 1964). De hecho, la aspartasa se emplea en la industria para producir L-aspartato a partir de fumarato. Sin embargo, por lo que respecta a HinI,

parece tener exclusivamente un papel catabólico o, en caso de participar efectivamente en la síntesis de aminoácidos, este papel sería un mecanismo secundario, ya que el crecimiento de los mutantes no se ve afectado cuando son cultivados en medios mínimos conteniendo como fuentes de carbono moléculas no relacionadas con la histamina y el ImAA. Esto indica que en todos ellos existe una síntesis endógena efectiva de todos los aminoácidos proteinogénicos, no viéndose afectada la síntesis proteica.

Residuos conservados y funcionalidad.

Diversos estudios estructurales y otros resultados obtenidos tras mutagénesis de la aspartasa en diferentes microorganismos han permitido establecer la ubicación del sitio activo de la enzima y han conducido a la identificación de un conjunto de aminoácidos que participan tanto en la unión al sustrato como en la catálisis (Viola, 2000). Éstos, en HinI, corresponden a **D-23**, **R-42**, **K-68**, **T-116**, **T-156**, **T-202**, **K-340**, y **S-155**, respectivamente (**Figura 84**). En particular, existe una secuencia altamente conservada situada en las inmediaciones de un sitio activo de lisina (**K-340**) que sirve como secuencia distintiva para identificar a los miembros de la familia fumarasa-aspartasa (**Figura 84**). Este residuo **K-340**, implicado en la unión al sustrato, se encuentra localizado en la cavidad del sitio activo de la enzima, por lo que se sospecha que desempeña un papel significativo en la actividad catalítica. La alteración de esta lisina, tanto como la de la **K-68** (localizada en la superficie del sitio activo), causa una pérdida de la actividad de la enzima.

Como se ha mencionado anteriormente, el sustrato (ácido L-aspartico) se une a un sitio activador que es diferente al sitio activo de la enzima (Karsten *et al.*, 1986). Se han identificado determinados residuos localizados en la hélice α pertenecientes a una

la unión al sustrato se marcan en verde y los relacionados con el sitio activador se marcan en amarillo. La zona donde se localiza el sitio activo de la enzima se señala subrayada.

Estructuras terciaria y cuaternaria.

Las aspartasas descritas en la literatura son activas como homotetrámeros. Así, la aspartasa de *E. coli* es activa cuando se encuentra como tetrámero, es decir, compuesta por cuatro subunidades idénticas de 52.000 Da (Takagi *et al.*, 1985). La enzima de *P. fluorescens* también es un homotetrámero con subunidades de 50.900 Da (Takagi *et al.*, 1986). De igual modo, la aspartasa de *Bacillus* sp. YM55-1 está compuesta por cuatro subunidades idénticas con pesos moleculares de 51.000 Da (Kawata *et al.*, 1999). En HinI (52.560,76 Da), al igual que en la aspartasa de *E. coli*, se pueden identificar en cada monómero 3 dominios orientados entre sí en forma de S alargada (**Figura 85**). El dominio N-terminal incluye los residuos 1-165 y está compuesto por dos láminas β antiparalelas, seguidas de cinco hélices α (**Figura 85, dominio 1**). El segundo dominio contiene los residuos 166-406 y está formado únicamente por hélices α (**Figura 85, dominio 2**). Éste es el dominio más conservado y es el que contiene el sitio catalítico de la enzima. El dominio C-terminal engloba los residuos 406-485 y consiste en dos motivos hélice-vuelta-hélice (**Figura 85, dominio 3**). Esta región tiene gran variabilidad, sin embargo, presenta un gran interés debido a que existe una correlación directa entre esta zona de la enzima y la actividad biológica de la misma. Por ejemplo, deleciones de determinados aminoácidos en este dominio confieren una nueva actividad biológica a la aspartasa, como la capacidad de potenciar específicamente la activación del plasminógeno en la coagulación sanguínea (Viola, 2000). Los miembros pertenecientes a esta familia poseen una elevada

homología estructural ya que constan de un haz central de 5 hélices que conecta los dominios N y C-terminal, siendo ambos de pequeño tamaño (**Figura 85**).



Figura 85. Modelo teórico de la estructura terciaria de HinI de *P. putida* U. Se realizó por modelado de homología a través del servidor PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015) utilizando como plantilla la estructura cristalina de la fumarato hidratasa de *Rickettsia prowazekii* (Phan *et al.*, 2011), obteniéndose un 100% de confianza en el modelado de 454 residuos (94% de la secuencia).

Análisis del intermediario acumulado por los mutantes afectados en el gen *hinI*.

En *P. putida* U, el ácido aspártico sólo es capaz de degradarse por acción de la enzima aspartasa (HinI). Por este motivo, se ha observado que el mutante *P. putida* U *hinI*::Tn5, que codifica dicha aspartasa, no es capaz de crecer en MM suplementado con ácido aspártico (10 mM) como única fuente de carbono, mientras que los mutantes afectados en genes que pertenecen al *cluster hin2* son capaces de degradarlo del mismo modo que la cepa silvestre (**Figura 86**). Además, los mutantes afectados en el gen *hinI* tampoco son capaces de asimilar la asparagina, la cual se cataboliza *via* ácido aspártico (Huerta-Zepeda *et al.*, 1997). Sin embargo, sí que son capaces de utilizar como única

fente de carbono el ácido glutámico y la glutamina, hecho que pone de manifiesto, de nuevo, la ausencia de relación entre el catabolismo de la histamina y el del aminoácido histidina.

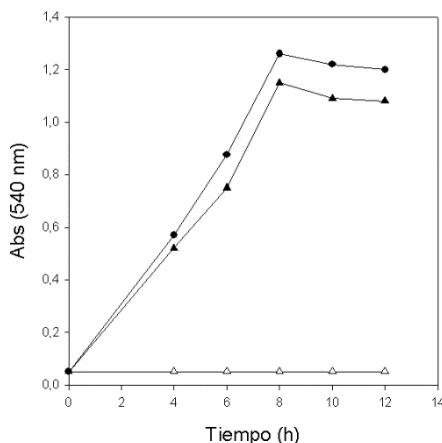


Figura 86. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinI::Tn5* (Δ) y de un mutante representativo del *cluster hin2* (▲) cuando se cultivaba en MM + ácido L-aspartico (10 mM).

Además, tal y como hemos mencionado anteriormente, el mutante afectado en el gen *hinI* acumulaba ácido aspártico en el caldo cuando se cultivaba en MM suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM), para soportar el crecimiento bacteriano, e histamina (10 mM) como fuente de precursores, por lo que podemos concluir que este compuesto actúa como intermediario de la ruta de degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U. El análisis de este catabolito se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) (**Figura 87**) ya que, como vimos en el apartado 2 de Resultados y Discusión de este trabajo, este compuesto no es detectable mediante el sistema de HPLC que se emplea para detectar la histamina, el ImAA y algunos de los intermediarios de la ruta.

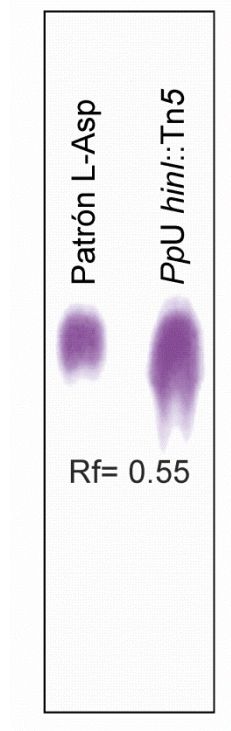


Figura 87. Identificación del ácido aspártico acumulado al final de la curva de crecimiento mediante TLC (Rf=0,55).

Adicionalmente, se analizó el intermediario acumulado por el mutante afectado en *hinI* mediante IR (**Figura 88**). Como se puede observar, las señales de infrarrojo del producto acumulado por el mutante y las del ácido L-aspártico comercial coinciden, lo que confirma los resultados obtenidos por TLC (**Figura 87**) y permite afirmar que *HinI* es la enzima responsable de catabolizar el ácido aspártico en *P. putida* U.

Tabla 19. Identificación de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U *hinJ*::Tn5. El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 81**.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinJ</i>	
Mutante 15 y 17	<p>E R R F V T Q P A F S R R I R S L E A A</p> <p>1681 CAGAGCGGCGTTTCGTCACCCAACCGGCCTTCAGCCGGCGTATCCGCA -Tn5- GCCTCGAAGCGG GTCTCGCCGCAAAGCAGTGGGTTGGCCGGAAGTCGGCCGCATAGGCGT CCGAGCTTCGCC</p>
Mutante 18	<p>P L F D L E G E G S V P L L A Y T A G A</p> <p>2161 AGCCGTGTTCGACCTGGAA -Tn5- GGTGAGGGCAGCGTGCCGTTGTTGGCCTATACCGCTGGCG TCGGCAACAAGCTGGACCTT CCACTCCCCTCGCACGGCAACAACCGGATATGGCGACCGC</p>
Mutante 42	<p>H H L E G G Q G E V V Q V A A A H S L A</p> <p>1861 TGCATCATCTTGAGGGCGGGCAGGGCGAGGTGTCAGGTG -Tn5- GCTGCGGCACACTCCCTGG ACGTAGTAGAACTCCC GCCCTCCCGCTCCACCACGTCCAC CGACGCCGTGTGAGGGACC</p>
Mutante 68 y 69	<p>T T V Y E T A M A D S L K S M A L E G M</p> <p>2272 ATACCACGG -Tn5- TCTATGAAACCGCCATGGCCGACAGCCTCAAGAGCATGGCGCTTGAGGGCA TATGGTGCC AGATACTTTGGCGGTACCGGCTGTGCGAGTTCTCGTACCGGAACCTCCCGT</p>

Expresión en *trans* del gen *hinJ*.

A continuación, se procedió a determinar si la incapacidad del mutante *P. putida* U *hinJ*::Tn5 para asimilar tanto la histamina como el ImAA se debía específicamente a la interrupción del gen *hinJ* o si, por el contrario, el transposón estaba ejerciendo un efecto polar sobre algún gen adyacente. Para ello, se amplificó mediante PCR el gen *hinJ* de *P. putida* U utilizando los oligonucleótidos HinJ.F y HinJ.R, y, posteriormente, se clonó en el plásmido replicativo pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *ApaI/SacI*. Esta construcción, pMC-3*hinJ* (**Tabla 8**), se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) al mutante afectado en *hinJ*. La cepa transformante obtenida, *P. putida* U *hinJ*::Tn5 pMC- 3*hinJ* (**Tabla 7**), era capaz de crecer tanto en histamina como en ImAA con la misma eficiencia que la cepa silvestre (**Figura 89**). Como en casos anteriores, los mutantes afectados en el gen *hinJ* eran capaces de asimilar la histidina como única fuente de carbono, lo que indicaba que este gen no interviene en el metabolismo general de la célula.

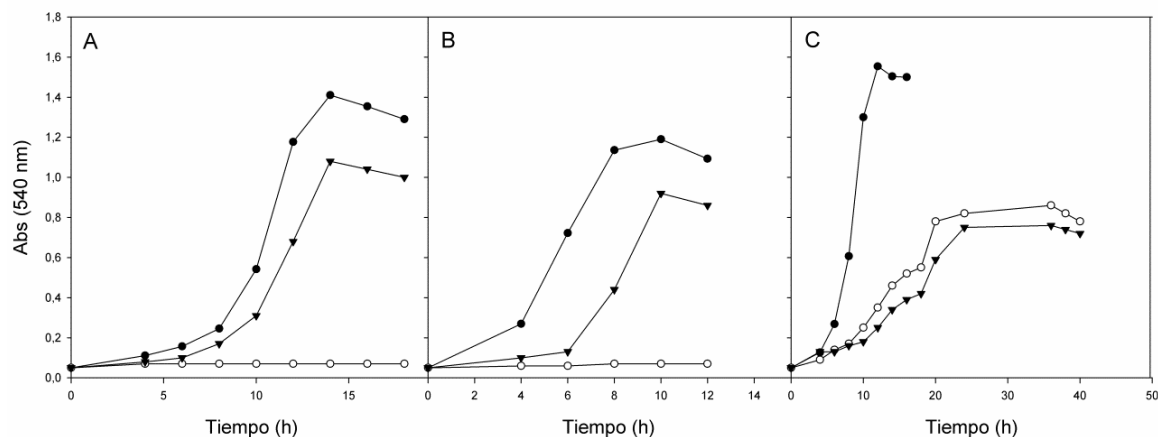


Figura 89. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinJ*::Tn5 (○) y del mutante complementado con el gen *hinJ* (*P. putida* U *hinJ*::Tn5 pMC-3*hinJ*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM).

El hecho de que la expresión en *trans* del gen *hinJ* en el mutante *P. putida* U *hinJ*::Tn5 restableciera la capacidad para degradar la histamina y el ImAA, evidenciaba que no había un ningún efecto polar sobre la expresión de algún gen corriente abajo del mutado, o que, en caso de haberlo, dicho gen no tenía una relación directa con la degradación de estos compuestos. Al mismo tiempo, la recuperación de este fenotipo indicaba que la proteína codificada en *hinJ* cumplía una función imprescindible e insustituible en esta vía catabólica.

Enzima codificada por *hinJ*.

Cuando se analizó el fragmento de DNA que contenía el marco abierto de lectura correspondiente al gen *hinJ* se identificó una proteína de 313 aminoácidos cuya secuencia se recoge a continuación. En el mismo esquema, se observa la composición aminoacídica de la misma, su peso molecular y el punto isoelectrico teórico correspondiente a esa proteína.

HinJ			
MCFVNLESKWLEDFSAALASTRSFSQAAERRFV TQPAFSRRIRSLAALGLQLVNRSRTPIELTE AGQLFLVTARTVVDQLSEILRHLHHLEGGQGE VVQVAAAHSIASGFFPRWVAQLRNDGLNIATR LVATNVGDAVHALREGGCDLMLAFYDPDAALQ MDAEIFPSLHMGNTMLPVCVAVDGEKPLFDL EGEGSVPLLAYTAGAFLGRSVNLLLRQRNLRY TTVYETAMADSLKSMALGEGMGIWVPRLSMRG ELERGELAVCGGSQWHVPLEIRLYRCALVRKA NVRLLWRKLEGTATVDPKVSQSPEK	313 aminoácidos		
	Mw: 34519,72		pI: 6,41
	Ala (A)	34	Leu (L)
Arg (R)	26	Lys (K)	7
Asn (N)	9	Met (M)	9
Asp (D)	12	Phe (F)	12
Cys (C)	5	Pro (P)	12
Gln (Q)	12	Ser (S)	20
Glu (E)	23	Thr (T)	15
Gly (G)	24	Trp (W)	5
His (H)	7	Tyr (Y)	5
Ile (I)	7	Val (V)	25

Al comparar la secuencia de aminoácidos de HinJ con las depositadas en la base de datos, observamos que esta proteína presenta homología con los reguladores transcripcionales de tipo LysR (LTTRs), mostrando un porcentaje de identidad del 78% y del 100% con LysR de *Streptococcus pneumoniae* y de *Pseudomonas putida* NBRC 14164, respectivamente (NCBI Resource Coordinators, 2017). Estas proteínas pueden actuar como activadores o represores de genes u operones.

Esta familia de reguladores transcripcionales es de las más abundantes en el reino procariota, aunque se han identificado genes ortólogos funcionales tanto en eucariotas como en arqueas. Los miembros pertenecientes a esta familia poseen una estructura conservada, con un motivo de hélice-vuelta-hélice (HTH) de unión a DNA en el extremo N-terminal, y un dominio de unión a la molécula moduladora en el extremo C-terminal. La unión de estos moduladores es fundamental para que los LTTRs desempeñen su función. A menudo, estos reguladores suelen constituir un ciclo de retroalimentación en el que un producto o un intermediario de un vía metabólica (generalmente activada por un LTTR) actúa como el modulador necesario para que se produzca la activación (co-inductor) o la represión (co-represor) transcripcional (Maddocks y Oyston, 2008).

En los LTTRs, y en concreto en HinJ, los residuos comprendidos entre las posiciones 20-80 son los más conservados y están directamente relacionados con la interacción con el DNA. Por el contrario, hay relativamente poca conservación aminoacídica en el extremo C-terminal (**Figura 90**). Esta región (entre los residuos 95 y 210) está integrada por dos subdominios α/β distintos (RD1 y RD2), que están conectados entre sí y que, en conjunto, forman la zona donde es probable que se una el modulador. Sin embargo, mediante estudios de mutagénesis, se ha identificado una región de aproximadamente 70-80 aminoácidos en el dominio C-terminal que también puede desempeñar un papel importante en la unión al DNA (Huang y Schell, 1991; Schell *et al.*, 1990).

HinJ	MCFVNLESKWLEDFSAALSTRSFSQAERRFVTQPAFSRRIRSLEAALGQLVNRSRTP I	60
Ec	--MAAVNLRHIEIFHAVMTAGSLTEAAHLLHTSQPTVSRELARFEKVIKLFERIRGRL	58
Sb	--MAAVNLRHIEIFHAVMTAGSLTEAAHLLHTSQPTVSRELARFEKVIKLFERVRGRL	58
St	--MAAVNLRHIEIFHAVMTAGNLTEAARLLHTSQPTVSRELARFEKVLGLTLFERTRGRL	58
Yp	--MPAISLRQIEIFHGVMTTGNLTEAALLLQTSQPTVSRELARFEQLVQLTLFERTVRGRL	58
Pe	---MKLTLRHIEVFRAIMAAGSVTGAARLLFTSQPTVSRELARMEQVTGLTLFEREGGRL	57
	: : * * .: .: .: ** .: ** .: ** .: : * * * .: *	
HinJ	ELTEAGQLFLVTARTVVDQLSEILRH---LHHLEGGQGEVVQVAAAHSLSAGFFPR---	113
Ec	HPTVQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGE---LSIACLPVFSQSFLPQLLQP	115
Sb	HPTVQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGE---LSIACLPVFSQSFLPQLLQP	115
St	HPTVQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGE---LSIACLPVFSQSFLPQLLQP	115
Yp	YPTVQGLRRLFEEVQRSYGLDRIKQAAEGIRQFQHAQ---LSIACLPVFSQSLLPAVCKP	115
Pe	VPTAQALLLIEEVERAFIGLERIDRFAQAIRNFEQGR---LAITCLPLFSQTLLPKVCKA	114
	* . : : . * . * : : . . : : . : : . : : . : *	
HinJ	WVAQLRNDGLNIATRL---VATNVGDVAHALREGGCDLMLAFYDPAALQMDAEIFPSLH	170
Ec	FLARYPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLG-----LTETLHTPAGTE--RTELL----	164
Sb	FLARYPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLG-----LTETLHTPAGTE--RTELL----	164
St	FLARYPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLG-----LTETLHAPAGTT--RTELL----	164
Yp	FIDRYPEVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLG-----FTENTQTPAGTQ--RHITLM----	164
Pe	FHQHHPGVSVSITAQESPLLEESLVAQQHDLG-----LTETGQVPRGAV--GELLF----	163
	: : .: .: : : : * * : * .: : :	
HinJ	MGNTEMLPVCVAVDG---EGKPLF---DLEGEVSVPLLAYTAGAFLGRSVNLLLRQRNLR	223
Ec	----SLDEVCVLPPGHPLAVKKVLTLPDDFHGENYISL---SRTDSYRQLLDQLFTENQVK	217
Sb	----SLDEVCVLPPGHPLAVKKVLTLPDDFHGENYISL---SRTDSYRQLLDQLFTENQVK	217
St	----TLNEVCVLPDHPPLAAKTVLTLPDDFHGENYISL---SRLDSYRQLLDQLFTENQVK	217
Yp	----TVNEVCVLPADHPLREKSVLTLPDDFHGENYISL---SRTDSYRQLLDQLFTENQVK	217
Pe	----SADMVCVLPDHPPLAAKTVLTLPDDFHGENYISL---SRLDSYRQLLDQLFTENQVK	216
	** .: * : : * .: .: * : : : : : : :	
HinJ	YTTVYETAMADSLKSMALEGMGIAWVPRLSMRGELERGERLA--VCGGSQWHVPLEIRLYR	281
Ec	RRMIVETHSAASVCAMVRAGVGVSVVNPLTALDYAA----SGLVRRRFSIAVPFPTVSLIR	273
Sb	RRMIVETHSAASVCAMVRAGVGVSVVNPLTALDYAA----SGLVRRRFSIAVPFPTVSLIR	273
St	RRMVVETHSAASVCAMVRAGVGVSVVNPLTALDYAA----SGVTVRRRFSIDVPFPTVSLIR	273
Yp	RRLVMETHSAASVCAMVRAGVGVSVVNPLTALDYLSKGRGSGVCRPFSVDIPFPTVSLIQ	277
Pe	RRTVIETTSAAASVCAMVRQGLGVAIINPLSGLEAGQ---GGLPIRRLSLSVPYQVMLIR	272
	: ** * * : : * .: * : : : * : .: * : * :	

HinJ	CALVRKANVR-LLWRKLEGTATVDPKVSQSPEK-----	313
Ec	PLHRPSSALVQAFSEHLQ---AGLPKLVTSLDAILSSATTA	311
Sb	PLHRPSSALVQAFSEHLQ---AGLPKLVTSLDAILSSATTA	311
St	PLHRPASALVDAFSKHLQ---THLSRLVEPLEVILGPMTKA	311
Yp	PLHRPSSTLVDTFVGHLK---QQTTLFQQRLATVIAPAC--	313
Pe	PELRPASAVLAPFCEALR---VQARAMAGALAKGF-----	304
	: : : * . .	

Figura 90. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HinJ de *P. putida* U y de diferentes LTTRs de *Escherichia coli* (Ec) (ANK03160.1), *Shigella boydii* (Sb) (ACD08223.1), *Salmonella typhimurium* (St) (AMM00824.1), *Yersinia pseudotuberculosis* (Yp) (CAH22284.1) y *Pseudomonas entomophila* (Pe) (CAK16334.1).

Regulación transcripcional de los LTTRs: caja LTTR.

En este tipo de reguladores transcripcionales, el sitio de unión del modulador se suele encontrar dentro de la región intergénica existente entre el gen que codifica el regulador y su gen/operón asociado. Este sitio de unión (puede haber varios) también se puede localizar corriente arriba de genes distantes regulados por un LTTR. El sitio de unión del represor (RBS), que posee el motivo conservado T-N₁₁-A, generalmente se ubica cerca de la posición -65 en relación con el inicio de la transcripción. El sitio de unión del activador (ABS), para el que no se ha identificado ninguna secuencia conservada, se localiza entre el RBS y el promotor, y, a menudo, se encuentra alrededor de la posición -35 (Porrúa *et al.*, 2007). Sin embargo, se han identificado otros sitios de unión tan lejanos como -218 pb con respecto a la región promotora, así como sitios de unión internos (+350 pb) (Viswanathan *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 1995).

Estructura y función de los LTTRs.

La mayoría de los reguladores transcripcionales que contienen un dominio HTH se dividen en dos grupos: activadores y represores de la transcripción. Los activadores transcripcionales, característicamente, tienen el HTH ubicado en el extremo C-terminal, mientras que los represores lo tienen en el extremo N-terminal (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). Sin embargo, los LTTRs son una excepción, ya que el dominio HTH está

ubicado en el extremo N-terminal (**Figura 91**), situado a unos 20-90 aminoácidos de este extremo de la proteína, independientemente de si el LTTR está activando o reprimiendo la transcripción de sí mismo o del gen (o genes) que está regulando.

En la **Figura 91** se puede observar el dominio HTH de HinJ, típico de los LTTRs, situado en el extremo N-terminal de la proteína, el cual está altamente conservado y, como mencionamos, está directamente relacionado con la unión al DNA.

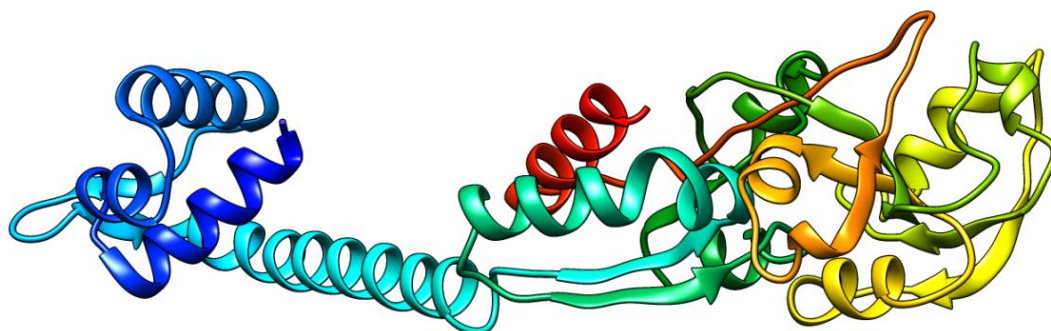


Figura 91. Modelo teórico de la estructura terciaria de la proteína HinJ de *P. putida* U donde podemos observar el dominio HTH (hélice-vuete-hélice) situado en el extremo N-terminal (azul oscuro). Se realizó por modelado de homología a través del servidor PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015) utilizando como plantilla la estructura cristalina de un regulador de tipo LysR de *Neisseria meningitidis* (Sainsbury *et al.*, 2009), obteniéndose un 100% de confianza en el modelado de 296 residuos (98% de la secuencia).

Activación transcripcional y autoregulación negativa.

Un ejemplo claro del probable modo de actuación de la proteína HinJ es el regulador IlvY, considerado como un prototipo de regulación por LTTR, además de ser el representante más estudiado de esta familia en *E. coli* y en *Salmonella* spp. (Blazey y Burns, 1980; Rhee *et al.*, 1999). IlvY se encuentra formando parte de un sistema compuesto por dos genes (*ilvY* y *ilvC*) que se transcriben a partir de promotores divergentes. La proteína IlvY exhibe una regulación clásica de tipo LTTR, según la

cual, la expresión de *ilvY* está autorregulada negativamente por IlvY, mientras que el mismo IlvY activa la expresión de *ilvC*. IlvC es una acetohidroxiácido isomeroreductasa que interviene en las vías biosintéticas paralelas de L-valina y de L-isoleucina, las cuales están catalizadas por las mismas enzimas que actúan sobre sustratos diferentes (Biel y Umbarger, 1981). Los sustratos de IlvC son los moduladores de IlvY, y son necesarios para que se produzca la activación transcripcional de *ilvC*, determinando un ciclo de retroalimentación (Blazey y Burns, 1980). Este tipo de regulación es muy común en los LTTRs. Éste podría ser el caso de HinJ y HinI, donde el ácido aspártico (sustrato de HinI) actuaría como co-inductor de HinJ, proteína necesaria para la activación transcripcional del gen *hinI*.

Además, el mutante *P. putida* U *hinJ*::Tn5 no era capaz de crecer en ácido aspártico como única fuente de carbono y, cuando se cultivaba en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), acumulaba aspartato en el caldo, tal y como ocurría en los mutantes afectados en el gen *hinI*. Por lo tanto, la hipótesis que se planteó fue que HinJ podría actuar como activador transcripcional de *hinI*, gen implicado directamente en el catabolismo de aspartato.

Por este motivo, se procedió a expresar en *trans* constitutivamente el gen *hinI* en el mutante afectado en el gen *hinJ*. El resultado fue que la cepa transformante *P. putida* U *hinJ*::Tn5 pMC-3*hinI* (**Tabla 7**) recuperaba la capacidad para asimilar la histamina y el ImAA (**Figura 92**), con lo que pudimos demostrar experimentalmente que HinJ es el activador transcripcional de HinI.

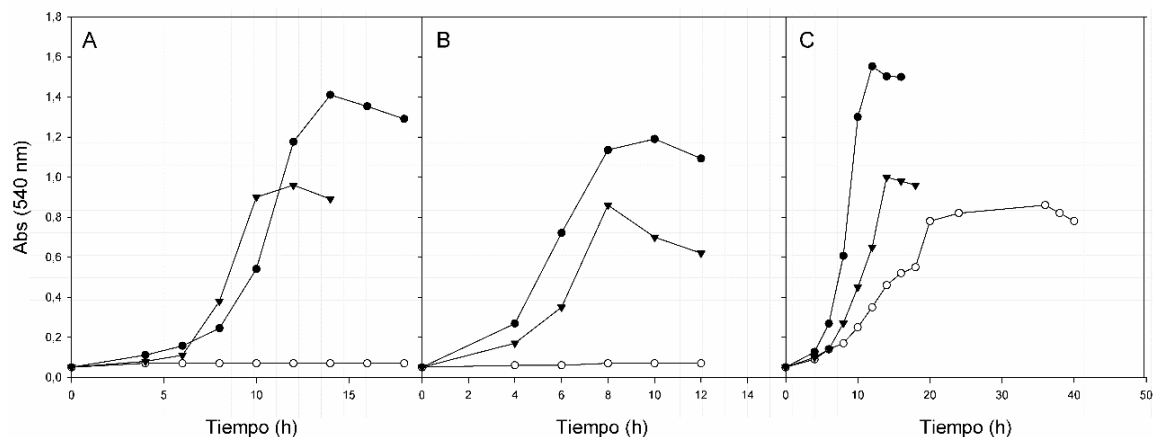


Figura 92. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinJ::Tn5* (○) y del mutante complementado con el gen *hinI* (*P. putida* U *hinJ::Tn5* pMC-3*hinI*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM).

4.3. Gen *hinK*.

Localización del punto de inserción.

Cuando se procedió a analizar el punto de inserción del transposón en los mutantes 3, 45, 46, 47, 48 y 51, se observó que el Tn5 se había insertado en un gen (*hinK*) (Tabla 20) que, al igual que los mutantes afectados en el gen *hinF*, acumulaba ImAA en el caldo de cultivo (MM + 10 mM 4-OH-PhAc + 10 mM histamina). A todos ellos los denominamos como *P. putida* U *hinK::Tn5* (Tabla 7). A continuación se muestra el fragmento secuenciado del genoma de *P. putida* U donde se localiza el gen *hinK*, así como el ORF codificado en él (Figura 93).

```

hinK → M A A Y T L R Q L K Y F V T T V E A G
1  CCCGTGGCTGCCTATACCCTGCGACAACCTCAAGTACTTCGTCCACCACCGTGGAGGCCGGT
   GGGCACCAGACGGATATGGGACGCTGTTGAGTTCATGAAGCAGTGGTGGCACCTCCGGCCA

   S V A E A S R Q L Y I A Q P S I S T A I
61 AGCGTTGCCGAGGCCTCTCGCCAGCTGTACATCGCCCAGCCGTCCATTTCCACGGCCATC
   TCGCAACGGCTCCGGAGAGCGGTGCACATGTAGCGGGTCGGCAGGTAAAGGTGCCGGTAG

```

K S L E E S F G V Q L F I R H H A Q G V
 121 AAGAGCCTGGAAGAAAGTTTCGGCGTGCAGCTGTTTCATTCGCCACCATGCCAGGGTGTG
 TTCTCGGACCTTCTTTCAAAGCCGCACGTCGACAAGTAAGCGGTGGTACGGGTCCCACAC

 S L T P S G K R F Y A K T R S L L Q M A
 181 TCGTTGACGCCCAGCGCAAGCGTTTCTACGCCAAGACCCGATCCCTGCTGCAGATGGCC
 AGCAACTGCGGGTCCCGTTCGCAAAGATGCGGTTCTGGGCTAGGGACGACGTCTACCGG

 H E F E Q N A L A D N D T V A G Q I D I
 241 CACGAGTTCGAGCAGAACGCCCTGGCTGACAACGACACCGTCGCCGGGCAGATCGACATC
 GTGCTCAAGCTCGTCTTGGGGACCGACTGTTGCTGTGGCAGCGGCCCGTCTAGCTGTAG

 G C F E T V A P L Y L P R L I A A F R Q
 301 GGCTGTTTCGAAAACCGTGGCACCCTGTATCTGCCGCGCCTGATCGCCGCCTTCCGCCAG
 CCGACAAAAGCTTTGGCACCCTGGCAACATAGACGGCGCGGACTAGCGGCGGAAGGCGGTC

 R Y P G V D I R L R D G E Q Q E L I Q G
 361 CGTTACCCAGGCGTGGATATCCGCCTGCGCGACGGCGAGCAGCAGGAGCTGATCCAGGGC
 GCAATGGGTCCGCACCTATAGGCGGACGCGCTGCCGCTCGTCTCGTCTCGACTAGGTCCCG

 L T A G T F D L A F L Y D H D L D G T I
 421 CTGACGGCCGGAACGTTTCGACCTGGCGTTCCTCTACGATCATGACCTGGACGGCACCATC
 GACTGCCGGCCTTGCAAGCTGGACCGCAAGGAGATGCTAGTACTGGACCTGCCGTGGTAG

 E A E P L M P P Q K P Y V L L P E N H R
 481 GAAGCCGAGCCTCTGATGCCGCCGCAAAAACCTTACGTGCTGCTGCCAGAAAACCACCGC
 CTTCCGGCTCGGAGACTACGGCGGGCTTTTTGGAATGCACGACGACGGTCTTTTGGTGGCG

 F A G Q A Q V S L R D L C P E P M I L L
 541 TTTGCCGGCCAGGCCAGGTATCGCTGCGTGACCTGTGCCCGGAGCCGATGATCCTGCTG
 AAACGGCCGGTCCGGGTCCATAGCGACGCACTGGACACGGGCCCTCGGCTACTAGGACGAC

 D V A P S R T Y F V S L F N E M G L T P
 601 GACGTGGCTCCCAGCCGACCTACTTCGTGACCTGTTCAACGAGATGGGCTTGACGCCG
 CTGCACCGAGGGTCCGGCTGGATGAAGCAGTCGGACAAGTTGCTCTACCCGAACCTGCCGG

 N I V F S S P S I E M V R G M V G Q G F
 661 AACATCGTCTTCAGCTCACCGTTCGATCGAGATGGTGCGGGGCATGGTCCGGGCAGGGTTTC
 TTGTAGCAGAAGTCGAGTGGCAGCTAGCTCTACCACGCCCGTACCAGCCCGTCCCAAAG

 G F S L L V T R P H S E Y T Y D G Q R L
 721 GGTTTTTCGCTGCTGGTGACCCGACCGCATTCGGAATACACCTACGACGGCCAGCGCCTG
 CCAAAAAGCGACGACCACTGGGCTGGCGTAAGCCTTATGTGGATGCTGCCGGTCCGGGAC

 A L L D I A E P V A L S G L A A A W L K
 781 GCCCTGTTGGATATCGCCGAGCCGGTGGCGCTGTCCGGGCTGGCGGCGCGTGGTTGAAA
 CGGGACAACCTATAGCGGCTCGGCCACCGCGACAGCCCCGACCGCCGCGCACCAACTTT

 R V Q L T K P A Q L F V E F C R E E L A
 841 CGGGTGCAATTGACCAAGCCTGCACAGTTGTTTGTGGAGTTTTGCCGGGAAGAAGTGGCG
 GCCACGTTAACTGGTTCGGACGTGTCAACAAACACCTCAAACGGCCCTTCTTGACCGC

 K F ■
 901 AAGTTCTGAGGC 912
 TTCAAGACTCCG

Figura 93. Fragmento secuenciado del genoma de *P. putida* U donde se localiza el gen *hinK*, así como el ORF codificado.

Tabla 20. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U *hinK*::Tn5. El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 93**.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinK</i>	
Mutante 3, 48 y 51	<p style="text-align: center;">M A A Y T L R Q L K Y F V T T V E A G</p> <p>1 CCGTGGCTGCCTATACCC -Tn5- TGCACAACCTCAAGTACTTCGTCACCACCGTGGAGGCCGGT GGGCACCGACGGATATGGG ACGCTGTTGAGTTCATGAAGCAGTGGTGGCACCTCCGGCCA</p>
Mutante 45 y 47	<p style="text-align: center;">F A G Q A Q V S L R D L C P E P M I L L</p> <p>541 TTGCGCGC -Tn5- CAGGCCAGGTATCGCTGCGTGACCTGTGCCCGAGCCGATGATCCTGCTG AAACGGCCG GTCCGGTCCATAGCGACGCACTGGACACGGGCCCTCGGCTACTAGGACGAC</p>
Mutante 46	<p style="text-align: center;">N I V F S S P S I E M V R G M V G Q G F</p> <p>661 AACATCGTCTTCA -Tn5- GCTCACCGTCGATCGAGATGGTGCGGGCATGGTCCGGCAGGGTTTC TTGTAGCAGAAGT CGAGTGGCAGCTAGCTCTACCACGCCCGTACCAGCCCGTCCCAAAG</p>

Expresión en *trans* del gen *hinK*.

Con objeto de determinar si se revertía la capacidad para degradar histamina e ImAA cuando en este mutante se expresaba en *trans* el gen *hinK* (*P. putida* U Tn5::*hinK*) y corroborar, además, que la incapacidad de degradar histamina e ImAA no se debía a un efecto polar causado por el transposón, el gen *hinK* se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos HinK.F y HinK.R y se clonó en el vector pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *ApaI/SacI*. Esta construcción (pMC-3*hinK*) (**Tabla 8**) se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) al mutante afectado en el gen *hinK*, observando que la cepa transformante obtenida (*P. putida* U Tn5::*hinK* pMC-3*hinK*) (**Tabla 7**) recuperaba la capacidad de crecer en MMs que contenían histamina o ImAA como únicas fuentes de carbono y energía (**Figura 94**). Al igual que el resto de mutantes, *P. putida* U Tn5::*hinK* era capaz de metabolizar el aminoácido histidina al igual que *P. putida* U, por lo que pudimos afirmar que las funciones celulares generales no se encontraban afectadas.

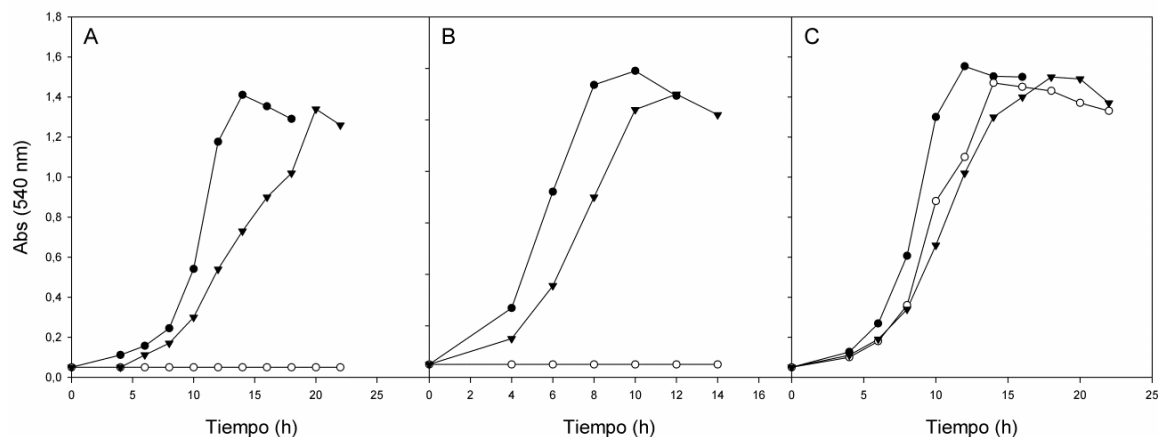


Figura 94. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* U (●), del mutante *P. putida* U *hinK*::Tn5 (○) y del mutante complementado con el gen *hinK* (*P. putida* U *hinK*::Tn5 pMC-3*hinK*) (▼) cuando se cultivaba en A) MM + histamina (10 mM), B) MM + ImAA (10 mM) y C) MM + histidina (10 mM).

El hecho de que la expresión en *trans* del gen *hinK* restaurase la capacidad para degradar histamina e ImAA, indicaba que, como hemos visto en casos anteriores, no se producía un efecto polar sobre la expresión de algún gen corriente abajo del mutado. A su vez, esto indicaba, sin lugar a dudas, que la proteína codificada por *hinK* desempeñaba una función imprescindible e insustituible en la ruta degradativa, tanto de la histamina como del ImAA.

Enzima codificada por *hinK*.

A continuación, se muestra el peso molecular, punto isoelectrico teórico, composición y número de aminoácidos de la proteína codificada por este gen (HinK).

HinK			
MAAYTLRQLKYFVTTVEAGSVAEASRQLYIAQ PSISTAIKSLEESFGVQLFIRHHAQGVSLTPS GKRFYAKTRSLQLQMAHEFEQNALADNDTVAGQ IDIGCFETVAPLYLPRLIAAFRQRYPGVDIRL RDGEQQELIQGLTAGTFDLAFLYDHDLDGTIE AEPLMPPQKPYVLLPENHRFAGQAQVSLRDLC PEPMILLDVAPSRTYFVSLFNEMGLTPNIVFS SPSIEMVRGMVGGFGFSLLVTRPHSEYTYDG QRLALLDIAEPVALSGLAAAALWLRVQLTKPAQ LFVEFCREELAKF	301 aminoácidos		
	Mw: 33536,53		pI: 5,44
	Ala (A)	30	Leu (L)
Arg (R)	18	Lys (K)	8
Asn (N)	5	Met (M)	7
Asp (D)	13	Phe (F)	18
Cys (C)	3	Pro (P)	18
Gln (Q)	19	Ser (S)	18
Glu (E)	20	Thr (T)	16
Gly (G)	19	Trp (W)	1
His (H)	6	Tyr (Y)	11
Ile (I)	14	Val (V)	19

HinK presentaba un elevado porcentaje de identidad con respecto a otras proteínas identificadas en la base de datos como proteínas pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales de tipo LysR (LTTRs) de *P. putida* GB-1 (98%) y de *Burkholderia gladioli* (83%) (NCBI Resource Coordinators, 2017). HinK pertenece a la misma familia de reguladores transcripcionales que HinJ, los cuales pueden actuar como activadores o represores de genes u operones.

Como se ha explicado anteriormente, esta familia de reguladores transcripcionales es de las más abundantes en el reino procariota, y se caracterizan por poseer una estructura conservada de hélice-vuelta-hélice (HTH) de unión a DNA en el extremo N-terminal, y un dominio en el extremo C-terminal de unión al modulador, el cual es fundamental para que los LTTRs desempeñen su función (Maddocks y Oyston, 2008).

Al igual que sucedía en HinJ, en la proteína HinK los residuos más conservados se encuentran entre las posiciones 20-80 (extremo N-terminal), los cuales están estrechamente relacionados con la interacción con el DNA. Sin embargo, la conservación de aminoácidos disminuye a medida que nos acercamos al extremo C-terminal (**Figura 95**). Este hecho se repite cuando se comparan las secuencias

aminoacídicas de HinK y de HinJ (23% de identidad), donde los residuos más conservados se encuentran el extremo N-terminal (**Figura 96**).

HinK	MAAYTLRQLKYFVTVEAGSVAEASRQLYIAQPSISTAIKSLEESFGVQLFIRHHAQGV	60
Ec	MAAVNLRHIEIFHAVMTAGSLTEAAHLLHTSQPTVSRELARFEKVIKLFERIRGR	60
Sb	MAAVNLRHIEIFHAVMTAGSLTEAAHLLHTSQPTVSRELARFEKVIKLFERIRGR	60
St	MAAVNLRHIEIFHAVMTAGNLTEAARLLHTSQPTVSRELARFEKVLGLTLFERT	60
Yp	MPAISLRQIEIFHGVMTTGNLTEAALLLQTSQPTVSRELARFEQLVQLTLFERV	60
Pe	-MKLTLRHIEVFRAIMAAGSVTGAARLLFTSQPTVSRELARMEQVTGLTLFEREG	59
	.***::: * : :*.::: * : * :**::* : :*: : ** * .:	
HinK	LTPSGKRFYAKTRSLLOMAHEFEQNALADNDTVAGQIDIGCFETVAPLYLPR	120
Ec	T-VQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGELSIACLPVFSQSFLP	119
Sb	T-VQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGELSIACLPVFSQSFLP	119
St	T-VQGLRRLFEEVQRSWYGLDRIVSAAESLREFRQGELSIACLPVFSQSFLP	119
Yp	T-VQGLRRLFEEVQRSYYGLDRIKQAAEGIRFQHAQLSIACLPVFSQSLLPA	119
Pe	T-AQALLLIEEVERAFIQLERIDRFAQAIRNFEQGRLAITCLPLFSQTLLPK	118
	.. : :.. ..: * . .: .: * *: .: ** : * :	
HinK	YPGVDIRLRDGEQQELIQGLTAGTFDLAFLYDHDLDGTIEAEPLMPPQKPY	180
Ec	YPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLGLTETLHTPAGTERTELLSL-DEVC	178
Sb	YPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLGLTETLHTPAGTERTELLSL-DEVC	178
St	YPDVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLGLTETLHAPAGTTRTELLTL-NEVC	178
Yp	YPEVSLNIVPQESPLLEEWLSAQRHDLGFTENTQTPAGTQRHTLMTV-NEVC	178
Pe	HPGVSVSITAQESPLLEESLVAQQHDLGLTETGQVPRGAVGELLFSA-DMVC	177
	:* * .: : * . * : * * .**.: . * : . : ** * :	
HinK	AGQAQVSLRDLCEPEMILLDVA-PSRTYFVSLFNEMGLTPNIVFSSPSIEM	239
Ec	AVKKVLTTPDDFHGENYISLRTDSYRQLLDQLFTENQVKRRMIVETHSAASV	238
Sb	AVKKVLTTPDDFHGENYISLRTDSYRQLLDQLFTEHQVKRRMIVETHSAASV	238
St	AAKTVLTTPDDFQGENFISLRLDSYRQLLDLTLFAEHQVKRRMVETHSAASV	238
Yp	REKSVLTPQDFNGENFVSVLSDYRQLLDNLFAEEKVTRRLVMETHSAASV	238
Pe	LAKPVLELHDFHEVDFINLASLDSYRQLDRHFREAGVNRRTVIETTSAASV	237
	: : * : : * * : * *: * : . ** *	
HinK	GFSLLVTRPHSEYTYDGQR----LALLDIAEPVALSGLAAAWLKRVQLTKPA	294
Ec	GVSVVNPLTALDYAA----SGLVRRFSAIVPFTVSLIR-----P-LHRPSS	287
Sb	GVSVVNPLTALDYAA----SGLVRRFSAIVPFTVSLIR-----P-LHRPSS	287
St	GVSIVNPLTALDYAA----SGVTVRRFSAIDVPFTVSLIR-----P-LHRP	287
Yp	GVSIVNPLTALDYLSKGRGSGVCRPFSVDIPFTVSLIQ-----P-LHRPS	291
Pe	GVAIINPLSGLEAGQ----GGLPIRRLSLSVPYQVMLIR-----P-ELRP	286
	*.::: : : :.::: * : : : * : .: ** .: *	
HinK	RE---ELAKF-----	301
Ec	EHLQAGLPKLVTSLDAILSSATTA	311
Sb	EHLQAGLPKLVTSLDAILSSATTA	311
St	KHLQTHLSRLVEPLEVILGPMTRKA	311
Yp	GHLKQQTTLFQQRLATVIAPAC--	313
Pe	EALRVQARAMAGALAKGF-----	304
	:	

Figura 95. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HinK de *P. putida* U y de diferentes LTTRs de *E. coli* (Ec) (ANK03160.1), *S. boydii* (Sb) (ACD08223.1), *S. typhimurium* (St) (AMM00824.1), *Y. pseudotuberculosis* (Yp) (CAH22284.1) y *P. entomophila* (Pe) (CAK16334.1).

```

HinK  --MAAYTLRQLKYFVTTVEAGSVAEASRQLYIAQPSISTAIKSLEESFGVQLFIRHHAQG 58
HinJ  MCFVNLESKWLEDFSAALSTRSFSQAAERRFVTQPAFRRIRSLAALGLQLVNRSR-TP 59
      :.      : * : * : ..: * : : : : : : : : : : * : * : * : * : * : * : * :
HinK  VSLTPSGKRFYAKTRSLQMAHEFEQNALADNDTVAGQIDIGCFETVAPLYLPRLIAAFR 118
HinJ  IELTEAGQLFLVTARTVVDQLSEILRHLHHLEGGQGEVVQVAAAHSLSGFFPRWVAQLR 119
      :. * * : * : * : : : : : * : : : : : : : : : : : : : : * : * : * : * :
HinK  QRYPGVDIRLRDGEQQELIQGLTAGTFDLAFL-YDHDLDGTIEAEPLMPPQKPYVLLPEN 177
HinJ  NDGLNIATRLVATNVGDAVHALREGGCDLMLAFYDPDAALQMDAEI-F-----PSL 169
      : . : * * : : : : * * * * : * * * : : * * : : * * :
HinK  HRFAGQAQVSLRDLCP---EPMILLDVAPSRTYFVSLFNEMGLTPNIVFSSPSIEMVRGM 234
HinJ  HM--G--NTEMLPVCVAVDGEKPLFDLE-----GEGSVPLLAYTAG-----AF 208
      * * : : : : * * * * : * * * : : * * : : : : : :
HinK  VGQGFGLVTRPHSEYTYDQGRLLALLDIAEPVALSGLAAAWLKRVLTKPAQL-FVEF 293
HinJ  LGRS--VNLLLRQNLRYTT-VYETAMADSLKSMALGEMGIAWVPRLSMRGELERGELAV 265
      : * : . . * * : : : * * . * : * : : * * . * : * * : * : : : :
HinK  CREELAKF----- 301
HinJ  CGGSQWHVPLEIRLYRCALVRKANVRLLRKLEGTATVDPKVSQSPEK 313
      * . : .

```

Figura 96. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de HinK y de HinJ de *P. putida* U.

Estructura y función de los LTTRs.

Cuando se discutía acerca de la estructura de HinJ (pág. 255), se explicaba que la mayoría de los reguladores transcripcionales que contienen un dominio HTH podían actuar como activadores o represores de la transcripción. Por norma general, este dominio HTH está localizado en el extremo C-terminal de la proteína en el caso de los activadores transcripcionales, o en el extremo N-terminal en el caso de los represores (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). No obstante, HinK, al ser una proteína perteneciente a la familia LTTR, tiene el dominio HTH situado en el extremo N-terminal (**Figura 97**), independientemente de si esta proteína activa o reprime la transcripción de sí mismo o del gen (o genes) que esté regulando.

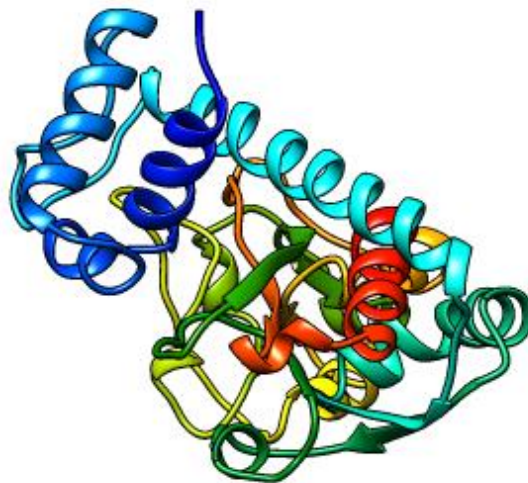


Figura 97. Modelo teórico de la estructura terciaria de HinK de *P. putida* U modelada por homología con referencia a proteínas de la familia LTTR, donde podemos observar el dominio HTH (hélice-vuelta-hélice) situado en el extremo N-terminal (azul oscuro). Se realizó por modelado de homología a través del servidor PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015) utilizando como plantilla la estructura cristalina de un regulador de tipo LysR de *N. meningitidis*, obteniéndose un 100% de confianza en el modelado de 296 residuos (98% de la secuencia).

4.4. Organización génica de los genes responsables del catabolismo de histamina y de ImAA en *P. putida* U.

Una vez analizados los diferentes *clusters* implicados en la degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U, concluimos que los ORFs afectados están repartidos en 7 genes, divididos en tres regiones de DNA con diferente localización cromosómica, y que corresponden a tres organizaciones génicas diferentes: *cluster hin2* (*hinGHFL*), *cluster hin3* (*hinIJ*) y el gen *hinK* (**Figura 98**).

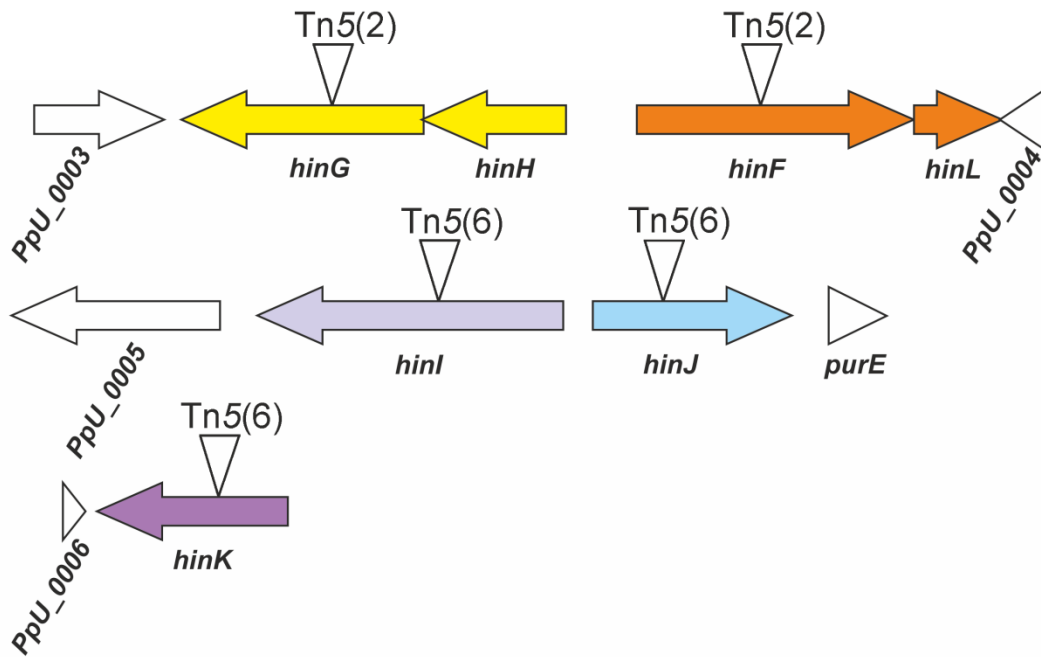


Figura 98. Organización de los diferentes ORFs identificados en el genoma de *P. putida* U al analizar los puntos de inserción del transposón Tn5 en los distintos mutantes incapaces de degradar la histamina ni el ImAA. También se muestra en el esquema los genes afectados por el transposón Tn5. Entre paréntesis se indica el número de mutantes en los que el transposón Tn5 se había insertado en el mismo gen. Las flechas blancas corresponden a los ORFs adyacentes secuenciados, los cuales no están implicados en la degradación de histamina.

4.5. Regulación de la ruta catabólica: actuación de los genes

hinK Y *hinJ*.

4.5.1. Regulador transcripcional HinK.

El siguiente abordaje experimental consistió en determinar qué gen o genes regulaba HinK, analizando, para ello, la expresión de los genes que conforman los clusters *hin2* (*hinGHFL*) y *hin3* (*hinIJ*), así como el gen *hinK*, mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. En primer lugar, se obtuvo el RNA y, posteriormente, el cDNA de la cepa silvestre (*P. putida* U) y del mutante afectado en el gen *hinK*

(*P. putida* U Tn5::*hinK*) (**Tabla 7**) en las condiciones descritas en el apartado 13 de Materiales y Métodos. A continuación, se llevó a cabo la cuantificación del cDNA obtenido en ambas condiciones mediante la técnica de PCR cuantitativa con el objetivo de estudiar la expresión de los genes *hinGHFL*, *hinIJ* y *hinK*. Para ello, se realizaron amplificaciones de un tamaño entre 150-200 pb, usándose para cada gen (*hinF*, *hinL*, *hinH*, *hinG*, *hinI*, *hinJ* y *hinK*) los oligonucleótidos que figuran en la **Tabla 14** de Materiales y Métodos.

Como se observa en la **Figura 99**, todos los genes se estaban expresando en la cepa silvestre (*P. putida* U). Sin embargo, en el mutante *P. putida* U Tn5::*hinK* los genes *hinF*, *hinL*, *hinH* y *hinG* no se expresaron. Tampoco hubo expresión del gen *hinK* (actuaba como control negativo), ya que se encontraba interrumpido por el transposón. Por otro lado, en la cepa mutante observamos que la expresión de los genes *hinI* y *hinJ* no se ve afectada por la interrupción del gen *hinK*.

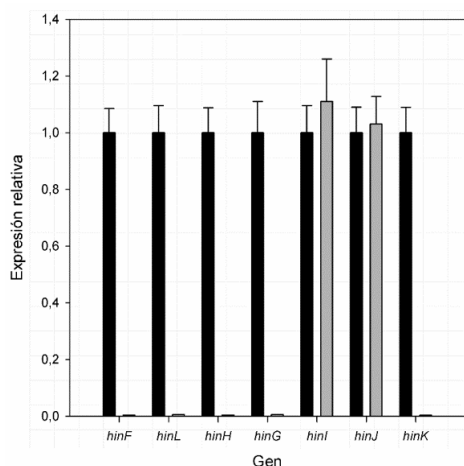


Figura 99. Estudio de la expresión de los genes *hinF*, *hinL*, *hinH*, *hinG*, *hinI*, *hinJ* y *hinK* en *P. putida* U (barras negras) y en el mutante *P. putida* U *hinK*::Tn5 (barras grises). Las barras de error indican la desviación estándar.

Estos resultados, junto con el hecho de que el mutante *P. putida* U *hinK*::Tn5 acumule ImAA en el caldo, al ser cultivado en 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), demostraban que el regulador transcripcional HinK actúa exclusivamente como un activador de la transcripción de los genes que conforman el *cluster hin2* (*hinGHFL*).

4.5.2. Regulador transcripcional HinJ.

Tal y como se vió con HinK, se llevó a cabo un estudio para dilucidar qué gen o genes estaban regulados por el regulador transcripcional HinJ. Para alcanzar dicho objetivo, se analizó la expresión de los genes que conforman los *clusters hin2* (*hinGHFL*) y *hin3* (*hinIJ*), así como del gen *hinK*, mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Inicialmente, se extrajo el RNA y, seguidamente, el cDNA de la cepa silvestre (*P. putida* U) y del mutante afectado en el gen *hinJ* (*P. putida* U Tn5::*hinJ*) (**Tabla 7**) siguiendo el protocolo detallado en el apartado 13 de Materiales y Métodos.

Por último, se llevó a cabo la cuantificación del cDNA obtenido en ambas condiciones mediante la técnica de PCR cuantitativa con el objetivo de estudiar la expresión de los genes *hinGHFL*, *hinIJ* y *hinK*. Para ello, se realizaron amplificaciones de un tamaño entre 150-200 pb, usándose para cada gen (*hinF*, *hinL*, *hinH*, *hinG*, *hinI*, *hinJ* y *hinK*) los oligonucleótidos que figuran en la **Tabla 14** de Materiales y Métodos.

Como observamos en la **Figura 100**, todos los genes se estaban expresando en la cepa control (*P. putida* U). Sin embargo, en la cepa mutante (*P. putida* U Tn5::*hinJ*) no había expresión por parte del gen *hinI*, así como tampoco lo hacía el propio gen *hinJ*, ya

que está interrumpido por el transposón. Sin embargo, observamos que la expresión de los genes del *cluster hin2* (*hinGHFL*) y del gen *hinK* no se ve afectada por la interrupción del gen *hinJ*.

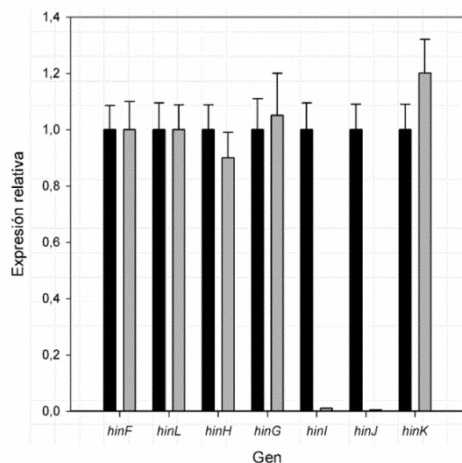


Figura 100. Estudio de la expresión de los genes *hinF*, *hinL*, *hinH*, *hinG*, *hinI*, *hinJ* y *hinK* en *P. putida* U (barras negras) y en el mutante *P. putida* U *hinJ::Tn5* (barras grises). Las barras de error indican la desviación estándar.

Estos resultados, junto con el hecho de que el mutante *P. putida* U *hinJ::Tn5* acumule ácido aspártico en el caldo al ser cultivado en 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM), confirmaban que HinJ actuaba como un activador de la transcripción del gen *hinI*, y que ambos (*hinI* y *hinJ*) son los responsables de la degradación del ácido aspártico en *P. putida* U.

4.6. Análisis comparativo de los *clusters hin2*, *hin3* y del gen *hinK* en diferentes microorganismos.

El análisis comparativo de las diferentes secuencias correspondientes a los genes pertenecientes a los *clusters hin* permitió detectar la existencia de dichos *clusters* en distintos microorganismos G-, particularmente en especies del género *Pseudomonas* (**Figura 101**). Sin embargo, los genes *hin* no se encontraron en ninguna secuencia de bacterias G+, lo que sugiere que en estas bacterias este mecanismo de degradación de histamina no es un proceso muy común.

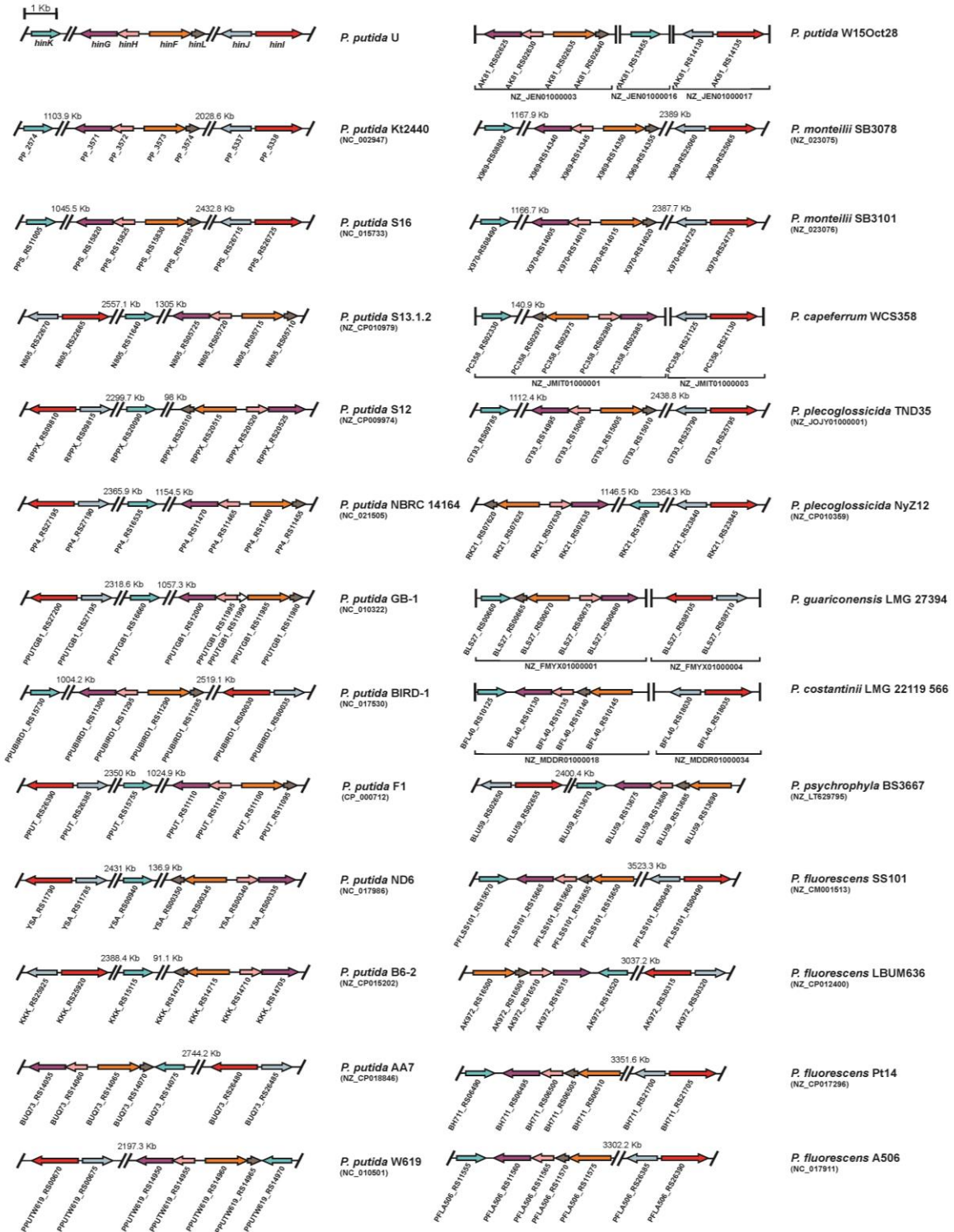


Figura 101. Sintenia de los genes ortólogos *hin* encontrados en los genomas de diferentes bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*. Está indicado el nombre de los genes o de los *loci* correspondientes. Los genes ortólogos se muestran del mismo color. También están indicados los números de acceso de GenBank de las secuencias de los genomas completos o de los *contigs* de los genomas parciales. En los casos en los que es posible, se indican las distancias entre los genes agrupados.

El *cluster hin2* de *P. putida* U está constituido por un *cassette* catabólico de 3,9 Kb y el *cluster hin3* por un *cassette* catabólico de 2,5 Kb. Sin embargo, el gen *hinK* de *P. putida* U ocupa una posición distal respecto a ambos *clusters*. La organización de los genes *hin* en las cepas *P. putida* KT2440, *P. putida* S16, *P. monteilii* SB3078, *P. monteilii* SB 3101 y *P. plecoglossicida* TND35 no varía con respecto a la observada en *P. putida* U (**Figura 101**).

Las diferencias de organización más significativas entre *P. putida* U y algunos de los microorganismos analizados se exponen a continuación.

En el genoma publicado de *P. putida* GB-1 (NC_010322) existe un pequeño ORF (PPUTGB1_RS11990) que se encuentra entre los ortólogos de los genes *hinF* y *hinH*, y que se transcribe en el mismo sentido que los ortólogos de *hinF* y *hinL* (**Figura 101**).

En los genomas de *P. putida* AA7 (NZ_CP018846), *P. putida* W619 (NC_010501) y *P. guariconensis* LMG 27394 (NZ_FMYX01000001), el ortólogo del gen *hinK* se localiza a continuación de los ortólogos de los genes que conforman el *cluster hin2*, concretamente corriente abajo del ortólogo de *hinL* transcribiéndose en sentido contrario (**Figura 101**).

En los genomas depositados en la base de datos del GenBank de *P. constantinii* LMG 22119 556 (NZ_MDDR01000018), *P. psychrophyla* BS3667 (NZ_LT629795), *P. fluorescens* SS101 (NZ_CM001513), *P. fluorescens* LBUM636 (NZ_CP012400), *P. fluorescens* Pt14 (NZ_CP017296) y *P. fluorescens* A506 (NC_017911) los genes ortólogos del *cluster hin2* se transcriben todos seguidos en el mismo sentido en orden *hinFLHG*, que coincide con el orden de actuación propuesto para la degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U. Además, el ortólogo del gen *hinK* se localiza

corriente abajo del ortólogo de *hinG*, transcribiéndose en sentido contrario **(Figura 101)**.

En todas las cepas analizadas, los ortólogos de *hinF* y *hinL* se encuentran situados del mismo modo que en *P. putida* U, lo que sugiere la participación conjunta de ambos en la ruta. Lo mismo sucede con los ortólogos de los genes *hinH* y *hinG*, los cuales se encuentran en todos los casos con una organización genética similar a *P. putida* U, lo que hace pensar que, del mismo modo que en nuestra bacteria, se transcriben como un operón.

A pesar de las diferencias anteriormente citadas, en los organismos comparados se aprecia una organización genética muy similar a la descrita en esta Tesis Doctoral para los *clusters hin* de *P. putida* U. De hecho, se puede observar una elevada conservación en lo que se refiere a las distancias que separan los grupos de genes. Los genes ortólogos pertenecientes al *cluster hin2* y al *cluster hin3* se encuentran a una distancia de unos 3.000 Kb en todos los casos, salvo en las cepas en la que no está secuenciado el genoma el completo y, por lo tanto, se desconocen estas distancias. En cuanto al ortólogo del gen *hinK*, este se sitúa, en la mayor parte de las cepas, a una distancia de unas 1.000 Kb de los genes ortólogos del *cluster hin2*, exceptuando los casos en los que se encuentra agrupado junto con los genes ortólogos de este *cluster*. Este hecho es otra evidencia de que HinK actúa regulando la expresión de los genes del *cluster hin2*.

La conservación, tanto en la sintenia como en la distancia entre los grupos, sugiere que los genes no se han podido transferir en bloque, sino que son genes arquetípicos de pseudomonádidos y que las diferencias en las distancias génicas o en el

orden relativo de los genes se debe a reordenamientos del cromosoma de la cepa de la que se trate.

5. RUTA CATABÓLICA PROPUESTA PARA LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN *Pseudomonas putida* U.

Reuniendo todos los resultados experimentales descritos hasta ahora, podemos definir la ruta catabólica de histamina y de ImAA en *P. putida* U (**Figura 102**).

En primer lugar, intervendrían las enzimas codificadas en los genes pertenecientes al *cluster hin1* (HinA, HinB, HinC, HinD), así como los sistemas DadRAX y CoxBA-C, responsables de la transformación de histamina en ImAA y descritos por mi compañero, el Dr. José Luis Gómez Botrán (Gómez-Botrán, 2017). HinA es un transportador implicado en la toma de histamina desde el medio de cultivo al interior de la bacteria. HinC utiliza como sustratos la histamina y el ácido pirúvico, generando L-alanina e imidazol acetaldehído (ImAdh), el cual es catalizado por HinD en una reacción de oxidación en la que actúa como coenzima el NAD⁺ para dar lugar al ImAA. Finalmente, HinB es un regulador que actúa modulando la transcripción de los genes del *cluster hin1*. La misión del sistema DadRAX es doble. Por una parte, permite regenerar el piruvato requerido como aceptor del grupo amino en la reacción de transaminación y, además, participa en un sistema de transferencia de electrones, en el cual, la etapa final es catalizada por el complejo CoxBA-C que, además, es el responsable de la génesis de la energía requerida para el transporte de la histamina.

En segundo lugar, actúan las enzimas codificadas en el *cluster hin2*, encargadas de degradar el ImAA hasta ácido L-aspártico. El ImAA es hidroxilado por HinF mediante una reacción de óxido-reducción en la que participa el NADH. Posteriormente, HinL facilita la apertura del anillo, dando lugar a la N₂-formil-

isoasparagina (FiAsn), aunque el anillo de ImAA también puede romperse mediante una hidrólisis no enzimática. La FiAsn es utilizada como sustrato por HinH, una hidrolasa N-terminal, para generar ácido N-formil-aspártico (FAsp), el cual es metabolizado por HinG hasta ácido L-aspártico. Por último, intervienen las enzimas codificadas en el *cluster hin3*, encargadas de transformar el ácido L-aspártico en ácido fumárico. HinI degrada el ácido L-aspártico mediante una reacción de beta-eliminación en la que participa el NAD generando ácido fumárico, el cual se incorporará al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo TCA).

La ruta de degradación del ImAA hasta ácido fumárico está regulada por dos proteínas. HinJ activa la transcripción del gen *hinI*, mientras que HinK hace lo propio con los genes pertenecientes al *cluster hin2*.

Tanto la ruta catabólica en sí, como algunas de las enzimas que llevan a cabo las reacciones que forman parte de la misma, han sido descritas aquí por primera vez. Su naturaleza no era obvia a partir del estado de la técnica pues, como se ha comentado previamente, la ruta responsable de transformar la histamina y el ImAA *in vivo* en *P. putida* U y en otras bacterias relacionadas se desconocía hasta la fecha.

Además, el descubrimiento de esta ruta demuestra que la degradación de histamina y de ImAA en *P. putida* U no se realiza mediante los mecanismos catabólicos descritos, hasta la fecha, en otros seres vivos.

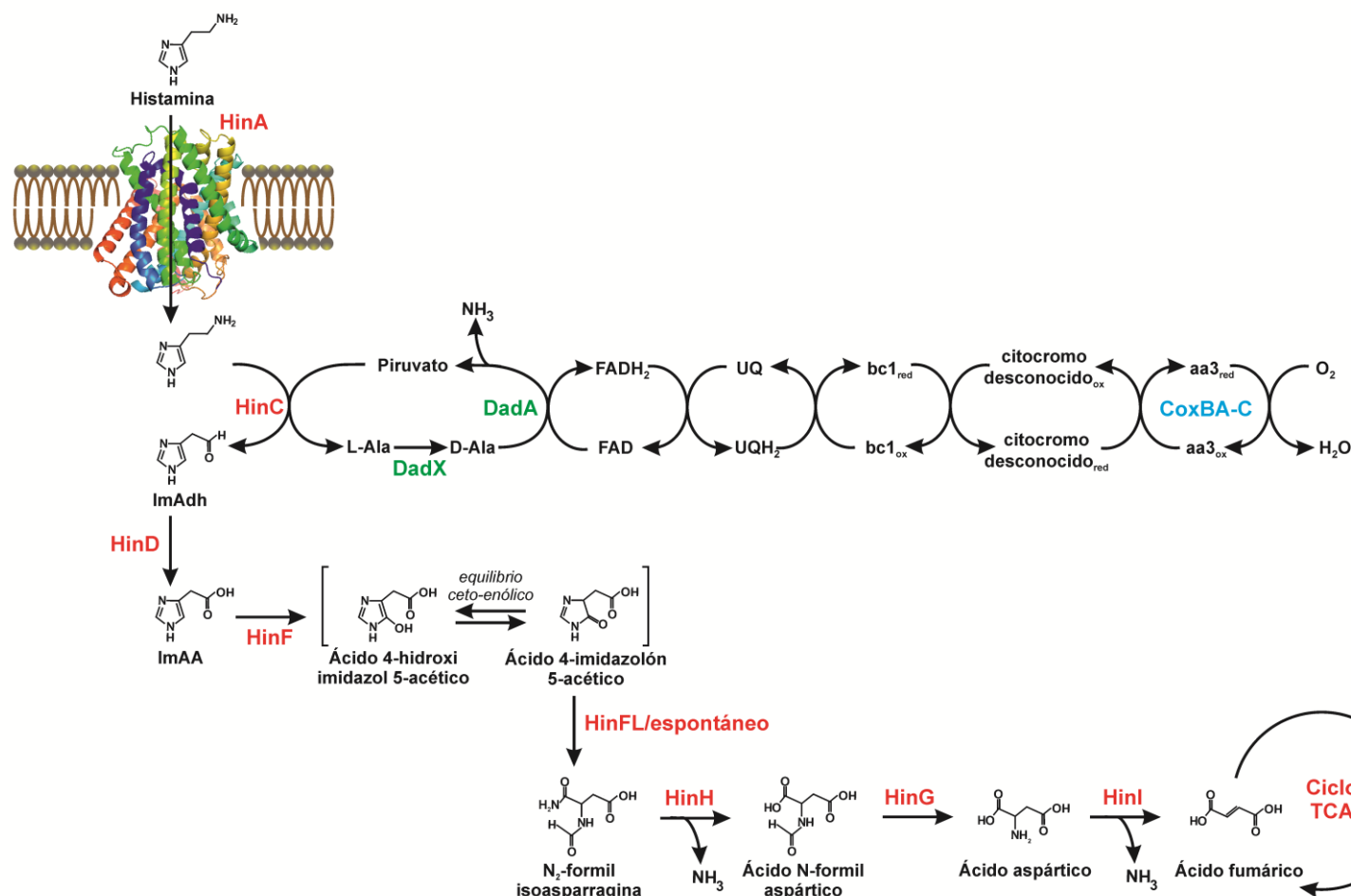


Figura 102. Representación esquemática de los procesos metabólicos responsables de la degradación de histamina e ImAA en *P. putida* U así como las enzimas que catalizan estas reacciones. Los distintos metabolitos son: histamina, ImAdh (imidazolacetaldehído), ImAA (ácido imidazolacético), L-Ala (L-alanina), D-Ala (D-alanina), ácido 4-hidroxi-imidazol-5-acético, ácido 4-imidazolón-5-acético, N₂-formil-isoasparagina (FiAsn), ácido N-formil-aspártico (FAsp) y ácido aspártico. UQ, ubiquinona; UQH₂, ubiquinol; bc1, complejo citocromo *bc1*; aa₃, citocromo *c* oxidasa de tipo aa₃

6. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA Y DE ÁCIDO IMIDAZOLACÉTICO EN *P. putida* U.

En este apartado nos centraremos en el estudio de la expresión heteróloga de los genes identificados como implicados en la ruta de degradación de la histamina y del ImAA en *P. putida* U. Para asegurar la correcta expresión de los genes, utilizaremos una cepa bacteriana incapaz de degradar ni la histamina ni el ImAA, pero que asimila sin ningún problema el ácido aspártico. Esta cepa es *Pseudomonas putida* DOC21, una cepa muy próxima filogenéticamente a *P. putida* U.

La cepa silvestre de *P. putida* DOC21 utilizada en este experimento pertenece a nuestra colección, y fue aislada por nuestro grupo de investigación a partir de muestras de suelos próximos a la Universidad de León (Merino *et al.*, 2013). Esta bacteria es aerobia estricta, su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C y presenta resistencia a ampicilina.

A continuación, se detallan las cepas recombinantes de *P. putida* DOC21 obtenidas en esta Tesis Doctoral, mediante transferencia de diferentes construcciones genéticas, así como el efecto observado en cada una de ellas.

P. putida* DOC21 pMC-3*hin2

La primera construcción genética que se transfirió a la cepa *P. putida* DOC21 fue el *cluster hin2*, clonado en el vector pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995).

Para la obtención de esta construcción, se realizó la amplificación mediante PCR del gen *hinL* utilizando los oligonucleótidos HinL.F y HinL.R. El producto de amplificación se clonó en el plásmido pJQ200KS, utilizando los sitios de restricción *SalI/SpeI*, presentes tanto en los cebadores como en la zona de clonación múltiple (*polylinker*) del plásmido, y se obtuvo la construcción pJQ200KShinL (**Tabla 8**). Posteriormente, se llevó a cabo la recombinación de esta construcción con la región del genoma (*hinL*) de *P. putida* U. Una vez conseguido, se purificó el DNA genómico y se digirió a su totalidad con la enzima de restricción *SalI*. Este sitio de restricción se encontraba en el *polylinker* del plásmido y al inicio del *cluster hin2* (justo antes del gen *hinG*) (**Figura 103**). A continuación, mediante una reacción de ligación, se obtuvo la construcción pJQ200KShin2 (**Tabla 8**). Finalmente, utilizando los sitios de restricción *XhoI/SpeI*, se transfirió todo el *cluster hin2* al plásmido pBBR1MCS-3.

A esta construcción, que posee una longitud de 4562 pb, la denominamos pMC-3hin2 (**Tabla 8**) (**Figura 103**).

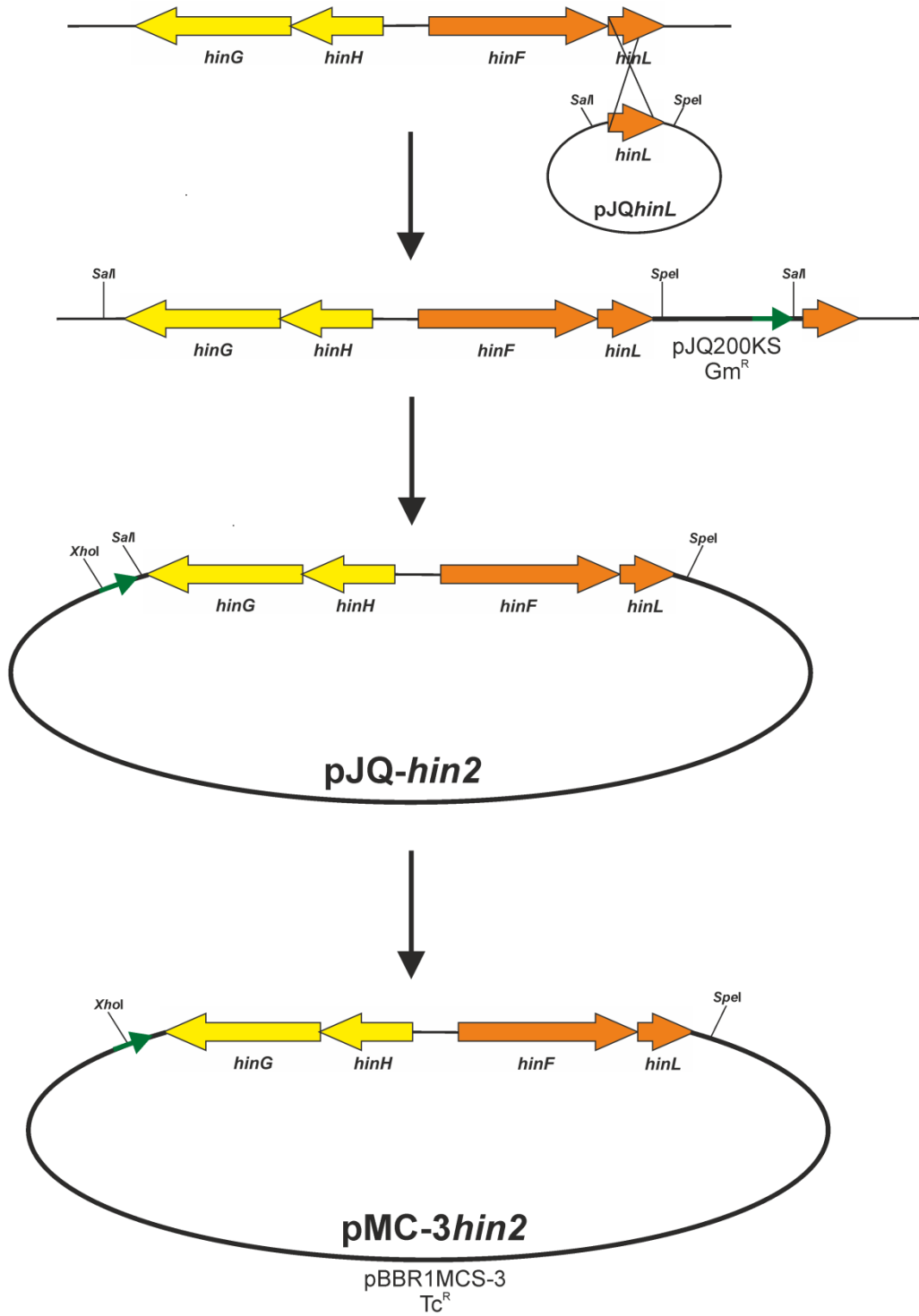


Figura 103. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la obtención de la construcción pMC-3hin2. La localización de la secuencia promotora del plásmido se indica con una flecha verde.

En este punto, surgió la incertidumbre de si esta construcción, al ser transferida a la cepa *P. putida* DOC21, conferiría a ésta la capacidad para degradar el ImAA, ya que en dicha construcción se encontraban presentes todos los genes que integran el *cluster hin2* en *P. putida* U, pero no estaba presente el activador transcripcional (*hinK*), hecho que podía ser determinante. Al transferir a la cepa *P. putida* DOC21 la construcción pMC-3*hin2* mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990), la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pMC-3*hin2* (**Tabla 7**) no era capaz de crecer en medio mínimo (MM) suplementado con ImAA (10 mM) como única fuente de carbono.

P. putida* DOC21 pMC-3*hin2* pMC-5*hinK

Teniendo en cuenta el resultado obtenido anteriormente, el siguiente paso fue la incorporación a la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pMC-3*hin2* del gen que codificaba el activador transcripcional (*hinK*). Para ello, se clonó en el plásmido pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995) el gen *hinK* en los sitios de restricción *ApaI/SacI*, mediante la subclonación del inserto presente en la construcción pMC-3*hinK* (**Tabla 8**). Seguidamente, se incorporó esta construcción (pMC-5*hinK*) (**Tabla 8**) a la cepa obtenida anteriormente (*P. putida* DOC21 pMC-3*hin2*) mediante un proceso de conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990). El resultado final fue la obtención de la cepa *P. putida* DOC21 pMC-3*hin2* pMC-5*hinK* (**Tabla 7**), la cual era capaz de asimilar el ImAA.

Con el objeto de caracterizar con mayor precisión la cinética de crecimiento de esta cepa en ImAA, se procedió a cultivarla en medio líquido, y se analizó mediante HPLC el consumo de ImAA, observando que a las 60 horas éste había desaparecido completamente del caldo de cultivo, lo que indicaba que había sido degradado en su totalidad (**Figura 104**).

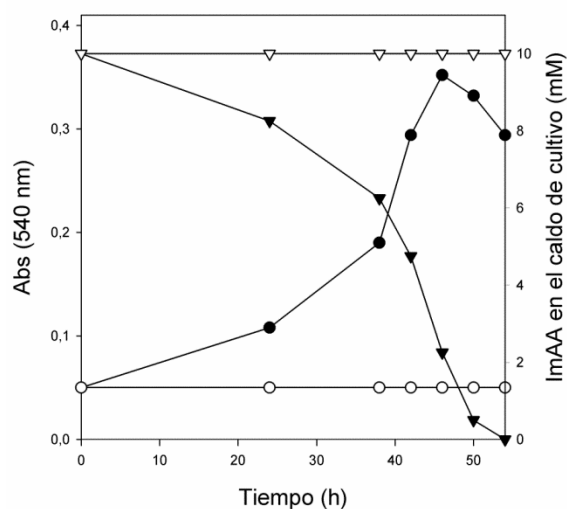


Figura 104. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* DOC21 pMC-3 pMC-5 (○) y de *P. putida* DOC21 pMC-3hin2 pMC-5hinK (●) en MM + ImAA (10 mM). También se representa la concentración de ImAA en la cepa *P. putida* DOC21 pMC-3 pMC-5 (▽), así como la concentración de ImAA (▼) en el caldo de cultivo de la cepa *P. putida* DOC21 pMC-3hin2 pMC-5hinK.

Los resultados mostrados en la **Figura 104** revelaban que la cepa *P. putida* DOC21 pMC-3hin2 pMC-5hinK adquiriría la capacidad para utilizar el ImAA como única fuente de carbono y energía gracias a la expresión heteróloga de los genes presentes en las construcciones pMC-3hin2 y pMC-5hinK, ya que la cepa control de *P. putida* DOC21 pMC-3 pMC-5, transformada solamente con ambos plásmidos, continuaba siendo incapaz de asimilar este compuesto.

***P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hin2 pMC-5hinK**

Una vez alcanzado el objetivo de construir una cepa capaz de asimilar el ImAA, el siguiente paso consistió en ampliar las capacidades degradativas de esta cepa dotándola de las funciones necesarias para eliminar la histamina. Para ello, a esta cepa (*P. putida* DOC21 pMC-3hin2 pMC-5hinK), se le transfirió un plásmido que contenía los genes responsables de la transformación de histamina en ImAA, es decir, que

contenía el *cluster hin1* al completo. Esta construcción (pK18::*mobhin1*), obtenida por mi compañero el Dr. José Luis Gómez Botrán y descrita en su Tesis Doctoral (Gómez-Botrán, 2017), confería a la cepa la capacidad de transformar eficientemente la histamina en ImAA cuando era cultivada en un medio conteniendo 4-OH-PhAc (10 mM) como fuente de carbono y energía e histamina (10 mM) como precursora del ImAA.

La construcción pK18::*mobhin1* se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a la cepa *P. putida* DOC21 pMC-3*hin2* pMC-5*hinK*, obteniéndose la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1* pMC-3*hin2* pMC-5*hinK* (**Tabla 7**). Ésta, cuando se cultivaba en MM suplementado con histamina como única fuente de carbono y energía (10 mM), degradaba toda la histamina de un modo muy eficiente, ya que desaparecía en 16 horas, retrasándose sólo 2 horas con respecto a la cepa *P. putida* U. Asimismo, la cepa transformada únicamente con los plásmidos sin ninguno de los genes seguía siendo incapaz de asimilar la histamina (**Figura 105**).

Como se puede observar en la **Figura 105**, se caracterizó la cinética de crecimiento de esta cepa, así como el consumo de histamina mediante HPLC.

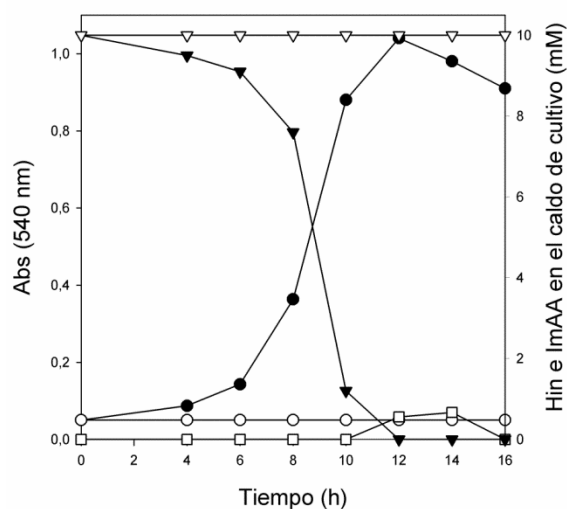


Figura 105. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *P. putida* DOC21 pK18::mob pMC-3 pMC-5 (○) y de *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hin2 pMC-5hinK (●) en MM + histamina (10 mM). También se representa la concentración de histamina en la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mob pMC-3 pMC-5 (▽), así como la concentración de histamina (▼) y de IMAA (□) en el caldo de cultivo de la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hin2 pMC-5hinK.

***P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hinF pMC-5hinK y *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hinFL pMC-5hinK**

Como se ha explicado en apartados anteriores, HinF es la proteína responsable de la hidroxilación del ImAA, mientras que la proteína HinL, bien sola o formando un complejo con HinF (HinFL), podrían ser las responsables de la apertura del anillo hidroxilado del ImAA, si bien también se puede producir una hidrólisis espontánea (no enzimática). Con el objetivo de determinar si HinL era indispensable para que se produzca la apertura del anillo hidroxilado del ImAA, se diseñaron dos cepas (*P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hinF pMC-5hinK y *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 pMC-3hinFL pMC-5hinK) (Tabla 7), mediante las cuales se pretendía determinar la evolución del ImAA en presencia únicamente de HinF, o en presencia de HinF y de HinL. En el primer caso, se amplificó el gen *hinF* sobre el genoma de *P. putida* U

mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos HinF.F y HinF.R, y se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *XhoI/XbaI*, obteniéndose la construcción pMC-3*hinF* (**Tabla 8**). En el segundo caso, se amplificaron los genes *hinFL* sobre el genoma de *P. putida* U mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos HinF.F y HinL.R, y el amplicón se clonó en el plásmido pBBR1MCS-3 (Kovach *et al.*, 1995) utilizando los sitios de restricción *XhoI/SpeI*, obteniéndose la construcción pMC-3*hinFL* (**Tabla 8**). En ambos casos, los genes están expresándose bajo el promotor del plásmido pBBR1MCS-3, replicativo en *Pseudomonas*.

Las construcciones obtenidas, pMC-3*hinF* y pMC-3*hinFL*, se transfirieron, independientemente, mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a la cepa *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1* pMC-5*hinK*, la cual contenía el *cluster hin1*, encargado de transformar la histamina en ImAA, y el gen *hinK*, responsable de activar la transcripción de los genes *hinF* y *hinL*.

Al cultivar estas cepas en MM suplementado con 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM) se observó que, en ambos casos, la histamina se transformaba en su totalidad a ImAA y, posteriormente, éste se degradaba parcialmente (30%) hasta FiAsn, la cual se acumulaba en el caldo de cultivo y era detectada en nuestro sistema de HPLC con un tiempo de retención de 6,7 minutos (**Figura 106**). Además, la velocidad de generación de la FiAsn era similar por parte de ambas cepas. Este resultado mostraba claramente que tanto en presencia como en ausencia de HinL, el anillo de imidazol sufría una ruptura para dar lugar a la FiAsn. Nuestra hipótesis es que, probablemente, cuando HinL está presente, esta enzima es la encargada de llevar a cabo la reacción de apertura del anillo, mientras que en ausencia de HinL, se produce una hidrólisis no

enzimática, similar a la propuesta por Kny y Witkop (Kny y Witkop, 1959), generándose, en ambos casos, la FiAsn.

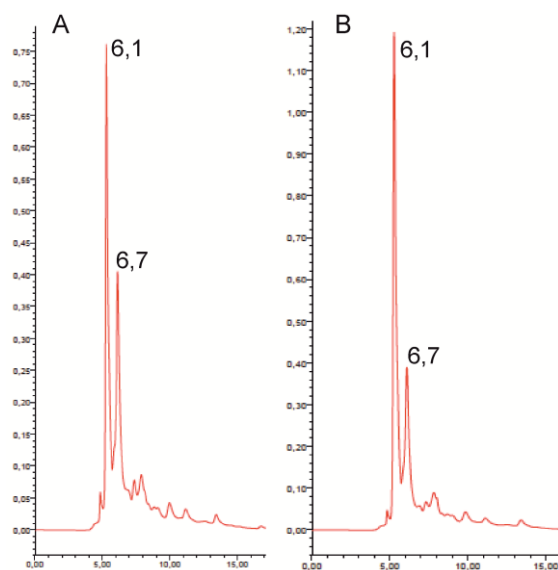


Figura 106. Aparición de ImAA (Rt= 6,1 min) y del intermediario acumulado (FiAsn) (Rt= 6,7 min) mediante HPLC cuando se cultiva A) *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1* pMC-3*hinF* pMC-5*hinK* y B) *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1* pMC-3*hinFL* pMC-5*hinK* en MM + 4-OH-PhAc (10 mM) + histamina (10 mM).

7. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS ENZIMAS CODIFICADAS EN LOS *clusters hin* PARA DEGRADAR OTROS COMPUESTOS.

El siguiente abordaje experimental consistió en demostrar la especificidad de sustrato de las diferentes enzimas codificadas en los *clusters hin2* y *hin3* y en el gen *hinK*, para lo cual se cultivaron los mutantes afectados en la asimilación de histamina y de ImAA en MMs suplementados con otras aminas biogénicas y aminoácidos (**Tablas 19 y 20**), así como con algunos compuestos imidazólicos (**Tablas 21 y 22**).

7.1. Aminas biogénicas y aminoácidos.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de crecimiento de las diferentes cepas mutantes, afectadas en los genes del *cluster hin2* y en el gen *hinK*, en MM suplementado con diferentes aminas biogénicas, así como con algunos aminoácidos, como únicas fuentes de carbono (5 mM) (**Tablas 21 y 22**).

Tabla 21. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes afectados en genes del *cluster hin2* y en el gen *hinK* en MM sólido suplementado con algunas aminas biogénicas y diversos aminoácidos como únicas fuentes de carbono (5 mM).

	Cepa silvestre	<i>Cluster hin2</i> y gen <i>hinK</i>				
	<i>P. putida</i> U	<i>PpU hinF::Tn5</i>	<i>PpU ΔhinL</i>	<i>PpU hinH::pK18::mob</i>	<i>PpU hinG::Tn5</i>	<i>PpU hinK::Tn5</i>
Histamina	+	-	+*	-	-	-
Tiramina	+	+	+	+	+	+
Dopamina	+	+	+	+	+	+
2-feniletilamina	+	+	+	+	+	+
Octopamina	-	-	-	-	-	-
Putrescina	+	+	+	+	+	+
Cadaverina	+	+	+	+	+	+
Espermidina	+	+	+	+	+	+
Glutamina	+	+	+	+	+	+
Asparagina	+	+	+	+	+	+
Metionina	-	-	-	-	-	-
Triptófano	+	+	+	+	+	+
Ácido aspártico	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+
Histidina	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+
GABA	+	+	+	+	+	+

* *PpU ΔhinL* crece en histamina con un retraso de 4-6 horas respecto al control.

Como podemos observar en la **Tabla 21**, todos los mutantes afectados en los genes pertenecientes al *cluster hin2* y en el gen *hinK* son capaces de asimilar todos los compuestos ensayados del mismo modo que *P. putida* U. Este hecho demuestra que las enzimas codificadas en estas organizaciones génicas son específicas del catabolismo de histamina, y que, por tanto, el resto de compuestos tienen sus propias vías de asimilación, como es el caso de la 2-feniletilamina (Arias *et al.*, 2008) o la tiramina (Arcos *et al.*, 2010). Un caso a destacar es el de la ornitina, ya que en la base de datos, los genes ortólogos de *hinG* presentes en otros pseudomonánidos están anotados como

codificantes de una N-acetilornitina desacetilasa, enzima que participa en la degradación de este compuesto. Sin embargo, el mutante afectado en *hinG* es capaz de asimilar la ornitina de un modo eficaz, debido a la existencia de otra ornitina desacetilasa, ArgE, mencionada anteriormente, y que sería la implicada específicamente en la ruta catabólica de la ornitina.

Tabla 22. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes afectados en genes del *cluster hin3* en MM sólido suplementado con algunas aminos biogénicas y diversos aminoácidos como únicas fuentes de carbono (5 mM).

	Cepa silvestre	Cluster <i>hin3</i>	
	<i>P. putida</i> U	<i>PpU hinI::Tn5</i>	<i>PpU hinJ::Tn5</i>
Histamina	+	-	-
Tiramina	+	+	+
Dopamina	+	+	+
2-feniletilamina	+	+	+
Octopamina	-	-	-
Putrescina	+	+	+
Cadaverina	+	+	+
Espermidina	+	+	+
Glutamina	+	+	+
Asparagina	+	-	-
Metionina	-	-	-
Triptófano	+	+	+
Ácido aspártico	+	-	-
Lisina	+	+	+
Histidina	+	+	+
Ornitina	+	+	+
GABA	+	+	+

En la **Tabla 22** se puede observar que todos los mutantes afectados en los genes pertenecientes al *cluster hin3* son capaces de catabolizar todos los compuestos del mismo modo que lo hace la cepa silvestre (*P. putida* U), exceptuando la histamina, el ácido aspártico y la asparagina, ya que, como se ha explicado anteriormente, tanto *HinI*

como HinJ son dos proteínas que participan en la degradación de estos compuestos en *P. putida* U. Por consiguiente, podemos afirmar que las enzimas codificadas en el *cluster hin3* son específicas del catabolismo de histamina a través del ácido aspártico, y que el resto de compuestos tienen rutas catabólicas independientes.

7.2. Compuestos imidazólicos.

Como ya se ha demostrado experimentalmente en esta Tesis Doctoral, el ImAA participa como intermediario de la degradación de histamina en *P. putida* U. Esto puede dar lugar a la hipótesis de que las enzimas encargadas de degradar el ImAA pudieran ser también las responsables de degradar otros compuestos imidazólicos.

Por ello, se cultivaron tanto la cepa silvestre como los mutantes afectados en cada uno de los genes que codifican las enzimas responsables de esta parte de la ruta (*cluster hin2*, *cluster hin3* y gen *hinK*) en ImAA y en otros compuestos imidazólicos, como únicas fuentes de carbono (5 mM) (**Tablas 23 y 24**).

Tabla 23. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes afectados en genes del *cluster hin2* y en el gen *hinK* en MM sólido suplementado con diferentes compuestos imidazólicos como únicas fuentes de carbono (5 mM).

	Cepa silvestre	<i>Cluster hin2</i> y gen <i>hinK</i>				
	<i>P. putida</i> U	<i>PpU hinF::Tn5</i>	<i>PpU ΔhinL</i>	<i>PpU hinH::pK18::mob</i>	<i>PpU hinG::Tn5</i>	<i>PpU hinK::Tn5</i>
ImAA	+	-	+	-	-	-
Ácido 4-imidazolcarboxílico	-	-	-	-	-	-
Ácido 4,5-imidazoldicarboxílico	-	-	-	-	-	-
Ácido 4-imidazolacrílico (ácido urocánico)	+	+	+	+	+	+
4-Imidazol carboxaldehído	-	-	-	-	-	-
Ácido 4,(5)-imidazolditiocarboxílico	-	-	-	-	-	-

* *PpU ΔhinL* crece en ImAA con un retraso de 4-6 horas respecto al control.

Tabla 24. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes afectados en genes del *cluster hin3* en MM sólido suplementado con diferentes imidazoles como únicas fuentes de carbono (5 mM).

	Cepa silvestre	<i>Cluster hin3</i>	
	<i>P. putida</i> U	<i>PpU hinI::Tn5</i>	<i>PpU hinJ::Tn5</i>
ImAA	+	-	-
Ácido 4-imidazolcarboxílico	-	-	-
Ácido 4,5-imidazoldicarboxílico	-	-	-
Ácido 4-imidazolacrílico (ácido urocánico)	+	+	+
4-Imidazol carboxaldehído	-	-	-
Ácido 4,(5)-imidazolditiocarboxílico	-	-	-

Como puede observarse, *P. putida* U solo es capaz de degradar el ImAA y el ácido imidazolacrílico (ácido urocánico), intermediario de la degradación de histidina en *Pseudomonas*. En cuanto a los diferentes mutantes analizados en esta Tesis Doctoral, ninguno de ellos degrada ImAA. Sin embargo, todos son capaces de asimilar el ácido

urocánico, hecho que demuestra que las enzimas estudiadas en este trabajo participan exclusivamente en la degradación de ImAA en *P. putida* U y no están relacionadas con el catabolismo del ácido urocánico, intermediario de la ruta de degradación del aminoácido histidina.

8. POTENCIALES APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

En el apartado de Introducción de esta Tesis Doctoral se ha tratado el problema de la presencia de aminas biogénicas en los alimentos, debido a los efectos nocivos de éstas para la salud humana. La histamina, objeto de estudio de este trabajo, está presente en multitud de alimentos que ingerimos a diario en nuestra dieta, donde esta amina se encuentra a elevadas concentraciones, lo que puede producir multitud de efectos perjudiciales para el organismo (Maintz y Novak, 2007). Como ya se ha comentado (ver el apartado Introducción), esta amina aparece, principalmente, como resultado de la descarboxilación microbiana por parte de algunas bacterias fermentadoras, incluyendo las de la flora intestinal.

Afortunadamente, el organismo cuenta con diferentes sistemas naturales de detoxificación que les permiten eliminar la histamina evitando, así, sus efectos nocivos (Schwelberger, 2004a, 2004b). Sin embargo, en algunos casos estos sistemas no funcionan eficientemente o se encuentran inhibidos por la acción de determinadas sustancias, como por ejemplo algunos fármacos. En estas situaciones, la presencia de esta amina biogénica en los alimentos puede suponer un grave problema para la salud.

Los alimentos que comúnmente contienen altas concentraciones de histamina son los alimentos fermentados (verduras, quesos, embutidos, soja, yogur, etc.), algunos alimentos no fermentados como el pescado o la carne, y algunas bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino (Schirone *et al.*, 2016). En el caso de los embutidos, se puede disminuir en cierta medida la cantidad de aminas acumuladas en el producto final mediante la utilización de cultivos iniciadores (*starters*) que contengan en su composición los microorganismos adecuados para llevar a cabo la fermentación, pero

que no producen estas aminas indeseables. Esta medida, que ha supuesto un gran avance en la regularización de los procesos de fermentación, no siempre es eficaz, ya que la flora microbiana presente en las materias primas utilizadas puede ser capaz, por sí sola, de producir aminas biogénicas.

Actualmente, se está planteando la redacción de una reglamentación oficial que fije los valores máximos para la presencia de histamina en determinados alimentos. En este sentido, algunos países han establecido ya una concentración máxima en el vino con valores tolerables para la salud humana (Canadá y Suiza 10 mg/L, Holanda 5 mg/L). Esto es debido a que la presencia de aminas biogénicas en el vino entraña más riesgo que en otros alimentos, ya que al interactuar con ellas el alcohol, se van a ver afectados los mecanismos de detoxificación del organismo, incrementando las posibilidades de intoxicación. Otros países, como Alemania, Bélgica y Francia, recomiendan valores máximos incluso más bajos (2 mg/L, 5-6 mg/L y 8 mg/L, respectivamente).

Por lo tanto, sería muy interesante seleccionar microorganismos que al ser utilizados en los procesos de elaboración de alimentos (curados, fermentaciones, etc.), no acumulen histamina, o que lo hagan en concentraciones inocuas para la salud. La Ingeniería Genética y la Ingeniería Metabólica podrían contribuir a obtener este tipo de cepas asegurando, además, que se conserven otra serie de propiedades y características que son necesarias para mantener los estándares de identidad y de calidad de los alimentos. Recientemente, el control de los microorganismos que inician los procesos de transformación de determinadas materias primas en alimentos o bebidas ha cobrado gran interés en la industria. El conocimiento del consorcio de microorganismos implicados permite controlar las condiciones del proceso, dotar a los productos finales de las características deseadas y, en particular, facilitar la obtención de productos finales

cuyas características sean más homogéneas e identificables por el consumidor. Estos objetivos son más difíciles de conseguir cuando se emplean exclusivamente los organismos iniciadores que aparecen en la materia prima de forma natural.

Por otro lado, tal y como se ha documentado en esta Tesis Doctoral, la histamina se degrada a través del intermediario catabólico ImAA. Este compuesto es un metabolito natural que se encuentra presente en el cerebro y que contiene actividad biológica, por ejemplo, como agonista o antagonista de determinados receptores del GABA (Bähre y Kaefer, 2017), debido a que el ImAA es un análogo estructural de este compuesto. Por tanto, el hecho de que el ImAA pueda interferir en multitud de procesos fisiológicos, hace que su eliminación del medio, así como la de sus derivados catabólicos, sea vital, con el fin de evitar sus acciones no deseadas.

Por lo tanto, la utilización de cultivos iniciadores capaces de llevar a cabo el procedimiento de degradación de histamina, de ImAA y de sus derivados, descrito en esta Tesis Doctoral, sería una ventaja más, permitiendo el control de la concentración de estos compuestos desde el inicio del proceso. Incluso podría suceder que la existencia de genes ortólogos a los genes *hin* en determinadas LAB, diera lugar a que los mismos microorganismos susceptibles de producir histamina fueran los mismos que permitieran su eliminación.

En nuestro laboratorio, hemos diseñado una construcción genética en la que se expresan los genes del *cluster hin1*, descrita en la Tesis Doctoral de mi compañero el Dr. José Luis Gómez Botrán, mediante la que se puede transferir la capacidad para transformar la histamina en ImAA a distintas cepas bacterianas (*E. coli* W y *P. putida* DOC21) y, potencialmente, podremos hacer lo mismo con otros organismos de interés para la industria alimentaria.

En esta Tesis Doctoral se ha conseguido diseñar una construcción genética que permite transformar el ImAA en intermediarios generales mediante la expresión de los genes que conforman el *cluster hin2* y del gen *hinK*. Con esta construcción así como con la que posea el *cluster hin1*, se puede conferir la capacidad de degradar completamente la histamina a cualquier cepa bacteriana que, como *P. putida* DOC21, sea capaz de expresarla. Mediante transferencia de los *cassettes* genéticos contenidos en los *clusters hin1*, *hin2* y en el gen *hinK* podríamos dotar a cualquier bacteria, tanto G+ como G-, con la capacidad para degradar histamina e ImAA, evitando, de este modo, la acumulación de estos compuestos en aquellos alimentos en cuyo proceso de elaboración intervenga dicha bacteria. No obstante, la legislación actual impide el uso de cepas manipuladas genéticamente para la elaboración de alimentos, pero, cuando se controlen todos los riesgos derivados de su utilización, las administraciones públicas adoptarán estas nuevas aplicaciones biotecnológicas, debido a su impacto industrial y económico.

Adicionalmente, aunando los hechos de que la histamina es un importante neurotransmisor, de que el ImAA es un análogo estructural del GABA (el principal transmisor químico con acción inhibitoria del cerebro) y de que estamos en posesión de una construcción genética transferible capaz de degradar ambos compuestos, estos genes podrían, en un futuro, ser utilizados como base de terapias génicas. Todo ello abunda en el interés y en la importancia de las aplicaciones biotecnológicas que surgirán como consecuencia de la aplicación, tanto en clínica como en alimentación, de los resultados expuestos en esta Tesis.

CONCLUSIONES

- 1.- El catabolismo aeróbico de la histamina en *P. putida* U tiene lugar mediante una ruta específica e independiente de la descrita para degradar el aminoácido L-histidina.
- 2.- La histamina es degradada en *P. putida* U mediante una serie de pasos metabólicos que conducen a su transformación en ácido imidazolacético y, posteriormente, en ácido aspártico, el cual se degradará hasta ácido fumárico que se incorporará al metabolismo general.
- 3.- Se han identificado y caracterizado todos los genes que codifican las funciones necesarias para la degradación del ácido imidazolacético y del ácido aspártico en *P. putida* U. Estos 7 genes están agrupados en tres *cassettes* catabólicos (*cluster hin2*, *cluster hin3* y gen *hinK*).
- 4.- El *cluster hin2* es el responsable de la transformación del ácido imidazolacético en ácido aspártico y está constituido por 4 genes que se extienden a lo largo de un fragmento de DNA de 3,9 Kb. Entre las proteínas codificadas por esta agrupación genética se encuentran: una imidazolacetato monooxigenasa dependiente de FAD (HinF), que hidroxila el anillo de imidazol; una N-amino deaminasa (HinL), encargada de romper el anillo de imidazol, dando lugar a la N₂-formil-isoasparagina; una hidrolasa N-terminal (HinH), que participa en el proceso de desaminación de la N₂-formil-isoasparagina para obtener ácido N-formil-aspártico; y una N-acetilornitina desacetilasa (HinG), que elimina el grupo formilo para dar lugar al ácido aspártico.
- 5.-El gen *hinK* es un activador transcripcional, perteneciente a la familia de reguladores LysR, que actúa regulando positivamente al *cluster hin2*.
- 6.- El *cluster hin3* es el responsable de la degradación del ácido aspártico generando fumarato, el cual se incorporará al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y está constituido

por 2 genes que se hallan en un fragmento de DNA de 2,5 Kb. Estos genes (*hinI* y *hinJ*) codifican una aspartato amonio liasa o aspartasa (HinI), responsable de la degradación del ácido aspártico, y su activador transcripcional (HinJ).

7.- Se ha logrado clonar y expresar conjuntamente en dos plásmidos (pBBR1MCS-3 y pBBR1MCS-5) los *clusters hin2 (hinGHFL)* y el gen *hinK*, dotando a las bacterias transformadas con estas construcciones con la capacidad necesaria para metabolizar el ácido imidazolacético.

8.- Se ha logrado clonar y expresar conjuntamente en tres plásmidos (pK18::*mob*, pBBR1MCS-3 y pBBR1MCS-5) los *clusters hin1 (hinEABCD)*, *hin2 (hinGHFL)* y el gen *hinK*, respectivamente, confiriendo a las bacterias recombinantes la capacidad necesaria para asimilar completamente la histamina. Estas cepas son unas herramientas biotecnológicas muy importantes, ya que pueden ser utilizadas para la eliminación de la histamina de diferentes medios.

BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, N. (2005). Cerebral ischemia and brain histamine. *Brain Res. Rev.* **50**, 275–286.
- Adams, M.R., Nicolaides, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* **8**, 227–239.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Álvarez, M.A., Moreno-Arribas, M.V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* **39**, 146–155.
- Arcos, M., Olivera, E.R., Arias, S., Naharro, G., Luengo, J.M. (2010). The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. *Environ. Microbiol.* **12**, 1684–1704.
- Arias, S., Olivera, E.R., Arcos, M., Naharro, G., Luengo, J.M. (2008). Genetic analyses and molecular characterization of the pathways involved in the conversion of 2-phenylethylamine and 2-phenylethanol into phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U. *Environ. Microbiol.* **10**, 413–432.
- Arrang, J.-M., Garbarg, M., Schwartz, J.-C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* **302**, 832–837.
- Arreola, R., Álvarez-Herrera, S., Pérez-Sánchez, G., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Flores-Gutiérrez, E.O., Garcés-Álvarez, M.E., Cruz-Aguilera, D.L., Luz, D., Medina-Rivero, E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabián, S., Pavón, L. (2016). Immunomodulatory effects mediated by dopamine. *J. Immunol. Res.* **2016**, 3160486.
- Artymiuk, P.J. (1995). A sting in the (N-terminal) tail. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1035–1037.
- Auerswald, L., Morren, C., Lopata, A.L. (2006). Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood. *Food Chem.* **98**, 231–239.
- Bähre, H., Kaefer, V. (2017). Analytical methods for the quantification of histamine and histamine metabolites. *En Hattori, Y., Seifert, R. (eds.). Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease*, pp: 3–19, Springer, Cham.
- Bajc, Z., Gačnik, K. (2009). Densitometric TLC analysis of histamine in fish and fishery products. *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* **22**, 15–17.
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* **87**, 802–807.
- Becker, K., Southwick, K., Reardon, J., Berg, R., MacCormack, J.N. (2001). Histamine poisoning associated with eating tuna burgers. *JAMA* **285**, 1327–1330.

- Benkerroum, N. (2016). Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 801–826.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A., Wheeler, D.L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 15–18.
- Berry, M.D. (2004). Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J. Neurochem.* **90**, 257–271.
- Biel, A.J., Umbarger, H.E. (1981). Mutations in the *ilvY* gene of *Escherichia coli* K-12 that cause constitutive expression of *ilvC*. *J. Bacteriol.* **146**, 718–724.
- Biji, K.B., Ravishankar, C.N., Venkateswarlu, R., Mohan, C.O., Gopal, T.K.S. (2016). Biogenic amines in seafood: a review. *J. Food Sci. Technol.* **53**, 2210–2218.
- Blackwell, B. (1963). Hypertensive crisis due to monoamine-oxidase inhibitors. *The Lancet* **282**, 849–851.
- Blaschko, H. (1950). Substrate specificity of amino-acid decarboxylases. *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 130–137.
- Blazey, D.L., Burns, R.O. (1980). Gene *ilvY* of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **142**, 1015–1018.
- Boulton, A.A. (1980). Trace amines and mental disorders. *Can. J. Neurol. Sci.* **7**, 261–263.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **66**, 185–189.
- Bovet, D. (1950). Introduction to antihistamine agents and antergan derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.* **50**, 1089–1126.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**, 459–472.
- Branchek, T.A., Blackburn, T.P. (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 90–97.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416–419.
- Bulushi, I.A., Poole, S., Deeth, H.C., Dykes, G.A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation—a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 369–377.
- Burchett, S.A., Hicks, T.P. (2006). The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* **79**, 223–246.

- Burman, J.D., Stevenson, C.E., Sawers, R.G., Lawson, D.M. (2007). The crystal structure of *Escherichia coli* TdcF, a member of the highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family. *BMC Struct. Biol.* **7**, 30.
- Cacabelos, R., Yamatodani, A., Niigawa, H., Hariguchi, S., Tada, K., Nishimura, T., Wada, H., Brandeis, L., Pearson, J. (1989). Brain histamine in Alzheimer's disease. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **11**, 353–360.
- Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2013). Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 185–198.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 131–149.
- Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Fiocco, D., Álvarez, M.A., Grieco, F., Spano, G. (2012). Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: toward a potential application in wine. *Front. Microbiol.* **3**, 122.
- Carlsson, A. (1993). Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurol.* **60**, 1–10.
- Chatterjee, I.B., Majumder, A.K., Nandi, B.K., Subramanian, N. (1975). Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA.* **258**, 24–47.
- Chen, H.-C., Huang, Y.-R., Hsu, H.-H., Lin, C.-S., Chen, W.-C., Lin, C.-M., Tsai, Y.-H. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Control* **21**, 13–18.
- 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.
- Chong, C.Y., Bakar, F.A., Abdul Rahman, R., Bakar, J., Mahyudin, N.A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *Int. Food Res. J.* **18**, 867-876.
- Chou, H.T., Kwon, D.-H., Hegazy, M., Lu, C.-D. (2008). Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **190**, 1966–1975.
- Chou, H.T., Li, J.-Y., Peng, Y.-C., Lu, C.-D. (2013). Molecular characterization of PauR and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the γ -glutamylase pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **195**, 3906–3913.
- Combarros-Fuertes, P., Fernández, D., Arenas, R., Diezhandino, I., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M. (2016). Biogenic amines in Zamorano cheese: factors involved in their accumulation. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 295–305.
- Coote, J.G., Hassall, H. (1973). The control of the enzymes degrading histidine and related imidazolyl derivatives in *Pseudomonas testosteroni*. *Biochem. J.* **132**, 423–433.

- Crisp, A.J., Chapman, C.M., Kirkham, S.E., Schiller, A.L., Krane, S.M. (1984). Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **27**, 845–851.
- Cueva, C., García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E., Bartolomé, B., Martín-Álvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F., Moreno-Arribas, M.V. (2012). Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 672–682.
- Cuskey, S.M., Olsen, R.H. (1988). Catabolism of aromatic biogenic amines by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via *meta* cleavage of homoprotocatechuic acid. *J. Bacteriol.* **170**, 393–399.
- Cuskey, S.M., Peccoraro, V., Olsen, R.H. (1987). Initial catabolism of aromatic biogenic amines by *Pseudomonas aeruginosa* PAO: pathway description, mapping of mutations, and cloning of essential genes. *J. Bacteriol.* **169**, 2398–2404.
- Dagley, S. (1971). Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. *En Rose*, A.H., Wilkinson, J.F. (eds.). *Advances in Microbial Physiology*, pp: 1–46, Academic Press, New York.
- Dagley, S. (1986). Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in *Pseudomonas*. *En Gunsalus*, I.C., Sokatch, J.R., Ornston, L.N. (eds.). *The Bacteria*, Vol. 10, pp: 527–556, Academic Press, New York.
- Dagley, S., Gibson, D.T. (1965). The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* **95**, 466–474.
- Dale, H.H., Laidlaw, P.P. (1910). The physiological action of β -iminazolylethylamine. *J. Physiol.* **41**, 318–344.
- Datta, P., Bhadra, R. (1978). Biodegradative threonine dehydratase. Reduction of ferricyanide by an intermediate of the enzyme-catalyzed reaction. *Eur. J. Biochem.* **91**, 527–532.
- Deml, K.-F., Beermann, S., Neumann, D., Strasser, A., Seifert, R. (2009). Interactions of histamine H1-receptor agonists and antagonists with the human histamine H4-receptor. *Mol. Pharmacol.* **76**, 1019–1030.
- Deutch, A.Y., Roth, R.H. (1999). Neurotransmitters. *En Zigmond*, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R., (eds.). *Fundamental Neuroscience*, Cpt. 8, Academic Press, New York.
- Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* **373**, 264–268.
- Eller, K., Henkes, E., Rossbacher, R., Höke, H. (2000). Amines, aliphatic. *En Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim.
- Elmore, B.O., Bollinger, J.A., Dooley, D.M. (2002). Human kidney diamine oxidase: heterologous expression, purification, and characterization. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 565–579.

- Emanuel, M.B. (1999). Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. *Clin. Exp. Allergy* **29**, 1–11.
- Emborg, J., Ahrens, P., Dalgaard, P. (2015). *Morganella psychrotolerans*-Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning (Thesis). Technical University of Denmark.
- Enna, S.J., Snyder, S.H. (1975). Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Res.* **100**, 81–97.
- Enna, S.J., Snyder, S.H. (1977). Influences of ions, enzymes, and detergents on γ -aminobutyric acid-receptor binding in synaptic membranes of rat brain. *Mol. Pharmacol.* **13**, 442–453.
- Entsch, B., Van Berkel, W.J. (1995). Structure and mechanism of *para*-hydroxybenzoate hydroxylase. *FASEB J.* **9**, 476–483.
- Entsch, B., Cole, L.J., Ballou, D.P. (2005). Protein dynamics and electrostatics in the function of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 297–311.
- Eppink, M.H., Boeren, S.A., Vervoort, J., Van Berkel, W.J. (1997). Purification and properties of 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase (decarboxylating), a novel flavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase from *Candida parapsilosis* CBS604. *J. Bacteriol.* **179**, 6680–6687.
- Ernsberger, P., Giuliano, R., Willette, R.N., Reis, D.J. (1990). Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 408–418.
- Ernsberger, P.R., Westbrooks, K.L., Christen, O.M., Schäfer, S.G. (1992). A second generation of centrally acting antihypertensive agents act on putative I1-imidazoline receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**, S1–S10.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level: temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail. *EFSA J.* **13**, 4162.
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* **9**, 2393.
- Ezzat, M.A., Zare, D., Karim, R., Ghazali, H.M. (2015). *Trans*- and *cis*-urocanic acid, biogenic amine and amino acid contents in ikan pekasam (fermented fish) produced from Javanese carp (*Puntius gonionotus*) and black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.* **172**, 893–899.
- Falzone, C.J., Karsten, W.E., Conley, J.D., Viola, R.E. (1988). L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate specificity and role of divalent metal ions. *Biochemistry* **27**, 9089–9093.

- Faustino-Rocha, A.I., Ferreira, R., Gama, A., Oliveira, P.A., Ginja, M. (2017). Antihistamines as promising drugs in cancer therapy. *Life Sci.* **172**, 27–41.
- Food and Drug Administration (FDA) (2011). Fish and fishery products hazards and controls guidance. University of Florida.
- Feldberg, R.S., Datta, P. (1971). L-threonine deaminase of *Rhodospirillum rubrum*. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **21**, 438–446.
- Fernández, M., Flórez, A.B., Linares, D.M., Mayo, B., Álvarez, M.A. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *J. Dairy Res.* **73**, 318–321.
- Fibiger, H.C. (1995). Neurobiology of depression: focus on dopamine. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **49**, 1–17.
- Fu, Y., Zhou, Z., Li, Y., Lu, X., Zhao, C., Xu, G. (2016). High-sensitivity detection of biogenic amines with multiple reaction monitoring in fish based on benzoyl chloride derivatization. *J. Chromatogr. A* **1465**, 30–37.
- García, B., Olivera, E.R., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., Arias, S., Naharro, G., Luengo, J.M. (2004). Strategy for cloning large gene assemblages as illustrated using the phenylacetate and polyhydroxyalkanoate gene clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5019–5025.
- García-Villar, N., Hernández-Cassou, S., Saurina, J. (2007). Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric data analysis. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7453–7461.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* **23**, 641–648.
- Gizang-Ginsberg, E., Ziff, E.B. (1990). Nerve growth factor regulates tyrosine hydroxylase gene transcription through a nucleoprotein complex that contains c-Fos. *Genes Dev.* **4**, 477–491.
- Gómez-Bostrán, J.L. (2017). Estudio bioquímico, genético y biotecnológico de la ruta catabólica responsable de la transformación de histamina en ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U (Tesis Doctoral). Universidad de León.
- Grandy, D.K. (2007). Trace amine-associated receptor 1-family archetype or iconoclast? *Pharmacol. Ther.* **116**, 355–390.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4645–4649.
- Grundy, D. (2008). 5-HT system in the gut: roles in the regulation of visceral sensitivity and motor functions. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **12**, 63–67.

- Haavik, J., Blau, N., Thöny, B. (2008). Mutations in human monoamine-related neurotransmitter pathway genes. *Hum. Mutat.* **29**, 891–902.
- Hacisalihoglu, A., Jongejan, J.A., Duine, J.A. (1997). Distribution of amine oxidases and amine dehydrogenases in bacteria grown on primary amines and characterization of the amine oxidase from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology* **143**, 505–512.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* **5**, 42–49.
- Halpern, Y.S., Umbarger, H.E. (1960). Conversion of ammonia to amino groups in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **80**, 285–288.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**, 115–122.
- Harayama, S., Timmis, K.N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons in bacteria. *En Sigel, H., Sigel, A. (eds.). Metal Ions in Biological Systems, Vol. 28, pp: 99-156, Marcel Dekker, New York.*
- Hayaishi, O., Tabor, H., Hayaishi, T. (1957). N-formimino-L-aspartic acid as an intermediate in the enzymatic conversion of imidazoleacetic acid to formylaspartic acid. *J. Biol. Chem.* **227**, 161–180.
- He, Z., Spain, J.C. (1998). A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **180**, 2502–2506.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6557–6567.
- Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M.C., Ladero, V., Álvarez, M.A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 297–304.
- Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **49**, 253–278.
- Hochstrasser, D.F., Appel, R.D., Golaz, O., Pasquali, C., Sánchez, J.-C., Bairoch, A. (1995). Sharing of worldwide spread knowledge using hypermedia facilities & fast communication protocols (Mosaic and World Wide Web): the example of ExpASy. *Methods Inf. Med.* **34**, 75–78.
- Horton, J.R., Sawada, K., Nishibori, M., Zhang, X., Cheng, X. (2001). Two polymorphic forms of human histamine methyltransferase: structural, thermal, and kinetic comparisons. *Struct.* **9**, 837–849.

- Hu, W., Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: an update. *Pharmacol. Ther.* **175**, 116–132.
- Hu, Y., Huang, Z., Li, J., Yang, H. (2012). Concentrations of biogenic amines in fish, squid and octopus and their changes during storage. *Food Chem.* **135**, 2604–2611.
- Huang, J.Z., Schell, M.A. (1991). *In vivo* interactions of the NahR transcriptional activator with its target sequences. Inducer-mediated changes resulting in transcription activation. *J. Biol. Chem.* **266**, 10830–10838.
- Huang, X., Madan, A. (1999). CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **9**, 868–877.
- Huerta-Zepeda, A., Ortuño, L., Du Pont, G., Durán, S., Lloret, A., Merchant-Larios, H., Calderón, J. (1997). Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine. *J. Bacteriol.* **179**, 2068–2072.
- Hungerford, J.M. (2010). Scombroid poisoning: a review. *Toxicol.* **56**, 231–243.
- Ichihara, K., Kanagawa, H., Uchida, M. (1955). Studies on aspartase. *J. Biochem.* **42**, 439–447.
- Imanaga, Y. (1955). Autooxidation of L-ascorbic acid and imidazole nucleus. *J. Biochem.* **42**, 669–676.
- Javid-Majd, F., Blanchard, J.S. (2000). Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase. *Biochemistry* **39**, 1285–1293.
- Kalač, P., Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.* **90**, 219–230.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1467–1473.
- Karovičová, J., Kohajdova, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chem. Pap.* **59**, 70–79.
- Karsten, W.E., Gates, R.B., Viola, R.E. (1986). Kinetic studies of L-aspartase from *Escherichia coli*: substrate activation. *Biochemistry* **25**, 1299–1303.
- Kawata, Y., Tamura, K., Yano, S., Mizobata, T., Nagai, J., Esaki, N., Soda, K., Tokushige, M., Yumoto, N. (1999). Purification and characterization of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 40–46.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845.
- Khan, M.Z., Nawaz, W. (2016). The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors (hTAARs) in central nervous system. *Biomed. Pharmacother.* **83**, 439–449.

- Kim, B.J., Kwon, Y.K., Kim, E., So, I. (2013). Effects of histamine on cultured interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **17**, 149–156.
- Kim, K.-S., Pelton, J.G., Inwood, W.B., Andersen, U., Kustu, S., Wemmer, D.E. (2010). The Rut pathway for pyrimidine degradation: novel chemistry and toxicity problems. *J. Bacteriol.* **192**, 4089–4102.
- Klepp, J., Fallert-Müller, A., Grimm, K., Hull, W.E., Rétey, J. (1990). Mechanism of action of urocanase. *FEBS J.* **192**, 669–676.
- Kny, H., Witkop, B. (1959). Chemical and enzymatic studies of the labile metabolite 4(5H)-imidazoline-5-acetic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 6245–6251.
- Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., Hemmer, W. (2011). Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Addit. Contam. Part A* **28**, 408–416.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol.* **43**, 498–506.
- Krnjevic, K. (1991). Significance of GABA in brain function. *En Tunicliff, G., Raess, B.U. (eds.). GABA Mechanisms in Epilepsy*, pp: 47-87, Wiley-Liss, New York.
- Kurihara, S., Oda, S., Tsuboi, Y., Kim, H.G., Oshida, M., Kumagai, H., Suzuki, H. (2008). γ -Glutamylputrescine synthetase in the putrescine utilization pathway of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **283**, 19981–19990.
- Ladero, V., Linares, D.M., Fernández, M., Álvarez, M.A. (2008). Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. *Food Res. Int.* **41**, 1015–1019.
- Ladero, V., Fernández, M., Álvarez, M.A. (2009). Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses. *Int. Dairy J.* **19**, 759–762.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., Álvarez, M.A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 145–156.
- Ladero, V., Sánchez-Llana, E., Fernández, M., Álvarez, M.A. (2011). Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 516–521.
- Lambrecht, J.A., Flynn, J.M., Downs, D.M. (2012). Conserved YjgF protein family deaminates reactive enamine/imine intermediates of pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme reactions. *J. Biol. Chem.* **287**, 3454–3461.

- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., Belletti, N., Gardini, F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chem.* **104**, 693–701.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2005). Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine? *J. Appl. Microbiol.* **99**, 580–586.
- Landete, J.M., Pardo, I., Ferrer, S. (2006). Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 84–90.
- Landete, J.M., de las Rivas, B., Marcobal, A., Muñoz, R. (2008). Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 697–714.
- Lee, Y.-C., Kung, H.-F., Wu, C.-H., Hsu, H.-M., Chen, H.-C., Huang, T.-C., Tsai, Y.-H. (2016). Determination of histamine in milkfish stick implicated in food-borne poisoning. *J. Food Drug Anal.* **24**, 63–71.
- Lehane, L., Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 1–37.
- Lessie, T.G., Neidhardt, F.C. (1967). Formation and operation of the histidine-degrading pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **93**, 1794–1799.
- Linares, D.M., Martín, M., Ladero, V., Álvarez, M.A., Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**, 691–703.
- Linares, D.M., del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M.C., Álvarez, M.A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Front. Microbiol.* **3**, 180.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Loew, E.R. (1947). Pharmacology of antihistamine compounds. *Physiol. Rev.* **27**, 542–573.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 9–13.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. (1994). Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 401–407.
- Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., Erlander, M.G. (1999). Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol. Pharmacol.* **55**, 1101–1107.
- Luss, L.V. (2014). Use of antihistamines in a physician's clinical practice. *Ter. Arkh.* **86**, 106–109.

- Lyte, M. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *J. Food Prot.* **67**, 878–883.
- Maddocks, S.E., Oyston, P.C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609–3623.
- Maijala, R.L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 40–43.
- Maintz, L., Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1185–1196.
- Maki, Y., Yamamoto, S., Nozaki, M., Hayaishi, O. (1969). Studies on monooxygenases. II. Crystallization and some properties of imidazole acetate monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **244**, 2942–2950.
- Malle, P., Vallé, M., Bouquelet, S. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.* **79**, 43–49.
- Martí-Arbona, R., Xu, C., Steele, S., Weeks, A., Kutty, G.F., Seibert, C.M., Raushel, F.M. (2006). Annotating enzymes of unknown function: N-formimino-L-glutamate deiminase is a member of the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* **45**, 1997–2005.
- Martín-Álvarez, P.J., Marcobal, A., Polo, C., Moreno-Arribas, M.V. (2005). Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 420–424.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L.B., Luengo, J.M. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. A specific enzyme for the catabolism of phenylacetic acid. *J. Biol. Chem.* **265**, 7084–7090.
- Mason, J.R., Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 277–305.
- Matsunami, H., Okajima, T., Hirota, S., Yamaguchi, H., Hori, H., Kuroda, S., Tanizawa, K. (2004). Chemical rescue of a site-specific mutant of bacterial copper amine oxidase for generation of the topa quinone cofactor. *Biochemistry* **43**, 2178–2187.
- Matthysse, S. (1974). Dopamine and the pharmacology of schizophrenia: the state of the evidence. *J. Psychiatr. Res.* **11**, 107–113.
- Mayer, H.K., Fiechter, G., Fischer, E. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3251–3257.
- McCabbe, B.J. (1986). Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* **86**, 1059–1064.

- McCabe-Sellers, B.J., Staggs, C.G., Bogle, M.L. (2006). Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Compos. Anal.* **19**, S58–S65.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., McLennan, H. (1961). The inhibitory action of 3-hydroxytyramine, gamma-aminobutyric acid (GABA) and some other compounds towards the crayfish stretch receptor neuron. *J. Neurochem.* **8**, 36–49.
- McGregor, W.C., Swierczek, S.I., Bennett, B., Holz, R.C. (2005). *argE*-encoded N-acetyl-L-ornithine deacetylase from *Escherichia coli* contains a dinuclear metalloactive site. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14100–14107.
- McIntire, W.S., Hartmann, C. (1993). Copper-containing amine oxidases. *En Davidson, V.L. (ed.). Principles and Applications of Quinoproteins*, pp: 97–171, The University of Mississippi Medical Center Jackson, Mississippi.
- McKennon, M.J., Meyers, A.I., Drauz, K., Schwarm, M. (1993). A convenient reduction of amino acids and their derivatives. *J. Org. Chem.* **58**, 3568–3571.
- Merino, E., Barrientos, A., Rodríguez, J., Naharro, G., Luengo, J.M., Olivera, E.R. (2013). Isolation of cholesterol-and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: evidence of a common pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 891–904.
- Miller, J. (1972). *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Moffat, E.D., Lytle, R.I. (1959). Polychromatic technique for identification of amino acids on paper chromatography. *Anal. Chem.* **31**, 926–928.
- Mohan, C.O., Ravishankar, C.N., Gopal, T.S., Kumar, K.A., Lalitha, K.V. (2009). Biogenic amines formation in seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks packed with O₂ scavenger during chilled storage. *Food Res. Int.* **42**, 411–416.
- Montes, J., Flores, J., Barrón, E.A. (2005). Histamina, receptores y antagonistas. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.* **68**, 104–109.
- Moonen, M.J.H., Fraaije, M.W., Rietjens, I.M.C.M., Laane, C., Van Berkel, W.J.H. (2002). Flavoenzyme-catalyzed oxygenations and oxidations of phenolic compounds. *Adv. Synth. Catal.* **344**, 1023–1035.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., Conte, L.S. (2005). A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chem.* **89**, 355–361.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G.T., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273.
- Murray, T.J. (2009). The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J. Neurol. Sci.* **277**, S3–S8.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J. Food Sci.* **75**, R139–R150.

- Nakamura, T., Itadani, H., Hidaka, Y., Ohta, M., Tanaka, K. (2000). Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 615–620.
- NCBI Resource Coordinators (2017). Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **45**, D12–D17.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., Deboy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhöft, A., Tümmler, B., Fraser, C.M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**, 799–808.
- Nordlund, I., Powlowski, J., Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**, 6826–6833.
- Norrande, J., Kempe, T., Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101–106.
- Ohmura, E., Hayaishi, O. (1957). Enzymatic conversion of formylaspartic acid to aspartic acid. *J. Biol. Chem.* **227**, 181–190.
- Oinonen, C., Rouvinen, J. (2000). Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci.* **9**, 2329–2337.
- Olanow, C.W., Freeman, T.B., Kordower, J.H. (1997). Neural transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **74**, 249–269.
- Olivera, E.R., Miñambres, B., García, B., Muñoz, C., Moreno, M.A., Ferrández, A., Díaz, E., García, J.L., Luengo, J.M. (1998). Molecular characterization of the phenylacetic acid catabolic pathway in *Pseudomonas putida* U: the phenylacetyl-CoA catabolon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6419–6424.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* **753**, 2–18.
- Orii, C., Takenaka, S., Murakami, S., Aoki, K. (2004). A novel coupled enzyme assay reveals an enzyme responsible for the deamination of a chemically unstable intermediate in the metabolic pathway of 4-amino-3-hydroxybenzoic acid in *Bordetella* sp. strain 10d. *FEBS J.* **271**, 3248–3254.
- Oubrie, A., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Huizinga, E.G., Dijkstra, B.W. (2002). Crystal structure of quinoxinone alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer. *J. Biol. Chem.* **277**, 3727–3732.
- Palleroni, N.J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231–251.

- Palleroni, N.J. (2005). *Pseudomonas*. En Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Part B, pp: 323-379, Springer, Michigan State University.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., Doudoroff, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **23**, 333–339.
- Parsons, M.E., Ganellin, C.R. (2006). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.* **147**, S127-S135.
- Pearson, W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* **183**, 63–98.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 2444–2448.
- Peräkylä, M., Kollman, P.A. (1997). A simulation of the catalytic mechanism of aspartylglucosaminidase using *ab initio* quantum mechanics and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 1189–1196.
- Peräkylä, M., Rouvinen, J. (1996). *Ab initio* quantum mechanical model calculations on the catalytic mechanism of aspartylglucosaminidase (AGA): a serine protease-like mechanism with an N-terminal threonine and substrate-assisted catalysis. *Chem. Eur. J.* **2**, 1548–1551.
- Pérez-Rueda, E., Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1838–1847.
- Phan, I., Subramanian, S., Olsen, C., Edwards, T.E., Guo, W., Zhang, Y., Van Voorhis, W.C., Stewart, L.J., Myler, P.J. (2011). Structure of fumarate hydratase from *Rickettsia prowazekii*, the agent of typhus and suspected relative of the mitochondria. *Acta Crystallograph. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 1123–1128.
- Porrúa, O., García-Jaramillo, M., Santero, E., Govantes, F. (2007). The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol. Microbiol.* **66**, 410–427.
- Price, R.J., Melvin, E.F. (1994). Recommendations for on board handling of albacore tuna. Sea Grant Extension Program. *Food Sci. Technol. Ext.* University of California, Davis.
- Quandt, J., Hynes, M.F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15–21.
- Rabie, M., Simon-Sarkadi, L., Siliha, H., El-seedy, S., El Badawy, A.-A. (2009). Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage. *Food Chem.* **115**, 635–638.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. En Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K.-I. (eds.). *Rapid Cycle Real-Time PCR*, pp: 21–34, Springer, Berlin, Heidelberg.

- Rauscher-Gabernig, E., Grossgut, R., Bauer, F., Paulsen, P. (2009). Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control* **20**, 423–429.
- Recsei, P.A., Snell, E.E. (1972). Histidine decarboxylaseless mutants of *Lactobacillus* 30a: isolation and growth properties. *J. Bacteriol.* **112**, 624–626.
- Reznikoff, W.S. (1993). The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 945–964.
- Rhee, K.Y., Opel, M., Ito, E., Hung, S., Arfin, S.M., Hatfield, G.W. (1999). Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 14294–14299.
- Rico, S., Antonijoan, R., Barbanoj, M. (2009). Ebastine in the light of CONGA recommendations for the development of third-generation antihistamines. *J. Asthma Allergy* **2**, 73–92.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **245**, 154–160.
- de las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R. (2006). PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Prot.* **69**, 2509–2514.
- Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., Hernández-Herrero, M. (2002). Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* **215**, 96–100.
- Rollan, G.C., Coton, E., Lonvaud-Funel, A. (1995). Histidine decarboxylase activity of *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiol.* **12**, 455–461.
- Rorije, E., Germa, F., Philipp, B., Schink, B., Beimborn, D.B. (2002). Prediction of biodegradability from structure: imidazoles. *SAR and QSAR in Environ. Res.* **13**, 199–204.
- Rosell-Camps, A., Zibetti, S., Pérez-Esteban, G., Vila-Vidal, M., Ferrés-Ramis, L., García-Teresa-García, E. (2013). Histamine intolerance as a cause of chronic digestive complaints in pediatric patients. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **105**, 201–207.
- Ross, W.F., Walters, D.R., Robins, D.J. (2004). Synthesis and antifungal activity of five classes of diamines. *Pest. Manag. Sci.* **60**, 143–148.
- Rothberg, S., Hayaishi, O. (1957). Studies on oxygenases. Enzymatic oxidation of imidazoleacetic acid. *J. Biol. Chem.* **229**, 897–903.
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 489–499.

- Sainsbury, S., Lane, L.A., Ren, J., Gilbert, R.J., Saunders, N.J., Robinson, C.V., Stuart, D.I., Owens, R.J. (2009). The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4545–4558.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandmeier, E., Hale, T.I., Christen, P. (1994). Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur. J. Biochem.* **221**, 997–1002.
- Santos, M.H.S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 213–231.
- Sawers, G. (1998). The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals. *Arch. Microbiol.* **171**, 1–5.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Schell, M.A., Brown, P.H., Raju, S. (1990). Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J. Biol. Chem.* **265**, 3844–3850.
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., Suzzi, G. (2016). Histamine food poisoning. *En Hattori, Y., Seifert, R. (eds.). Histamine and histamine receptors in health and disease. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 241, pp: 217-235, Springer, Cham.*
- Schreuder, H.A., Hol, W.G.J., Drenth, J. (1990). Analysis of the active site of the flavoprotein *p*-hydroxybenzoate hydroxylase and some ideas with respect to its reaction mechanism. *Biochemistry* **29**, 3101–3108.
- Schwartz, J.H. (2001). Neurotransmitters. *eLS*.
- Schwelberger, H.G. (2004a). Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. *En Falus, A. (ed.). Histamine: Biology and Medical Aspects, pp: 43–52, SpringMed Publishing, Budapest.*
- Schwelberger, H.G. (2004b). Histamine N-methyltransferase (HNMT) enzyme and gene. *En Falus, A. (ed.). Histamine: Biology and Medical Aspects, pp: 53–59, SpringMed Publishing, Budapest.*
- Selvaraj, G., Iyer, V.N. (1983). Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* **156**, 1292–1300.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q.X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**, 278–309.

- Shah, P., Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **68**, 4–16.
- Shahid, M., Tripathi, T., Khardori, N., Khan, R.A. (2010). An overview of histamine synthesis, regulation and metabolism, and its clinical aspects in biological system. *En Khardori, N., Ali Khan, R., Tripathi, T. (eds.). Biomedical Aspects of Histamine*, pp: 3–13, Springer, Netherlands.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**, 675–690.
- Shi, W., Dunbar, J., Jayasekera, M.M., Viola, R.E., Farber, G.K. (1997). The structure of L-aspartate ammonia-lyase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 9136–9144.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., López, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.
- Simons, F.E.R., Simons, K.J. (2003). Antihistamines. *En Kay, A.B., Kaplan, A.P., Bousquet, J., Holt, P.G. (eds.). Allergy and allergic diseases, Vol. 1*, pp: 549–565, Wiley-Blackwell, Oxford.
- Smith, T.A. (1981). Amines in food. *Food Chem.* **6**, 169–200.
- Smuda, C., Bryce, P.J. (2011). New developments in the use of histamine and histamine receptors. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **11**, 94–100.
- Stoesser, G., Baker, W., Van den Broek, A., Camon, E., García-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Lombard, V., López, R., Parkinson, H., Redaschi, N., Sterk, P., Stoehr, P., Tuli, M.A. (2001). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res.* **29**, 17–21.
- Sturgill, G., Rather, P.N. (2004). Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* **51**, 437–446.
- Suyama, M., Yoshizawa, Y. (1973). Free amino acid composition of the skeletal muscle of migratory fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **39**, 1339–1343.
- Suzzi, G., Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 41–54.
- Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M.E., Neviani, E. (2003). Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Res.* **3**, 159–166.
- Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R., Siemann, M. (1999). Microbial hydantoinases – industrial enzymes from the origin of life? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 293–309.
- Tabor, H., Mehler, A.H. (1954). Isolation of N-formyl-L-glutamic acid as an intermediate in the enzymatic degradation of L-histidine. *J. Biol. Chem.* **210**, 559–568.

- Tabor, H., Mehler, A.H., Hayaishi, O., White, J. (1952). Urocanic acid as an intermediate in the enzymatic conversion of histidine to glutamic and formic acids. *J. Biol. Chem.* **196**, 121–128.
- Takagi, J.S., Ida, N., Tokushige, M., Sakamoto, H., Shimura, Y. (1985). Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Escherichia coli* W. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2063–2074.
- Takagi, J.S., Tokushige, M., Shimura, Y. (1986). Cloning and nucleotide sequence of the aspartase gene of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem.* **100**, 697–705.
- Takagi, K., Torimura, M., Kawaguchi, K., Kano, K., Ikeda, T. (1999). Biochemical and electrochemical characterization of quinoxaline amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **38**, 6935–6942.
- Takemoto, T., Fujita, S., Ohno, K. (2004). Process for producing N-formylamino acid and utilization thereof. *European Patent Application* EP1380570A1.
- Takenaka, S., Sato, T., Koshiya, J., Murakami, S., Aoki, K. (2009). Gene cloning and characterization of a deaminase from the 4-amino-3-hydroxybenzoate-assimilating *Bordetella* sp. strain 10d. *FEMS Microbiol. Lett.* **298**, 93–98.
- Tateno, Y., Fukami-Kobayashi, K., Miyazaki, S., Sugawara, H., Gojobori, T. (1998). DNA Data Bank of Japan at work on genome sequence data. *Nucleic Acids Res.* **26**, 16–20.
- Taylor, S.L., Eitenmiller, R.R. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 91–128.
- Taylor, S.L., Sumner, S.S. (1986). Determination of histamine, putrescine and cadaverine. *En Kramer, D.T., Liston, J. (eds.). Seafood Quality Determination*, pp: 235–245, Elsevier Science Publishers, B.V, Amsterdam.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis in 't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11**, 73–84.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Thurmond, R.L. (2015). The histamine H4 receptor: from orphan to the clinic. *Front. Pharmacol.* **6**, 65.
- Tolbert, W.D., Graham, D.E., White, R.H., Ealick, S.E. (2003). Pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase from *Methanococcus jannaschii*: crystal structures of the self-cleaved and S53A proenzyme forms. *Structure* **11**, 285–294.
- Toro-Funes, N., Bosch-Fuste, J., Latorre-Moratalla, M.L., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C. (2015). Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market. *Food Chem.* **173**, 1119–1124.

- Tunncliff, G. (1992). Significance of γ -hydroxybutyric acid in the brain. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **23**, 1027–1034.
- Tunncliff, G. (1998). Pharmacology and function of imidazole 4-acetic acid in brain. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **31**, 503–509.
- Uchida, M., Ohtani, A., Kohyama, N., Okajima, T., Tanizawa, K., Yamamoto, Y. (2003). Stereochemistry of 2-phenylethylamine oxidation catalyzed by bacterial copper amine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 2664–2667.
- Valembois, S., Krall, J., Frølund, B., Steffansen, B. (2017). Imidazole-4-acetic acid, a new lead structure for interaction with the taurine transporter in outer blood-retinal barrier cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **103**, 77–84.
- Van Berkel, W.J.H., Kamerbeek, N.M., Fraaije, M.W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**, 670–689.
- Van Neste, A., Duce, R.A., Lee, C. (1987). Methylamines in the marine atmosphere. *Geophys. Res. Lett.* **14**, 711–714.
- Vandenberghe, I., Kim, J.K., Devreese, B., Hacısalihoglu, A., Iwabuki, H., Okajima, T., Kuroda, S., Adachi, O., Jongejan, J.A., Duine, J.A., Tanizawa, K., Van Beeumen, J. (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.
- Vender, J., Rickenberg, H.V. (1964). Ammonia metabolism in a mutant of *Escherichia coli* lacking glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 218–220.
- Viola, R.E. (2000). L-aspartase: new tricks from an old enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **74**, 295–341.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Front. Microbiol.* **3**, 188.
- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., Suzzi, G. (2014). Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front. Microbiol.* **5**, 500.
- Viswanathan, P., Ueki, T., Inouye, S., Kroos, L. (2007). Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 7969–7974.
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* **299**, 76.
- Wang, C.C., Billett, E., Borchert, A., Kuhn, H., Ufer, C. (2012). Monoamine oxidases in development. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 599–630.
- Whited, G.M., Gibson, D.T. (1991). Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**, 3010–3016.

- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G.J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.
- Wilbur, W.J., Lipman, D.J. (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 726–730.
- Wilson, R.L., Urbanowski, M.L., Stauffer, G.V. (1995). DNA binding sites of the LysR-type regulator GcvA in the *gcv* and *gcvA* control regions of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4940–4946.
- Wöhrl, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., Jarisch, R. (2004). Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy Asthma Proc.* **25**, 305–311.
- Wu, F., Yu, J., Gehring, H. (2008). Inhibitory and structural studies of novel coenzyme-substrate analogs of human histidine decarboxylase. *FASEB J.* **22**, 890–897.
- Wyder, M.-T., Bachmann, H.-P., Puhon, Z. (1999). Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil wrapped raclette cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* **32**, 333–343.
- Yamada, H., Adachi, O., Ogata, K. (1965). Amine oxidases of microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **29**, 649–654.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119.
- Yao, X., He, W., Lu, C.-D. (2011). Functional characterization of seven γ -glutamylpolyamine synthetase genes and the *bauRABCD* locus for polyamine and β -alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **193**, 3923–3930.
- Yatsunami, K., Ohtsu, H., Tsuchikawa, M., Higuchi, T., Ishibashi, K., Shida, A., Shima, Y., Nakagawa, S., Yamauchi, K., Yamamoto, M. (1994). Structure of the L-histidine decarboxylase gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 1554–1559.
- Zelyas, N.J., Cai, H., Kwong, T., Jensen, S.E. (2008). Alanylclavam biosynthetic genes are clustered together with one group of clavulanic acid biosynthetic genes in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* **190**, 7957–7965.
- Zukin, S.R., Young, A.B., Snyder, S.H. (1974). Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 4802–4807.

