



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 transformación de histamina en ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U.

Jóse Luis Gómez Botrán

Tesis Doctoral. León, 2017



universidad
de león

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. D. José María Luengo Rodríguez como Director y, el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera y el Dr. D. José Manuel Fernández Cañón como codirectores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio bioquímico, genético y biotecnológico de la ruta catabólica responsable de la transformación de histamina en ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U”, realizada por D. José Luis Gómez Botrán en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a de Julio de 2017.

Fdo.: Dr. D. José María Luengo Rodríguez

Fdo: Dr. D. Elías Rodríguez Olivera

Fdo.: Dr. D. José Manuel Fernández Cañón



universidad
de león

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día de Julio de 2017 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Estudio bioquímico, genético y biotecnológico de la ruta catabólica responsable de la transformación de histamina en ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U”, dirigida por el Dr. D. José María Luengo Rodríguez, el Dr. D. Elías Rodríguez Olivera y el Dr. D. José Manuel Fernández Cañón, elaborada por D. José Luis Gómez Botrán y cuyo título en inglés es el siguiente “Biochemical, genetic and biotechnological study of the catabolic pathway involved in the transformation of histamine into imidazoleacetic acid in *Pseudomonas putida* U”.

Lo que firmo, en León a de Julio de 2017.

El Secretario,

Fdo.: Dr. D. Jesús Manuel Aparicio Fernández

Vº Bº

El Director del Departamento/
Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: Dra. D^a. Ana Isabel González Cordero

**A mis padres,
por su gran apoyo.**

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Ghandi.

AGRADECIMIENTOS.

Ha sido un placer llevar a cabo este trabajo de Tesis Doctoral en el que, no solo he adquirido conocimientos de laboratorio, sino también de la vida. Ha sido duro, sobre todo la última parte, pero sin duda con esfuerzo, constancia y gente que cree en ti se consigue.

Quiero empezar agradeciendo al que ha propiciado que este trabajo salga adelante, el Dr. José María Luengo Rodríguez, Director de Tesis, además de compañero, porque no solo me has dirigido, sino que también hemos compartido buenos momentos haciendo experimentos juntos. Muchas gracias por todos estos años en los que me has ayudado a formarme como investigador y como persona. También quiero agradecerte una gran experiencia de mi vida, la estancia en Bahrain, la cual siempre recordaré y que se llevó a cabo por tu colaboración.

A mis codirectores, el Dr. Elías Rodríguez Olivera y el Dr. José Manuel Fernández Cañón. Elías, has sido un gran apoyo en el laboratorio y me has ayudado en todo lo que he necesitado. Gracias José Manuel, porque me abriste las puertas de tu laboratorio y fuiste más un compañero que un codirector.

Al Dr. Germán Naharro, por tu amabilidad y tus consejos científicos. Gracias al Dr. Óscar Ferrero y al Dr. Francisco Bermejo, por vuestra inestimable colaboración en este trabajo.

Al Dr. Wael Ahmed Ismail Elmoslimany, por acogerme en tu laboratorio durante la estancia en Bahrain, dándome la oportunidad de vivir una experiencia inolvidable y fantástica a nivel profesional y personal.

A mis compañeros de trabajo con los que más tiempo he compartido dentro y fuera del laboratorio, como sois Iñaki, Manu, Fani, Lidia, Sergio, Carmen, Álvaro y Joaquín. En este apartado, quiero hacer especial mención a Manu, compañero de trabajo con el que he formado un gran equipo, haciendo que todo fuese más fácil, y por supuesto a Iñaki, que además de

compañero de laboratorio y amigo, ha sido compañero de piso en la mayor parte de estos años. También mencionar a gente con la que he compartido momentos en el laboratorio como Mario, Nico, Patri, Andrea y Sagrario. Gracias a todos aquellos estudiantes de Máster y Grado que han ido pasando por el departamento como Luis, Andoni e Israel entre otros. Gracias también a los técnicos Eduardo, Toñi, Yaiza, Laura y Sergio.

A mis Padres, porque vuestro apoyo ha sido fundamental. Gracias a vosotros he podido hacer lo que me gusta, y habéis estado apoyándome en los malos momentos. Gracias MADRE y PADRE, porque todo lo que soy os lo debo a vosotros.

A Noelia, porque nos hemos conocido en los momentos más difíciles de este trabajo y has tenido una gran paciencia, siempre has creído en mí. Me has apoyado incondicionalmente y eres la que más ánimo me ha dado transmitiéndome fuerza para continuar. Me has mostrado que con esfuerzo se consigue todo.

A mis amigos por escucharme, por interesarse por mí y animarme. Gracias por vuestras visitas que me han hecho salir de la rutina. Gracias Paco Javi, Sara, Dani, Pablo, Patri, Sergio, Jorge, David y Carmen por todo esto y por sacar siempre hueco para quedar a pesar de las apretadas agendas.

Al colegio Lestonnac, y concretamente a los coordinadores de los Grupos, Juancho y Alejandro, porque a pesar de cambiar de ciudad y no haber podido tener una continuidad, me habéis permitido ejercer de monitor y de coordinador, depositando en mi la responsabilidad de organizar campamentos, convivencias y la excursión veraniega.

También quiero agradecer al Ministerio de Educación por concederme la beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU AP2010-2735, Orden EDU/3445/2011, de 30 de noviembre de 2011), y a la Junta de Castilla y León por adjudicarme la Ayuda para la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria cofinanciada por el Fondo Social Europeo (Orden EDU/537/2010, de 20 de abril de 2010). Además, ambas instituciones han concedido distintos proyectos y, todo ello, ha permitido que pueda realizar esta Tesis Doctoral.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Biodegradación: aspectos generales	15
2. Aminas biogénicas	17
2.1. Aminas biogénicas con función neurotransmisora	19
2.2. Aminas biogénicas en los alimentos.....	22
2.3. Producción de aminas biogénicas.....	27
2.3.1. Descarboxilación de aminoácidos.....	28
2.3.2. Organismos productores	30
2.3.3. Factores que afectan a la producción de aminas biogénicas.....	33
2.4. Toxicidad de las aminas biogénicas	34
2.5. Métodos de identificación y análisis cualitativos y cuantitativos.....	35
2.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	35
2.5.2. Electroforesis capilar	36
2.5.3. Cromatografía de gases.....	36
2.5.4. Cromatografía en capa fina (TLC).....	37
2.5.5. Métodos enzimáticos	37
3. Degradación de aminas biogénicas	38
3.1. Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas	39
3.2. Quinoproteínas amino deshidrogenasas	42
3.3. Quinoproteínas amino oxidasas.....	43
3.4. Flavoproteínas amino oxidasas.....	45

4. Histamina	46
4.1. Receptores de histamina y antihistamínicos	47
4.2. Funciones de la histamina.....	50
4.3. Enfermedades asociadas con la histamina.....	51
4.4. Síntesis de histamina	54
5. Transporte de histamina.....	57
5.1. Sistemas OCT	57
5.2. Sistemas PMAT	58
5.3. Sistemas VMAT	58
5.4. Sistemas antiporte.....	59
5.5. Transportadores ABC	60
6. Degradación de histamina	62
6.1. Desaminación oxidativa	65
6.2. Metilación.....	66
6.3. Acetilación.....	67
6.4. Otras alternativas	68
6.4.1. Vía del ácido ascórbico.....	68
6.4.2. Glutamilación.....	69
6.4.3. Alanización	69

OBJETIVOS..... 73

MATERIALES Y MÉTODOS..... 77

1. Microorganismos utilizados	79
1.1. Especies bacterianas de <i>Pseudomonas</i>	79
1.1.1. <i>Pseudomonas putida</i> U	79

ÍNDICE

1.1.2. <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	81
1.1.3. <i>Pseudomonas putida</i> DOC21.....	82
1.2. Especies bacterianas de <i>Escherichia coli</i>	82
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> HB101	82
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> DH10B	83
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> W.....	83
1.3. Otra especie bacteriana: <i>Enterobacter aerogenes</i>	83
2. Vectores utilizados.....	86
2.1. pGS9	86
2.2. pUC18.....	86
2.3. pGEM [®] -T Easy.....	87
2.4. pTZ57R/T	87
2.5. pBlueScript II (KS/ SK)	88
2.6. pK18:: <i>mob</i>	88
2.7. pJQ200 (KS/SK).....	88
2.8. pBBR1MCS-(3/5).....	89
3. Reactivos químicos y bioquímicos	92
4. Medios de cultivo	93
4.1. Medio Luria Bertani (LB).....	93
4.2. Medio Φ	93
4.3. Medio SOC	93
4.4. Sales del medio mínimo (MM) de <i>Pseudomonas</i>	94
4.5. Aditivos suplementados.....	94
5. Mantenimiento y crecimiento de los microorganismos	95
6. Métodos generales para el análisis y/o tratamiento de las muestras de DNA	96
6.1. Determinación de la concentración y pureza del DNA/RNA.....	96
6.2. Digestión del DNA	96

6.3. Desfosforilación del DNA	97
6.4. Ligación de fragmentos de DNA.....	97
6.5. Análisis de las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa	98
6.6. Recuperación del DNA desde los geles de agarosa.....	99
6.7. Aislamiento de DNA genómico de <i>Pseudomonas putida</i>	99
6.8. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	101
7. Transformación de <i>E. coli</i>	102
7.1. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i>	102
7.1.1. Método del cloruro de rubidio	102
7.1.2. Obtención de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> W	103
7.2. Procedimiento de transformación	104
7.2.1. Choque térmico.....	104
7.2.2. Electroporación	105
8. Técnica de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ..	105
9. Análisis de las secuencias de DNA	107
10. Obtención de mutantes de <i>P. putida</i>	108
10.1. Mutagénesis con el transposón Tn5.....	108
10.1.1. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico.....	110
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”	112
10.1.3. Secuenciación de las zonas adyacentes a un fragmento de secuencia conocida.	115
10.2. Obtención de mutantes mediante disrupción.....	116
11. Expresión de los genes en <i>trans</i>	118
12. Análisis de los caldos de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	119

13. Extracción, identificación y separación de D-alanina y L-alanina en diferentes mutantes	120
13.1. Extracción de alanina.....	120
13.2. Identificación de la alanina mediante cromatografía en capa fina (TLC)	121
13.3. Separación de D-alanina y L-alanina.....	122
14. Técnica de espectroscopía de infrarrojo (IR)	122
15. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	123
16. PCR a tiempo real (RT-PCR).....	123
17. Determinación del transporte de histamina en <i>P. putida</i> U.....	125
18. Síntesis química de imidazoletanol	126

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 129

1. Justificación del planteamiento experimental	131
2. Aislamiento de mutantes incapaces de degradar histamina.....	133
3. Análisis del consumo de histamina y de los metabolitos acumulados por los distintos mutantes.....	135
4. Identificación del punto de inserción del transposón Tn5 y secuenciación de las zonas adyacentes	139
5. Análisis de los diferentes <i>clusters</i> implicados en la degradación de histamina en <i>P. putida</i> U	140
5.1. Organización genética del <i>cluster hinEABCD (hin1)</i>	141
5.1.1. Transporte de histamina.....	146
5.1.1.1. Gen <i>hinA</i>	146
5.1.2. Desaminación de la histamina	159
5.1.2.1. Gen <i>hinC</i>	159
5.1.3. Otros ORFs presentes en el <i>cluster hin</i>	167
5.1.3.1. Gen <i>hinD</i>	168
5.1.3.2. Gen <i>hinE</i>	171

5.1.3.3. Disrupción de los genes <i>hinD</i> y <i>hinE</i>	175
5.1.4. Regulación de la ruta <i>hin</i>	177
5.1.4.1. Gen <i>hinB</i>	177
5.1.5. Análisis comparativo de otros posibles <i>cluster hinI</i> presentes en diferentes microorganismos.....	184
5.2. Organización genética del <i>cluster dad</i>	186
5.2.1. Regeneración del piruvato y participación en el sistema de transferencia de electrones	188
5.2.1.1. Gen <i>dadA</i>	188
5.2.1.2. Gen <i>dadX</i>	197
5.2.2. Regulación del <i>cluster dad</i>	202
5.2.2.1. Gen <i>dadR</i>	202
5.2.3. Análisis comparativo del <i>cluster dad</i> en otros microorganismos	211
5.3. Organización genética del <i>cluster cox</i>	213
5.3.1. Generación de la energía requerida para la incorporación de histamina	216
5.3.1.1. Gen <i>coxB</i>	220
5.3.1.2. Gen <i>coxA</i>	225
5.3.1.3. Gen <i>coxII</i>	228
5.3.1.4. Gen <i>coxC</i>	230
5.3.2. ORFs adyacentes al <i>cluster cox</i>	233
5.3.3. Transferencia de electrones a la enzima citocromo c oxidasa	234
5.3.4. Análisis comparativo del <i>cluster cox</i> en otros microorganismos.....	235
6. Posible intermediario catabólico: imidazoletanol	237
7. Estudio de la expresión heteróloga de los genes implicados en la degradación de histamina en <i>P. putida</i> U en otros microorganismos	239
8. Estudio de la capacidad de los mutantes de histamina para catabolizar otras aminas y aminoácidos	245
9. Ingeniería metabólica: degradación de histidina vía histamina	252

10. Ruta propuesta de la eliminación microbiana de histamina en *P. putida* U 256

11. Aplicaciones biotecnológicas 259

CONCLUSIONES 263

BIBLIOGRAFÍA 269

ABREVIATURAS.

AADH: amino deshidrogenasa de aminoácidos aromáticos.

Abs: Absorbancia.

AFA: ácido fenilacético.

3-OHAF: ácido 3-hidroxifenilacético.

4-OHAF: ácido 4-hidroxifenilacético.

Ap: ampicilina.

ALDH: aldehído deshidrogenasa.

ATP: trifosfato de adenosina.

Cm: cloranfenicol.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

CTQ: cisteína triptofilquinona.

DAO: diamino oxidasa.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNasa: desoxirribonucleasa.

DO: densidad óptica.

EC: comisión enzimática.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

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

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.

Gtm: gentamicina.

h: horas.

HCO: oxidasas hemo-cobre.

hin: genes catabólicos de histamina.

his: genes catabólicos de histidina.

HNMT: histamina N-metiltransferasa.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

ImAA: ácido imidazolacético.

ImAdh: imidazolacetaldehído.

IPTG: isopropil- β -D-galactopiranosido.

IR: espectroscopía de infrarrojo.

Km: kanamicina.

LB: Luria Bertani.

LTQ: lisina tirosilquinona.

MADH: metilamina deshidrogenasa.

MAO: monoamino oxidasa.

min: minuto.

MM: medio mínimo de composición definida.

Mw: peso molecular.

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

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

OCT: transportador catiónico orgánico.

ORF: marco abierto de lectura.

pI: punto isoeléctrico.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PMAT: transportador de monoaminas a través de la membrana plasmática.

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-PCR: PCR a tiempo real.

s: segundos.

Str: estreptomycin.

ABREVIATURAS

Tc: tetraciclina.

TE: Tris-EDTA.

TLC: cromatografía en capa fina.

Tm: temperatura de fusión.

TTQ: triptófano triptofilquinona.

TPQ: topaquinona.

VMAT: transportador vesicular de monoaminas.

v/v: relación volumen/volumen.

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

ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS:

A: Alanina.

C: Cisteína.

D: Aspártico.

E: Glutámico.

F: Fenilalanina.

G: Glicina.

H: Histidina.

I: Isoleucina.

K: Lisina.

L: Leucina.

M: Metionina.

N: Asparragina.

P: Prolina.

Q: Glutamina.

R: Arginina.

S: Serina.

T: Treonina.

V: Valina.

W: Triptófano.

Y: Tirosina.

INTRODUCCIÓN

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein.

INTRODUCCIÓN.

1. BIODEGRADACIÓN: ASPECTOS GENERALES.

La sociedad en la que vivimos está sometida a una revolución tecnológica e industrial tan intensa que, fruto de esa actividad, se han modificado numerosos nichos ecológicos. Por esta razón, uno de los objetivos más acuciantes es el de eliminar los compuestos contaminantes que estamos generando antes de que provoquemos alteraciones irreversibles de nuestro ecosistema. Como consecuencia de esta necesidad imperiosa, han surgido nuevas disciplinas científicas que tienen como finalidad conseguir un planeta más habitable y salvaguardar su riqueza natural. Por esta razón, hoy en día es común hablar de términos tales como biodegradación y, sobre todo, de biorremediación.

La **biodegradación** se define como el proceso por el cual las sustancias orgánicas con estructuras más o menos complejas son transformadas en moléculas más sencillas mediante la acción de los microorganismos. Con este término se describen todos aquellos cambios biológicos que acaecen sobre un contaminante concreto y que se realizan mediante dos procedimientos diferentes. En unos casos, el contaminante orgánico se utiliza como fuente de carbono y energía durante el crecimiento del microorganismo, dando como resultado una completa biodegradación (a este proceso se le denomina **mineralización**). En otros casos, el metabolismo del compuesto orgánico requiere, además, la presencia de un substrato que es utilizado para crecer. A este procedimiento se le denomina **cometabolismo** porque para que se pueda biodegradar un compuesto se requiere otro que sirva como soporte energético. La biodegradación varía enormemente en función del compuesto orgánico y/o del microorganismo que lo realiza (Joutey *et al.*, 2013).

Cuando la biodegradación se asocia con la remediación medioambiental surge lo que entendemos como **biorremediación**, término que hace referencia a cualquier proceso que utilice los microorganismos, las plantas, los animales o las enzimas derivadas de ellos para restaurar un medio ambiente alterado por los contaminantes. La biorremediación consta de tres fases. En la primera tiene lugar una atenuación natural de los contaminantes. Durante ella, los microorganismos propios del ecosistema reducen los compuestos orgánicos sin ninguna actuación externa. En la segunda fase se produce una bioestimulación, esto es, se aplican

nutrientes y oxígeno para mejorar la eficacia y acelerar así la biodegradación. En la última fase se lleva a cabo lo que se denomina bioaumentación, que consiste en la incorporación de nuevos microorganismos, usualmente más eficientes que la flora propia del nicho natural (Glazer and Nikaido, 2007; Joutey *et al.*, 2013). A veces, el compuesto contaminante no se puede eliminar totalmente, en tales casos hablamos de **biotransformación**. Este proceso implica la conversión de la molécula original en otro u otros productos menos tóxicos, reduciendo, así, sus efectos nocivos sobre los ecosistemas.

Los compuestos orgánicos biodegradables pueden clasificarse en dos grupos: los compuestos **naturales**, que son aquellos sintetizados por los seres vivos o por procesos geológicos o ambientales y que existen en la naturaleza desde tiempo remoto, y los **xenobióticos**, compuestos de origen industrial, que tienen estructuras moleculares usualmente muy estables y que no suelen encontrarse en la naturaleza (Dagley, 1981; Leisinger, 1983). Un grupo especial de compuestos orgánicos son los denominados aromáticos, caracterizados por su gran estabilidad química. Dentro de los compuestos aromáticos se incluyen tanto moléculas biodegradables como aquellas otras que solo pueden ser atacadas por algunos seres vivos.

Los animales y las plantas son capaces de modificar únicamente la estructura de ciertas moléculas aromáticas. Por esta razón, estos seres vivos no contribuyen de manera importante a la mineralización de los compuestos aromáticos tóxicos (Alexander, 1981; Gibson, 1988). Sin embargo, la potencialidad catabólica de los microorganismos, particularmente de las bacterias y de los hongos, les permite degradar numerosos compuestos aromáticos, incluso algunos que son extremadamente tóxicos. A pesar de lo expuesto, no todos los compuestos aromáticos pueden ser eliminados con facilidad ya que los microbios poseen una capacidad limitada, lo que les impide introducir grupos funcionales que incrementen la inestabilidad química de esas moléculas. En los últimos años han surgido distintas líneas de investigación que tienen como finalidad obtener, bien mediante ingeniería genética o bien aplicando ingeniería metabólica microbiana, cepas capaces de degradar un gran número de compuestos xenobióticos.

En suma, el objetivo final es conseguir que en un único microorganismo se expresen conjuntamente rutas de biodegradación completas, o, al menos, ciertas enzimas que confieran alguna ventaja metabólica a la cepa degradadora (Dua *et al.*, 2002). El hecho de que los genes que pertenecen a la misma ruta catabólica se encuentren generalmente asociados en

agrupaciones llamadas *clusters* y que, en muchos casos, estén codificados en plásmidos, facilita en gran medida el estudio y la transferencia de los genes que codifican enzimas catabólicas inusuales.

Como hemos indicado, numerosas especies bacterianas pueden catabolizar un amplio rango de sustratos, aunque las que pertenecen al género *Pseudomonas* poseen una potencialidad catabólica mucho más elevada que el resto. Esto se debe a que esas bacterias tienen una gran capacidad de adaptación a muchos ambientes (suelen ser ubicuas) y además son capaces de reaccionar frente a cambios en las condiciones físico-químicas y fisiológicas. Por esta razón, las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, han sido utilizadas para el estudio de las rutas catabólicas responsables de la degradación de diferentes compuestos con naturaleza aromática. Una especie en particular, *Pseudomonas putida* U, es capaz de degradar un gran número de compuestos entre los que se incluyen ácidos orgánicos con estructura aromática, alifática o mixta, ésteres, aminas (feniletilamina, tiramina, dopamina e histamina) y muchas otras fuentes de carbono (Martínez-Blanco *et al.*, 1990; Olivera *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2010). Esta cepa es una poderosa herramienta biotecnológica y, por esta razón, ha sido utilizada en este trabajo para abordar el estudio de la ruta catabólica responsable de la asimilación de histamina.

2. AMINAS BIOGÉNICAS.

Las aminas son compuestos orgánicos nitrogenados derivados del amoníaco, de bajo peso molecular y en las que se ha producido el reemplazamiento de alguno de los hidrógenos por grupos alquilo. En función del número de hidrógenos substituidos se habla de aminas primarias, secundarias o terciarias. Las aminas que se forman como consecuencia de la actividad de organismos vivos, y que poseen actividad biológica, se denominan **aminas biogénicas**. Estas aminas biogénicas se pueden clasificar en dos grupos (Benkerroum, 2016): las **endógenas** que son sintetizadas en diferentes tejidos de los organismos superiores y las **exógenas** que son ingeridas en la dieta, apareciendo durante el procesado o almacenaje de los alimentos por acción de los microorganismos. Algunas aminas, tales como la putrescina, la cadaverina, la agmatina y la histamina, pertenecen a ambos grupos (Emborg *et al.*, 2015). Las aminas también se pueden clasificar en función del número de grupos amino o de su estructura química (Smith, 1981; Bardócz, 1995; Glória, 2005). De acuerdo al número de

INTRODUCCIÓN

grupos amino, pueden ser monoaminas (tiramina y feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermidina, espermina y agmatina). Basándose en su estructura química, se dividen en 3 grupos: aminas alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina y agmatina); aminas aromáticas (tiramina y feniletilamina) y aminas heterocíclicas (histamina y triptamina) (**Figura 1**).

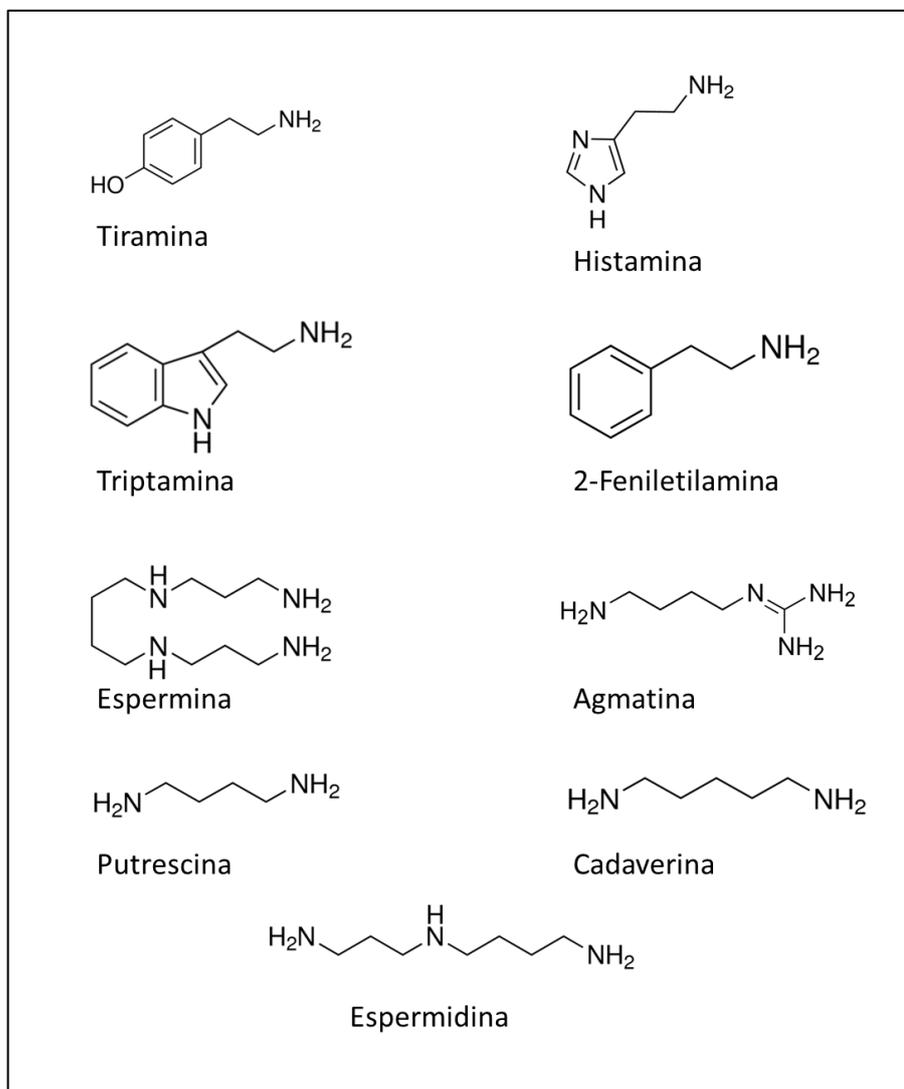


Figura 1. Estructura química de algunas aminas biogénicas.

Los primeros estudios realizados sobre las aminas biogénicas tuvieron lugar en el siglo XVII. Surgieron como consecuencia del descubrimiento de la espermina en los seres humanos, aunque esta amina no se nombró así hasta el siglo XIX (A. Ladenburg y J. Abel) y su estructura no se estableció hasta 1926 por H.W. Dudley, quien también identificó la espermidina en tejidos animales (Dudley *et al.*, 1927). En 1876, el profesor y químico M. Nencki habló por primera vez de la feniletilamina, aislándola de la gelatina en

descomposición. Más tarde, entre 1885 y 1886, se identificaron la cadaverina y la putrescina en restos procedentes de animales en descomposición. La agmatina se descubrió en 1910 (A. Kossel) en esperma de arenque y, más adelante (1994), se vio que se sintetizaba y se almacenaba también en órganos de mamíferos. La histamina se descubrió en 1910 y la tiramina fue aislada por primera vez en los pulpos (1913). A pesar de que se creía que la triptamina podía estar presente en los tejidos animales, no fue hasta 1959 cuando se confirmó esta hipótesis (Hess *et al.*, 1959; Grandy, 2007; Sarkadi, 2009).

2.1. Aminas biogénicas con función neurotransmisora.

Desde hace décadas se tiene constancia de que la transmisión catecolaminérgica está mediada por ciertas aminas biogénicas entre las que se incluyen las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), que se denominan así por poseer una estructura química derivada del catecol, y otras que, como la serotonina e histamina, poseen una estructura diferente (Deutch and Roth, 1999).

- **Catecolaminas.**

En este grupo de las catecolaminas se incluyen las aminas biogénicas derivadas de la tirosina (dopamina, noradrenalina y adrenalina). Como hemos indicado, todas ellas contienen un grupo catecol y un grupo amino (**Figura 2**).

La dopamina se obtiene por la descarboxilación de la dihidrofenilalanina (L-DOPA) mediante una reacción catalizada por la enzima DOPA descarboxilasa. La dopamina además de ser un importante neurotransmisor, también juega un papel importante en el sistema inmune y está asociada con problemas de salud (hipertensión, desórdenes psiquiátricos, y enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson) (Olanow, 1997; Arreola *et al.*, 2016).

La noradrenalina se forma a partir de la dopamina, mediante una reacción catalizada por la enzima dopamina hidroxilasa (**Figura 2**). Esta catecolamina se produce mayoritariamente en las neuronas de los ganglios simpáticos y su acción está relacionada con el sueño, la vigilia, la atención y la conducta (Schwartz, 2001).

INTRODUCCIÓN

La noradrenalina se convierte en adrenalina por medio de la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa que requiere S-adenosilmetionina (**Figura 2**). En la médula suprarrenal y en el sistema nervioso simpático algunas células adrenérgicas liberan adrenalina en lugar de noradrenalina. Sin embargo, en el cerebro hay un menor nivel de adrenalina que de noradrenalina y de dopamina (Schwartz, 2001).

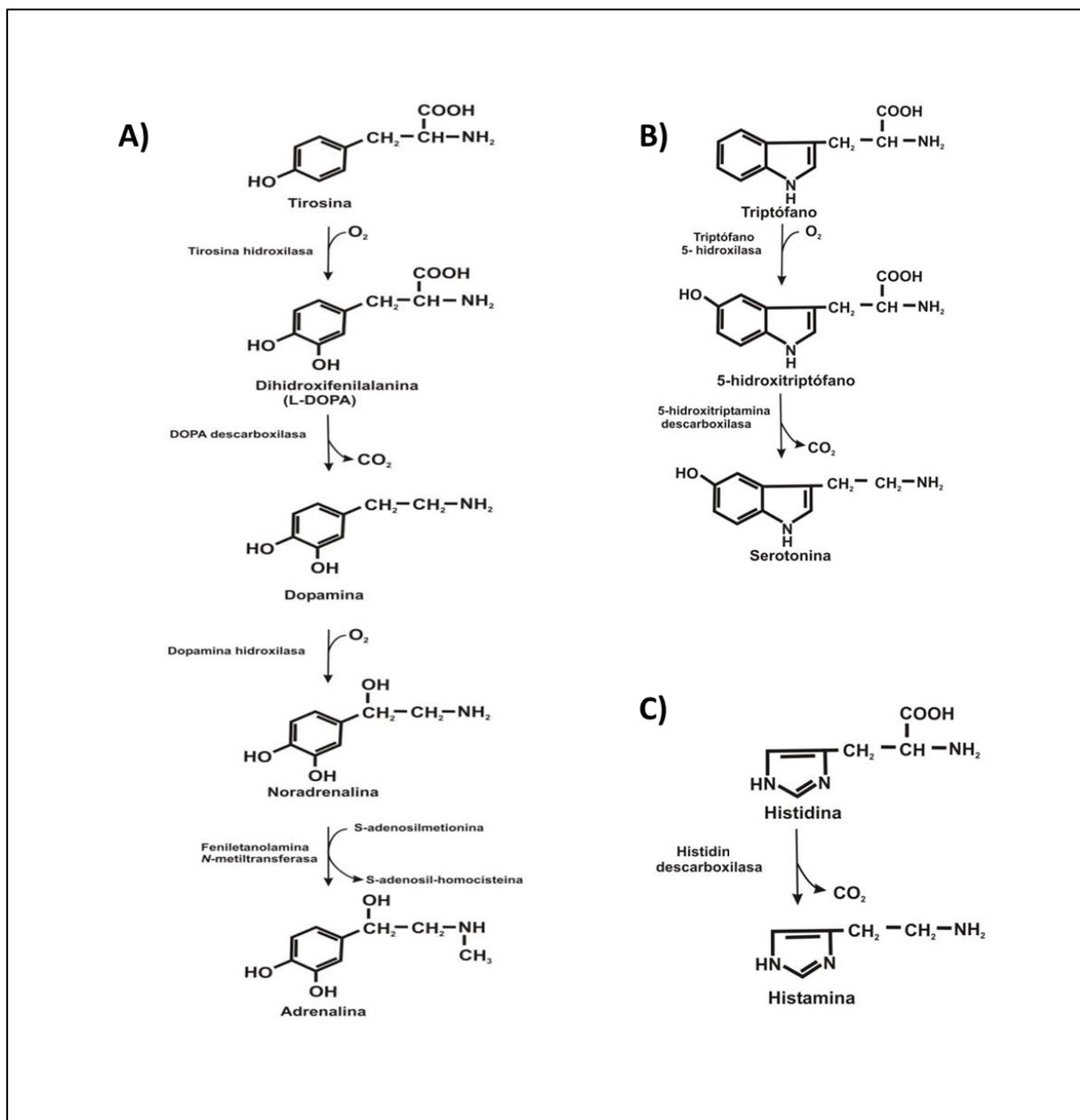


Figura 2. Etapas enzimáticas y precursores que conducen a la biosíntesis de diferentes aminas con función neurotransmisora tales como (A) las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), (B) la serotonina y (C) la histamina.

- **Serotonina.**

Esta amina, llamada también 5-hidroxitriptamina, se obtiene a partir del triptófano que previamente ha sido hidroxilado en las neuronas por la enzima triptófano 5-hidroxilasa. El 5-hidroxitriptófano formado se descarboxila por medio de la 5-hidroxitriptamina descarboxilasa generándose serotonina (5-hidroxitriptamina) (**Figura 2**). Esta amina es un importante neurotransmisor y las variaciones en su concentración se han relacionado con importantes enfermedades neurodegenerativas, tales como la depresión, el Alzheimer y el Parkinson. Además, actúa sobre la regulación de procesos fisiológicos complejos tales como el sueño y la vigilia (Izzati-Zade, 2008; Olivier, 2015; Stahl, 2016).

- **Histamina.**

Esta amina biogénica se obtiene por descarboxilación de la histidina mediante una reacción catabolizada por la enzima histidin descarboxilasa (**Figura 2**). Esta amina, tal y como se verá mas adelante, está relacionada con multitud de funciones.

- **Aminas traza.**

Una segunda clase de aminas endógenas son las **aminas traza**, denominadas así por encontrarse en bajas concentraciones en el cerebro de mamíferos. Estos compuestos están relacionados estructural y fisiológicamente con la dopamina, la noradrenalina y la serotonina, por lo que juegan un importante papel como “falsos neurotransmisores” (Axelrod and Saavedra, 1977). Desde 1960 se han considerado muy importantes por actuar sobre el sistema nervioso central y por estar involucradas en diversos desórdenes neurológicos y psiquiátricos (Boulton, 1976; Khan *et al.*, 2016). Las principales aminas incluidas en este grupo son la β -feniletilamina, la triptamina, la feniletanolamina, las *m* y *p*-tiramina, las *m* y *p*-octopamina y la sinefrina (Narang *et al.*, 2011).

Es interesante reseñar que los receptores específicos de estas **aminas traza** pertenecen a la familia de receptores asociados a la proteína G y se denominan TA1 (específicos de 2-feniletilamina y tiramina) y TA2 (específicos de 2-feniletilamina y triptamina). Debido a que se activan por diferentes tipos de drogas alucinógenas, despertaron un gran interés científico y

clínico, ya que podían actuar como “anfetaminas endógenas” (Borowsky *et al.*, 2001; Kim and von Zastrow, 2001).

En resumen, el análisis de la función de estas **aminas traza** ha revelado que pueden actuar como neuromoduladores o neurotransmisores. Un neurotransmisor es una molécula liberada por una neurona al canal sináptico en respuesta a una actividad eléctrica y que, posteriormente se va a unir específicamente a sus receptores post-sinápticos. Esto provoca la inducción de un cambio en la excitabilidad de la célula post-sináptica y, de este modo, permite el paso de la información. Un neuromodulador es también una molécula liberada por una neurona, pero con la diferencia de que no es capaz de provocar un cambio en la excitabilidad de la membrana de la célula post-sináptica por sí mismo, necesitando de la presencia de un neurotransmisor (Raiteri *et al.*, 1977; Berry, 2004; Grandy, 2007). Debido a estas funciones, las **aminas traza** se han asociado con varias enfermedades tales como la esquizofrenia, la depresión, el desorden bipolar, la migraña, los desórdenes de alimentación y de hiperactividad y la falta de atención (Boulton, 1980; Premont *et al.*, 2001; Branchek and Blackburn, 2003; Davenport, 2003).

2.2. Aminas biogénicas en los alimentos.

Debido a los efectos adversos que un incremento de los niveles de aminas biogénicas tiene sobre la salud de los seres humanos, uno de los retos más interesante es conseguir reducir la concentración de estas sustancias en algunos alimentos.

Para que se acumulen aminas biogénicas en los alimentos, tienen que darse las siguientes premisas (Greif *et al.*, 1997; Bodmer *et al.*, 1999):

- Disponibilidad de aminoácidos libres.
- Presencia de microorganismos con actividades aminoácido descarboxilásicas.
- Las condiciones que permitan el crecimiento de la bacteria, la síntesis de las descarboxilasas y las requeridas para su actividad.

Sin embargo, existen mecanismos que previenen la formación de aminas biogénicas. Los más efectivos son: el control de temperatura, el uso de materiales de alta calidad, las buenas prácticas de manufacturación (GMP), la utilización de cultivos *starters* (cultivos

iniciadores), presencia de oxidantes de aminos y el mantenimiento de una alta presión hidrostática (Schirone *et al.*, 2016).

Dentro de los alimentos ricos en aminos biogénicas, caben destacar la carne, el pescado y algunas bebidas alcohólicas durante los procesos de producción y/o almacenamiento (**Figura 3**) (Ordóñez *et al.*, 2016).

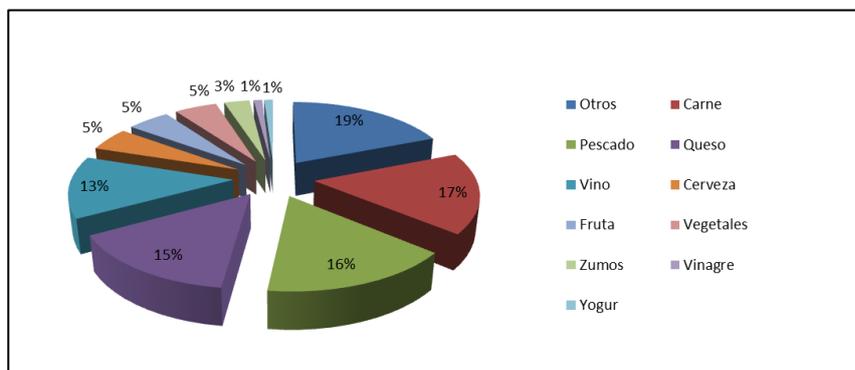


Figura 3. Distribución de las aminos biogénicas en los alimentos.

La concentración de aminos biogénicas varía en función de si se trata de alimentos frescos (en ellos la concentración es muy baja, alrededor de 10 µg/g o no detectable), o de si se trata de productos fermentados (donde la concentración puede ser alta, alrededor de 50 µg/g), por lo que podrían comportarse como auténticos venenos químicos (Naila *et al.*, 2010).

En suma, la presencia de aminos biogénicas en alimentos no fermentados es un indicador de la existencia de la actividad microbiana no deseada, indicándonos que dicho alimento no se encuentra en las condiciones óptimas para ser tomado. Durante el procesado y almacenaje de los alimentos, las concentraciones de algunas aminos tales como como la histamina, la cadaverina y la putrescina aumentan, mientras que los niveles de espermidina y espermina se mantienen o se reducen. Un parámetro importante es el índice de aminos biogénicas (IAB), el cual permite indicar la frescura y la calidad del alimento y que se expresa en mg/kg (Karmas, 1981).

$$IAB = \frac{[HISTAMINA] + [PUTRESCINA] + [CADAVERINA]}{1 + [ESPERMINA] + [ESPERMIDINA]}$$

Pescados o carnes con un valor de IAB por debajo de 1 son considerados de primera calidad, mientras que valores alrededor de 10 indican una pobre calidad microbiológica del producto.

- **Carne y productos cárnicos.**

La carne y sus derivados son los productos más demandados hoy en día en todo el mundo. Como indicábamos anteriormente, los niveles más altos de aminas biogénicas se encuentran en productos cárnicos fermentados, aunque también se han detectado en carne fresca y en productos cocinados.

Cuando los valores de IAB son menores de 5 mg/kg, consideramos que la carne es fresca. Cuando los valores oscilan entre 5 y 20 mg/kg, se está iniciando la putrefacción y si está entre 20 y 50 mg/kg, se trata de carne de baja calidad. Finalmente, si el coeficiente IAB es superior a 50 mg/kg, se trata de carne putrefacta (Hernández-Jover *et al.*, 1996).

Se ha visto que el cocinado de la carne reduce las concentraciones de aminas biogénicas entre cuatro y diez veces con respecto a los productos maduros. Por esta razón se buscan los mejores aditivos con el fin de contribuir a la conservación, dar sabor o conferir alguna característica concreta a los alimentos. Así, el sulfato de sodio inhibe la formación de la cadaverina y aumenta los niveles de tiramina y de putrescina, mientras que los aditivos más efectivos para inhibir la formación de la tiramina, la triptamina y la histamina son el nitrato de sodio, el cloruro de sodio y el difosfato disódico (Jastrzębska *et al.*, 2016).

- **Pescado.**

El pescado es, junto a la carne, un alimento también muy consumido. La principal amina biogénica en estos alimentos es la histamina. Los altos niveles de histamina en los pescados se deben a:

- microbiota natural (varía dependiendo del hábitat);
- la temperatura de almacenaje después de la captura;
- el manejo inadecuado a bordo del buque de pesca o durante el proceso de conservación (Schirone *et al.*, 2016).

Cuando se ingieren alimentos provenientes del mar que contienen altas concentraciones de aminas biogénicas, hay riesgo elevado de intoxicaciones. La más frecuente se produce por histamina, cuando su concentración está próxima a 200 mg/kg. En tales casos, se provoca un síndrome conocido como escombroidosis (Smith, 1981; Hu *et al.*, 2012).

- **Queso.**

El queso es uno de los alimentos más consumidos en España, y dentro de los derivados lácteos es el segundo más consumido [7,78 kilos por persona y año] (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, año 2015).

La primera intoxicación descrita debida a la presencia de aminas biogénicas en quesos ocurrió en 1967 en Holanda en el queso Gouda (Taylor, 1983). Posteriormente, se documentaron casos relacionados también con el consumo de queso suizo y con otro tipo de quesos en Estados Unidos (Stratton *et al.*, 1991).

Los quesos representan un substrato ideal para la producción de aminas, siendo varios los factores que contribuyen a ello. Así, el pH (entre 5,0 y 6,5 dependiendo de la edad y el tipo), la concentración de sal, la disponibilidad de agua, la temperatura y la duración de la maduración y el almacenamiento, la densidad bacteriana y la presencia de cofactores, modifican el contenido de aminas en esta clase de alimentos (Vale and Glória, 1998).

Los quesos elaborados con leche cruda duplican la concentración de aminas biogénicas con respecto a los quesos elaborados con leche pasteurizada (72°C, 20 s). También se ha visto que los niveles de putrescina, espermina y tiramina son más altos en quesos elaborados con leche de oveja Churra (Combarros-Fuertes *et al.*, 2016). La concentración de aminas biogénicas, excepto la de triptamina, también varían en función de la parte del queso analizada, siendo mayores en la parte central del queso que en la parte externa. Además, en los quesos maduros se detecta un mayor contenido de aminas biogénicas que en los quesos blandos y semiblandos (Novella-Rodríguez *et al.*, 2003).

- **Vino y cerveza.**

Las aminas biogénicas tienen una importancia especial en las bebidas alcohólicas ya que el etanol puede actuar de una forma directa o indirecta sobre la detoxificación de las mismas al inhibir la actividad de las enzimas monoamina oxidasa (MAO) y la diamino oxidasa (DAO), que son las responsables su catabolismo (ver más adelante).

La concentración de aminas biogénicas en vinos es muy variable, dependiendo de numerosos factores entre los que cabe citarse: el proceso de elaboración; el tiempo y las condiciones de almacenamiento; la calidad de la materia prima, y la posible contaminación microbiana en las diferentes etapas que transcurren en la bodega (Ferreira and Pinho, 2006). La concentración de aminas biogénicas en el vino tinto oscila entre 0-60 mg/l, mientras que para vinos blancos la concentración es mucho más baja, no superando los 4 mg/l (Peña-Gallego *et al.*, 2012).

Aunque muchas aminas biogénicas están presentes en el vino, hasta los años 70 no se hizo hincapié en su estudio. Una de ellas, la histamina, se detectó en el vino por Tarandola en 1954. Sin embargo, hasta 1968, no se habló del riesgo que había al incrementarse la concentración de esta amina en el vino. Además, junto con la histamina, otras aminas tales como la tiramina y la putrescina son las aminas biogénicas mayoritarias. Otras aminas tales como la cadaverina, la feniletilamina, la etilamina, la metilamina y la isoamilamina, aunque están presentes en la uva, suelen degradarse durante el proceso de vinificación (Lonvaud-Funel, 2001).

En vinos blancos, cantidades de 10 a 15 mg/l de putrescina producen un sabor desagradable, mientras que una concentración de entre 10 y 20 mg/l de esta amina puede redondear el sabor de los vinos tintos. No obstante, a concentraciones superiores a 30 mg/l estos vinos tienen un sabor raro, y su aroma es maloliente o pútrido.

La cerveza es la quinta bebida más consumida en el mundo, siendo muy importante detectar la presencia de aminas biogénicas en ella (Pradenas *et al.*, 2016). Las aminas que proliferan en la cerveza dependen del proceso de fabricación y del material empleado (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1996). La histamina y la cadaverina pueden aparecer debido al metabolismo de las bacterias ácido lácticas, aunque la histamina también es un indicador de las condiciones higiénicas en las que ha tenido lugar el proceso de fabricación de la cerveza. La putrescina y la agmatina son constituyentes naturales de la cerveza (proviene

originalmente de la malta) y se encuentran en ella concentraciones muy bajas. La triptamina normalmente no aparece en la cerveza, y cuando es así, su concentración está siempre por debajo de 2 mg/l. La etanolamina y la etilamina no suelen encontrarse en la cerveza, sino en los vinos, ya que proceden de la uva. Sin embargo, ciertos artículos recientes sugieren que también puede ser un constituyente común en algunos tipos de cervezas (Redruello *et al.*, 2017).

- **Frutas y verduras.**

Las aminas se encuentran de forma natural en los alimentos de origen vegetal, es decir, son endógenas. Así, la putrescina es la amina predominante en los diversos zumos de frutas, y en el zumo de limón se han observado concentraciones elevadas de histamina. La noradrenalina y la triptamina suelen aparecer en el zumo de naranja; la tiramina, la triptamina y la histamina se han descrito en el tomate; y la tiramina, la noradrenalina, la triptamina y la serotonina se han detectado en el plátano. Finalmente, la tiramina y la noradrenalina se han identificado en la ciruela (Halász *et al.*, 1994).

En el caso de las verduras, se ha visto que la histamina aparece en las espinacas; en ciertas setas se han detectado concentraciones elevadas de tiramina y de feniletilamina; y la espermidina se ha descrito en los vegetales verdes (Shalaby, 1996; Moret *et al.*, 2005). Usualmente, las aminas aromáticas están presentes en menor concentración que las poliaminas en las hortalizas, donde se cree que tienen un papel defensivo frente a insectos y a herbívoros. En resumen, el creciente interés para conseguir una alimentación sana y equilibrada ha hecho que el análisis de estas aminas en diferentes alimentos haya cobrado una gran importancia.

2.3. Producción de aminas biogénicas.

Tal y como hemos indicado, la síntesis de aminas se lleva a cabo, en la mayoría de los casos, mediante la descarboxilación de aminoácidos libres catalizada por enzimas bacterianas. Sin embargo, también puede tener lugar mediante la aminación reductora de aldehídos y cetonas; por medio de la transaminación entre aldehídos y aminoácidos o por medio de la degradación hidrolítica de compuestos nitrogenados, como por ejemplo, fosfolípidos (**Figura**

4) (Glória, 2005; Bäumlisberger *et al.*, 2015). Así, la metilamina, la etilamina y la isoamilamina son aminas alifáticas volátiles que se originan por la aminación de aldehídos y cetonas (Vincenzini *et al.*, 2009). Por ejemplo, la etilamina se ha obtenido por medio de la aminación reductora del acetaldehído en presencia de un catalizador complejo que contiene níquel (52,2 %), cobre (14%), molibdeno (2%) y tierra de diatomea (31,5 %) (Klyuev and Khidekel', 1980).

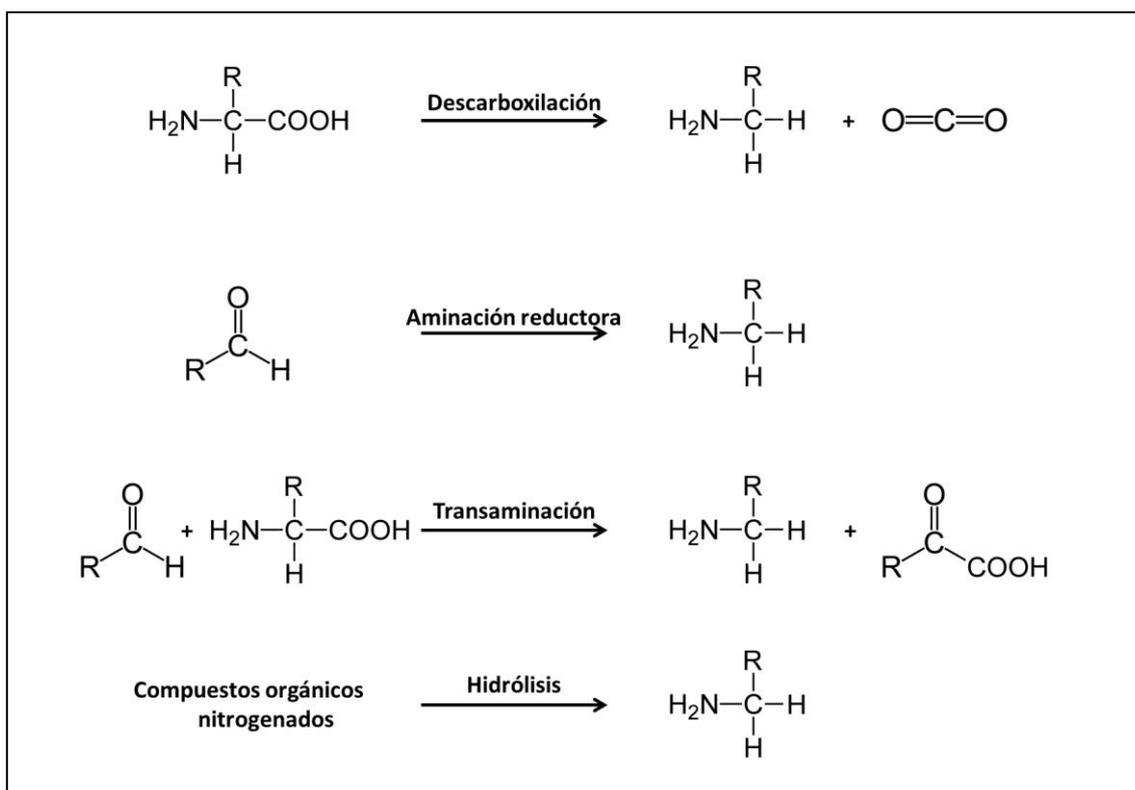


Figura 4. Mecanismos de formación de aminas biogénicas: 1) descarboxilación de aminoácidos; 2) aminación reductora de aldehídos y cetonas; 3) reacción de transaminación y 4) degradación hidrolítica de compuestos nitrogenados.

2.3.1. Descarboxilación de aminoácidos.

En la descarboxilación de aminoácidos se produce la eliminación del grupo α -carboxilo del aminoácido en cuestión, para dar lugar a CO₂ y a la amina correspondiente (**Figura 4**). Esta reacción está catalizada por descarboxilasas bacterianas que suelen ser específicas para cada aminoácido (**Tabla 1**). En el apartado 4.4 se describirá con más detalle

una de estas descarboxilasas, la histidin descarboxilasa, así como los dos posibles mecanismos de acción (Tolbert *et al.*, 2003).

Algunos microorganismos utilizan esta reacción para generar un gradiente de protones que les proporciona energía y/o para aumentar el pH citoplasmático, protegiendo a las células en un medio ácido y, por tanto, dotando a los microorganismos que posean actividades descarboxilasas de una notable ventaja ecológica (Vincenzini *et al.*, 2009).

Tabla 1. Descarboxilasas bacterianas que producen aminas biogénicas.

AMINA BIOGÉNICA	PRECURSOR	DESCARBÓXILASA	REFERENCIA
ALIFÁTICAS			
Putrescina	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	Bello-Fernández <i>et al.</i> , 1993
Cadaverina	Lisina	Lisina descarboxilasa	Kikuchi <i>et al.</i> , 1997
AROMÁTICAS			
Tiramina	Tirosina	Tirosina descarboxilasa	Connil <i>et al.</i> , 2002
Feniletilamina	Fenilalanina	Fenilalanina descarboxilasa	Kato <i>et al.</i> , 2007
HETEROCÍCLICAS			
Histamina	Histidina	Histidin descarboxilasa	Recsei and Snell, 1972
Triptamina	Triptófano	Triptófano descarboxilasa	Mitoma and Udenfriend, 1960

No hay homología entre las descarboxilasas descritas en procariotas y en eucariotas, excepto en el caso de la glutamato descarboxilasa, la histidin descarboxilasa y la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) que si presentan similitud en ambos tipos de organismos (Sandmeier *et al.*, 1994).

Las AADC poseen una menor especificidad de sustrato que las demás descarboxilasas, siendo las encargadas de descarboxilar el L-DOPA, la tirosina, la fenilalanina, el 5-hidroxitriptófano y el triptófano (Zhu and Juorio, 1995; Ishii *et al.*, 1998).

2.3.2. Organismos productores.

La producción de las aminas biogénicas en los alimentos mediada por descarboxilasas de aminoácidos, se lleva a cabo por un gran número de bacterias entre las que se incluyen enterobacterias, pseudomonádidos, enterococos y lactobacilos (Halász *et al.*, 1994; Suzzi and Gardini, 2003).

Las cepas que producen mayores cantidades de histamina son *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* o *Morganella morganii* y, aunque se encuentren en baja proporción en los productos finales, las malas prácticas de elaboración, así como fallos en el almacenamiento o la falta de control de los procesos de fermentación, pueden hacer que aumente significativamente su concentración (Roig-Sagues *et al.*, 1996; Santos, 1998; Bover-Cid *et al.*, 2001).

Otras aminas pueden aparecer durante la putrefacción, tal es el caso de la putrescina y de la cadaverina. Ambas son producidas principalmente por bacterias Gram-negativas (G-), siendo *Enterobacter cloacae* un típico ejemplo de bacteria generadora de tales compuestos (Ten Brink *et al.*, 1990; Bover-Cid *et al.*, 2001).

Los alimentos en mal estado suelen ser ricos en microorganismos productores de aminas biogénicas. Así, en el pescado putrefacto se han identificado especies como *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides* que poseen descarboxilasas de aminoácidos (Shalaby, 1996).

Las bacterias ácido lácticas participan en muchos procesos destinados a obtener diversos alimentos, por lo que generalmente se reconocen como seguras (GRAS), y, aunque no son especies tóxicas ni patógenas, muchas de ellas tienen una actividad metabólica que propicia la formación de aminas biogénicas, principalmente la de tiramina y de histamina (Arena and Manca de Nadra, 2001). Dentro de los lactobacilos, las especies que producen tiramina son *Lactobacillus buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. bavaricus*, *L. homohiochii*, *L. reuteri* y *L. sakei* (Masson *et al.*, 1996; Bover-Cid and

Holzappel, 1999; Montel *et al.*, 1999). Entre las productoras de histamina, se encuentran: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *L. arabinose* (Stratton *et al.*, 1991). También existen otras especies de bacterias ácido lácticas que producen otras aminas biogénicas, como por ejemplo, *Lactobacillus hilgardii* que produce agmatina y putrescina en altas concentraciones (Arena and Manca de Nadra, 2001). En quesos, se ha visto que *Enterococcus faecalis* produce gran cantidad de aminas biogénicas, y entre ellas destaca la feniletilamina (Nout, 1994; Linares *et al.*, 2011). La cepa *L. curvatus* CTC273 también produce feniletilamina, putrescina, cadaverina y tiramina (Latorre-Moratalla *et al.*, 2012).

Pero en el mundo microbiano, no solo las bacterias Gram-positivas (G+) o Gram-negativas (G-) tienen el potencial de producir aminas biogénicas, ya que los hongos y las levaduras también poseen esta capacidad. En alimentos fermentados, las levaduras pertenecientes a los géneros *Debaryomyces* y *Candida*, producen más histamina que las bacterias ácido lácticas. Ello se debe a que poseen más actividad histidin descarboxilasa. La especie *Debaryomyces hansenii* es la responsable de la aparición de histamina en quesos (Montel *et al.*, 1999; Gardini *et al.*, 2016).

A pesar de que se han identificado pocos microorganismos productores de triptamina, *Bacillus cereus*, *L. curvatus*, *L. bulgaricus* y *Clostridium sporogenes* son capaces de acumularla (Marcobal *et al.*, 2012; Benkerroum, 2016).

La **Tabla 2** recoge los microorganismos más relevantes en cuanto a la producción de aminas biogénicas, indicando en cada caso la amina biogénica sintetizada (Benkerroum, 2016).

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Organismos productores de las aminas biogénicas.

AMINA BIOGÉNICA	ORGANISMO PRODUCTOR
HISTAMINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus buchneri</i>, <i>L. parabuchneri</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. helveticus</i>, <i>L. sakei</i>, <i>L. reuteri</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>L. rossiae</i>, <i>Clostridium perfringens</i>, <i>Staphylococcus xylosum</i>.</p> <p>Bacterias Gram-negativas: <i>Morganella morganii</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>E. cloacae</i>, <i>E. gergoviae</i>, <i>Hafnia alvei</i>, <i>Serratia liquefaciens</i>, <i>S. marcescens</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Shewanella putrefaciens</i>, <i>Aeromonas hydrophila</i>.</p> <p>Levadura: <i>Debaryomyces hansenii</i>.</p>
TIRAMINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>S. thermophilus</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. hirae</i>, <i>E. durans</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. divergens</i>, <i>L. buchneri</i>, <i>L. alimentarius</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. bavaricus</i>, <i>L. reuteri</i>, <i>L. sakei</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. bavaricus</i>, <i>L. bifementans</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. johnsonii</i>, <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>, <i>Pediococcus</i> spp., <i>Carnobacterium divergens</i>, <i>Carnobacterium gallinarum</i>, <i>C. piscicola</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.</p> <p>Bacterias Gram-negativas: <i>Pseudomonas putida</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>H. alvei</i>, <i>Citrobacter braakii</i>, <i>C. freundii</i>, <i>Raoultella ornithinolytica</i>, <i>E. gergoviae</i>, <i>S. liquefaciens</i>.</p> <p>Levadura: <i>Yarrowia lipolytica</i>.</p>
FENILETILAMINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>L. brevis</i>, <i>Carnobacterium divergens</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. hirae</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Staphylococcus</i> spp.</p>
TRIPTAMINA	<p><i>L. curvatus</i>, <i>L. bulgaricus</i>, <i>B. cereus</i>, <i>Clostridium sporogenes</i>.</p>
CADAVERINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>L. brevis</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. paracasei</i>.</p> <p>Bacterias Gram-negativas: <i>E. coli</i>, <i>E. fergusonii</i>, <i>E. aerogenes</i>, <i>E. cloacae</i>, <i>E. georgoviae</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>K. terrigena</i>, <i>Salmonella enterica</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>P. lundensis</i>, <i>P. luteola</i>, <i>P. putida</i>, <i>P. agglomerans</i>, <i>Psychrobacter celer</i>.</p> <p>Levadura: <i>Y. lipolytica</i>.</p>
AGMATINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>E. faecalis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>B. subtilis</i>.</p> <p>Bacterias Gram-negativas: <i>E. coli</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>E. aerogenes</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Aeromonas</i> spp.</p>
PUTRESCINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>Lactobacillus mali</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. collinoides</i>, <i>L. paracollinoides</i>, <i>L. fructivorans</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. sakei</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>L. lactis</i>, <i>L. paracasei</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. sanfranciscensis</i>, <i>Enterococcus casseliflavus</i>, <i>E. durans</i>, <i>E. faecalis</i>, <i>E. faecium</i>, <i>E. hirae</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>, <i>Leuconostoc lactis</i>, <i>S. thermophilus</i>, <i>Pediococcus parvulus</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. licheniformis</i>, <i>B. cereus</i>.</p> <p>Bacterias Gram-negativas: <i>E. coli</i>, <i>E. fergusonii</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>C. braakii</i>, <i>Cronobacter sakazakii</i>, <i>E. aerogenes</i>, <i>E. cloacae</i>, <i>E. georgoviae</i>, <i>H. alvei</i>, <i>K. oxytoca</i>, <i>K. terrigena</i>, <i>M. morganii</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>Salmonella enterica</i>, <i>Serratia grimesii</i>, <i>S. liquefaciens</i>, <i>S. marcescens</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>P. fluorescens</i>, <i>P. lundensis</i>, <i>P. luteola</i>, <i>P. putida</i>, <i>P. agglomerans</i>, <i>Psychrobacter celer</i>, <i>Acinetobacter</i> spp., <i>R. ornithinolytica</i>.</p> <p>Levaduras: <i>Y. lipolytica</i>, <i>Candida intermedia</i>, <i>C. inconspicua</i>, <i>Kluyveromyces marxianus</i>, <i>D. hansenii</i>, <i>S. cerevisiae</i>.</p>
ESPERMIDINA	<p><i>Corynebacterium</i> sp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>L. plantarum</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p>Patógenos lácteos: <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Salmonella paratyphi</i>, <i>S. typhi</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>Shigella boydii</i>, <i>S. sonnei</i>, <i>S. dysenteriae</i>, <i>S. flexneri</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>Helicobacter pylori</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>M. bovis</i>.</p> <p>Levaduras: <i>S. cerevisiae</i>, <i>Schizosaccharomyces pombe</i>, <i>Sporobolomyces roseus</i>, <i>Candida albicans</i>, <i>Kluyveromyces lactis</i>.</p>
ESPERMINA	<p>Bacterias Gram-positivas: <i>Bacillus stearothermophilus</i>, <i>B. thermodenitrificans</i>, <i>B. acidocaldarius</i>.</p> <p>Levaduras: <i>S. cerevisiae</i>, <i>C. albicans</i>, <i>K. lactis</i>.</p>

2.3.3. Factores que afectan a la producción de aminas biogénicas.

Entre los múltiples factores que pueden afectar a la producción de aminas biogénicas, cabe destacar la temperatura, la concentración salina y el pH.

La **temperatura** es un factor decisivo en la producción de aminas biogénicas. Se ha visto que existe una correlación muy estrecha entre la producción de la putrescina, de cadaverina y de triptamina, y el aumento de la temperatura. Normalmente la capacidad para producir aminas biogénicas está limitada por la baja temperatura, de ahí que sea muy importante mantener la cadena de frío. En otros casos, es necesaria la aplicación de tratamientos térmicos. Así, por ejemplo, bacterias G-, como las enterobacterias y especies de *Pseudomonas*, son inactivadas a temperaturas superiores a 60°C. Sin embargo, esta temperatura es insuficiente para inactivar las bacterias lácticas, que requieren tratamientos térmicos mucho más drásticos (Gardini *et al.*, 2016).

La **concentración de sal** es otro factor importante, ya que altas concentraciones salinas contribuyen a la reducción de los niveles de estas aminas biogénicas, inhibiendo la actividad descarboxilasa. Concretamente, las bacterias G- son más sensibles a la concentración salina que las bacterias G+, aunque a veces, debido al efecto de la sal sobre la tensión arterial, se tiende a reducir su concentración (Gardini *et al.*, 2016).

El **pH** es otro factor importante porque, en un determinado rango de pH, la actividad de la enzima descarboxilasa puede incrementarse. Se ha observado que a valores de pH bajos se favorece una mayor actividad de las descarboxilasas. Los valores óptimos de pH pueden ser distintos en el caso de que se trate de una enzima pura o del extracto celular. Así, la enzima comercial tirosina descarboxilasa tiene un máximo de actividad en el rango de pH entre 5 y 6, mientras que en microorganismos tales como *L. brevis* y *E. faecalis*, la actividad de la tirosina descarboxilasa se favorece entre valores de pH comprendidos entre 4 y 5 (Gardini *et al.*, 2016).

2.4. Toxicidad de las aminas biogénicas.

Como ya hemos indicado anteriormente, las aminas biogénicas se consideran tóxicas cuando se encuentran por encima de ciertas concentraciones. En esas condiciones pueden originar síndromes y alteraciones patológicas (Ladero *et al.*, 2010). Así, una concentración elevada de histamina causa dolores de cabeza; sudoración; secreción nasal; erupciones; edemas; dificultad al tragar; dificultad respiratoria; broncoespasmo; taquicardias y desórdenes de tensión arterial. Del mismo modo, concentraciones altas de tiramina provocan migraña; desórdenes neurológicos y respiratorios; náuseas; vómitos e hipertensión.

De entre todas las aminas biogénicas presentes en los alimentos, caben destacar por su elevada toxicidad a la histamina y a la tiramina, las cuales producen escombroidosis y la enfermedad del queso, respectivamente.

Para la salud humana, la putrescina y la cadaverina no se consideran perjudiciales, aunque hay estudios que han demostrado que la absorción, el metabolismo y el potencial de acción de una amina biogénica puede ser modificado por la acción de una segunda amina biogénica. En los cobayas, la toxicidad de la histamina se incrementaba hasta diez veces tras la administración de la putrescina y también al administrar simultáneamente la cadaverina y la histamina (Bjeldanes *et al.*, 1978). Otras aminas potenciadoras de la toxicidad de la histamina son la tiramina, que inhibe la MAO; la triptamina, que inhibe la DAO y la feniletilamina, que inhibe la DAO y la histamina N-metiltransferasa (HNMT) (Stratton *et al.*, 1991).

Otras evidencias han demostrado que en presencia de nitritos y de ciertos ácidos, la espermidina y la espermina conducen a la formación de nitrosamina. Así por ejemplo, en el tocino ahumado puede formarse desde espermidina y desde putrescina, N-nitropirrolidina, que es un potente carcinógeno (Bardócz, 1995).

La determinación del umbral de toxicidad causado por las aminas biogénicas en las personas es una tarea difícil de establecer, ya que depende de la eficiencia de los mecanismos de detoxificación de cada individuo (Halász *et al.*, 1994; Bodmer *et al.*, 1999). La escasa legislación referente al control de las aminas, así como la referente al establecimiento de unas concentraciones máximas en los alimentos, dificulta notablemente los intentos de corregir su reducción o su eliminación. Los niveles máximos considerados aceptables para las aminas biogénicas suelen oscilar entre 750-900 mg/kg, y en concreto, para la histamina el máximo permitido es 50 mg/kg por parte de la Agencia de Drogas y Alimentos de Estados Unidos

(FDA), y menor de 100 mg/kg por la normativa vigente en la Comunidad Europea (Erim, 2013). Para las demás aminas biogénicas solo existen sugerencias o simples recomendaciones. Así, por ejemplo, se recomienda que la concentración de tiramina se mantenga entre 100 y 800 mg/kg como máximo, y se ha propuesto un límite de 30 mg/kg para la feniletilamina. En resumen, se requiere con urgencia una mayor concreción a fin de llegar a establecer un consenso con respecto a los límites que deben ser permitidos (Ten Brink *et al.*, 1990; Halász *et al.*, 1994; Ladero *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2011).

2.5. Métodos de identificación y análisis cualitativos y cuantitativos.

La necesidad de detectar las aminas biogénicas en los alimentos ha conducido al desarrollo de gran número de métodos analíticos y a que se siga investigando con el fin de proponer otros que nos permitan detectar concentraciones más bajas. Además, dado que estos compuestos derivan de aminoácidos, se han desarrollado técnicas que tienen como finalidad cuantificar los aminoácidos precursores (Önal, 2007).

2.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Ésta es una de las técnicas más utilizadas. Las muestras se extraen con ácidos, tales como el ácido tricloroacético, el ácido perclórico o el ácido hidroclicórico. El proceso de derivatización es esencial, porque la mayor parte de estas aminas biogénicas no tienen cromóforos, siendo necesario que los reactivos se unan al grupo amino para poder detectarlas. Los más utilizados son el *o*-ftaldehído (OPA), el cloruro de dansilo (dansil-Cl), la 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS), la 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimida (AQC) y el éster de N-hidroxisuccinimida. Los métodos de derivatización para la detección por fluorescencia se pueden hacer pre-columna o post-columna, es decir, antes o después del proceso de separación cromatográfica, siendo la primera de ellas la técnica más utilizada por ser mucho más sensible (Önal *et al.*, 2013; Ordóñez *et al.*, 2016). Un método de detección, que proporciona una gran sensibilidad, aunque tiene el problema del extremo cuidado que hay que tener a la hora de trabajar, es el que utiliza un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), en el que el eluyente se nebuliza y se evapora, y, a continuación, la muestra es

irradiada con un haz de luz láser, de modo que lo que se mide es la radiación dispersada. Para aplicar estas técnicas se utilizan usualmente columnas C18 en fase reversa (RP-HPLC).

La técnica de UHPLC (cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución) tiene los mismos fundamentos que el HPLC. Este método es muy preciso y es bastante innovador, permitiendo diferenciar claramente varias aminas biogénicas y aminoácidos, con tiempos de elución más cortos, una mayor sensibilidad y una mayor resolución de las distintas sustancias. Esto hace que se reduzcan los costes para la detección de aminoácidos y sus derivados, aunque a día de hoy, pocos laboratorios poseen el equipo necesario para aplicar esta técnica (Redruello *et al.*, 2017).

2.5.2. Electroforesis capilar.

Esta técnica, que se basa en la separación de moléculas en función de su relación carga/masa, ha sufrido un gran desarrollo desde finales del siglo XX. Presenta ventajas respecto al HPLC ya que proporciona una mayor eficiencia de columna (105-106 platos teóricos de separación); se requiere menor volumen de muestra (aproximadamente 10 nl), y su sensibilidad y selectividad es muchísimo mayor. Es una técnica rápida, barata, efectiva y permite analizar muchas muestras en un corto periodo de tiempo (Sun *et al.*, 2003b).

Dentro de este grupo existen diferentes técnicas de análisis. A pesar de que la más utilizada es la detección indirecta UV-Vis (Arce *et al.*, 1998), hay un procedimiento electroquímico en el que se utiliza un pulso amperométrico (PAD) que proporciona una mayor sensibilidad (Sun *et al.*, 2003b). Otros sistemas de detección se basan en la espectrometría de masas y en la fluorescencia inducida por láser (LIF) (Chen *et al.*, 2001b).

2.5.3. Cromatografía de gases.

En esta técnica la muestra se volatiliza y se introduce en la columna de relleno siendo necesaria la derivatización previa de las muestras a analizar. Las aminas biogénicas son extraídas en formas de derivado de trifluoroacetilo, trimetilsililo o derivados de 2,4-dinitrofenilo. Los detectores más utilizados son de conductividad, de ionización de llama o de captura de electrones (Karovičová and Kohajdova, 2005).

A pesar de que las tres técnicas mencionadas son las más utilizadas a la hora de detectar aminas biogénicas en los alimentos, no son las únicas. Así, la cromatografía en capa fina o las reacciones enzimáticas se utilizan con bastante asiduidad, aunque, en estos casos los resultados son menos precisos.

2.5.4. Cromatografía en capa fina (TLC).

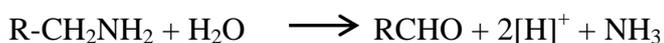
Inicialmente, se aislaban las aminas biogénicas de una forma individual, de ahí la necesidad de encontrar técnicas que fuesen capaces de discernir la presencia entre varias aminas biogénicas. Para la cromatografía de capa fina, inicialmente, era necesario utilizar como reactivo el cloruro de dansilo, analizándose tanto el Rf de la amina como el color del producto de reacción (Chin and Koehler, 1983). Además, se solían utilizar placas de silicagel, que tenían que ser calentadas a 110 °C antes de ser reveladas para su activación (Shalaby, 1994). Usando ensayos TLC monodimensionales no se podían identificar todas las aminas, de ahí que fuera necesario poner a punto técnicas de TLC bidimensionales. Las placas, una vez reveladas, informan sobre la presencia de aminas biogénicas y utilizando la densitometría se puede establecer su cantidad relativa (Shakila *et al.*, 2001). Esta técnica, que permite separar una gran cantidad de aminas en diferentes muestras, es un método rápido, simple y versátil. Por esta razón, es fácilmente aplicable en la industria alimentaria, sobre todo cuando se trata de determinar la calidad de un elevado número de muestras (Shalaby, 1995). Hoy día, es una técnica usualmente empleada en el análisis de ciertas bebidas tales como el vino (Erim, 2013).

2.5.5. Métodos enzimáticos.

Son aquellos en los que se usan enzimas que han sido inmovilizadas sobre determinados substratos, generando biosensores (López-Sabater *et al.*, 1993). Una enzima muy empleada es la DAO, la cual se obtiene de varias fuentes como microorganismos, plantas y tejidos animales (Carelli *et al.*, 2007). Hoy en día se buscan biosensores con alta especificidad, utilizando enzimas comerciales o purificadas. Así, la empresa BIOLAN, asentada en el País Vasco, es una empresa pionera en la utilización de biosensores para detectar la presencia de histamina en productos lácteos, en vinos y en pescados.

3. DEGRADACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS.

La cantidad de aminas que se encuentran en el medio ambiente está incrementándose de forma considerable como consecuencia de la actividad generada por diferentes industrias. Sin embargo, muchas también pueden ser liberadas por los organismos vivos o generadas *post mortem*. Algunas de estas aminas, especialmente las metiladas, son muy volátiles y están implicadas en la formación de óxido nítrico, un importante gas causante del efecto invernadero (Van Neste *et al.*, 1987; Chistoserdov, 2001). Como se ha descrito previamente, el acúmulo de determinadas aminas biogénicas en los alimentos y el consumo de estos, conlleva la aparición de una serie de efectos adversos. Por lo tanto, es deseable la utilización de cualquier técnica que pueda ser usada por la industria alimentaria para disminuir o eliminar estos compuestos de los alimentos. Una aproximación a este problema se basa en un enfoque biotecnológico que requiere la utilización de microorganismos, genes o proteínas para reducir o eliminar estas aminas durante el proceso de manufactura del alimento. Muchos microorganismos convierten las aminas primarias en catabolitos centrales que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía, como fuente de nitrógeno, o como ambas (Yamada *et al.*, 1965).



El mecanismo más habitual para la eliminación del grupo amino de las aminas primarias es la oxidación. Este proceso está ampliamente distribuido en la naturaleza, habiéndose descrito tanto en organismos eucariotas como en procariotas. La oxidación está catalizada por diferentes enzimas, entre las que se incluyen quinoproteínas amino oxidasas y quinoproteínas o quinohemoproteínas amino deshidrogenasas (Hacisalihoglu *et al.*, 1997). Ambas catalizan 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, utilizan como aceptores de electrones el agua u otros compuestos produciendo peróxidos tóxicos, las amino deshidrogenasas, presentes exclusivamente en bacterias, producen equivalentes reducidos que transfieren directamente los electrones a la cadena respiratoria (McIntire and Hartmann, 1993; Vandenberghe *et al.*, 2001). Los aldehídos así formados son reducidos a los correspondientes ácidos que se catabolizan a través de las rutas pertenecientes al metabolismo general (Cooper, 1997).

La localización de estas enzimas varía en función del tipo de microorganismo analizado. Así, en los microorganismos G-, la mayoría poseen localización periplásmica y suelen estar unidas a la cara externa de la membrana citoplasmática. Sin embargo, en los microorganismos G+ estas enzimas se encuentran en el citoplasma o unidas a la membrana citoplasmática por su cara interna. Por el contrario, en algunas levaduras se ha visto que su localización es exclusivamente citoplásmica, y, más concretamente, peroxisomal (Hacisalihoglu *et al.*, 1997).

Además, las enzimas responsables de la desaminación oxidativa de las aminas utilizan distintos cofactores, que una vez reducidos tras la oxidación del sustrato suelen formar parte de los mecanismos de transferencia de electrones a uno o dos aceptores exógenos (citocromo c, cupredoxinas u oxígeno molecular).

La mayoría de las enzimas implicadas en la oxidación de aminas a aldehídos, son oxidorreductasas que se caracterizan por utilizar cofactores distintos a los nucleótidos de nicotamida o de flavina. Estas enzimas se denominan quinoproteínas (Oubrie *et al.*, 2002) porque utilizan cofactores que presentan un grupo quinona tales como TPQ (topaquinona), TTQ (triptófano triptofilquinona), LTQ (lisina tirosilquinona) o CTQ (cisteína triptofilquinona). Los cofactores suelen formarse durante el proceso de catálisis a partir de uno o dos aminoácidos presentes en la propia estructura primaria de la enzima que sufre una modificación química postranscripcional (Stites *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2002; Davidson, 2004).

En función del cofactor utilizado podemos diferenciar varios tipos de amino oxidasas: quinohemoproteínas amino deshidrogenasas, quinoproteínas amino deshidrogenasas y amino oxidasas.

3.1. Quinohemoproteínas amino deshidrogenasas.

Son enzimas (EC 1.4.9.1, QH-AmDH) heterotriméricas constituidas por tres subunidades ($\alpha\beta\gamma$) que utilizan como cofactor el CTQ, el cual se forma a partir de un residuo de cisteína presente en la subunidad pequeña (γ). No se descarta la posibilidad de que una cuarta proteína, cuya función es todavía desconocida, pudiera intervenir facilitando la formación del cofactor. Estas enzimas presentan, además del grupo quinona, dos grupos hemo

c, unidos a una de las subunidades de la enzima, que actúan como grupos redox activos. En este caso, los electrones liberados durante el proceso de oxidación son transferidos en último término a una citocromo oxidasa presente en la cadena de transporte, vía el citocromo c_{550} , como se ha visto en *Paracoccus denitrificans*; o vía la azurina como sucede en *P. putida* (Vandenberghe *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003a; Ono *et al.*, 2006).

La quinohemoproteína amino deshidrogenasa de *P. putida* U, responsable de la desaminación oxidativa de la 2-feniletilamina (Arias *et al.*, 2008) pertenece a este grupo. *P. denitrificans* posee dos enzimas con actividad amino deshidrogenasa en su periplasma: una metilamina deshidrogenasa (MADH) que usa metilamina y una QH-AmDH que reconoce aminas primarias alifáticas y aromáticas, aunque muestra mayor actividad con *n*-butilamina y bencilamina (Takagi *et al.*, 1999; Datta *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003a). Otra QH-AmDH que se encuentra dentro de este grupo ha sido purificada a partir de dos cepas de *P. putida*, la cepa *P. putida* IFO 15633 y la cepa *P. putida* ATCC 12633 (Vandenberghe *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2006).

Los cuatro genes que codifican la QH-AmDH de *P. putida* U y de *P. denitrificans* han sido identificados y secuenciados. El ORF1 codifica la subunidad α , que presenta dos grupos hemo que actúan como grupos redox durante la oxidación; el ORF2 codifica una proteína, cuya función es desconocida, pero que desempeña un papel esencial en la oxidación de estos compuestos; el ORF3 codifica la subunidad pequeña γ (es a la que se encuentra unido el cofactor) y el ORF4 codifica la subunidad β . Estos genes se transcriben conjuntamente, por lo que constituyen un único *cluster* (Vandenberghe *et al.*, 2001).

El mecanismo de las reacciones catalizadas por este grupo de enzimas es el siguiente (Satoh *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003a) (**Figura 5**):

- I. La reacción se inicia mediante el ataque nucleofílico del nitrógeno del grupo amino al C_6 perteneciente al grupo carbonilo del cofactor CTQ, dando lugar a la formación de un intermediario carbinolamina (a).
- II. La carbinolamina pierde una molécula de agua y se forma una imina (b).
- III. A continuación, un residuo del sitio activo (probablemente el D33 γ) abstrae un protón del C_α de la amina para formar un intermediario carbaniónico que evoluciona (mediante resonancia) al compuesto (c). Al mismo tiempo se

reduce el CTQ tras captar una molécula de H₂O, dando lugar al intermediario (d).

- IV. El producto resultante de esta oxidación, el aldehído (e), es finalmente liberado mediante la hidrólisis del nuevo enlace imina que se había formado entre el C_α y el grupo amino.

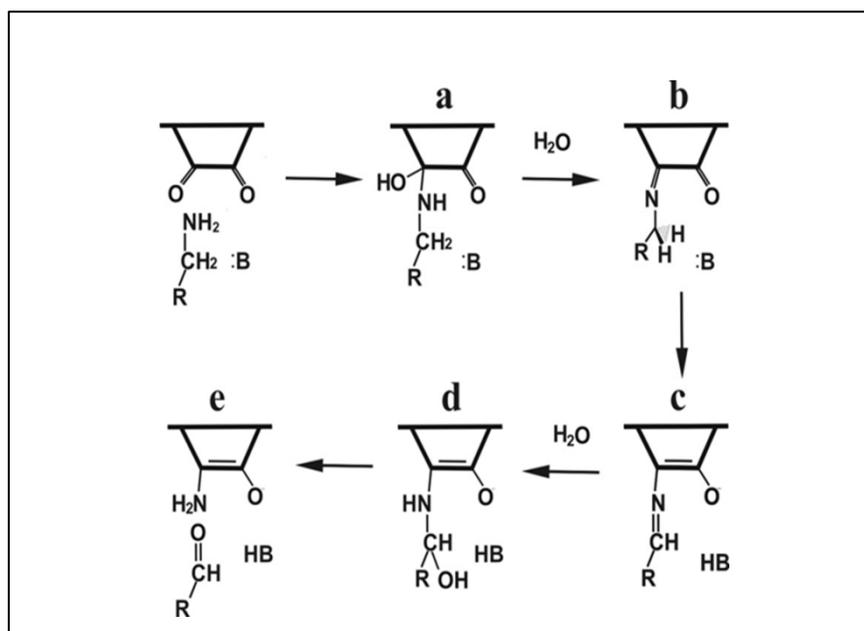


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de reacción utilizado por las QH-AmDH para oxidar las aminas primarias. B indica una base. Los intermediarios (a), (b), (c), (d) y (e) se explican en el texto (Modificado de Sun *et al.*, 2003a).

Parece ser, por lo tanto, que hay una transferencia intramolecular de electrones desde el complejo generado por el sustrato reducido-CTQ al hemo I; desde aquí al hemo II y, a partir de él, se produce una transferencia intermolecular al aceptor exógeno. Esta reacción oxidativa tendrá lugar a través de dos reacciones secuenciales hasta que conducen a la reoxidación del cofactor y de los grupos hemo.

Se ha comprobado que la QH-AmDH de *P. putida* puede ser inhibida por *p*-nitrofenilhidrazina. Este compuesto se une al sitio activo de la enzima, situado entre la subunidad β y γ , del mismo modo que lo haría el sustrato. Esta unión provoca algunos cambios importantes en el cofactor CTQ y también cambios conformacionales en las cadenas

laterales de los residuos pertenecientes a los aminoácidos que componen el sitio activo, causando así la pérdida de la actividad enzimática (Sato *et al.*, 2003).

3.2. Quinoproteínas amino deshidrogenasas.

Estas enzimas (EC 1.4.9.2, Q-AmDH) utilizan como cofactor el TTQ que se forma a partir de dos residuos de triptófano presentes en la subunidad pequeña de la enzima. Presentan una estructura de 4 subunidades $\alpha_2\beta_2$, dos ligeras (α) y dos pesadas (β), donde el cofactor se encuentra unido a las subunidades β (Takagi *et al.*, 1999; Davidson, 2005).

Dentro de este grupo de enzimas se incluyen la metilamina deshidrogenasa (MADH) de *Methylobacterium extorquens* AM1 o de *P. denitrificans* y la amino deshidrogenasa de aminoácidos aromáticos (AADH) descrita en *A. faecalis*. Esta última parece estar implicada en el catabolismo de diferentes aminas primarias, tales como la feniletilamina, la tiramina y la triptamina (Chistoserdov, 2001).

En cuanto a su organización genética, en *A. faecalis* se han identificado nueve genes que se transcriben en el mismo sentido y que, aparentemente, están implicados en la degradación de aminas (ORF1, *aauBEDA*, ORF2, ORF3, ORF4 y *hemE*). Los genes *aauA* y *aauB* codifican la subunidad pequeña y la grande de la AADH, respectivamente, y son homólogos de los genes *mauA* y *mauB* que codifican la MADH. Los genes *aauE* y *aauD* son homólogos de *mauE* y *mauD* y, aparentemente, codifican proteínas que llevan a cabo la misma función (el transporte y el plegamiento de la subunidad pequeña en el periplasma, respectivamente). Los genes homólogos de *mauF*, *mauG*, *mauL*, *mauM* y *mauN*, que participan en la biosíntesis del cofactor TTQ, no se encuentran en el *cluster aau*. Sin embargo, se han identificado otros ORFs, tales como el ORF2, que codifica un citocromo monohemo de tipo c, y los ORF1, ORF3, y ORF4, a los que todavía no se les ha asignado ninguna función, pero que parecen ser esenciales para la degradación de ciertas aminas, ya que su disrupción es letal en esta bacteria (Chistoserdov, 2001).

El mecanismo catalítico descrito para las AADH y las MADH es similar al propuesto para las QH-AmDH, aunque estas enzimas carecen de los dos grupos hemo. Una característica común de los sitios activos de las dos enzimas (AADH y MADH) es que los átomos de oxígeno del aspartato catalítico están involucrados en las uniones de hidrógeno (Zelleke and Marx, 2016).

En las reacciones catalizadas por las Q-AmDH, la transferencia de dos electrones desde el cofactor TTQ reducido hasta el aceptor externo de electrones se produce mediante dos reducciones consecutivas. El aceptor de electrones es la azurina, en el caso de las AADH, y la amicianina en el caso de las MADH. Ambos aceptores fisiológicos median la transferencia de electrones hasta diferentes tipos de citocromo c solubles. En el caso de las AADH, la reacción se favorece cuando la fuerza iónica es alta, mientras que la actividad de las MADH disminuye cuando aumenta la fuerza iónica (Hyun and Davidson, 1995; Takagi *et al.*, 1999). En ambos casos, tras la liberación del producto, se genera una forma quinol del TTQ. Por ejemplo, en la reducción del TTQ por metilamina, el formaldehído es liberado, pero el grupo amino permanece unido al cofactor. Por lo tanto, la reducción del sustrato implica la génesis de una forma aminoquinol del TTQ en el que uno de los oxígenos del grupo carbonilo es reemplazado por el grupo amino derivado del sustrato. La liberación del grupo amino se produce tras la segunda transferencia de electrones, lo que permite la regeneración de la quinona (Hyun and Davidson, 1995).

3.3. Quinoproteínas amino oxidasas.

Estas enzimas (EC 1.4.3.6, Q-AmO) reciben también la denominación de amino oxidasas dependientes de cobre (Klinman and Mu, 1994). En cuanto a su estructura, son generalmente homodímeros formados por dos subunidades idénticas. Se caracterizan porque en cada subunidad se presenta una molécula de TPQ y un cofactor enzimático que se forma mediante modificación postranscripcional a partir de uno de los residuos de triptófano existentes en la enzima. Además, llevan unido un átomo de cobre (II), necesario tanto para la biosíntesis del cofactor como para la catálisis de la enzima. Este Cu(II) está coordinado con tres residuos de histidina y dos moléculas de agua (Hirota *et al.*, 2001; Matsunami *et al.*, 2004).

Estas enzimas 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. Así, en *Klebsiella oxytoca* se ha caracterizado una Q-AmO que está relacionada con la degradación de feniletilamina y de tiramina (Hacisalihoglu *et al.*, 1997). Cuando *E. coli* (Cooper, 1997) o *Klebsiella aerogenes* (*K. pneumoniae*) se cultivan en presencia de tiramina, también expresan una Q-AmO similar a la de *K. oxytoca* (Hacisalihoglu *et al.*, 1997). También se han identificado otras Q-AmO en bacterias G+ y en

levaduras. Así, por ejemplo, en *Arthrobacter globiformis* se ha caracterizado una Q-AmO que contiene cobre y que utiliza como sustrato feniletilamina (Hirota *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2003) y en la levadura *Hansenula polymorpha* se ha identificado una metilamina oxidasa implicada en la degradación de metilamina (Matsunami *et al.*, 2004). En el plasma y en tejidos animales, en plantas, en levaduras, en hongos y en bacterias se han descrito también D-aminoácido oxidasas dependientes de cobre. Las DAO son las principales enzimas responsables de la desaminación oxidativa de la histamina en todos esos organismos (Malmstrom *et al.*, 1975), como se detallará en el apartado 6.1.

La reacción catalítica llevada a cabo por estas quinoproteínas amino oxidasas, transcurre mediante un mecanismo ping-pong de transaminación que puede dividirse en dos hemirreacciones o etapas, en función del estado de oxidación del cofactor (Hirota *et al.*, 2001):

I. Hemirreacción reductiva: desaminación oxidativa del sustrato.

- El cofactor TPQ participa en esta etapa formando un enlace covalente con el sustrato (a través del grupo carbonilo del C₅ y del grupo amino del sustrato), dando lugar a la formación una base de Schiff (imina).
- La base de Schiff es entonces desprotonada por un residuo de aspartato próximo al sitio activo y al mismo tiempo se reduce el cofactor. En este paso se forma otra base de Schiff, pero ahora es producida entre el carbono adyacente al grupo amino del sustrato y el nitrógeno derivado del grupo amino del mismo sustrato.
- A continuación, se produce la hidrólisis de esta base de Schiff, liberándose el aldehído y dejando la forma aminoresorcinol del TPQ reducido.

La estereoespecificidad de la abstracción del protón de la posición C₁ del sustrato ha sido estudiada en diferentes enzimas, tanto las de origen bacteriano como la aislada de animales o de vegetales. Se ha visto que la especificidad varía en función de la naturaleza de la enzima y de los sustratos utilizados. Así, por ejemplo, en el caso de la dopamina, en ocasiones se abstrae el protón *pro-R* y en ocasiones el *pro-S*, dependiendo de si la reacción es catalizada por la enzima presente en plantas o en animales (Uchida *et al.*, 2003).

II. Hemirreacción oxidativa: reducción del oxígeno molecular.

En esta etapa se produce la re-oxidación del TPQ reducido (TPQ_{red}) y la liberación de amonio. La participación del Cu(II) en esta etapa se apuntó tras el descubrimiento de la forma Cu(I)/topa semiquinona (TPQ_{seq}). Debido a que la transferencia de electrones desde el TPQ_{red} al Cu(II) para formar Cu(I)/TPQ_{seq} es muy rápida, y debido a que el Cu(I) reacciona fácilmente con el O₂, el estado Cu(I)/TPQ_{seq} ha sido propuesto como un intermediario cinéticamente competente con Cu(I) que oxida directamente al O₂. De este modo, se establece un equilibrio entre la forma Cu(II)/TPQ_{red} y Cu(I)/TPQ_{seq} para la transferencia intramolecular de electrones (Hirota *et al.*, 2001).

3.4. Flavoproteínas amino oxidasas.

Hay enzimas implicadas en la oxidación de diferentes aminas que utilizan FAD como cofactor, son las flavoproteínas amino oxidasas (EC 1.4.3.4). Dentro de este grupo cabe destacar las monoamino oxidasas (MAOs), que se han aislado de varios tejidos y que están presentes en distintas formas llamadas MAO-A y MAO-B (Mondovì and Agrò, 1982). En el hígado la isoforma MAO-B es la predominante, mientras que en la mucosa del duodeno la isoforma mayoritaria es la MAO-A, siendo esta isoenzima la encargada de la desaminación de las aminas introducidas con la dieta. Por esta razón, se provocarán procesos de hipertensión críticos en aquellos pacientes que consuman alimentos ricos en aminas y sigan tratamientos con inhibidores de la MAO-A. Esta es una de las causas por las que los tratamientos con fármacos inhibidores de la MAO, actualmente están dirigidos a la inhibición de la actividad de la isoforma MAO-B (Saura *et al.*, 1996).

Cada una de estas isoformas tiene distinta especificidad de sustrato e inhibidores. Las MAO-A oxidan mejor la 5-hidroxitriptamina, la noradrenalina y la adrenalina y son inhibidas por clorgilina, mientras que las MAO-B actúan sobre la tiramina, la dopamina, la bencilamina y la feniletilamina y son inhibidas por deprenilo. También se ha relacionado a la isoforma MAO-B con la degradación de histamina (ver apartado 6.1) (Hough and Domino, 1979). Se habla de una tercera isoforma, MAO-C, pero no hay prácticamente información sobre ella (Mondovì and Agrò, 1982; Sugino *et al.*, 1992).

La desaminación de la tiramina en *P. putida* U, la bacteria utilizada en este trabajo, transcurre a través de un proceso descrito en nuestro laboratorio en el que participan enzimas de este tipo (Arcos *et al.*, 2010).

4. HISTAMINA.

La histamina (2-(4-imidazol)-etilamina) es una amina biogénica cuyo Mw es de 111 Da y que está compuesta por 17 átomos. Se considera una hormona local o autocoide que, como se ha mencionado con anterioridad, se sintetiza por la descarboxilación de la L-histidina, en una reacción catalizada por la histidin descaboxilasa (Recsei and Snell, 1972).

Esta amina biogénica se conoce desde hace más de 100 años y fue sintetizada *in vitro* por Windaus y Voght en 1907 (Windaus and Vogt, 1907). Más adelante, en 1910, Dale y Laidlaw extrajeron esta molécula de *Claviceps purpurea*, estableciendo sus funciones biológicas sobre el musculo liso, así como su acción vasodilatadora (Barger and Dale, 1910; Dale and Laidlaw, 1910). En este mismo año, Ackermann y Kutscher sintetizaron la histamina a través de la descarboxilación de la histidina, incrementándose los rendimientos del proceso de síntesis (Emanuel, 1999). Popielsky, discípulo de Pavlov, observó en 1916 que la histamina actuaba como un agente que aumentaba la secreción del ácido clorhídrico en el estómago del perro, aunque este trabajo no se publicó hasta 1920 (Popielski, 1920). En 1919, se aisló por primera vez histamina del cerebro por J. Abel (Abel and Kubota, 1919). En 1927, el grupo científico dirigido por Best aisló la histamina de muestras frescas de hígado y pulmón, comprobando que estaba presente en muchos tejidos del organismo, razón por la que se la denominó, histamina, derivado de *histos* (tejido) (Best *et al.*, 1927). Este descubrimiento dio pie a un gran número de estudios que han permitido establecer sus funciones e interacciones metabólicas, así como definir agonistas, antagonistas y fármacos que modulan su actividad.

Sobre los años 30, se observó que las concentraciones de histamina eran distintas en las cobayas y en los perros, antes y después de la reacción anafiláctica (Dragstedt and Mead, 1936; Code, 1937; Steinhoff *et al.*, 2004) y permitió establecer una estrecha relación entre la anafilaxis y la presencia de histamina en mastocitos y basófilos (Riley and West, 1953; Ishizaka *et al.*, 1972; Hasala, 2006).

4.1. Receptores de histamina y antihistamínicos.

- **Receptores.**

Debido a la multitud de funciones que desempeña la histamina, y dada su relación con las reacciones anafilácticas, en el primer tercio del siglo XX se empezaron a estudiar en el Instituto Pasteur, compuestos que contrarrestasen los efectos de esta amina. A la vez que se iban descubriendo compuestos que disminuían los efectos patológicos de la histamina, se iban hallando nuevos receptores de esta amina biogénica. El receptor H1 (**Tabla 3**) se descubrió en 1966, siendo antagonistas de este receptor los primeros antihistamínicos encontrados. En 1972, se descubrió el receptor H2 (**Tabla 3**) (Bachert, 1998). La aparición del receptor H3 (**Tabla 3**) surgió al comprobar que las acciones en el cerebro no estaban moduladas por ninguno de los receptores descritos (ni por H1 ni por H2), sino por un tercero que se parecía muy poco a los anteriores (Arrang *et al.*, 1983; Lovenberg *et al.*, 1999).

Posteriormente, se identificó un gen que codificaba una proteína que mantenía una similitud de secuencia del 35% con la del receptor H3. La proteína expresada en sistemas heterólogos tenía una alta afinidad por la histamina. Esta proteína, que correspondía a un nuevo receptor de histamina, el receptor H4 (**Tabla 3**), fue descrito por seis laboratorios distintos de forma simultánea (Thurmond, 2015). El receptor H4 se localiza en la médula ósea, y, en menor concentración, en el colon. Los antagonistas del receptor H1 no son efectivos para combatir el asma bronquial, aunque se ha observado que en ratón, los antagonistas del receptor H4 si son efectivos (Deml *et al.*, 2009). La caracterización completa de este nuevo receptor aún no ha sido completada.

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Características de los receptores de histamina metabotrópicos. Adaptada de Ramos-Jiménez *et al.*, 2009.

RECEPTOR	H1	H2	H3	H4
LOCALIZACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Músculo liso. - Células endoteliales. - Médula de las glándulas suprarrenales. - Corazón. - SNC. 	<ul style="list-style-type: none"> - Células gástricas parietales. - Músculo liso. - Células supresoras T. - Neutrófilos. - Corazón. - Útero. - SNC. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nervios simpáticos y parasimpáticos del corazón. - Cerebro. - Tracto gastrointestinal. - SNC. 	<ul style="list-style-type: none"> - Médula ósea. - Leucocitos. - Neutrófilos. - Eosinófilos. - Mastocitos. - Pulmón.
TAMAÑO (Aminoácidos)	<ul style="list-style-type: none"> - Rata (486). - Ratón (489). - Ser humano (487). 	<ul style="list-style-type: none"> - Rata y ratón (358). - Perro, cobaya y ser humano (359). 	<ul style="list-style-type: none"> - Ser humano: isoforma más abundante (445), otras isoformas (de 326 a 453). - Mono: 3 isoformas (335, 410, 413). 	<ul style="list-style-type: none"> - Rata y ratón (391). - Cobaya, mono y ser humano (390).
INTRONES EN EL GEN	No	No	Sí (2-3)	Sí (2)
ISOFORMAS	No	No	Sí	No
AFINIDAD POR LA HISTAMINA	Micromolar	Micromolar	Nanomolar	Nanomolar
UBICACIÓN CROMOSOMAL DEL GEN EN EL SER HUMANO	3p25	5q35.3	20q13.33	18q11.2

SNC, sistema nervioso central.

Es interesante reseñar que los distintos receptores se han asociado con varias funciones metabólicas importantes (Cianchi *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2005; Zampeli and Tiligada, 2009). Así:

- **Receptor H1:** participa en la contracción del músculo liso bronquial; prurito; dolor; incremento de permeabilidad vascular; hipotensión; rubicundez facial; liberación de mediadores de la inflamación; generación de prostaglandinas; reclutamiento de células inflamatorias; secreción de moco de la mucosa bronquial; cefalea;

taquicardia; activación de nervios aferentes vagales de vías aéreas y aumento del tiempo de conducción del nodo atrioventricular.

- **Receptor H2:** regula la permeabilidad vascular; secreción gástrica del ácido clorhídrico; relajación del músculo liso bronquial; controla la producción de moco en las vías aéreas; está relacionado con la acción cronotrópica en el músculo del atrio y la acción inotrópica del músculo ventricular. Interviene en el efecto lipolítico en células sebáceas; estimulación de células T supresoras; quimiotaxis de neutrófilos y basófilos; liberación de enzimas y en procesos de citotoxicidad y proliferación de linfocitos. Además, participa en la hipotensión, rubicundez, cefalea y taquicardia.
- **Receptor H3:** previene la broncoconstricción excesiva; inhibe la secreción de ácido gástrico; aumenta la vasodilatación de vasos cerebrales; actúa como controlador *feedback* de la liberación de neurotransmisores en los nervios periféricos; controla la producción de histamina en neuronas histaminérgicas del sistema nervioso central y controla la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central.
- **Receptor H4:** participa en el prurito crónico; colitis y cáncer colorrectal. Al igual que otros receptores participa en procesos inflamatorios, tales como la alergia y el asma.

- **Antihistamínicos.**

El término antihistamínico hacía referencia a los antagonistas del receptor H1 (Ash and Schild, 1966), ya que compiten por la unión de éste con la histamina de forma reversible en los tejidos. El primer antihistamínico, el 2-isopropil-5-metil-fenoxietil-dietilamina, se descubrió en 1933 por Forneau y Bovet, sin embargo, no fue hasta 1942 cuando se utilizó de forma terapéutica la fenbenzamina en humanos (Bovet, 1950; Flowers *et al.*, 1986; Hasala, 2006).

Los antihistamínicos H1 se han clasificado en 6 grupos químicos: las etanolaminas, las etilendiaminas, las alquilaminas, las piperazinas, las piperidinas y las fenotiazinas. Sin embargo, actualmente se clasifican en antihistamínicos de primera generación, que son sedantes y pertenecen a este grupo los descubiertos antes de los años 80 y antihistamínicos de segunda generación, que no son sedantes (Simons and Simons, 2003), siendo los representantes de este segundo grupo el astemizol y la terfenadina (Emanuel, 1999).

Hoy día, ya se habla de antihistamínicos de tercera generación, que son metabolitos activos producidos a partir de los antihistamínicos de segunda generación (Handley and Graff, 1998). Este tipo de antihistamínicos empezaron a surgir en 1990, aunque hasta 2003 no se definieron las características requeridas para pertenecer a este grupo (propiedades antiinflamatorias, potencia, eficacia y efectividad, bloqueo de la cardiotoxicidad, falta de interacciones con drogas, falta de efectos sobre el sistema nervioso central y enfoque farmacológico) (Rico *et al.*, 2009).

Aunque el término antihistamínico se utiliza de forma frecuente para designar aquellas sustancias antagonistas que actúan sobre los receptores H1, también hay sustancias consideradas antihistamínicos que ejercen su acción como antagonistas de la histamina en la unión al resto de receptores H2, H3 y H4 (Faustino-Rocha *et al.*, 2017). Los antihistamínicos H2 más utilizados son la cimetidina, la ranitidina, la famotidina y la nizatidina, que alivian los síntomas del reflujo gastroesofágico (Mahdy and Webster, 2014; D'Erme *et al.*, 2015). En cambio, los antihistamínicos H3 y H4 son importantes en el tratamiento de trastornos alérgicos tales como la rinitis, el asma, el prurito y la dermatitis atópica. Los representantes más importantes dentro de los antihistamínicos H3 son el ciproxifan, el imoproxifan y la impromidina, y dentro de los antihistamínicos H4, se encuentran la tioperamida, el JNJ-7777120 y el VUF-6002. El problema de este tipo de antihistamínicos que actúan sobre los receptores H3 y H4, es que su comercialización aún no está aprobada, aunque los ensayos clínicos ya están en curso (Tiligada *et al.*, 2009; Thurmond, 2015; Faustino-Rocha *et al.*, 2017).

4.2. Funciones de la histamina.

Como ya se ha mencionado, dentro de las aminas biogénicas, la histamina ha sido la más estudiada por estar presente en gran variedad de alimentos y por jugar un importante papel como neurotransmisor. Se sintetiza por muchos tipos de células en el cuerpo, entre las que se encuentran las neuronas, las células de la mucosa gástrica, los mastocitos, los basófilos y los linfocitos T. La histamina causa la contracción del músculo liso, vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, secreción mucosa, taquicardia, alteraciones en la presión sanguínea, arritmias. Además, estimula la secreción gástrica ácida y participa en la hematopoyesis, neurotransmisión, inmunomodulación, ritmos circadianos y en la regulación de la proliferación y la angiogénesis de los modelos tumorales. Algunas de las funciones de la

histamina se recogen en la **Figura 6** (Aoi *et al.*, 1989; Maintz and Novak, 2007; Shahid *et al.*, 2010):

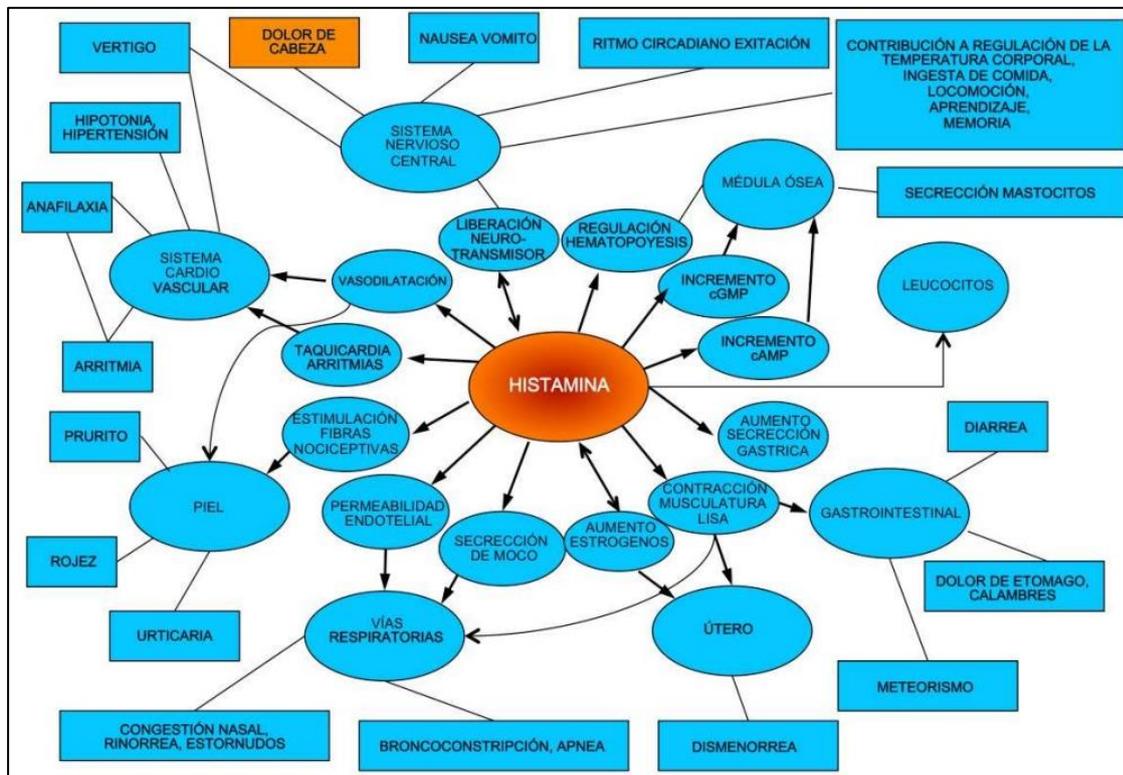


Figura 6. Algunos procesos fisiológicos desencadenados por la histamina en el organismo.

Las concentraciones de histamina en el plasma sanguíneo oscilan entre 0,3 y 1 ng/ml, y fuera de ese rango se puede dar histapenia (deficiencia de histamina) o histadelia (abundancia de histamina) produciendo alteraciones físicas y enfermedades neurológicas en ambos casos (Shahid *et al.*, 2010).

4.3. Enfermedades asociadas con la histamina.

La intolerancia a la histamina es un proceso patológico que ocurre cuando se da una desproporción entre la toma de histamina y la eliminación de ésta, generando altas concentraciones de histamina en el organismo. Se ha descrito en humanos de mediana edad y la prevalencia es del 1% de la población. En esta patología la mayoría de los síntomas se deben principalmente al aumento de la concentración de histamina en el organismo, pero los síntomas secundarios se deben al hecho de que este aumento provoca la síntesis y liberación de catecolaminas produciendo taquicardia, dolor de cabeza, urticaria, incremento de la presión

arterial, broncoespasmo y hasta paro cardiaco si los niveles de histamina son muy altos (Wöhrl *et al.*, 2004; Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015). Uno de los síntomas neurológicos más usuales es el dolor de cabeza, comprobándose que en pacientes que sufrían ataques de migraña había un incremento de los niveles de histamina (Lassen *et al.*, 1996).

En ciertas **afectaciones respiratorias**, como aquellas que causan ataques de asma bronquial, obstrucción nasal y broncoconstricción, se ha visto que la actividad de la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT) ha disminuido considerablemente lo que conduce a una alta concentración de histamina (Yamauchi *et al.*, 1994; Preuss *et al.*, 1998).

En aquellos casos en los que se producen ciertas **patologías de la piel**, tales como la urticaria crónica o la dermatitis atópica, se ha comprobado también que los niveles de la actividad de la enzima DAO eran más bajos que respecto a individuos normales (Ionescu and Kiehl, 1988), por lo que la concentración de histamina es mayor que en aquellas personas que no la sufren.

Además, se ha visto que la histamina juega un papel importante en la **dismenorrea** (menstruación difícil y dolorosa) ya que en el aparato genital femenino la histamina se produce principalmente por los mastocitos, las células endoteliales y las células epiteliales en el útero y en los ovarios (Hamada *et al.*, 2013).

La **escombroidosis** se conoce como síndrome de intoxicación histamínica. Se describió en 1799 en el Reino Unido, y suele aparecer cuando hay un consumo elevado de pescado azul (de las especies pertenecientes a la familia *Scombridae* y *Scomberesocidae*, entre los que se incluye el atún, el bonito y la caballa). Sin embargo, también se ha comprobado que hay especies de pescado, que están implicadas en esta enfermedad, y que no pertenecen a la familia *Scombridae* (anchoas -*Engraulis* spp.-, arenque -*Clupea* spp.-, marlín -*Makaira* spp.-, sardina -*Sardina pilchardus*-, sardinillas -*Sardinella* spp.-, pescado azul -*Pomatomus* spp.-, salmón australiano del Oeste -*Arripis truttaceus*-, salmón rojo -*Oncorhynchus nerka*-, pez limón -*Seriola* spp.-, y pez espada -*Xiphias gladius*-) (Hungerford, 2010). Los síntomas no aparecen hasta pasado un tiempo tras la ingestión (entre 10 minutos y una hora) (Ansdell, 2008). Se considera como una enfermedad bastante leve, pero con muchos síntomas diferentes en la piel, en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso. Entre los síntomas cutáneos, se incluyen la erupción, urticaria, edema e inflamación localizada alrededor de la boca (Gilbert *et al.*, 1980; de Cerio *et al.*, 2016). Entre los síntomas

gastrointestinales, cabe destacarse diarrea, vómitos y calambres. Los síntomas neurológicos más importantes son el dolor de cabeza, las palpitaciones, la rubefacción, una sensación oral ardiente, picazón e hipotensión (Taylor *et al.*, 1989).

La terapia más efectiva para tratar estos síndromes es la limitación de alimentos ricos en histamina; la limitación de fármacos que inhiban la actividad de las dos enzimas más importantes que inactivan la histamina (HNMT y DAO) y potenciar la acción de la enzima DAO por medio de la suplementación de sus cofactores, tales como el zinc, el cobre, la vitamina C y la vitamina B6. En los casos más severos, es necesario la administración de antihistamínicos H1 y H2 (Maintz and Novak, 2007; Kovacova-Hanuszkova *et al.*, 2015). Tal es el caso de la escombroidosis, donde se administran la difenhidramina y la clorfeniramina que son antihistamínicos antagonistas de H1 (Dickinson, 1982). A veces también responde al tratamiento con antagonistas de H2, tales como la cimetidina (Blakesley, 1983; Feng *et al.*, 2016).

Debido a la función de la histamina como neurotransmisor, se ha observado que esta amina biogénica tiene un papel en enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer y el Parkinson (Fernández-Novoa and Cacabelos, 2001; Haas and Panula, 2003).

En la enfermedad de **Parkinson**, los pacientes que padecen esta enfermedad tienen unas concentraciones elevadas de los catabolitos de histamina en el fluido cerebroespinal (Coelho *et al.*, 1991; García-Martín *et al.*, 2008). Se ha observado que puede haber una asociación entre individuos con alto catabolismo de histamina, y un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, sugiriéndose que la modulación de la histamina cerebral puede estar relacionada con el Parkinson, aunque, por el momento, se desconocen los mecanismos moleculares responsables de esta interacción (Agúndez *et al.*, 2008; García-Martín *et al.*, 2008). Recientemente, se ha comprobado que una baja actividad de la enzima HNMT tiene un efecto protector contra esta enfermedad, sugiriéndose que este efecto se debe al hecho de que elevadas concentraciones de histamina podrían estimular las funciones cerebrales (Yang *et al.*, 2015; Yoshikawa and Yanai, 2016).

En la enfermedad del **Alzheimer** se ha observado que los niveles de histamina disminuyen en las áreas del cerebro afectadas por esta enfermedad, tales como el hipotálamo, el hipocampo y el cortex temporal (Panula *et al.*, 1997; Haas and Panula, 2003). Esta disminución de la concentración de histamina se debe a la reducción de los liberadores de esta amina y de los receptores en el cortex temporal, dando como resultado la degeneración de las

neuronas de los núcleos tuberomamilares, responsables de la síntesis de histamina en el cerebro (Airaksinen *et al.*, 1991; Alraksinen *et al.*, 1991).

La variación de la concentración de histamina en ambas enfermedades ha propiciado el estudio sobre la participación de los receptores de histamina, observándose que el receptor H3 es importante. De ahí que la administración de antagonistas H3 puedan servir para estas enfermedades si se aplica el tratamiento en las primeras fases (Aquino-Miranda *et al.*, 2012; Vohora and Bhowmik, 2012; Grove *et al.*, 2014; Hu and Chen, 2017).

4.4. Síntesis de histamina.

Los animales sintetizan histamina para llevar a cabo las funciones fisiológicas, pero distintos organismos también lo sintetizan como parte de su metabolismo para la obtención de energía. La histidin descarboxilasa (Hdc, EC 4.1.1.22) cataliza la reacción de conversión de histidina a histamina. Se han encontrado dos familias de histidin descarboxilasas distintas en función del tipo de organismo que la produce. Las secuencias y las características de estos dos tipos de proteínas son diferentes. Así, una familia incluye a las histidin descarboxilasas dependiente de piridoxal-fosfato. Éstas han sido descritas en bacterias G- y en mamíferos. El grupo aldehído del piridoxal se une en el centro activo a uno de los grupos amino pertenecientes a una lisina localizada en el centro activo de la enzima formando una base de Schiff (aldimina interna). El grupo carbonilo del piridoxal-5-fosfato reacciona fácilmente con los aminoácidos para formar una nueva base de Schiff (aldimina externa) que funciona como intermediario, y que permite que éstos sean posteriormente descarboxilados para dar lugar a la correspondiente amina y a la molécula de piridoxal fosfato original.

Otra familia incluye a las histidin descarboxilasas dependientes de piruvato que se encuentran en bacterias G+ y, especialmente, en bacterias ácido lácticas. En este caso, será el grupo piruvoil el que se une covalentemente al grupo amino del aminoácido formando una base de Schiff y permitiendo que se produzca la descarboxilación de la N-piruvoil-histamina (cetimina).

El gen de la histidin descarboxilasa en humanos está formado por exones y codifica una proteína de 74 kDa, que posee muy baja actividad enzimática. La generación de la forma activa (de 53-55 kDa) requiere una modificación postraduccional compleja (Yatsunami *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2008).

En las bacterias G+, los genes involucrados en la síntesis de histamina y su regulación están agrupados en un *cluster*, denominado *cluster hdc* compuesto por hasta cuatro genes: *hdcA*, *hdcB*, *hdcP* y *hisRS* (**Figura 7**). El gen que codifica la histidin descarboxilasa, *hdcA*, se ha identificado en diferentes bacterias G+, tales como *Lactobacillus* 30a, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, estando al lado del gen *hdcB*, que codifica una enzima de maduración de *hdcA* (Trip *et al.*, 2011), pero no así en *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus capitis*, los cuales no poseen el gen *hdcB* (Martín *et al.*, 2005). En *Streptococcus thermophilus* (Calles-Enríquez *et al.*, 2010), entre ambos genes, *hdcA* y *hdcB*, se encuentra el gen *hdcP* que codifica el sistema de transporte antiporte histamina/histidina, a diferencia de lo que ocurre en algunas especies del género *Lactobacillus*, tales como *L. hilgardii* y *L. buchneri*, donde dicho gen se encuentra corriente arriba de los genes *hdcA* y *hdcB* (Martín *et al.*, 2005; Landete *et al.*, 2008; Diaz *et al.*, 2015). Estos genes (*hdcA*, *hdcB* y *hdcP*) están seguidos y orientados en la misma dirección junto con el gen *hisS*, que codifica una histidil-tRNA sintetasa (que muestra homología con las histidil-tRNA sintetasa de clase II, HisRS) y que tiene una acción reguladora sobre el *cluster hdc* (Martín *et al.*, 2005). En *L. buchneri*, la expresión del gen *hisRS* depende de la concentración de histidina en el medio (Landete *et al.*, 2008). Algunos microorganismos, tales como *C. perfringens* y *S. capitis*, solo poseen dos de los cuatro genes comentados, *hdcA* y *hdcP*, cuyos productos, la histidin descarboxilasa y un transportador, se combinan para formar la vía de descarboxilación típica en bacterias (De las Rivas *et al.*, 2008; Landete *et al.*, 2008).

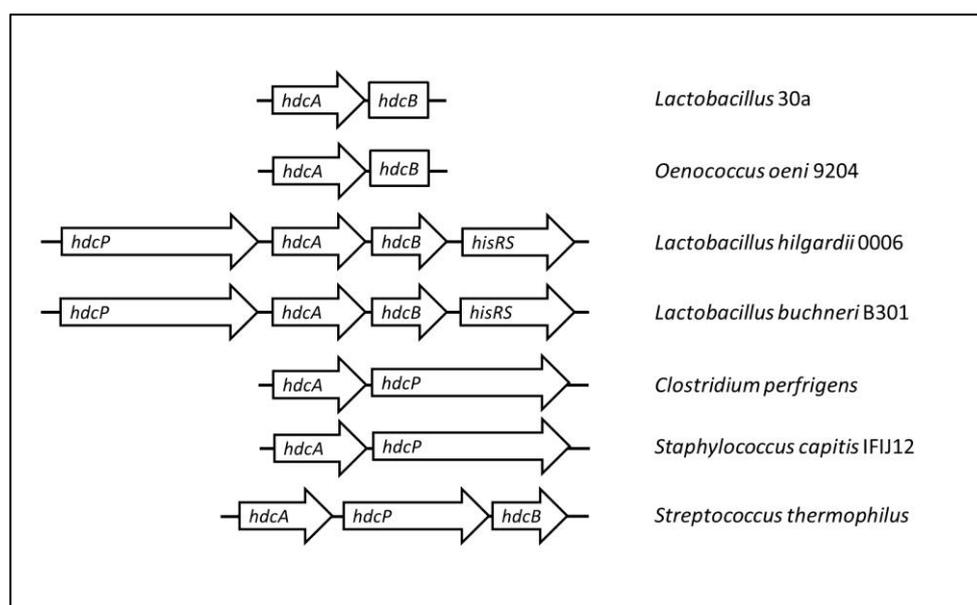


Figura 7. Organización genética del *cluster* de la histidin descarboxilasa en bacterias G+.

Los bacterias G- en las que más se ha estudiado el *cluster* que contiene el gen *hdc* (o *hdcA*) que codifica la histidin descarboxilasa, son las bacterias entéricas, tales como *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Raoultella planticola* y *Enterobacter aerogenes*; y en algunas bacterias marinas, tales como, *Photobacterium phosphoreum* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. En este *cluster*, además del gen *hdc*, pueden estar presentes los genes *hdcT1* (*ydjE* o *hdcT*), *hdcT2* y *hisS* (o *hisRS*). El gen *hdcT1* codifica un sistema de transporte antiporte histamina/histidina, al igual que el gen *hdcT2*. Ambos, se encuentran en *M. morganii* y *K. oxytoca*. El gen *hisS* (o *hisRS*) que codifica una histidil-tRNA sintetasa está presente en las bacterias citadas, y algunos microorganismos (*R. planticola* y *E. aerogenes*) poseen dos copias de este gen (*hisS* y *hisS2*) (**Figura 8**) (Kimura *et al.*, 2009; Ferrario *et al.*, 2014; Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2016).

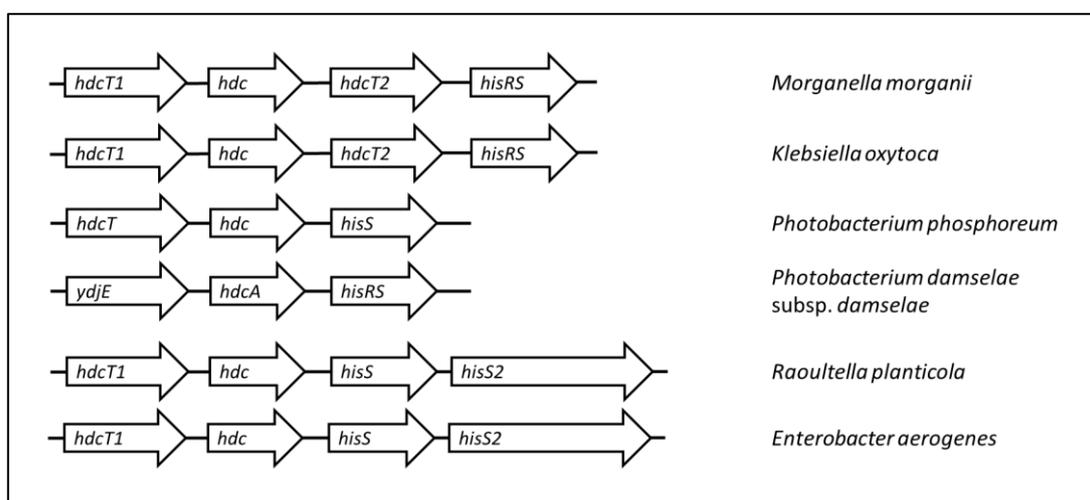


Figura 8. Organización genética del *cluster* de la histidin descarboxilasa en bacterias G-.

Las condiciones requeridas para que la actividad descarboxilasa sea óptima dependen de cada microorganismo. En general, la temperatura óptima para la histidin descarboxilasa oscila en un rango de entre 30°C y 40°C, siendo aún activa a 5°C, pero inactivándose rápidamente a 60°C (Kanki *et al.*, 2007). La enzima de la especie *Streptomyces thermophilus* muestra un máximo de actividad a 50°C, de tal manera que cuando se incubaba en leche a 42°C produce más histamina que cuando se incubaba a 4°C (Tabanelli *et al.*, 2012). En algunos casos, se ha comprobado que ciertos microorganismos (*Photobacterium phosphoreum* NUFM 262) poseen dos histidin descarboxilasas, una constitutiva y otra inducible, y que cada una de ellas tiene unas condiciones óptimas particulares (Morii and Kasama, 2004).

5. TRANSPORTE DE HISTAMINA.

En mamíferos, el exceso de histamina es eliminado por varios transportadores. Algunos de ellos se caracterizan por ser sistemas de transporte de baja afinidad, de alta capacidad de transporte y Na^+/Cl^- independiente, tales como los sistemas OCT y los sistemas PMAT, los cuales son importantes en el proceso de almacenamiento de histamina (en basófilos y en mastocitos) y en su eliminación (en riñón, en intestino y en sinapsis nerviosa) (Ogasawara *et al.*, 2006; Schwelberger *et al.*, 2013; Yoshikawa and Yanai, 2016). La histamina también puede ser transportada mediante los sistemas VMAT, que son dependientes de H^+ (Parsons, 2000).

En bacterias existen otros sistemas de transporte, tales como los sistemas antiporte y los transportadores ABC, estando estos últimos presentes también en los organismos eucariotas (Higgins, 1992).

5.1. Sistemas OCT.

En el ser humano, se pueden encontrar los transportadores OCT (acrónimo en inglés de Transportador Catiónico Orgánico). Estos sistemas participan en el transporte de aminas endógenas o de compuestos xenobióticos en el hígado, en los riñones, en el intestino y en otros órganos importantes para la eliminación de estos productos (Schwelberger *et al.*, 2013). Son sistemas de difusión electrogénica que transportan los cationes en ambas direcciones a través de la membrana plasmática. Estos substratos suelen ser cationes monovalentes, divalentes o bases débiles que se cargan positivamente a pH fisiológico. Dentro de estas bases, se incluyen monoaminas, neurotransmisores y neuromoduladores (Kim *et al.*, 1998). Los sistemas encargados del transporte de histamina son OCT2 y OCT3. El transportador OCT2 se expresa principalmente en los riñones y utiliza como substratos los antagonistas del receptor H_2 , tales como la acetilcolina, la dopamina, la norepinefrina y la serotonina además de la histamina. El transportador OCT3 se expresa abundantemente en las células endoteliales, el intestino, el corazón y el cerebro, y es capaz de transportar otros neurotransmisores además de la histamina (Černe *et al.*, 2008; Černe and Kržan, 2009; Yoshikawa and Yanai, 2016).

5.2. Sistemas PMAT.

Otro tipo de transportadores son los denominados PMAT (acrónimo en inglés de Transportadores de Monoaminas a través de la Membrana Plasmática). Es un nuevo transportador poliespecífico de cationes que permite incorporar una gran variedad de aminas biogénicas y cationes xenobióticos, siendo el sistema predominantemente utilizado para la toma de monoaminas con función neurotransmisora (Wang, 2016).

Los sistemas PMAT se expresan en el cerebro, en los músculos esqueléticos y en el riñón (Yoshikawa *et al.*, 2013; Usui *et al.*, 2016). Los astrocitos humanos incorporan la histamina a través de este tipo de sistemas y, también parcialmente, mediante el sistema OCT3. A continuación, la histamina es inactivada por la enzima HNMT (**Figura 9**) (Yoshikawa *et al.*, 2013; Naganuma *et al.*, 2014).

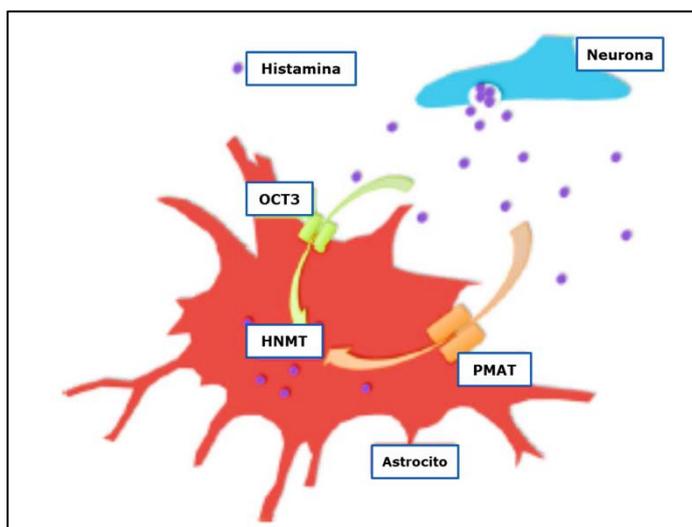


Figura 9. Mecanismo de transporte e inactivación de histamina por los astrocitos humanos. La histamina extracelular es transportada a través de los sistemas OCT3 y PMAT. A continuación, esta amina biogénica es degradada por la enzima HNMT (Yoshikawa and Yanai, 2016).

5.3. Sistemas VMAT.

Los neurotransmisores clásicos se almacenan en vesículas secretoras especializadas, de modo que su liberación puede ser regulada por la actividad neuronal. La mayoría de los neurotransmisores se forman en el citoplasma, de tal manera que el almacenamiento en estas vesículas requiere el transporte desde allí. Se han identificado unos Transportadores Vesiculares de Monoaminas (VMAT) que difieren entre ellos atendiendo a sus propiedades

funcionales y a su distribución. El transportador vesicular de monoaminas 1 (VMAT1) muestra mayor afinidad por las monoaminas que el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), ya que éste sufre inhibición por sustrato (Merickel and Edwards, 1995). Esta clase de transportadores están integrados en la bicapa lipídica de las vesículas secretoras en las neuronas y en las células endocrinas. Los transportadores VMAT tienen muy baja afinidad por la histamina, ya que ésta carece de grupos hidroxilo, que son generalmente necesarios para ser reconocido como sustrato, aunque la del VMAT2 es mayor que la del VMAT1. Además, el transportador VMAT2 está asociado a la histidin descarboxilasa tanto en neuronas como en células endocrinas (Schwelberger *et al.*, 2013).

5.4. Sistemas antiporte.

Los sistemas antiporte son aquellos que transportan una molécula en un sentido a la vez que otro soluto en sentido contrario. Las moléculas transportadas por este sistema pueden tener carga positiva, negativa o neutra. Dentro de estos sistemas se encuentra el sistema de transporte de un precursor y la excreción de su producto (Konings *et al.*, 1994). Los transportadores incluidos en este grupo pertenecen a la familia de sistemas antiporte aminoácido/poliamina (APA, TC 2.A.3.2) (Jack *et al.*, 2000).

Los transportadores APA se incluyen dentro de la superfamilia de transportadores de Aminoácidos, Poliaminas y Cationes orgánicos (APC). Esta superfamilia está presente en bacterias, hongos, plantas y animales, aunque los transportadores de la familia APA solo se encuentran en bacterias (Jack *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2006; Yen *et al.*, 2009). Los genes que codifican estos transportadores tanto en bacterias G- (*hdcT*) como en bacterias G+ (*hdcP*) ya se mencionaron en el apartado 4.4, al explicar el mecanismo de descarboxilación, ya que ambos procesos están acoplados (**Figura 10**), generándose un gradiente transmembranal y un potencial eléctrico (Lucas *et al.*, 2005).

Dentro de esta familia, se encuentran otros intercambiadores de aminoácido/amina, tales como ornitina/putrescina, tirosina/tiramina, lisina/cadaverina y arginina/agmatina (Konings *et al.*, 1994; Lucas *et al.*, 2005; Gardini *et al.*, 2016) (**Figura 10**).

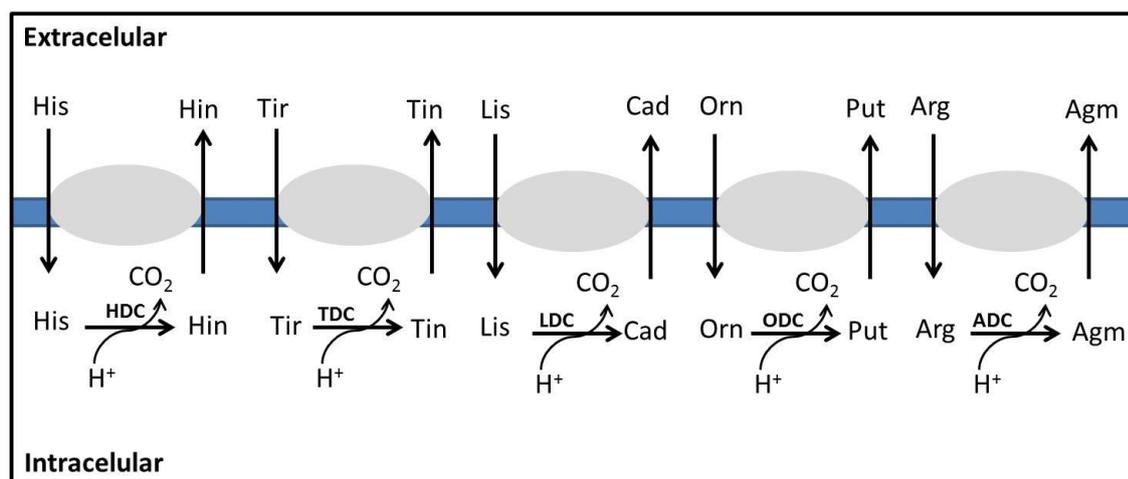


Figura 10. Reacciones de descarboxilación de aminoácidos asociadas con el transporte mediante un sistema antiporte. HDC, histidin descarboxilasa; TDC, tirosina descarboxilasa; LDC, lisina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; ADC, arginina descarboxilasa; His, histidina; Hin, histamina; Tir, tirosina; Tin, tiramina; Lis, lisina; Cad, cadaverina; Orn, ornitina; Put, putrescina; Arg, arginina; Agm, agmatina.

5.5. Transportadores ABC.

Los sistemas de transporte de tipo ABC (*ATP binding cassette*) están presentes en todos los grupos taxonómicos (arqueas, bacterias y eucariotas) y constituyen una de las familias de proteínas más amplias, desempeñando un papel esencial en el transporte activo de una gran variedad de compuestos (desde iones hasta toxinas muy complejas) a través de las membranas biológicas (Higgins, 1992; Locher, 2016; Lewinson and Livnat-Levanon, 2017). En los seres humanos, alteraciones genéticas que afectan a estos transportadores están relacionadas con la fibrosis cística y la enfermedad de Tangier (Higgins, 2001). Se han descrito dos modelos de transporte de tipo ABC: sistemas ABC de *importe* (entrada) y sistemas ABC de *exporte* (exportación).

Los sistemas ABC de *importe* transportan compuestos tales como lípidos, aminoácidos, péptidos, iones inorgánicos o vitaminas, desde el medio externo hacia el interior celular. Se caracterizan porque reconocen el sustrato a transportar en uno de los lados de la membrana (en el lado periplasmático) y en el otro lado unen ATP, lo que implica que las proteínas ABC no participan en el reconocimiento del sustrato, ya que se encuentran en el lado interno de la membrana.

Los Sistemas ABC de *exporte* están implicados en la secreción de factores de virulencia, polipéptidos extracelulares, proteasas, antibióticos, drogas, compuestos

xenobióticos o carbohidratos, en bacterias G- y en G+. Se caracterizan porque unen el sustrato y el ATP en la misma cara de la membrana (en el lado citoplasmático) y, en este caso, sí participan en el reconocimiento del sustrato.

La estructura básica de los transportadores ABC está formada por cuatro o cinco proteínas (o dominios incluidos en la misma proteína) que se detallan a continuación (Schneider and Hunke, 1998; Holland and Blight, 1999; Higgins and Linton, 2004). Usualmente existen:

- Dos dominios de membrana: que poseen seis regiones transmembranales cada uno, y que forman un canal que permite el paso del sustrato a través de la membrana. Estos dominios suelen denominarse permeasas.
- Dos dominios ABC: implicados en la hidrólisis de ATP, que están altamente conservados en todos los sistemas de transporte y que reciben la señal de los dominios transmembrana, lo que supone la hidrólisis del ATP tras la unión del sustrato.
- Una proteína periplásmica o quimiorreceptora, que participa en la unión del sustrato y que sólo aparece en algunos sistemas de transporte. Esta proteína se encuentra en el periplasma de las bacterias G-, mientras que en las bacterias G+ está unida a la superficie celular fusionada al resto del sistema de transporte.

Los dos dominios transmembrana, los dos ABC y la proteína periplásmica pueden ser proteínas individuales. Sin embargo, algunos sistemas de exclusión, pertenecientes tanto a bacterias como a mamíferos, presentan fusionadas, dos a dos, las proteínas ABC con las proteínas integrales de membrana. En otros sistemas, las dos unidades transmembrana y las dos ABC están fusionadas en una única proteína (Goldman *et al.*, 1997; ter Beek *et al.*, 2014).

Dentro de este tipo de transportadores, los encargados de transportar la histidina, el aminoácido precursor de la histamina, son realmente transportadores ABC de aminoácidos, los cuales se clasifican en dos subfamilias en función del tipo de aminoácido que transportan. La subfamilia PAAT (TC 3.A.1.3) incluye sistemas de transporte de aminoácidos polares, y la subfamilia HAAT (TC 3.A.1.4) agrupa sistemas de transporte de aminoácidos hidrofóbicos. La subfamilia PAAT se puede dividir en dos grupos en función de su especificidad de sustrato. Uno de ellos lo constituyen aquellos sistemas ABC que reconocen un solo aminoácido o un grupo de aminoácidos estructuralmente semejantes. El otro incluye aquellos transportadores que pueden reconocer un amplio rango de aminoácidos, tanto ácidos como

básicos (Hosie and Poole, 2001). Dentro de la segunda división de la subfamilia PAAT, se incluye el primer transportador ABC secuenciado, encargado de transportar la histidina, que también fue el primero del que se obtuvo la estructura cristalizada (Hosie *et al.*, 2002). En *Salmonella typhimurium*, se estudió el sistema transportador ABC de histidina, comprobándose que estaba compuesto por un receptor soluble de unión al sustrato HisJ (proteína de unión de la histidina), y un complejo de unión a membrana, HisQMP₂, formado por dos proteínas integrales de membrana, HisQ e HisM, y dos copias de HisP, proteína que posee un dominio de unión a ATP (**Figura 11**) (Ames *et al.*, 2001).

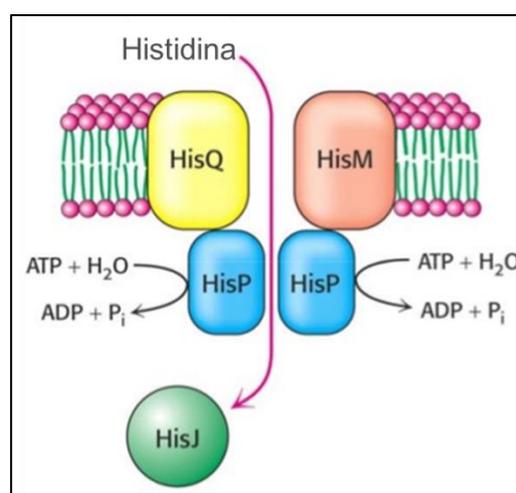


Figura 11. Sistema transportador ABC de histidina en *S. typhimurium*.

No se han encontrado evidencias de que los transportadores ABC de aminoácidos que reconocen la histidina, sean capaces de transportar la histamina. La única referencia sobre el transporte de histamina por medio de un transportador ABC se ha observado en *Drosophila melanogaster*. Este transportador ABC, codificado por el gen *white*, se encuentra en las células endoteliales, y transporta histamina a su interior donde se conjuga con β -alanina (ver apartado 6.4.3) (Borycz *et al.*, 2008).

6. DEGRADACIÓN DE HISTAMINA.

Para inactivar la histamina, esta amina biogénica debe ser: a) catabolizada y así ser convertida en metabolitos inactivos, y/o b) debe transportarse al interior de las células para eliminar el exceso de histamina extracelular (Ogasawara *et al.*, 2006). Los mecanismos

responsables del catabolismo de histamina son diversos, y varían en función del organismo y de la localización de la histamina. En los vertebrados, los mecanismos más importantes lo constituyen la desaminación oxidativa y la metilación de esta amina biogénica, pudiendo existir también un mecanismo de acetilación que suele ser minoritario (**Figura 12**). Por ejemplo, tras la administración de histamina radiactiva en ratas, los metabolitos que se obtuvieron y que se excretaron posteriormente en la orina, fueron el ácido imidazolacético (60,6%), la N-metil-histamina (7,3), el N-metil-imidazolacético (8,6%) y en menor concentración la acetil-histamina (4,5%) (Hui and Taylor, 1985).

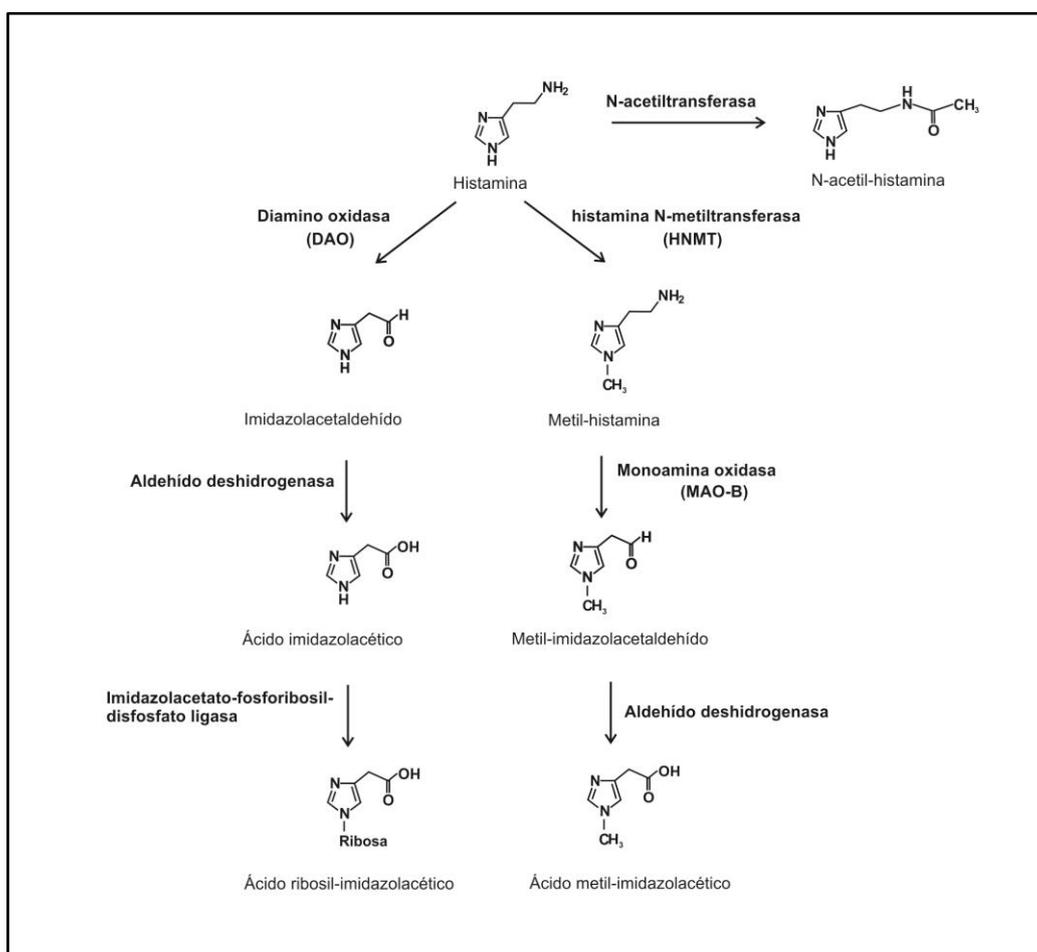


Figura 12. Rutas implicadas en la degradación de la histamina. La desaminación oxidativa, la metilación y la acetilación de la histamina.

En el ser humano, tras una dosis oral de histamina, entre un 60% y un 80%, es eliminada en la orina como catabolitos de histamina generados por la acción de las enzimas diamino oxidasa (DAO) e histamina N-metiltransferasa (HNMT). En la **Tabla 4** se describen algunas de las diferencias entre ambas enzimas (Maintz and Novak, 2007). Una pequeña cantidad de histamina también se puede eliminar a través de las heces (Emborg *et al.*, 2015).

INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Características de las dos enzimas más importantes en humanos que intervienen en ruta de degradación de histamina: DAO y HNMT.

	DAO	HMNT
<i>Locus</i>	Cromosoma 7q35	Cromosoma 2q22
Gen	10 kbp, 5 exones, 4 intrones.	35 kbp, 6 exones.
Enfermedades asociadas con SNPs	<ul style="list-style-type: none"> - Alergia alimentaria. - Enfermedad de Crohn. - Adenoma de colon. - Enteropatía sensible al gluten. - Colitis ulcerativa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Asma.
Proteína	<ul style="list-style-type: none"> - Glicoproteína homodimérica soluble. - Mw: 200.000 con subunidades de 70-124 kDa. - 750 aminoácidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína soluble, citosólica. - Mw: 33.000 con subunidades de 29-34 kDa. - 292 aminoácidos.
Grupo	Oxidasa dependientes de cobre.	Metiltransferasas.
Forma activa	Homodímero con sitio activo para el cofactor 2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona.	Monómero con 2 dominios.
Cinética enzimática (<i>km</i>)	Histamina: 20 μ M. Putrescina, cadaverina: 350 μ M. Espermidina: 3 mM.	Histamina: 6-13 μ M. S-adenosil-L-metionina: 6-10 μ M.
pH óptimo	7,2	7,5-9,0
Inhibidores	Agentes quelantes de cobre (cianuro) y reactivos de grupo carbonilo (aminoguanidina).	Productos de reacción: N-metil-histamina, S-adenosil-L-homocisteina Grupos sulfhidrilo: <i>p</i> -cloromercuribenzoato.
Expresión	Intestino delgado, colon ascendente, riñones, hígado y placenta.	<u>Máxima</u> : riñones e hígado. <u>Considerable</u> : bazo, colon, próstata, ovarios, células de la médula espinal, tráquea y bronquios. <u>Pequeña</u> : expresión casi ubicua.
Almacenamiento	Estructura vesicular asociada a membrana plasmática en células epiteliales, secreción a la circulación.	Compartimento citosólico de las células.
Función	Inactivación de histamina extracelular y de otras diaminas por desaminación oxidativa.	Inactivación intracelular de la histamina por metilación de su anillo de imidazol.

6.1. Desaminación oxidativa.

La primera barrera contra la histamina ingerida se localiza en el intestino, donde las células de la mucosa intestinal (los enterocitos) producen una enzima llamada diamino oxidasa (DAO, EC 1.4.3.22), que degrada esta amina exógena (Baenziger *et al.*, 1994; Jarisch *et al.*, 2015). Esta enzima juega un papel muy importante ya que permite controlar la histamina que va a pasar a la sangre. Además, también protege al organismo de la histamina formada fisiológicamente por las bacterias intestinales (Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015).

La enzima DAO se ha aislado de diversos órganos de cerdo (hígado y riñones), placenta humana y plasma sanguíneo, de microorganismos (*Microbacterium laticum* y *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007) (Naila *et al.*, 2012), de hongos y de una amplia variedad de plantas pertenecientes a las leguminosas (*Lathyrus sativus* y *Vigna radiata*) (Karim *et al.*, 2015). En el ser humano, la enzima DAO se expresa en el intestino delgado, el colon ascendente, la placenta, los riñones, el hígado y los glóbulos blancos (**Tabla 4**). Sin embargo, la actividad de esta enzima no se ha detectado en el hígado de rata, ni de ratón, ni de cobayas, y tampoco en el cerebro de conejo (Kitanaka *et al.*, 2002).

La DAO cataliza la desaminación oxidativa de la histamina generándose el imidazolacetaldehído (ImAdh) y utiliza como cofactor la 2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona (Akdis y Blaser, 2003; McGrath *et al.*, 2010). El ImAdh formado es rápidamente oxidado por una aldehído deshidrogenasa, NAD⁺-dependiente (EC 1.2.1.3), obteniéndose el ácido imidazolacético (ImAA). Este metabolito posee cierta actividad biológica, por ejemplo, como agonista del receptor GABA-A o antagonista del receptor GABA-C. A continuación, el ImAA es ribosilado por medio de la ligasa fosforibosildifosfato-imidazolacetato (EC 6.3.4.8) (**Figura 12**) (Bähre and Kaefer, 2017). El ácido ribosil-imidazolacético, se encuentra en la orina y en el plasma sanguíneo, y además se detecta en concentraciones micromolares en el sistema nervioso central (Schwelberger *et al.*, 2013). En mamíferos, el 60-80% de los metabolitos de histamina son generados a través de la ruta de desaminación oxidativa (Glória, 2005).

Este mecanismo también es utilizado por las bacterias. Por ejemplo, en *Arthrobacter globiformis* IFO12137 se lleva a cabo la desaminación oxidativa de histamina por medio de la enzima histamina oxidasa, obteniéndose ImAdh, amonio y peróxido de hidrógeno (Sekiguchi *et al.*, 2004). Otros microorganismos que poseen esta enzima, son *Staphylococcus xylosus* (Martuscelli *et al.*, 2000), *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus amyloliquefaciens* (Zaman *et al.*,

2010), *Brevibacterium linens* (Leuschner *et al.*, 1998) y *Lactobacillus sakei* (Dapkevicius *et al.*, 2000). En otros casos, bacterias tales como *Nocardiodetes simplex* (Rosini *et al.*, 2014), *Rhizobium* spp. (Sato *et al.*, 2005) y *Natrinema gari* (Tapingkae *et al.*, 2010), poseen una histamina deshidrogenasa que cataliza también la desaminación oxidativa de histamina obteniéndose ImAdh y amonio.

6.2. Metilación.

La metilación es una de las vías más importantes de biotransformación de numerosos compuestos, tales como drogas, neurotransmisores y hormonas. Este mecanismo es ubicuo en las especies de vertebrados, pero no está presente en invertebrados, en plantas ni en microorganismos (Schwelberger *et al.*, 2013). En lo que respecta al catabolismo de histamina mediante este proceso, en primer lugar se produce la metilación del anillo imidazol de la histamina, reacción catalizada por la histamina N-metiltransferasa (HNMT, EC 2.1.1.8). Ésta utiliza la S-adenosilmetionina como donador del grupo metilo (Brown *et al.*, 1959) y genera N-metil-histamina (**Figura 12**) que tiene una afinidad considerablemente más baja que la histamina por los receptores H1-H4 (Bähre and Kaever, 2017). A continuación, tiene lugar una desaminación oxidativa catalizada por una flavoproteína amino oxidasa. Esta enzima denominada monoamina oxidasa B (MAO-B, EC 1.4.3.4), utiliza como sustrato, la N-metil-histamina, además de otras aminas biogénicas (dopamina y feniletilamina), pero no la histamina (Schwelberger *et al.*, 2013; Maldonado and Maeyama, 2015). Como producto de reacción se genera el N-metil-imidazolacetaldehído, el cual también se obtiene por la acción conjunta de MAO-B y DAO fuera del sistema nervioso central. A continuación, el N-metil-imidazolacetaldehído es oxidado por acción de una aldehído deshidrogenasa citoplásmica NADP⁺-dependiente (EC 1.2.1.5) (Bähre and Kaever, 2017), dando lugar al ácido N-metil-imidazolacético (**Figura 12**), el cual es excretado en la orina (Gitomer and Tipton, 1983; Holm-Bentzen *et al.*, 1987).

La HNMT es la encargada de degradar la histamina del espacio intracelular (Kovacova-Hanusikova *et al.*, 2015), y se expresa principalmente 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 (**Tabla 4**). La actividad de esta enzima también se ha descrito en ratas, en ratones y en cobayas (Kitanaka *et al.*, 2002).

La HNMT es muy selectiva para la histamina, mientras que la enzima DAO es capaz de reconocer otras aminas biogénicas además de la histamina, tales como la putrescina, la cadaverina y la espermedina (**Tabla 4**) (Taylor and Sumner, 1986; Elmore *et al.*, 2002). Otra diferencia con respecto a la enzima DAO, es que la enzima HNMT no requiere iones metálicos (Gustafsson and Forshell, 1964).

En el intestino delgado del ser humano, la histamina es metabolizada tanto por la enzima HNMT como por la enzima DAO, y ambas también actúan sobre la histamina del hígado que ha atravesado la pared intestinal y que ha sido llevada allí a través del torrente sanguíneo (Emborg *et al.*, 2015).

6.3. Acetilación.

Durante el siglo pasado, mientras se estudiaban las rutas de degradación antes indicadas y se iban descubriendo nuevos receptores de histamina, se estaban estudiando otras rutas catabólicas alternativas. Así en la orina de perros tratados con histamina radiactiva se descubrió un conjugado de ácido acético e histamina, la N-acetil-histamina, lo que sugería la existencia de una ruta catabólica en la que se generaba este compuesto (**Figura 12**) (Tabor and Mosettig, 1949). Las enzimas encargadas de la acetilación de histamina, se denominan N-acetiltransferasas, y su función es la inactivación de esta amina antes de ser excretada. Además, se ha observado que estas enzimas pueden acetilar otras aminas biogénicas además de la histamina, tales como la tiramina, la feniletilamina y la triptamina (Aisien and Walter, 1993).

Esta acetilación constituye una vía catabólica minoritaria en mamíferos, pero muy importante en las bacterias, concretamente en las bacterias intestinales. Parte de esta N-acetil-histamina es excretada en las heces y otra parte es absorbida siendo eliminada en la orina (Urbach, 1949; Schayer, 1959). Existen evidencias que sugieren que esta vía catabólica también puede ser funcional fuera del tracto intestinal (Tabor, 1954). Ese derivado acetilado, la N-acetil-histamina, se ha detectado tanto en humanos (Van Dyke and Woodfork, 1998), como en el sistema nervioso central de langostas y de insectos, aunque el catabolismo de histamina transcurre principalmente por las dos vías explicadas en los apartados anteriores. En la retina de los insectos, el mecanismo de acetilación junto con la desaminación oxidativa

se dan por igual, mientras que en el ganglio torácico la histamina se cataboliza principalmente por la vía que implica su acetilación (Elias and Evans, 1983; Borycz *et al.*, 2000).

6.4. Otras alternativas.

Además de las vías descritas, existen otras rutas secundarias encargadas del catabolismo de histamina. Sin embargo, estas son poco eficientes y solo se han descrito en unas pocas especies.

6.4.1. Vía del ácido ascórbico.

Este mecanismo promueve el catabolismo de histamina en presencia de ácido ascórbico, utilizando cationes Cu^{2+} como catalizador. Así se obtiene ácido hidantoin-acético como intermediario y ácido aspártico como producto final (**Figura 13**). Durante este proceso se produce una hidroxilación del ácido imidazolacético, generándose el ácido hidantoin-acético (HA) tras un reordenamiento catalizado por el ácido monodehidro-ascórbico, siendo el ácido 2,4-dihidroxi-imidazolacético (tautómero del HA) un posible intermediario de esta ruta (Chatterjee *et al.*, 1975; Subramanian, 1978; Clemetson, 2004).

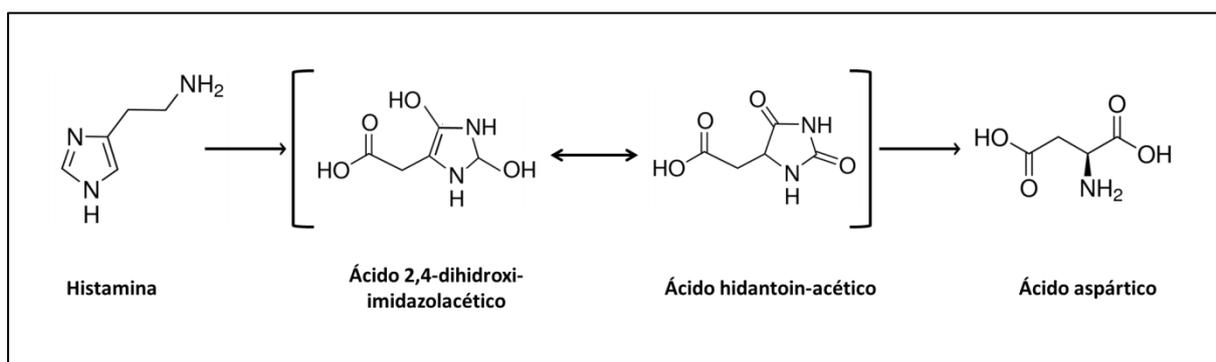


Figura 13. Degradación de histamina mediada por ácido ascórbico.

6.4.2. Glutamilación.

En los cerebros de los vertebrados los dos mecanismos más importantes para la degradación de histamina son la desaminación oxidativa y la metilación del anillo de imidazol, pero en las neuronas de los gasterópodos no se detectaron ninguno de ellos y tampoco parece que el proceso de acetilación contribuya de una forma significativa al catabolismo de histamina. En este caso, la ruta de degradación de la histamina implica su glutamilación, generándose el dipeptido γ -glutamil-histamina mediante una reacción catalizada por la γ -glutamil-histamina sintetasa (EC 6.3.2.18) (**Figura 14**). Este proceso se ha descrito en el tejido nervioso de moluscos marinos, y más concretamente, en el de *Aplysia californica* (Weinreich, 1979; Stein and Weinreich, 1983).

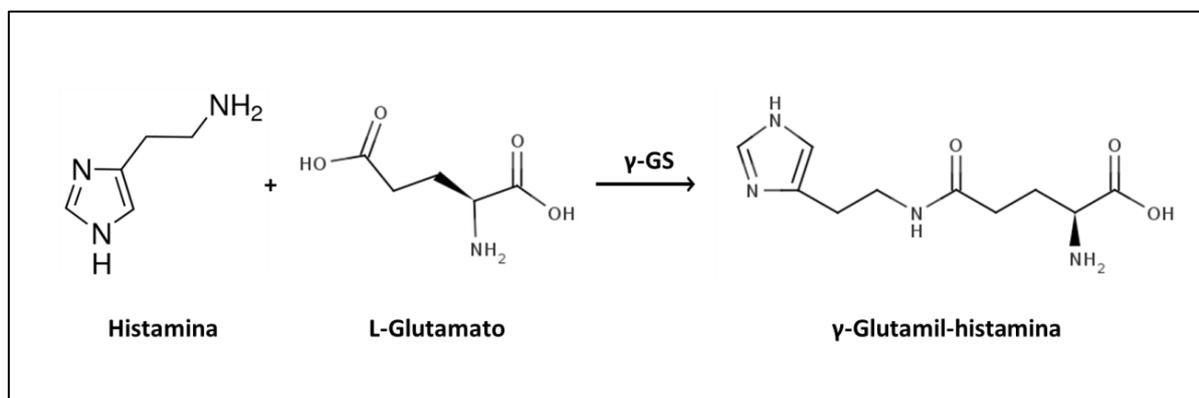


Figura 14. Inactivación de histamina por medio de la glutamilación de histamina. γ -GS, γ -glutamil-histamina sintetasa.

En el caso de mamíferos, también se ha demostrado glutamilación, pero solo *in vitro*. En estos casos se une el grupo glutamil de la glutamina de una proteína con la histamina y se libera amoníaco. Esta glutamilación permite su translocación a través de la membrana celular y la transmisión sináptica (Konishi and Kakimoto, 1976; Maslinski *et al.*, 2012).

6.4.3. Alanización.

La condensación de histamina con β -alanina, genera β -alanil-histamina (carcinina), que es un producto fisiológicamente inactivo. Esta ruta, catalizada por la carcinina sintetasa, se observó por primera vez en la especie de cangrejo *Carcinus maenas* (Arnould, 1985, 1987). Más adelante, se descubrió en *Drosophila*, donde el control de los niveles de histamina es necesario para el proceso de transducción visual (Gavin *et al.*, 2007; Denno *et al.*, 2016).

La carcinina también está presente en múltiples tejidos del ser humano y de roedores (ratas, cobayas y ratones), ricos en histamina tales como el corazón, el riñón, el estómago, el intestino y el cerebro (Flancbaum *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2004). En ratas, tras la incorporación de histidina marcada, se detectó la carcinina, la carnosina (análogo estable de la carcinina que tiene una función antioxidante) y la histamina. Por tanto, la carcinina puede ser considerada como un intermediario activo que participa en la síntesis de histamina o, por el contrario, un metabolito de la ruta catabólica de histamina (**Figura 15**) (Flancbaum *et al.*, 1990; Babizhayev *et al.*, 1994).

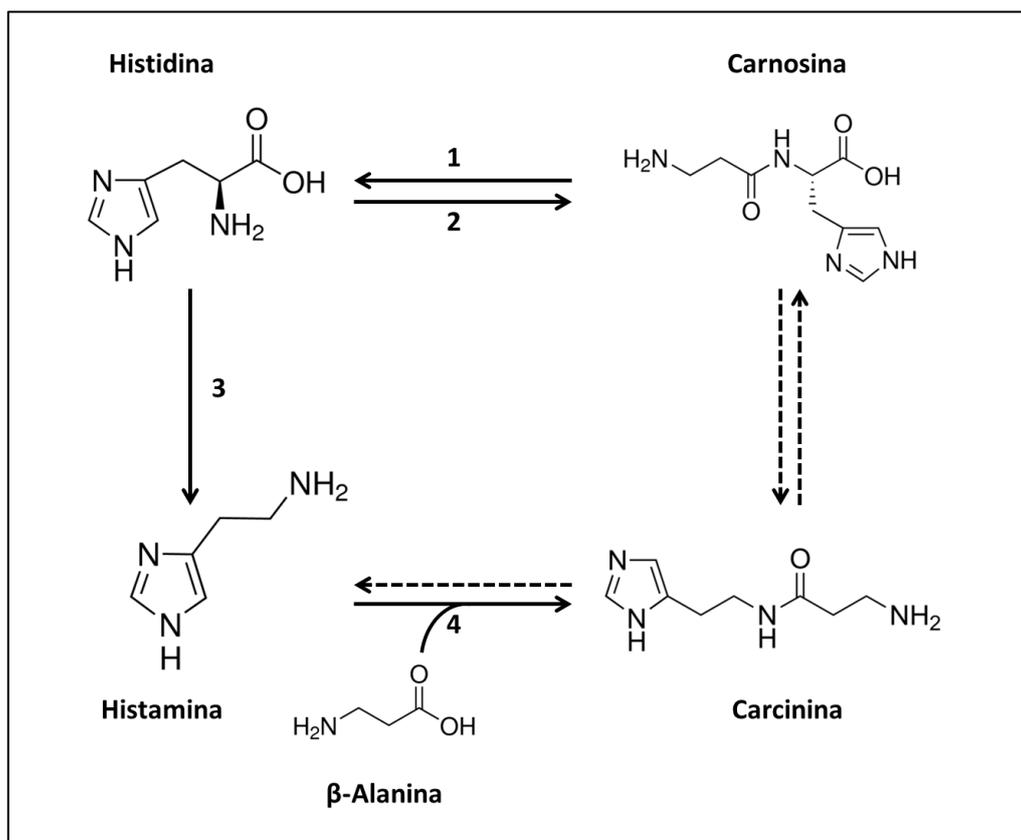


Figura 15. Mecanismo de alanización de la histamina. Los números indican una enzima: (1) carnosinasa, (2) carnosina sintetasa, (3) histidin descarboxilasa y (4) carcinina sintetasa. La línea continua representa una reaccion conocida, mientras que la línea discontinua representa una reaccion desconocida.

Este mecanismo no solo permite la eliminación de histamina, sino que como se ha visto en el sistema nervioso central del insecto *Manduca sexta*, también puede ser utilizado para eliminar otras aminas biogénicas como la tiramina y la dopamina, obteniéndose β-alanil-tiramina y N-β-alanil-dopamina (Maxwell *et al.*, 1980; Geng *et al.*, 1993). Alguno de estos derivados (N-β-alanil-dopamina) juega un papel muy importante durante el proceso de muda de algunos insectos (Schachter *et al.*, 2007).

En resumen, estos son algunos de los mecanismos que sirven para degradar la histamina. Sin embargo, no son los únicos. Por esta razón es necesario seguir estudiando las rutas catabólicas requeridas para degradar esta amina ya que ello proporcionaría información acerca de nuevos genes, enzimas y de sus reguladores. Esta información nos permitiría diseñar herramientas biotecnológicas que puedan ser aplicadas para la eliminación o reducción de la histamina presente en diferentes fuentes. Adicionalmente, el conocimiento genético y bioquímico de estas rutas permitirá la selección de cepas capaces de degradar la histamina y su utilización como cultivos *starters* (cultivos iniciadores), así como el diseño de nuevos agentes terapéuticos. Por todas estas razones, el estudio de estas rutas posee un indudable interés científico, clínico, farmacológico y, en suma, biotecnológico.

OBJETIVOS

“Lo conseguimos porque no sabíamos que descubrirlo era imposible.”

Jean Cocteau.

OBJETIVOS.

En esta Tesis Doctoral se pretende llevar a cabo la caracterización genética y bioquímica de la ruta responsable de la transformación de histamina en ácido imidazolacético en *Pseudomonas putida* U. Además, se estudiarán las posibles aplicaciones biotecnológicas de esta vía aeróbica.

Los objetivos propuestos para su consecución son los siguientes:

1. Aislamiento de mutantes de *Pseudomonas putida* U incapaces de degradar histamina, pero que, por el contrario, catabolicen eficientemente el 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 de los genes que codifican las proteínas que constituyen la ruta catabólica estudiada y análisis del efecto causado en cada caso.

OBJETIVOS

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 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

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo.”

Albert Einstein.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Para llevar a cabo todos los experimentos incluidos en el apartado Resultados y Discusión se emplearon cepas bacterianas aisladas por miembros de nuestro laboratorio o procedentes de diferentes colecciones tal y como se detalla en la **Tabla 5**.

1.1. Especies bacterianas de *Pseudomonas*.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* (Holt *et al.*, 1994) son bacterias G- incluidas en el grupo de las γ -proteobacterias. Muchos pseudomonadales son organismos saprófitos y se caracterizan por poseer una gran versatilidad metabólica y fisiológica. Están, además, presentes en numerosos ambientes, como son, el suelo, los medios acuáticos y también se encuentran asociados a organismos hospedadores, tales como plantas y animales. Suelen desempeñar un papel muy importante en 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). Siguiendo esta clasificación, *Pseudomonas putida* U, la cepa objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, está incluida en el grupo I de rRNA. El contenido de G + C en su cromosoma oscila entre el 60% y el 62%.

1.1.1. *Pseudomonas putida* U.

La cepa silvestre de *Pseudomonas putida*, 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 originalmente por el Prof. R. A. Cooper (*Department of Biochemistry, University of Leicester, Leicester, U.K.*) a partir del lodo de un arroyo en la ciudad de Urbana, Illinois (Estados Unidos) (Dagley and Gibson, 1965). 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 (Kessler and Palleroni, 2000).
- 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 -cetoglutárico, hidroximetilglutárico, L-málico, masónico, láctico, pirúvico, γ -aminobutírico (GABA), δ -aminovalérico, benzoico, *p*-hidroxibenzoico, fenilacético (AFA), 3-hidroxifenilacético (3-OHAFA), 4-hidroxifenilacético (4-OHAFA), 4-hidroxicinámico, quínico, vanilínico y úrico. Asimila bien betaína, vanilina, 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 aminas tales como, histamina, tiramina, 2-feniletamina, putrescina, cadaverina, espermina, bencilamina, propilamina, butilamina, pentilamina o hexilamina, y algunos alcoholes primarios, como por ejemplo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, etanol, propanol,

butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol y decanol 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, pimérico, 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, xantina y espermidina.
- Producen pigmentos fluorescentes como pioverdina.

- **Condiciones de crecimiento:**
 - Es un microorganismo que utiliza como aceptor final de electrones el O₂.
 - Su temperatura óptima de crecimiento es 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 \leq 4,5).
 - No requiere factores orgánicos de crecimiento.

1.1.2. *Pseudomonas putida* KT2440 (Bayley *et al.*, 1977).

Cepa derivada de *Pseudomonas putida* mt-2, una bacteria aislada del suelo y caracterizada por su capacidad para utilizar *m*-tolueno como única fuente de carbono. El contenido de G+C en el cromosoma de esta bacteria es de 61,6%, valor similar al estimado para otras especies dentro de este mismo género.

Es una cepa biológicamente segura con una gran aplicación en biotransformación, biorremediación y agricultura. Su genoma ha sido secuenciado completamente por The Institute for Genomic Research (TIGR) en colaboración con un consorcio alemán (Nelson *et al.*, 2002; Belda *et al.*, 2016).

P. putida KT2440 posee una elevada homología en su secuencia genómica con *P. putida* U así como una gran similitud metabólica.

Esta cepa degrada ácido fenilacético (AFA) (Luengo *et al.*, 2001), pero es incapaz de utilizar como única fuente de carbono la amina biogénica tiramina. Sin embargo, si asimila la histamina.

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

La cepa silvestre de *P. putida* DOC21 pertenece a nuestra colección, y 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.

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.

Es aerobia estricta (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 la histamina, ha sido utilizada en este trabajo para clonar y expresar genes implicados en el catabolismo de esta amina biogénica.

1.2. Especies bacterianas de *Escherichia coli*.

1.2.1. *Escherichia coli* HB101 (Boyer and Roulland-dussoix, 1969).

Genotipo: F⁻, *thi-1*, *hsdS20*, *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *supE44*, *xyl-5* *mtl-1*.

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

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

Genotipo de *E.coli* DH10B: F', *araD139*, $\Delta(\textit{ara, leu})7697$, $\Delta\textit{lacX74}$, *galU*, *galK*, *rpsL*, *deoR*, $\phi 80\textit{dlacZIM15}$, *endA1*, *nupG*, *recA1*, *mcrA*, $\Delta(\textit{mrr hsdRMS mcrBC})$.

Cepa empleada en los experimentos rutinarios de transformación y amplificación de DNA plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (superior a 1×10^8 transformantes/ μg de DNA). Posee una delección 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).

1.2.3. *Escherichia coli* W ATCC 11105 (Davis and Mingioli, 1950).

Esta cepa fue cedida por el Dr. José Luis García (Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

E. coli W, es un mutante auxótrofo de *E. coli* que requiere la adición de cobalamina cuando se cultiva en un medio mínimo de composición definida (MM). Es capaz de crecer en MM suplementado con AFA, 3-OHAFa, 4-OHAFa, feniletilamina o tiramina como únicas fuentes de carbono, pero, por el contrario, no crece en dichos medios si la fuente de carbono es tirosina, feniletanol o histamina. Esta cepa ha sido empleada para la expresión heteróloga de los genes implicados en la ruta catabólica de histamina.

1.3. Otra especie bacteriana: *Enterobacter aerogenes* CECT 684 (Hormaeche and Edwards, 1960).

Se trata de un bacilo G-, anaerobio facultativo, no esporulado, que posee flagelos. Es resistente a antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina y kanamicina. Causa infecciones oportunistas. *E. aerogenes* ha sido utilizada para aislar el gen *hdc* que codifica una histidin descarboxilasa.

A continuación, se muestra una tabla (**Tabla 5**), donde, de forma esquemática y resumida, se indican todas las cepas utilizadas.

TABLA 5
Cepas utilizadas para este trabajo.

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E.coli</i> HB101	F ⁻ , <i>thi</i> -1, <i>hsdS20</i> , <i>recA13</i> , <i>ara</i> -14, <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl</i> -5 <i>mtl</i> -1	Boyer and Roulland-Dussoix, 1969
<i>E.coli</i> DH10B	F ⁺ , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, Δ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>deoR</i> , Φ80 <i>dlacZ1M15</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>)	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>E.coli</i> W ATCC 11105 (W)	Cepa derivada de <i>E. coli</i> ATCC 9637 auxótrofa para vitamina B12.	Davis and Mingioli, 1950
W pMC	Tc ^r .	Este estudio
W pM <i>ChinC</i>	Tc ^r .	Este estudio
W pK18:: <i>mob</i>	Km ^r .	Este estudio
W pK18:: <i>mobhinEABCD</i>	Km ^r .	Este estudio
<i>Pseudomonas putida</i>		
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	<i>hsdMR</i>, Ap^r.	Bayley <i>et al.</i>, 1977
<i>Pseudomonas putida</i> U (PpU)	Cepa silvestre, Rf^r.	Dagley and Gibson, 1965
<i>PpU</i> mutante 1	Δ <i>dadA</i> ::Tn5. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 4	Δ <i>hinA</i> ::Tn5. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 6	Δ <i>hinB</i> ::Tn5. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 9	Δ <i>hinC</i> ::Tn5. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 10	Δ <i>hinA</i> ::Tn5. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 12	Δ <i>hinC</i> ::Tn5. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 14	Δ <i>hinC</i> ::Tn5. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 19	Δ <i>hinC</i> ::Tn5. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 20	Δ <i>dadA</i> ::Tn5. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 22	Δ <i>hinB</i> ::Tn5. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 23	Δ <i>hinA</i> ::Tn5. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 24	Δ <i>hinA</i> ::Tn5. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 25	Δ <i>hinB</i> ::Tn5. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, Rf ^r Km ^r .	Este estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>PpU</i> mutante 29	$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5}$. <i>coxB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 30	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 33	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 34	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 38	$\Delta\text{hinC}::\text{Tn5}$. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 44	$\Delta\text{hinA}::\text{Tn5}$. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 52	$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 54	$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$. <i>dadR</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 55	$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 56	$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 57	$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$. <i>hinB</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 58	$\Delta\text{hinA}::\text{Tn5}$. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 59	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 60	$\Delta\text{hinA}::\text{Tn5}$. <i>hinA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 61	$\Delta\text{hinC}::\text{Tn5}$. <i>hinC</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 65	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> mutante 66	$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$. <i>dadA</i> ⁻ debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
<i>PpU</i> ::Tn5	R ^f Km ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinA}::\text{Tn5}$ pMC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinA}::\text{Tn5}$ pMChinA	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pMC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pMChinA	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pMChinB	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pMChinC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pK18:: <i>mob</i>	R ^f Km ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ pK18:: <i>mob</i> <i>hinEABCD</i> (<i>hinI</i>)	R ^f Km ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinC}::\text{Tn5}$ pMC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinC}::\text{Tn5}$ pMChinC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{hinD}::\text{pK18}::\text{mob}$	<i>hinD</i> disrupto utilizando pK18:: <i>mob-hinD</i> (fi), R ^f Km ^r .	Este estudio.
$\Delta\text{hinE}::\text{pK18}::\text{mob}$	<i>hinE</i> disrupto utilizando pK18:: <i>mob-hinE</i> (fi), R ^f Km ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$ pMC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadA</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadA}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadX</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadR</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadA</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadX</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadA</i> pMC5 <i>dadX</i>	R ^f Km ^r Tc ^r Gtm ^r .	Este estudio
$\Delta\text{dadR}::\text{Tn5}$ pMC <i>dadAX</i>	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio

$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5 pMC}$	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5 pMCcoxB}$	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5 pJQ}$	R ^f Km ^r Gtm ^r .	Este estudio
$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5 pJQcoxB}$	R ^f Km ^r Gtm ^r .	Este estudio
$\Delta\text{coxB}::\text{Tn5 pJQcoxBA-C}$	R ^f Km ^r Ctm ^r .	Este estudio
$\Delta\text{his}::\text{Tn5}$	<i>his</i> ⁻ (genes de histidina) debido a una inserción del transposón Tn5, R ^f Km ^r .	Este estudio
$\Delta\text{his}::\text{Tn5 pMC}$	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
$\Delta\text{his}::\text{Tn5 pMChdc}$	R ^f Km ^r Tc ^r .	Este estudio
<i>Pseudomonas putida</i> DOC21 (DOC21)	Cepa silvestre, Ap^r.	Merino <i>et al.</i>, 2013
DOC21 pMC	Ap ^r Tc ^r .	Este estudio
DOC21 pMChinC	Ap ^r Tc ^r .	Este estudio
DOC21 pk18:: <i>mob</i>	Ap ^r km ^r .	Este estudio
DOC21 pK18:: <i>mobhinEABCD</i>	Ap ^r Km ^r .	Este estudio
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 684	Cepa silvestre.	Hormaeche and Edwards, 1960

2. VECTORES UTILIZADOS.

2.1. pGS9 (Selvaraj and Iyer, 1983).

Es un plásmido suicida en *P. putida* U que actúa como donador del transposón Tn5. Este plásmido 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), lo que permite una rápida selección de las cepas que han incorporado el transposón.

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

Es un vector plasmídico de clonación que se mantiene en el hospedador en un elevado número de copias y su tamaño es de 2,8 kb. 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 los medios apropiados. Ha sido utilizado para la realización de la genoteca.

2.3. pGEM[®]-T Easy (Promega Co.,U.S.A).

Plásmido comercializado por Promega Co. (U.S.A.) 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 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos obtenidos por PCR poseen en sus extremos restos de adenina, mientras que el pGEM[®]-T Easy es un plásmido abierto que presenta restos de timina en sus extremos 3'. 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, esto 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.

2.4. pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, U.S.A).

Plásmido comercializado por Thermo Fisher Scientific (U.S.A.) y de características similares al pGEM[®]-T Easy. Se mantiene en el hospedador en alto número de copias. Su tamaño es de 2886 pb y se utiliza rutinariamente para la clonación directa de los productos que han sido amplificados mediante PCR al poseer timinas libres en los extremos. Estas timinas complementan con las adeninas que incorporan diferentes polimerasas (*Taq*, *Tth*, *Tfl* o sus mezclas) 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* en diferentes medios selectivos.

2.5. pBlueScript II (KS/ SK) (Short *et al.*, 1988).

Son fagémidos comerciales, de alto número de copias distribuidos por Stratagene (U.S.A.). Tienen un tamaño de 2,9 kb y presentan el origen de replicación ColE1 de pBR322 para *E. coli*, así como el replicón pMB1. Como marcador de selección tienen un gen de resistencia a ampicilina (*bla*, Ap^r) y un fragmento del gen *lacZ* capaz de complementar la mutación presente en la β -galactosidasa de algunas cepas de *E. coli*, permitiendo identificar las colonias que posean el fragmento clonado mediante la selección blanco/azul. KS/SK indican la orientación del polylinker, orientado 5'-*KpnI* ... *SacI*-3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, y 5'-*SacI* ... *KpnI*-3', respectivamente.

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, en esta bacteria puede funcionar 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 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. pJQ200 (KS/SK) (Quandt and 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 (Gtm^r) y el sistema *lacZα* 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/SK indican la orientación del *polylinker*, orientado 5'-*ApaI*...*SstXI*-3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, y 5'-*SstXI*...*ApaI*-3', respectivamente. Este plásmido se utiliza para obtener mutantes de *P. putida* U en los que se ha disrumpido el gen cuya función quiere ser dilucidada.

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

Plásmido de bajo número de copias y amplio rango de hospedador. Presenta el origen de replicación *oriBBR1* que le confiere capacidad de replicarse autónomamente en multitud de cepas bacterianas, incluidas *E. coli*, *P. fluorescens* y *P. putida*. Este plásmido es movilizable y compatible con plásmidos pertenecientes a los grupos IncP, IncQ e IncW, así como con los orígenes de replicación ColE1 y P15a. Permite la selección directa de los recombinantes en *E. coli* mediante interrupción del péptido *LacZα*.

El plásmido pBBR1MCS se obtuvo por modificación del pBBR1, un plásmido aislado de una muestra ambiental al que se incorporó el pBluescript® IKS-*lacZα*-*polylinker*. De este modo, la nueva construcción contenía un *polylinker* con 16 sitios únicos de restricción, el gen *lacZα* interrumpido 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 (tetraciclina- Tc^r -; gentamicina- Gtm^r -; ampicilina- Ap^r - y kanamicina- Km^r -).

El pBBR1MCS-3 (5,2 kb), plásmido con resistencia a Tc, al que nos referiremos en adelante como pMC, 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 Gtm, al que denominaremos pMC5.

En la **Tabla 6** se recogen todos los plásmidos, vectores y construcciones genéticas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

TABLA 6

Plásmidos, vectores y construcciones genéticas utilizadas para este trabajo.

PLÁSMIDOS, VECTORES Y CONSTRUCCIONES	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pGS ₉	Cm ^r Km ^r , plásmido conjugativo que contiene el transposón Tn5.	Selvaraj and 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.	Norrand <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 Co.
pTZ57R/T (pTZ)	Cm ^r , <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor T7, vector utilizado para clonar directamente los productos de PCR.	Thermo Fisher Scientific
pK18:: <i>mob</i>	Km ^r , <i>oriColE1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor <i>lac</i> , plásmido utilizado para disrumpir genes mediante eventos de recombinación simple.	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pJQ200 (KS/SK) (pJQ)	Gtm ^r , <i>oriP15A</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , <i>sacB</i> , vector utilizado para generar deleciones, mediante eventos de doble recombinación.	Quandt and Hynes, 1993
pBlueScript (KS/SK)	Apr, <i>oriColE1</i> , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor <i>lac</i> , vector de clonación de genes.	Short <i>et al.</i> , 1988
pBBR1MCS-3 (pMC)	Tc ^r , <i>oriBBR1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor <i>lac</i> , vector de expresión y clonación de genes de amplio rango de hospedador.	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS-5 (pMC5)	Gtm ^r , <i>oriBBR1</i> , Mob ⁺ , <i>lacZα</i> ⁺ , promotor <i>lac</i> , vector de expresión y clonación de genes de amplio rango de hospedador.	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pJQ200KS-Tn5	Inserto de pGEM-T Easy desde la posición +57 a la +1269 de la secuencia IS50L del transposón Tn5, clonado en el pJQ200KS usando los cortes <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Arcos <i>et al.</i> , 2010
pMChinA	Inserto de pTZ desde la posición -476 a la +1835 desde el ATG de <i>hinA</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMChinB	Inserto de pTZ desde la posición -346 a la +1046 desde el ATG de <i>hinB</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>XbaI</i> .	Este estudio
pMC <i>hinC</i>	Inserto de pTZ desde la posición -137 a la +1668 desde el ATG de <i>hinC</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando el corte de restricción <i>KpnI</i> .	Este estudio
pBlueScript KS- <i>dadA</i>	Inserto de pGEM-T Easy desde la posición -223 a la +1577 desde el ATG de <i>dadA</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pBlueScript KS usando los cortes de restricción <i>SpeI</i> y <i>NotI</i> .	Este estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

pMC <i>dadA</i>	Inserto del gen <i>dadA</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC desde la construcción pBlueScript KS- <i>dadA</i> usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMC <i>dadX</i>	Inserto de pTZ desde la posición -56 a la +1110 desde el ATG de <i>dadX</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMC5 <i>dadX</i>	Inserto de pTZ desde la posición -56 a la +1110 desde el ATG de <i>dadX</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC5 usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMC5 <i>dadAX</i>	Inserto de pTZ que contiene los genes <i>dadA</i> y <i>dadX</i> desde la posición -223 a la +1110 desde el ATG de <i>dadA</i> y <i>dadX</i> de <i>PpU</i> , respectivamente, clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMC <i>dadR</i>	Inserto de pTZ desde la posición -198 a la +599 desde el ATG de <i>dadR</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>KpnI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pMC <i>coxB</i>	Inserto de pTZ desde la posición -246 a la +1275 desde el ATG de <i>coxB</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>ApaI</i> y <i>SacI</i> .	Este estudio
pJQ <i>coxB</i>	Inserto de pTZ desde la posición -246 a la +1275 desde el ATG de <i>coxB</i> de <i>PpU</i> , clonado en pJQ utilizando los cortes de restricción <i>SacI</i> y <i>BamHI</i> .	Este estudio
pMChdc	Inserto de pTZ desde la posición -145 a la +1317 desde el ATG de <i>hdc</i> de <i>Enterobacter aerogenes</i> , clonado en el pMC usando los cortes de restricción <i>XhoI</i> y <i>XbaI</i> .	Este estudio
pK18:: <i>mobhin1</i>	Inserto de 7636 pb que contiene los genes <i>hinEABCD</i> (<i>hinI</i>), clonados desde la posición + 1732 a la +1658 desde el ATG de <i>hinE</i> y <i>hinD</i> , respectivamente, en el plásmido pK18:: <i>mob</i> , utilizando el corte de restricción <i>NheI</i> .	Este estudio
pJQ <i>coxBA-C</i>	Inserto de 5479 pb que contiene los genes <i>coxBA-C</i> , clonados desde la posición -552 a la +1573 desde el ATG de <i>coxB</i> y <i>coxC</i> , respectivamente, en el plásmido pJQ, utilizando el corte de restricción <i>XhoI</i> .	Este estudio
pK18:: <i>mob-hinD</i> fragmento interno (fi)	Inserto de pTZ desde la posición +698 a la +1209 desde el ATG de <i>hinD</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este estudio
pK18:: <i>mob-hinE</i> (fi)	Inserto de pTZ desde la posición +424 a la +957 desde el ATG de <i>hinE</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este estudio
pK18:: <i>mob-hinI</i> (fi)	Inserto de pTZ desde la posición -350 a la +1732 desde el ATG de <i>hinE</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pK18:: <i>mob</i> usando los cortes de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este estudio
pJQ- <i>coxBA-C</i> (fi)	Inserto de pTZ desde la posición +1015 a la +1573 de <i>coxC</i> de <i>PpU</i> , clonado en el pJQ usando los cortes de restricción <i>XhoI</i> y <i>BamHI</i> .	Este estudio

3. REACTIVOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS.

Todos los productos químicos utilizados han sido adquiridos a alguna de las casas comerciales indicadas a continuación: Merck (Alemania), Conda-Pronadisa (España), Panreac (España), Probus (España), Bachem AG (Suiza), Alfa Aesar (U.S.A.), Bio-Rad (U.S.A.), Difco (U.S.A.), Perkin Elmer (U.S.A.), Promega Co. (U.S.A.), Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.) y Thermo Fisher Scientific (U.S.A.).

La histidina, histamina, ácido imidazolacético, imidazolmetanol, cadaverina, AFA, 3-OHAFa, 4-OHAFa, espermidina, tiramina, dopamina, triptamina, lisina, GABA, asparragina, glutamina y D-alanina fueron suministrados por Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.); la espermina y la putrescina por Alfa Aesar (U.S.A.) y la L-alanina por Panreac (España).

Los reactivos utilizados en los experimentos de Biología Molecular procedían de Promega Co. (U.S.A.), 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. (U.S.A.); 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. (U.S.A.)

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

Los diferentes reactivos comerciales (*kits*) utilizados para la extracción de DNA plasmídico y cromosómico, para la extracción de RNA, 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 adquiridos a las casas comerciales GE Healthcare (Gran Bretaña), Promega Co. (U.S.A.), Roche (Alemania) y Quiagen (Alemania).

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. Medio SOC (Hanahan, 1983).

Medio SOB	
Bacto-triptona	20,0 g/l
Extracto de levadura	5,0 g/l
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10,0 mM
MgCl ₂	10,0 mM

El medio SOC se prepara añadiendo glucosa 20 mM al medio SOB. La glucosa se esteriliza por separado. Añadir agua destilada hasta 1 L y ajustar el pH a 7 con KOH.

4.4. Sales del medio mínimo (MM) de *Pseudomonas* (Martinez-Blanco *et al.*, 1990).

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). A este medio se le añadieron las fuentes de carbono requeridas en función del experimento que se fuese a realizar.

4.5. Aditivos suplementados.

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas fueron 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); estreptomina (Str, 10 µg/ml); cloranfenicol (Cm, 30 µg /ml); tetraciclina (Tc, 37,5 µg /ml) y/o gentamicina (Gtm, 30 µg /ml). Todos los antibióticos utilizados fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.).

Para la inducción de los sistemas basados en promotores del tipo *lac*, que reconocen la lactosa como inductor, se utilizó un análogo no metabolizable del inductor natural, 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 (U.S.A.). La concentración final en el medio de cultivo fue de 34 µg/ml.

E. coli W requiere vitamina B12 (cobalamina) para crecer. Por esta razón, cuando esta cepa se cultivó en MM, hubo que suplementar esta vitamina (500 ng/ml). La cobalamina empleada fue suministrada por Sigma-Aldrich Co. (U.S.A.).

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-OHAFAs 5 mM como única fuente de carbono, ya que esta estrategia facilitaba el crecimiento posterior en otros MM.

Una vez que habían crecido en LB o en MM, las cepas bacterianas se mantuvieron a 4°C en placas de Petri selladas con ParafilmTM 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 la absorbancia de la suspensión celular a 540 nm periódicamente en un espectrofotómetro Bekman DU 640. 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 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.

Las etapas requeridas para el procesamiento de muestras que contenían DNA se llevaron siempre a cabo en condiciones de esterilidad 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 realizó midiendo 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 μ g de DNA en H₂O milliQ.

1-3 unidades de la endonucleasa de restricción/ μ g de DNA.

H₂O milliQ estéril hasta completar el volumen de digestión.

La mezcla de reacción se incubó a la temperatura adecuada (generalmente 37°C) 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 (SAP o CIAP) y la mezcla de reacción se incubó durante 60-90 min a 37°C.
- La enzima se inactivó calentando a 65°C durante 15 min y 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 6,5, 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 (10 x), 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 ver fácilmente fragmentos de entre 600 pb y 3.000 pb. Cuando se utilizaban fragmentos más grandes (más de 10 kb) la concentración de agarosa inicialmente 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 TAE (ver composición abajo) y añadiendo aproximadamente 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para visualizar las bandas de DNA mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

TAE 50 x: 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 utilizamos el *kit* comercial 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, bien en suspensión, o bien empaquetada en minicolumnas. En el paso previo a la purificación, la agarosa que contenía el DNA se disolvía por calentamiento moderado (50-65°C) en presencia de una solución salina de KI 6 M. Estos métodos son más rápidos que los que se basan en la extracción por congelación y proporcionan un mayor rendimiento. Sin embargo, cuando se trata de fragmentos de DNA de gran tamaño (10-20 kb), durante el proceso de purificación utilizando *kits* comerciales se produce una mayor fragmentación.

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

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se inocularon 50 ml de medio LB líquido, con una absorbancia inicial de 0,05 y suplementado con Rf, con la cepa *P. putida* U. 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 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 con un volumen de fenol neutro dos veces. A continuación, con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), otras dos veces, 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.

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

Cuando se empleó el *kit* comercial 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 (Promega o Quiagen) 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 10.000 rpm 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, 13.200 rpm).
- 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, 13.200 rpm).
- Elución del DNA mediante la adición de agua milliQ o de un tampón de baja fuerza iónica (TE).

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*.

7.1.1. 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 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 para proceder a inocular dos matraces de 2,5 L con 500 ml de medio cada uno.
- Incubar los matraces a 37°C hasta que el cultivo alcance una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,4-0,5 medida en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU640.
- 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.

7.1.2. Obtención de células electrocompetentes de *E. coli* W.

Para conseguir estas células se procedió tal y como se indica:

- Se inocularon 100 ml de medio LB con una colonia de *E. coli* W y se incubó a 37°C en agitación (250 rpm) hasta que el cultivo alcanzó el crecimiento requerido para proceder a inocular dos matraces de 500 ml con 100 ml de LB de modo que la DO inicial fuese 0,05. Estos matraces se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600 nm} de 0,6-0,8. Luego el cultivo se enfrió en hielo durante 30 min.
- Las células se recogieron por centrifugación (5 min, 5.000 x g, 4°C).

- El sedimento de células resultante se resuspendió en 200 ml de glicerol al 10% (p/v).
- Las células resuspendidas se centrifugaron como en pasos anteriores, y el sedimento de células se resuspendió en 100 ml de glicerol al 10% (p/v). Este paso se repitió una vez más.
- La suspensión de células obtenida se centrifugó (5 min, 5.000 x g, 4°C) y el sedimento de células se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10% (p/v) y se repartieron en alícuotas de 40 µl. Las células competentes pueden ser empleadas inmediatamente, o conservarse a -80°C, previa congelación en nitrógeno líquido o en un baño de hielo seco/etanol.

7.2. Procedimiento de transformación.

7.2.1. Choque térmico.

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* DH10B se ha seguido el método descrito por (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.

7.2.2. Electroporación.

Para la electroporación de células competentes de *E. coli* W se siguió el siguiente protocolo:

- El DNA (en un volumen no superior a 2 μl) se añadió a 40 μl de células electrocompetentes y la mezcla se puso en una cubeta de electroporación (1 mm, 90 μl) (VWR Co.).
- A continuación, la cubeta con la mezcla de electroporación se introdujo en el electroporador (Bio-Rad. Modelo Gen Pulser). Las condiciones de trabajo fueron: potencial 18kV/cm, capacitancia 25 μF y resistencia 200 Ω . La mezcla se enfrió en hielo y se le añadió 1 ml de medio SOC fresco.
- Las células se incubaron durante 45 min con agitación a 37°C con el fin de restituir las membranas.
- Por último, se sembraron alícuotas de 200 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.

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 (3' y 5') que hibridan en los extremos del fragmento a amplificar y que actúan como cebadores en una reacción 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 el plásmido comercial pGEM[®]-T Easy y pTZ57R/T.

Pfu polimerasa procedente de *Pyrococcus furiosus* (Promega). Esta enzima posee actividad correctora de copia (*proofreading*), 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.

A continuación se indica la composición de la mezcla de reacción de PCR empleada (volumen final de 50 µl). 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:

Concentración final

5 µl tampón (10 x) de la polimerasa -----	1x
2 µl de Cl ₂ Mg (50 mM) -----	2,0 mM
4 µl de desoxinucleótidos (2,5 mM) -----	0,4 µM
5 µl del oligonucleótido 5' (2 µM) -----	0,4 mM
5 µl del oligonucleótido 3' (2 µM) -----	0,4 mM
5 µl DNA (25 ng/µl) -----	2,5 ng/µl
1 unidad de DNA polimerasa	

Rutinariamente, la PCR se realizó durante 35 ciclos 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 propios cebadores, es decir, de la 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 polimerasa (a 68°C en el caso de la *Pfu* y la *FideliTaq*). El tiempo de extensión se determinó en cada caso, considerando que la polimerasa sintetizaba una molécula de 1 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, U.S.A.); el modelo 2720 de Applied Biosystems (U.S.A.) y el modelo MJ MiniTM Gradient de Bio-Rad (U.S.A.).

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 and Lipman, 1988; Pearson, 1990). Para ensamblar las secuencias obtenidas se utilizó el programa CAP3 (Huang and Madan, 1999). Para el cálculo de la masa molecular de las distintas proteínas a partir de secuencias de aminoácidos se utilizó el servidor SMS (Sequence Manipulation Suite). Los alineamientos múltiples se realizaron con los programas ALING (Wilbur and 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*.

Los mutantes obtenidos mediante disrupción genética causada por la inserción de Tn5 o del plásmido pK18::*mob* en un gen particular, se denominarán como *P. putida* U Δ gen::*Tn5* o *P. putida* U Δ gen::*pK18::mob*.

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), y *P. putida* U como cepa receptora (Rf^f) (Figura 16).

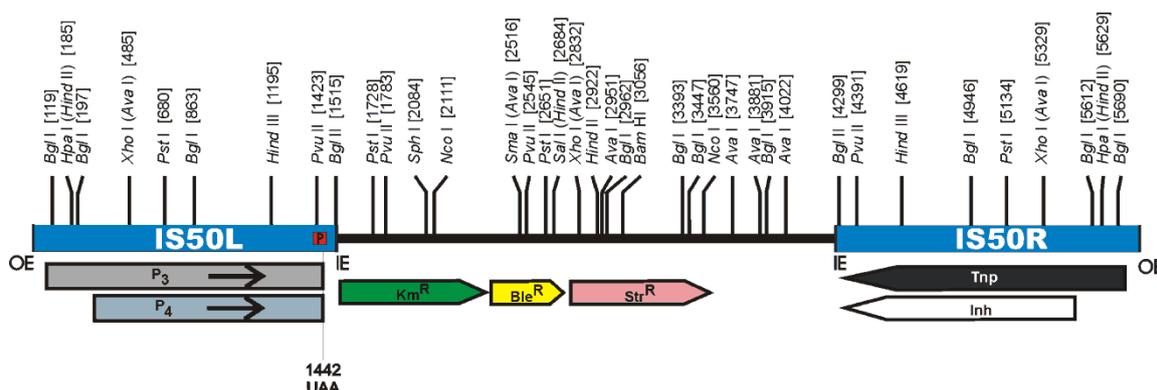


Figura 16. Mapa genético y de restricción del transposón Tn5. Se observan las secuencias de inserción IS50L e IS50R flanqueando la zona central, en la que se encuentran los marcadores genéticos de este transposón (un gen de resistencia a kanamicina- Km^r , un gen de resistencia a bleomicina- Ble^r y 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) 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 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 $Abs_{540nm} = 2,5$.
- 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 12.000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante. Las bacterias precipitadas se resuspendieron en 0,5 ml de medio LB estéril, y se volvieron a centrifugar (12.000 rpm, 3 min), repitiendo este proceso dos veces. A continuación, se desechó de nuevo el sobrenadante y la mezcla de células se resuspendió en 40 μ l de medio LB.
- En una placa de medio LB sólido se dispuso un filtro bacteriológico (Millipore) estéril (tamaño de poro 0,22 μ m) sobre el que se depositó la mezcla de bacterias resuspendida (*E. coli* HB101 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, y 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 μ l 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 el experimento (**Figura 17**).

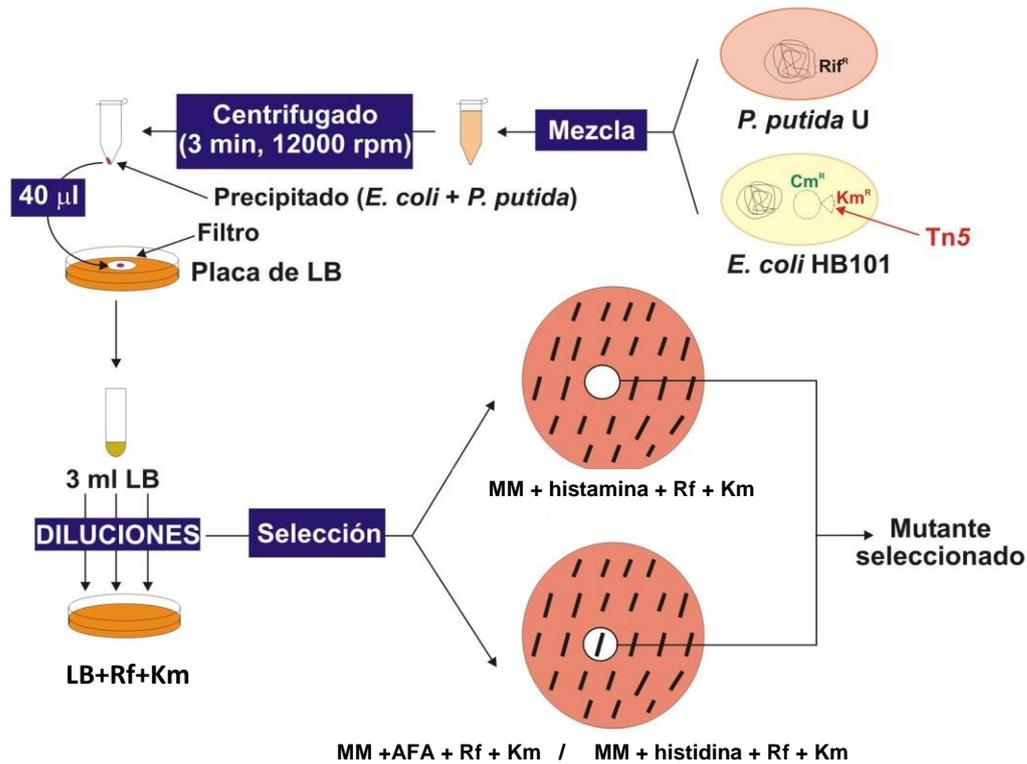


Figura 17. Esquema del proceso de mutación mediante conjugación e inserción del transposón Tn5 en *P. putida* U. En este ejemplo se seleccionaría un mutante en el que el Tn5 se ha insertado en un gen implicado en el catabolismo de histamina. AFA, ácido fenilacético.

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 cortara 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 16**), 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 limpiar la reacción de digestión y, posteriormente, se ligó en el plásmido pUC18 previamente cortado con las mismas dos 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 18, Tabla 7**). El análisis de la secuencia obtenida nos permitió identificar el punto exacto en el que se había integrado, así como el gen en el que se había introducido el transposón Tn5.

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en los diferentes mutantes.

Nombre del Primer	Secuencia
F24	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
Tn5-2	CCGCCGAAGAGAACAGGC

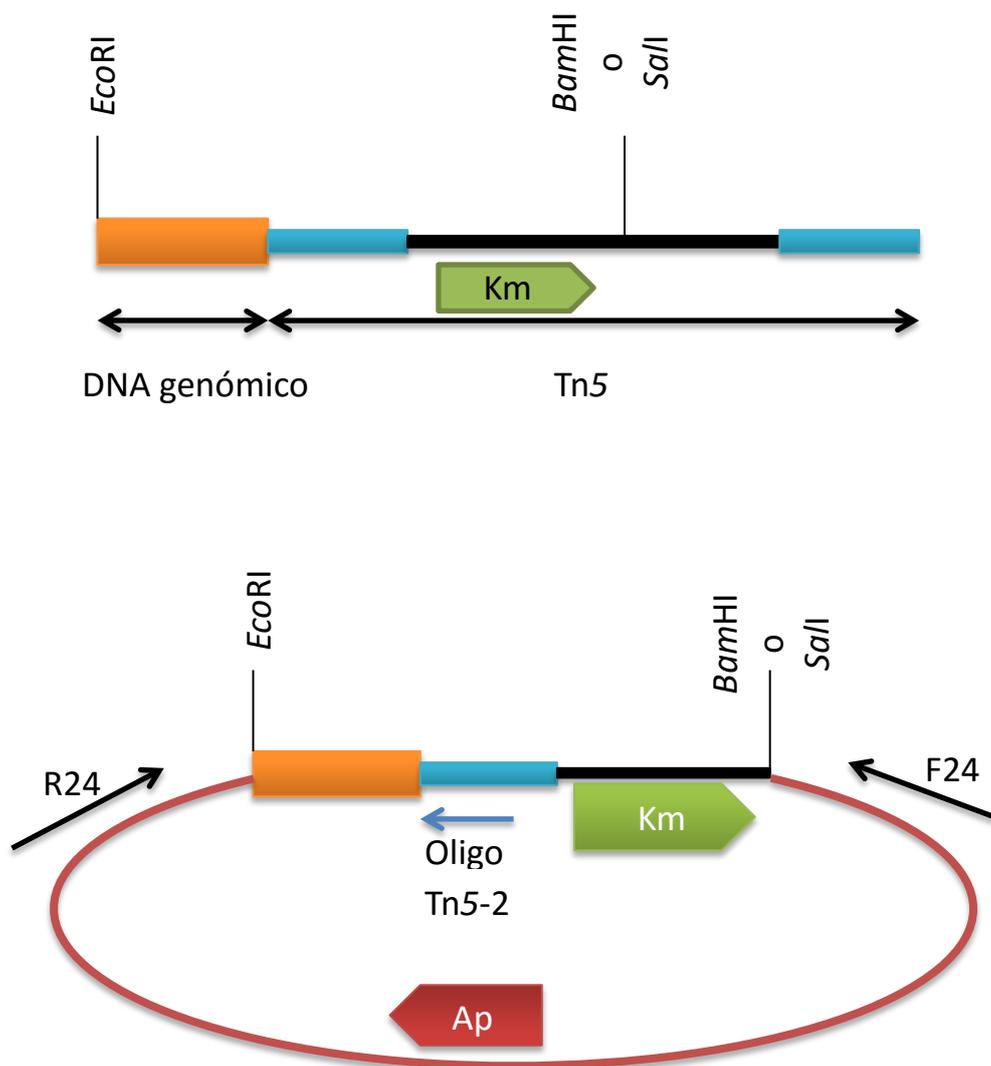


Figura 18. Procedimiento esquemático requerido para la identificación del punto de inserción del transposón Tn5 en el DNA genómico de *P. putida* U.

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 sobre una de las secuencias

repetidas e invertidas (**Figura 16**) (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 se podrán obtener, a partir del cromosoma de cada uno de los posibles mutantes, 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 1113 pb correspondiente a un trozo 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 del 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. Como cepa auxiliar se utilizó la cepa *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 (6.000 rpm, 1 min) desechándose el sobrenadante. Las bacterias así precipitadas se lavaron con 0,5 ml de medio LB estéril, volviéndose a centrifugar (6.000 rpm, 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 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 Gtm.
- 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 19**), y este hecho es el que nos va a permitir conocer las 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 limpió la reacción de restricción 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 Gtm, 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 7**. 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 del 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.

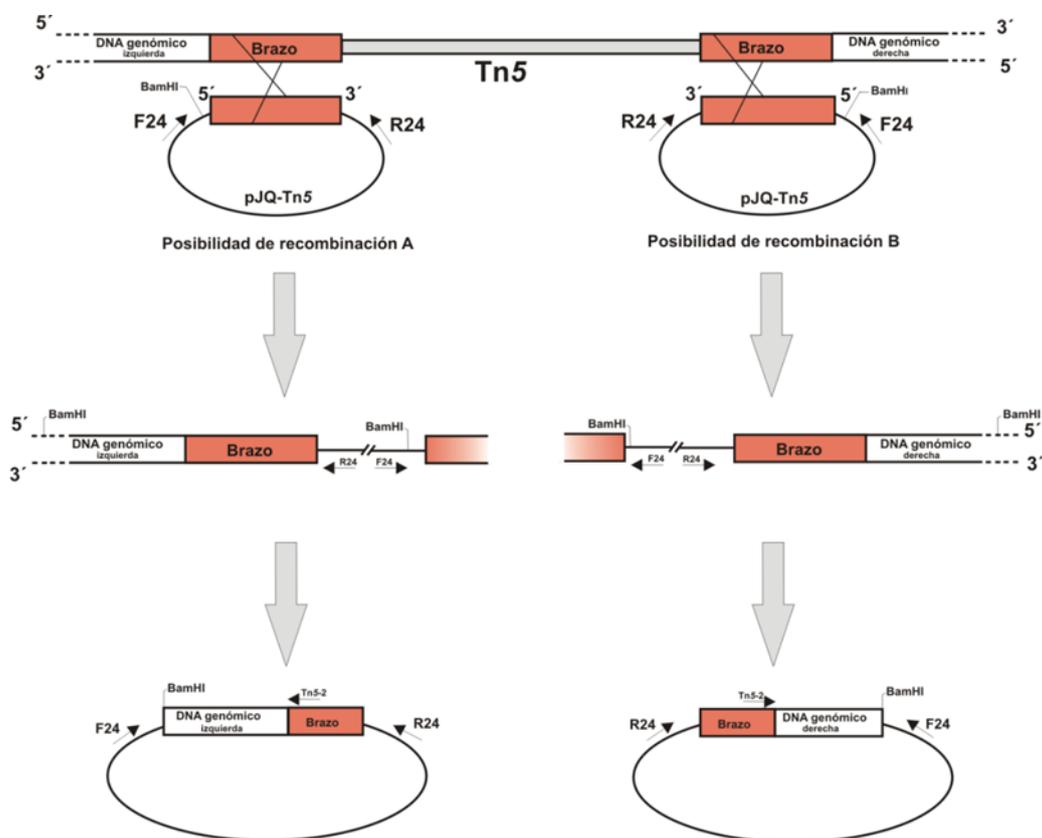


Figura 19. Representación esquemática del proceso de aislamiento y secuenciación de la zona adyacente al punto de inserción del transposón Tn5 mediante la estrategia de “recombinación en el brazo del Tn5”. En el esquema aparecen reflejadas las dos posibilidades de recombinación de la construcción pJQ-Tn5 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.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos sobre el fragmento de DNA de secuencia conocida de la cepa relacionada *Pseudomonas putida* KT2440, y se utilizaron para hacer amplificaciones (PCR) frente a un oligonucleótido específico del brazo del Tn5. Estas reacciones de PCR se limpiaron utilizando *kits* comerciales específicos para ello, y se

secuenciaron. Cuando el experimento así lo requería, se ligaron en el pGEM[®]-T Easy o en pTZ57R/T y, posteriormente, se clonaron en otro plásmido.

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 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*.
- 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 recombinación homóloga a través del inserto clonado, permitiendo, de este modo, la supervivencia de la cepa (**Figura 20**).

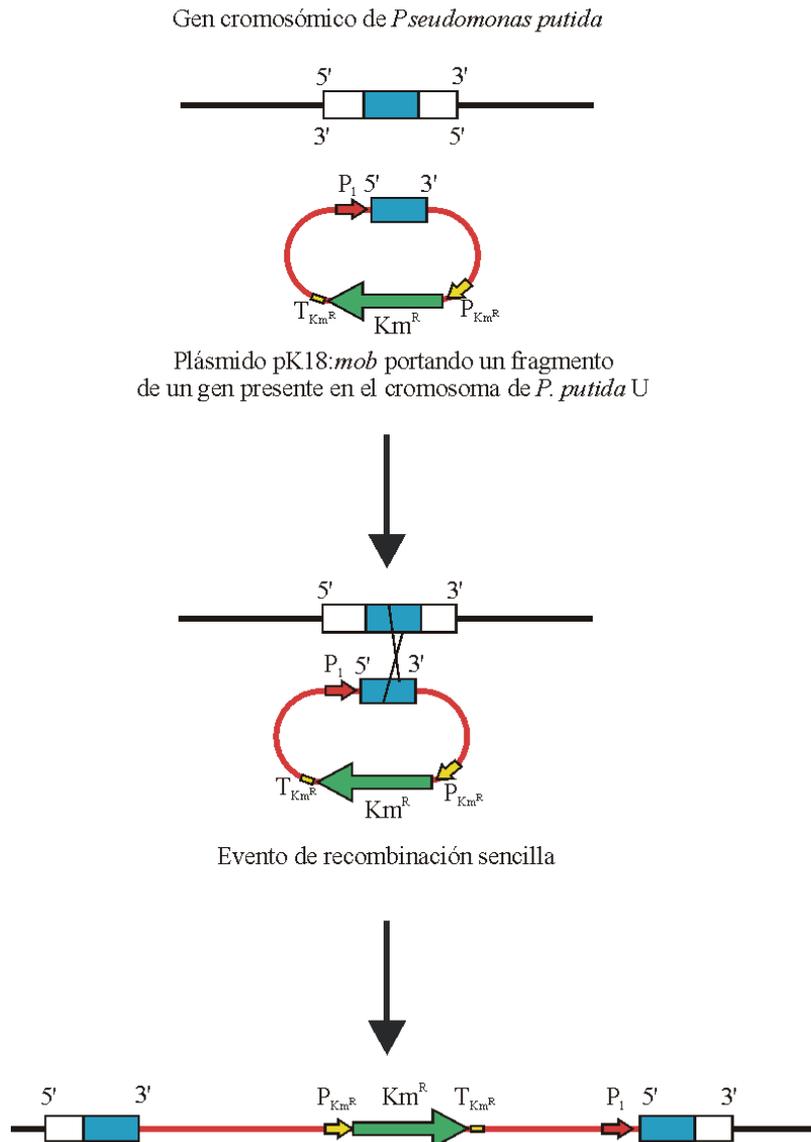


Figura 20. Esquema del evento de recombinación genética mediante recombinación homóloga. Se utiliza un fragmento interno del gen diana que se pretende mutar, clonado en un plásmido integrativo (pK18::*mob*).

- 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) (**Tabla 8**), frente a los oligonucleótidos universales F24 y R24 propios del plásmido.

Tabla 8. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para la comprobación en los mutantes disruptos.

Nombre del Primer	Secuencia
HinD.F1	GGGCAACCGGTTTCCCCTGTGGGAG
HinD.R1	GATATCAGCCGCGCAGCTGGTACC
HinE.F1	CATGCGCCGTATCACACGGCGTCG
HinE.R1	TAATCATTATTCAGCCCCCG

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, se llevó a cabo la clonación de los genes silvestres (correspondientes a los que habían sido mutados) en el plásmido pBBR1MCS-3 (pMC). El protocolo seguido se describe a continuación:

- En primer lugar, se amplificó por PCR el gen que va a ser expresado en *trans*. Se ligó el producto de amplificación en un plásmido comercial (pGEM-Teasy o pTZ57R/T), y se clonó (en el sentido adecuado para que tenga lugar su expresión) en el plásmido pMC (replicativo tanto en *E. coli* como en *Pseudomonas*). Posteriormente, se transformó la cepa *E. coli* DH10B con este plásmido.
- El plásmido pMC que contenía el gen de interés, se transfirió mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990) a los mutantes de *P. putida* U siguiendo el mismo proceso anteriormente descrito (ver apartado 10.2 de Materiales y Métodos).
- 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 pMC).
- 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 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 como fuente de carbono.

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

Para determinar el consumo de histamina, así como para observar la aparición de metabolitos durante la asimilación de ésta, se utilizó la técnica cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC). El primer método empleado se describe a continuación. Se tomaron muestras de los caldos de cultivo (1 ml) a diferentes tiempos. Éstas se centrifugaron (31.000 x g, 20 min) para eliminar los restos celulares, se filtraron a través de filtros Millipore (tamaño de poro de 0,22 µm) y las diferentes alícuotas (20 µl) fueron analizadas mediante un aparato de HPLC (Beckman System Gold Mod 126. Programable Solvent Module) equipado con un detector de longitud de onda variable UV/visible (Beckman System Gold Diode Array Detector Module Mod 168), un integrador con el sistema de análisis informático Waters Millennium 32 y una columna de fase reversa (Nucleosil C-18, 250 x 4,6 mm de diámetro interno) microparticulada (tamaño de partícula 10 µm, tamaño de poro 1 µm) (Phenomenex Laboratorios U.S.A.) con una precolumna Analytical Guard Cartridge System, (KJ0-4282). La fase móvil empleada contenía KH₂PO₄ (50 mM, pH 4) y acetonitrilo (CH₃CN), en una proporción 99:1 (v/v). El flujo se mantuvo a 2,4 ml/min y el eluido se monitorizó a 254 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención para la dopamina, la histamina, la tiramina, la 2-feniletilamina, el 3,4-dihidroxifenilacético, el 4-OH AFA y el AFA fueron de 3; 3,3; 4,5; 9,6; 13; 24 y 54 minutos, respectivamente (Arias *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2010).

Para el segundo método se utilizó el siguiente protocolo. Se tomaron muestras de los caldos de cultivo (1 ml) a diferentes tiempos. Éstas se centrifugaron (13.000 rpm, 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 Waters Millennium 32 y una columna de fase reversa Gemini 5 μ m C18 110Å (250 x 4.6 mm) (Phenomenex Laboratorios U.S.A.). 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 9**).

Tabla 9. Gradiente de flujo.

Tiempo (min)	Composición fase móvil (v/v)	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

13. EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE D-ALANINA Y L-ALANINA EN DIFERENTES MUTANTES.

13.1. Extracción de alanina.

La D/L-alanina acumulada por diferentes mutantes se extrajo de los medios de cultivo siguiendo el protocolo que a continuación se detalla:

- La cepas *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 y *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pMC*dadX* se cultivaron en un matraz Erlenmeyer de 2 L/500 ml de MM modificado, en el que las concentraciones de KH₂PO₄ y (NH₄)₂SO₄ se habían reducido 20 y 4 veces, respectivamente, a fin de que el exceso de sales no interfiriese en el proceso final de

extracción. A este medio se suplementó 4-OHAFa (20 mM) como fuente de energía e histamina (20 mM) como fuente de metabolitos.

- Una vez que había desaparecido toda la histamina (seguida por HPLC) y que también se había agotado el 4-OHAFa, se procedió a centrifugar el caldo de cultivo durante 10 min a 14.000 rpm a 4°C (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.
- La muestra liofilizada se resuspendió en 150 ml de H₂O milliQ y el pH se ajustó a 8,3. A continuación, este volumen se filtró a través de una columna (27,5 x 16 cm) que contenía 43 ml de resina aniónica fuerte (Purolite® A500Splus en forma cloruro) (Asia Pacific, China). La columna se equilibró previamente con 2-3 volúmenes de NaOH 2M.
- En estas condiciones, más del 90 % de L-alanina y D-alanina no se retenía. El filtrado que contenía alanina (pureza superior al 80%), se liofilizó y se repurificó de nuevo siguiendo el mismo protocolo. A continuación, el producto obtenido se analizó por distintas técnicas, tales como IR, RMN, HPLC o TLC.

13.2. Identificación de la alanina mediante cromatografía en capa fina (TLC).

La identificación de alanina acumulada por los mutantes *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5, *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 pMC*dadX* y *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 en el caldo de cultivo se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizándose placas de Silica-Gel (TLC Silica gel 60, Millipore). Para ello se tomaron alícuotas de los caldos de cultivo a distintos tiempos y se centrifugaron (10 min, 13.000 rpm a 4°C) para eliminar las células y se depositaron en la placa de TLC (5 µl).

El sistema de desarrollo empleado consistió en etanol al 96% y agua (70:30 v/v), y como revelador se utilizó el reactivo de ninhidrina-colidina (Moffat and Lytle, 1959). La alanina adquiere una coloración violeta en la placa.

13.3. Separación de D-alanina y L-alanina.

La separación de D-alanina y L-alanina se llevó a cabo con el equipo de HPLC Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Trap XCT. La columna utilizada fue Chiralpak ZWIX(+) de 150 mm de largo y 3 mm de diámetro con un tamaño de partícula de 3 μm . La fase móvil estaba formada por dos eluyentes. El eluyente A contenía acetonitrilo: metanol: agua (78,5:19,5:2 v/v) con 20 mM de ácido fórmico y 20 mM de formiato amónico, mientras que el eluyente B se preparó con metanol: agua (98:2 v/v), 20 mM de ácido fórmico y 20 mM de formiato amónico. El gradiente de flujo empleado se muestra en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Gradiente de flujo.

Tiempo (min)	Composición fase móvil (v/v)	Flujo (ml/min)
0	80% A 20% B	0,5
10	80% A 20% B	0,5
15	25% A 75% B	0,5
20	25% A 75% B	0,5
21	80% A 20% B	0,5
30	80% A 20% B	0,5

14. TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR).

Para la determinación de la estructura de algunos compuestos se empleó la espectroscopía de infrarrojo. 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 se colocó directamente en detector y se realizó el espectro.

15. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Para determinar la estructura molecular de algunos compuestos se utilizó la RMN, cuyos análisis fueron realizados en el servicio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad de Salamanca. 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.

16. PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR).

Para analizar la expresión de algunos de los genes *hin*, utilizamos la técnica de PCR a tiempo real. Para ello, la cepa *P. putida* U y el mutante *P. putida* U $\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$ se incubaron en MM suplementado con 4-OHAF (15 mM) y los correspondientes antibióticos (Rf para *P. putida* U y Rf, Km para el mutante *P. putida* U $\Delta\text{hinB}::\text{Tn5}$) 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 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, 7.500 rpm, 4°C). El precipitado obtenido se congeló a -80 °C. A partir de él se obtuvo el RNA utilizando el *kit* de Roche (Alemania) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Después, se midió la concentración del RNA obtenido en el NanoDrop[®] ND-1000 y se trató con una DNasa (Invitrogen) para eliminar cualquier resto de DNA. A continuación, se realizó una PCR utilizando el RNA como DNA molde para comprobar si estaba bien extraído y sin restos de DNA. El siguiente paso consistió en la síntesis de cDNA a partir de 1 µg de RNA utilizando el *kit* de Thermo Fisher Scientific (U.S.A.).

La PCR a tiempo real con el cDNA sintetizado se llevó a cabo empleando el *kit* Power SYBR Green maxter mix (Applied Biosystems). El tamaño de las amplificaciones osciló entre 150-200 pb, usándose para cada gen (*hinA*, *hinB*, *hinC*, *hinD*, *dadA* y *coxB*) los oligonucleótidos (0,01-0,05µM) que figuran en la **Tabla 11**. Se utilizó un equipo StepOne® Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y se siguió un procedimiento similar al descrito por Ugidos *et al.*, (2008). Las muestras se desnaturalizaron inicialmente durante 10 min a 95°C, y a continuación, se sometieron a 40 ciclos en los que había una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 s y una etapa de extensión a 60°C durante 1 min, con una única medida de fluorescencia por ciclo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto al gen *housekeeping* 16S (0,01 µM) amplificado con los oligonucleótidos que figuran en la **Tabla 11**. Los cambios de expresión de los genes se compararon siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabla 11. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR.

PRIMER	SECUENCIA
Gen control (<i>Housekeeping</i>).	
16S.F	ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTC
16S.R	TGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
Genes del catabolismo de histamina.	
hinA.PCR.F	GGGACACCATGGCCGAGGCG
hinA.PCR.R	GCTGATCGGCGGCTTGCTGTTTC
hinB.PCR.F	CGTGAATGCCGTATCGCCCAGTTG
hinB.PCR.R	GCGTCGATGAACAGGGAAAACAGC
hinC.PCR.F	GGGCGCAGGCGGCATGATCTTC
hinC.PCR.R	AATCCGAAGTATTCATGGGCAAACCAC
hinD.PCR.F	GTACTIONCGGCGCAGTCCAACCTC
hinD.PCR.R	GAGCAGTACCTACCTCGCGACG
dadA.PCR.F	GAAACGGGTGATCGCGACCTTGTAGG
dadA.PCR.R	AAGCTGGAAACCGCCGACCGC
coxB.PCR.F	GGCACTACAAATACCTGGGCCAG
coxB.PCR.R	CCCACCAGGAGTGGATGACGTCG

16S, RNA ribosomal 16S.

17. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE HISTAMINA EN *P. putida* U.

Con el objeto de estudiar la capacidad de incorporar histamina por *P. putida* U y por algunos de sus mutantes, las bacterias se cultivaron en MM que contenía esta amina y además, otra fuente de carbono (usualmente succinato).

Para estos experimentos se utilizó 1-³H-histamina (12.54 Ci/mmol, 0.464 TBq/mmol) que se adquirió a la casa comercial Perkin Elmer (U.S.A.). El líquido de centelleo empleado (EcoscintTM A) fue suministrado por Nacional Diagnostic (U.S.A.).

El **protocolo** seguido, muy similar al descrito por Schleissner *et al.*, (1994), se detalla a continuación:

- Las cepas que iban a ser analizadas, se sembraron en placas que contenían MM suplementado con 4-OHAFa (5 mM) más los antibióticos correspondientes, y se incubaron a 30°C durante 24 h.
- Pasado ese tiempo, se inocularon en matraces Erlenmeyer de 500 ml/100 ml de MM suplementado con la fuente de carbono correspondiente (histamina 20 mM; succinato 40 mM; ImAA 30 mM o histidina 20 mM) más los antibióticos correspondientes.
- Cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento ($Abs_{540nm} = 2,5$), se procedió a recoger 1 ml de muestra para hacer el transporte.
- Se centrifugó la muestra (2 min, 13.200 rpm), se tiró el sobrenadante y las células se lavaron con 1 ml de tampón fosfato-citrato 50 mM, pH 6,5. La suspensión bacteriana se centrifugó de nuevo (1 min, 13.200 rpm) y se resuspendió en el tampón fosfato-citrato. La absorbancia de la suspensión celular se ajustó a 1,1 (a 540 nm) y se depositó en matraces de 25 ml (conteniendo 950 μ l de suspensión bacteriana).
- Las condiciones de transporte fueron las siguientes:
 - o Temperatura del baño: 30°C
 - o Velocidad de agitación del baño: 100 rpm.

- Tiempo de preincubación del matraz en el baño: 5 min.
 - Concentración de los efectores: 0,5 mM.
 - Tiempo de actuación de los efectores: 5 min.
 - Volumen final: 1 ml en el que la concentración de histamina fue 2,508 μM (conteniendo 0,008 μM de 1- ^3H -histamina). Esta mezcla (1 ml) se depositó en matraces de 25 ml que se incubaron durante diferentes tiempos (usualmente 30 s) procurando mantener la linealidad.
- El transporte se detuvo tras la adición de 20 ml de histamina fría (10 mM) seguido de una rápida filtración a través de filtros Millipore (0,45 μm de diámetro de poro). A continuación, las células se lavaron dos veces con 10 ml de histamina 10 mM.
 - Los filtros que contenían las células con el material radiactivo incorporado se resuspendieron en 10 ml de líquido de centelleo y la radiactividad incorporada por las bacterias se midió en un contador de centelleo líquido Beckman 1800 LS (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1987; Fernández-Cañón *et al.*, 1989; Minambres *et al.*, 1992).

18. SÍNTESIS QUÍMICA DE IMIDAZOLETANOL.

Para la síntesis química de imidazoletanol se siguió el protocolo empleado por McKennon *et al.*, (1993):

- El primer paso consistió en pesar 1,62 gramos de ImAA, añadiéndose 3,64 g de borohidruro (NaBH_4) y 200 ml de tetrahidrofurano (THF) en un matraz de 3 bocas con una capacidad de 250 ml. Una boca se tapó, otra se unió a un serpentín de reflujo conectado a una atmósfera de nitrógeno y en la tercera boca se colocó un embudo de adición de presión compensada.
- Se añadieron 10,16 g de I_2 (resuspendidos en 30 ml de THF), gota a gota, mediante el embudo de adición, durante 1 h y manteniéndose una temperatura entre 8-10°C.
- Luego, la mezcla se calentó a reflujo durante 12 h y se mantuvo la temperatura a 66°C.

- Posteriormente, a la mezcla de reacción se añadieron, gota a gota y en agitación, 20 ml de metanol.
- El disolvente se evaporó a vacío y el residuo obtenido se disolvió en 10 ml de HCl 2 M.
- Esta disolución se llevó a residuo seco bajo vacío y éste se resuspendió en 30 ml de etanol a 40°C. La disolución se filtró a través de papel de filtro.
- El filtrado se cristalizó a 4°C y se lavó con etanol frío.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos.”

William Lawrence Bragg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. JUSTIFICACIÓN DEL PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

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

Como se ha descrito en el apartado de Introducción, la histamina es una amina biogénica que tiene multitud de efectos sobre el ser humano y que se encuentra frecuentemente en gran variedad de alimentos (Maintz and Novak, 2007). Debido a la estrecha relación existente entre ciertos síndromes y/o enfermedades y la concentración de histamina en el cerebro, las cantidades de esta amina en los alimentos deben controlarse estrictamente (Ladero *et al.*, 2010). Por esta razón, conocer el catabolismo de esta amina biogénica permitirá su potencial aplicación para la mejora de la salud humana. Una de las principales aplicaciones sería la identificación de genes análogos en otros organismos que, como *Lactobacillus*, se utilizan en la industria alimentaria. Otro enfoque interesante, para cuando la legislación actual lo permita, sería el diseño de microorganismos transformados genéticamente que, siendo seguros, pudiesen eliminar la histamina de los alimentos.

Todos los estudios bioquímicos y genéticos, que se describirán a continuación, se han llevado a cabo en la cepa *P. putida* U. Esta bacteria posee una enorme versatilidad metabólica, lo que se traduce en una notable capacidad para utilizar como fuente de carbono substratos muy variados. Por otro lado, *P. putida* U es una bacteria que ha sido ampliamente utilizada por nuestro grupo de investigación para abordar diferentes estudios encaminados a la caracterización de las rutas catabólicas de diferentes aminas biogénicas, tales como, la feniletilamina (Arias *et al.*, 2008), la tiramina y la dopamina (Arcos *et al.*, 2010).

El primer abordaje experimental tuvo por objeto estudiar la asimilación de histamina por esta bacteria. Para ello, se suplementó en medio de composición química definida (MM) las diferentes concentraciones de histamina (5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM) como única fuente de carbono. Los resultados mostrados en la **Figura 21** indican que esta cepa es capaz de asimilar la histamina, aunque concentraciones superiores a 20 mM no se traducen en un

mayor crecimiento y, además, tardan más horas en alcanzar la fase estacionaria. Por esta razón, la concentración utilizada en medio líquido para los experimentos que se detallarán a continuación fue de 10 mM (MMh).

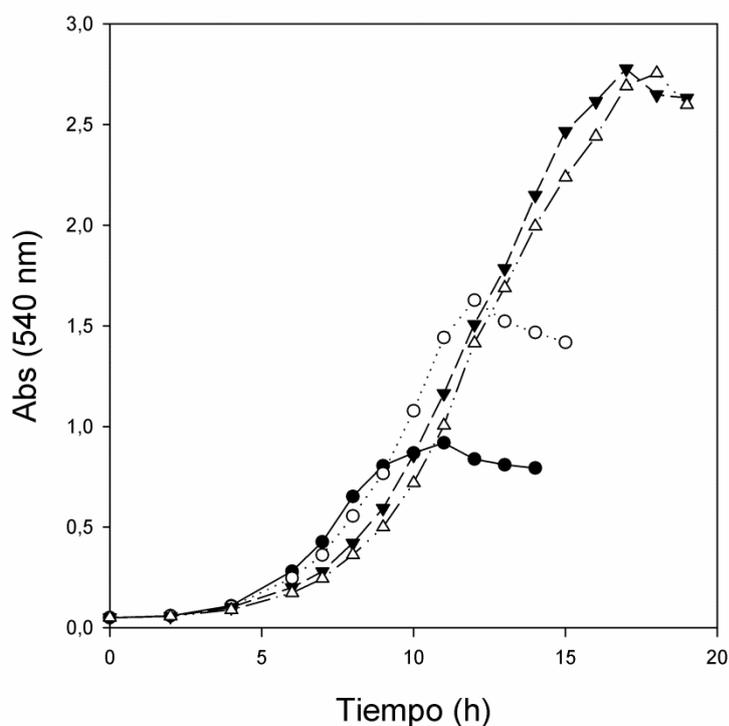


Figura 21. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de *Pseudomonas putida* U cuando se cultivaba en MM suplementado con diferentes concentraciones de histamina: 5 mM (●), 10 mM (○), 20 mM (▼) y 30 mM (Δ).

El crecimiento se determinó midiendo la turbidez de los cultivos a una longitud de onda de 540 nm. 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 y la concentración de células del cultivo. Este criterio fue utilizado en todas las curvas de crecimiento realizadas en este trabajo.

2. AISLAMIENTO DE MUTANTES INCAPACES DE DEGRADAR HISTAMINA.

Para afrontar el estudio de la ruta catabólica de histamina en *P. putida* U, se procedió a aislar mutantes incapaces de degradar esta amina biogénica. La técnica empleada fue la de mutagénesis con el transposón Tn5 (ver apartado 10.1 de los Materiales y Métodos). Tras el proceso de conjugación, la selección de los diferentes transconjugantes se llevó a cabo replicando cada una de las colonias en placas con MM que contenían histamina como única fuente de carbono y, de forma paralela, en otras que contenían MM suplementado con histidina o con ácido fenilacético (AFA) como únicas fuentes de carbono (se añadieron a una concentración final de 5 mM). También se adicionaron los antibióticos que se usaban como marcadores genéticos para cada una de las cepas utilizadas (Km, es el marcador genético del Tn5, y Rf, por ser la resistencia natural de *P. putida* U).

Mediante este procedimiento, se aislaron 96 mutantes, que se clasificaron en dos tipos diferentes: (i) un primer tipo incluía 41 mutantes que eran incapaces de degradar histidina pero que si catabolizaban la histamina y el AFA con la misma eficiencia que el control (*P. putida* U $\Delta his::Tn5$) (**Figura 22**); (ii) un segundo tipo incluía 55 mutantes que no podían asimilar la histamina, pero si degradaban la histidina y el AFA con la misma eficiencia que el control (*P. putida* U $\Delta hin::Tn5$) (**Figura 22**). La utilización de AFA como fuente de carbono se debió a que en ese momento no sabíamos si la degradación de histamina y de histidina tenían etapas comunes, o no. Tras analizar las cinéticas de crecimiento de los distintos mutantes, pudimos concluir que la degradación de histamina y de histidina en *P. putida* U no se lleva a cabo a través de la misma ruta y que tampoco poseen intermediarios catabólicos comunes. Además, el hecho de que exista un grupo de mutantes que no asimilan la histidina como única fuente de carbono, pone de manifiesto que *P. putida* U no posee la actividad histidin descarboxilasa, ya que en otro caso, los mutantes *P. putida* U $\Delta his::Tn5$ asimilarían la histidina a través de la ruta catabólica de histamina.

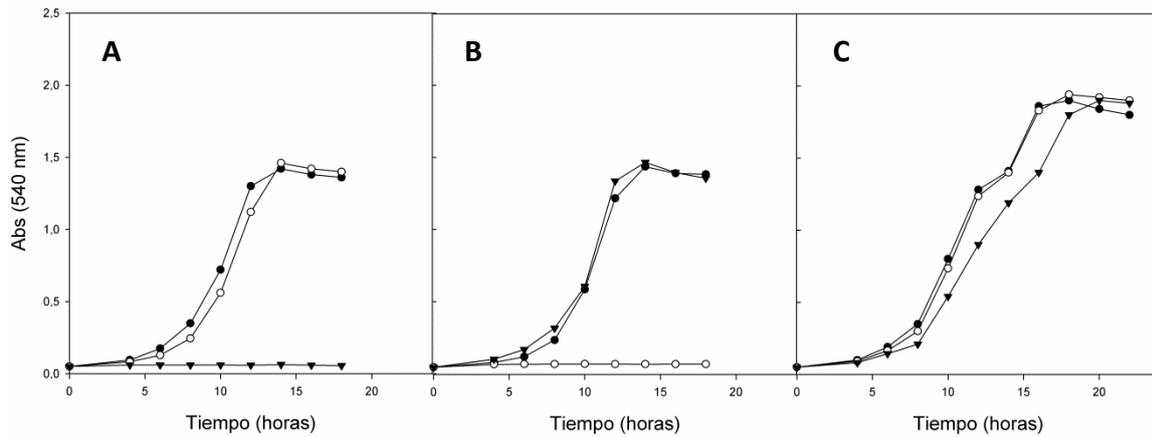


Figura 22. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de *P. putida* control (●), de mutantes *P. putida U Δhis::Tn5* (○) y de mutantes *P. putida U Δhin::Tn5* (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) histidina 10 mM y (C) AFA 10 mM.

A continuación, se procedió a estudiar con mayor detalle los mutantes *P. putida U Δhin::Tn5*. Éstos se cultivaron en MM suplementado con ácido imidazolacético (ImAA) como única fuente de carbono. Tras observar sus cinéticas de crecimiento, los 55 mutantes, se clasificaron en dos grupos: i) en el primer grupo se incluyeron 30 mutantes que, aunque no asimilaban la histamina, eran capaces de degradar el ImAA con la misma eficiencia que el control (**Figura 23**); ii) en el segundo grupo se encuentran aquellos mutantes (25) incapaces de asimilar tanto la histamina como el ImAA (**Figura 23**).

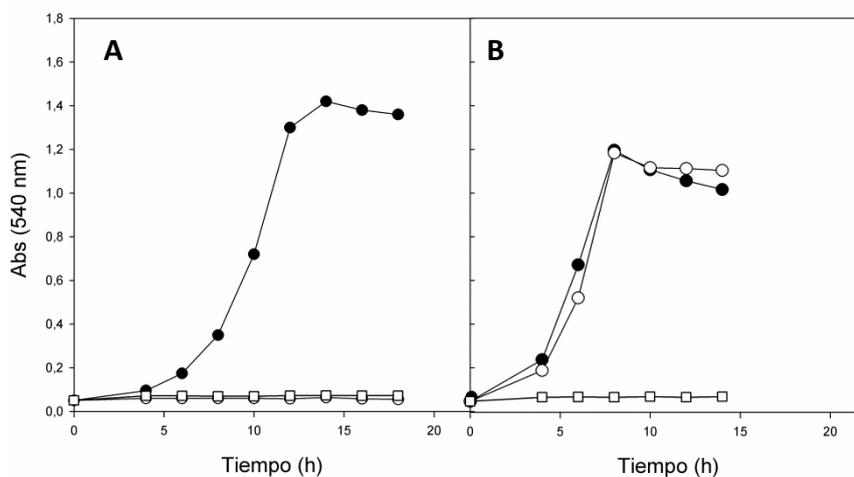


Figura 23. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de *P. putida U* control (●), de los mutantes afectados en la degradación de histamina (○), y de los mutantes afectados en la degradación de histamina y de ImAA (□) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM y (B) ImAA 10 mM.

Estos resultados nos permiten concluir que: (i) el ImAA es un intermediario de la ruta catabólica de histamina; (ii) los mutantes que no degradan histamina pero si ImAA están afectados en los genes relacionados con la conversión de histamina en ImAA y (iii) los mutantes que no crecen ni en histamina ni en ImAA están afectados en genes relacionados con las etapas que convierten el ImAA en intermediarios generales. En esta Tesis Doctoral se han estudiado los genes de la primera parte de la ruta catabólica de histamina, mientras que los de la segunda parte (conversión de ImAA en intermediarios generales) están siendo objeto de otra Tesis, que será defendida en su momento por D. Manuel de la Torre.

3. ANÁLISIS DEL CONSUMO DE HISTAMINA Y DE LOS METABOLITOS ACUMULADOS POR LOS DISTINTOS MUTANTES.

Utilizando el sistema de HPLC empleado en nuestro laboratorio para determinar aminas biogénicas (ver Materiales y Métodos) (Arias *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2010), comprobamos que aunque la histamina se resolvía bien ($R_t = 3,3$ min), el ImAA se desdoblaba en varios picos (**Figura 24**).

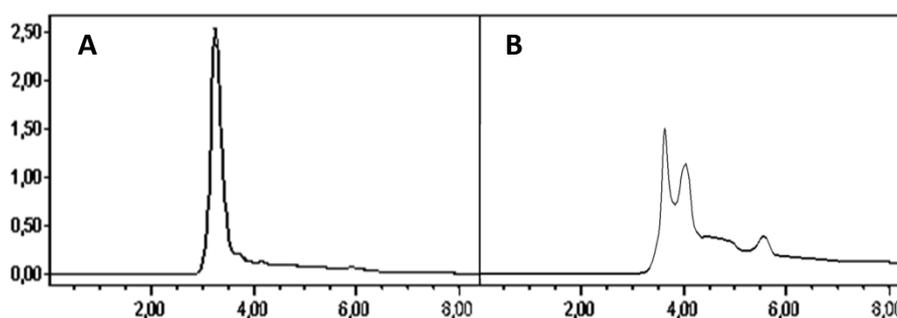


Figura 24. Detección de (A) la histamina y (B) el ImAA mediante HPLC utilizando las condiciones desarrolladas en nuestro laboratorio (Arias *et al.*, 2008; Arcos *et al.*, 2010). El eje Y representa la intensidad de absorbancia (unidades arbitrarias) y el eje X representa el tiempo de retención (min).

Como consecuencia de estos malos resultados, modificamos el protocolo basándonos en el hecho de que en el análisis de aminoácidos se suele utilizar como fase móvil el ácido ortofosfórico y el ácido sulfúrico. Además, la absorbancia de la histamina es mayor a 210 nm (Butler, 1961; Ching *et al.*, 1995), por lo que se decidió cambiar el protocolo anterior

introduciendo esas modificaciones. El nuevo método usaba como fase móvil una mezcla de H_3PO_4 59,4 mM, H_2SO_4 5,4 mM (pH 1,0) y acetonitrilo siguiendo el gradiente de flujo descrito en el apartado 12 de Materiales y Métodos. Se utilizó una columna de fase reversa (Gemini 5μ C18 110A, 250 mm x 4.6 mm; Phenomenex Laboratories. U.S.A.) y el eluido se determinó a 210 nm. En estas condiciones los R_t (min) para la histamina y para el ImAA, fueron, 4,8 y 5,9, respectivamente, y los cromatogramas generaban picos muy nítidos (**Figura 25**).

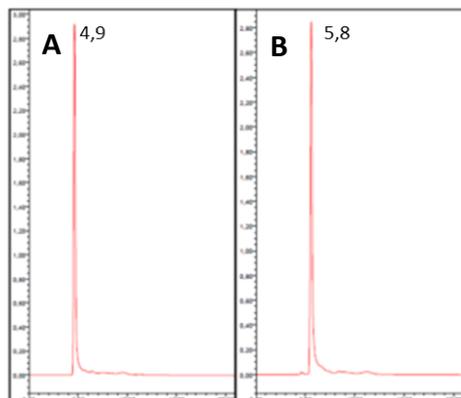


Figura 25. Detección de (A) la histamina (10 mM) y (B) del ImAA (10 mM) mediante HPLC siguiendo las condiciones indicadas en el texto. El eje Y representa la intensidad de absorbancia (unidades arbitrarias) y el eje X representa el tiempo de retención (min).

Con este método de HPLC se detectan también otras aminas biogénicas y algunos aminoácidos precursores de las mismas. Así, los R_t (min) para la histidina, la lisina, la ornitina, la asparragina, el GABA, la glutamina, la dopamina y la tiramina fueron 5,1; 5,2; 5,3; 5,5; 5,6; 5,7; 11,7 y 15,0, respectivamente (**Figura 26**).

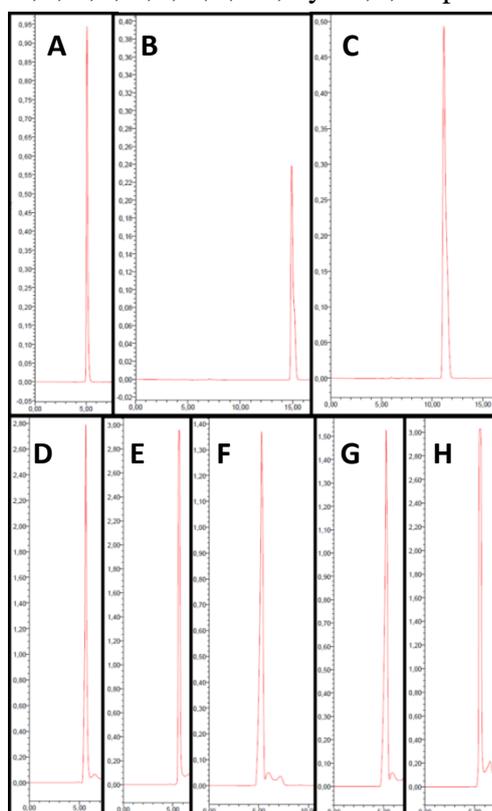


Figura 26. Detección mediante HPLC de aminas y aminoácidos a una concentración de 0,1 mg/ml. (A) histidina, (B) tiramina, (C) dopamina, (D) GABA, (E) glutamina, (F) lisina, (G) ornitina y (H) asparragina. El eje Y representa la intensidad de absorbancia (unidades arbitrarias) y el eje X representa el tiempo de retención (min).

En resumen, este protocolo nos permitire seguir eficazmente la degradación de histamina, y, probablemente, determinar la presencia de intermediarios catabólicos de esta ruta. Además, también sirve para detectar la presencia de otras aminas biogénicas y aminoácidos. Sin embargo, la triptamina, la 2-feniletilamina, la hexilamina, la heptilamina, la putrescina, la espermina, la espermidina y la cadaverina no se detectan por este método.

Una vez optimizado el protocolo para detectar estos compuestos, procedimos a analizar el consumo de histamina por *P. putida* U. Para ello, la bacteria se cultivó en MMh, observándose su crecimiento y la desaparición de histamina del caldo de cultivo (**Figura 27**). Como puede apreciarse, la histamina ha desaparecido totalmente de los caldos en 13 h y, curiosamente, entre las 9 h y las 13 h aparece cierta cantidad de ImAA en el medio, pero después desaparece. Este resultado indica que parte del ImAA generado es expulsado al medio y transportado de nuevo para ser metabolizado (**Figura 27**). Ello puede deberse a que o bien la velocidad de degradación de histamina es muy superior a la de ImAA, o que a partir de ImAA se generan intermediarios que pudieran ser tóxicos para la bacteria, lo que le obliga a liberar al caldo parte del ImAA generado.

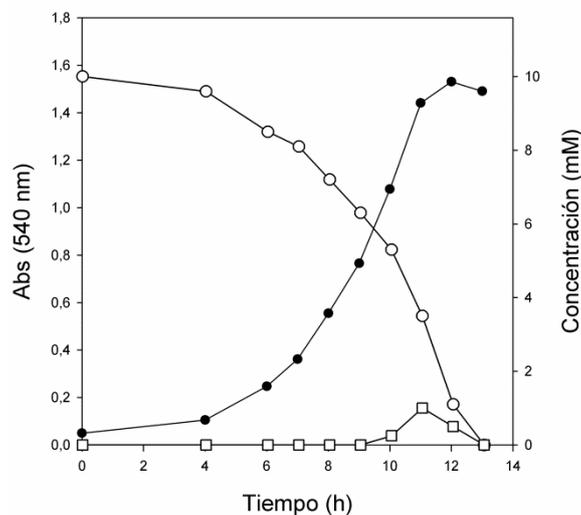


Figura 27. Curva de crecimiento (medida como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U cuando se cultivó en MMh (●); concentración residual de histamina (○) y concentración de ImAA (□).

Con el fin de recabar información acerca de las actividades enzimáticas responsables de la degradación de histamina, se procedió a cultivar los diferentes mutantes en MM

suplementado con 4-OHFAFA 10 mM (para soportar el crecimiento bacteriano), además de histamina 10 mM (como fuente de los posibles catabolitos que fuesen excretados al medio). Se tomaron muestras de los diferentes caldos de cultivo, se centrifugaron para eliminar las células y restos celulares y, el sobrenadante se filtró a través de los filtros *millipore* de 0,22 μm de tamaño de poro. Las muestras se analizaron mediante HPLC y, cuando fue necesario, mediante cromatografía en capa fina (TLC) (Materiales y Métodos).

El estudio de la cinética de utilización de las fuentes de carbono y de la acumulación de metabolitos, permitió agrupar a los mutantes estudiados por estas técnicas en dos clases (clase 1 y clase 2).

Los mutantes pertenecientes a la clase 1 correspondían a aquellos que eran incapaces de degradar la histamina aunque tengan otra fuente de carbono en el medio de cultivo (4-OHFAFA) (**Figura 28**).

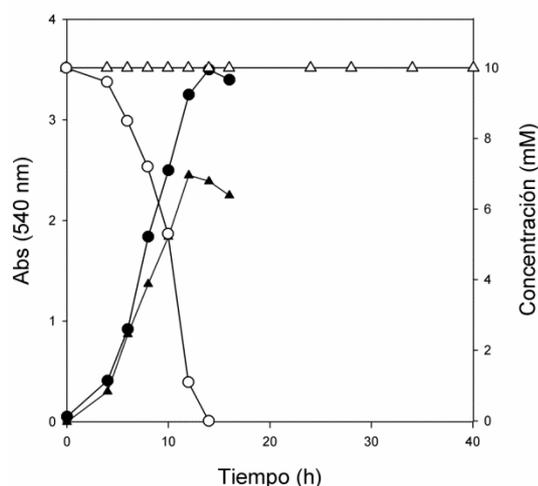


Figura 28. Curvas de crecimiento (medidas como $\text{Abs}_{540\text{nm}}$) de la cepa *P. putida* U control (●) y de los mutantes de la clase 1 (▲) cuando se cultivaban en MM suplementado con 4-OHFAFA 10 mM + histamina 10 mM. Concentración residual de histamina en los cultivos de la cepa *P. putida* U control (○) y en los de los mutantes pertenecientes a la clase 1 (Δ).

La segunda clase (clase 2) incluye a los mutantes (*P. putida* U *dadA*::Tn5 y *P. putida* U *dadR*::Tn5) afectados en genes que no impiden la transformación de histamina, ya que en ellos se observa la degradación de histamina si suplementamos con otra fuente de carbono (4-OHFAFA) (**Figura 29.A**). Cuando en estos mutantes utilizamos la técnica TLC para identificar posibles catabolitos acumulados, comprobamos que el compuesto presente en el medio era el aminoácido alanina (**Figura 29.B**).

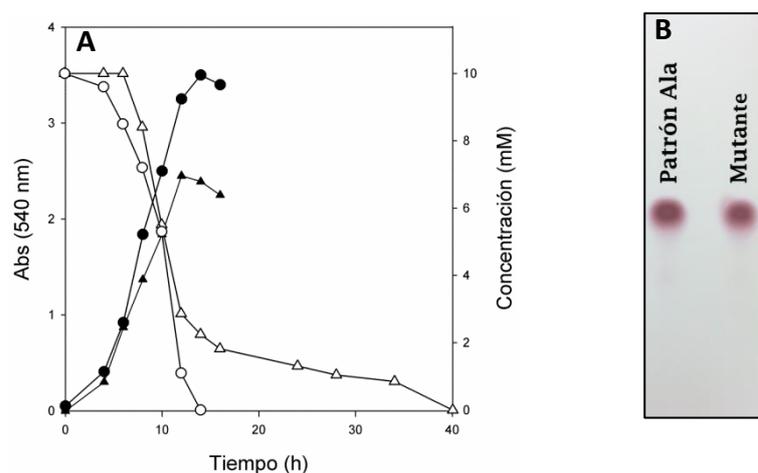


Figura 29. (A) Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●) y de los mutantes (*P. putida* U *dadA*::Tn5 y *P. putida* U *dadR*::Tn5) (▲) cuando se cultivaban en MM suplementado con 4-OHFAFA 10 mM + histamina 10 mM. Concentración residual de histamina en los cultivos correspondientes a la cepa *P. putida* U control (○) y a la de los mutantes (△); (B) identificación de la alanina acumulada ($R_f = 0,47$) por algunos mutantes mediante TLC.

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

Una vez que se estudió el crecimiento de los diferentes mutantes afectados en el catabolismo de histamina, y tras haber analizado los metabolitos acumulados en sus caldos de cultivo, se procedió a la localización del punto de inserción del transposón en el genoma de cada uno de ellos. Para esta tarea se emplearon dos estrategias diferentes. En una de ellas se identificó el punto de inserción del transposón mediante restricción del DNA genómico y clonación en un vector, para posteriormente seleccionar el clon idóneo por la doble resistencia, tal y como se describe en el apartado 10.1.1 de los Materiales y Métodos. La otra estrategia seguida fue la denominada “recombinación en el brazo del Tn5”, desarrollada en nuestro laboratorio (Arcos *et al.*, 2010) y que se describe en el apartado 10.1.2 de los Materiales y Métodos. A partir de la información obtenida, se abordó la secuenciación de las zonas adyacentes al punto de inserción del Tn5 con el objeto de caracterizar los genes que codificaban todas las actividades implicadas en el catabolismo de la histamina. Su

localización y la secuenciación de las regiones adyacentes, reveló que los ORFs afectados estaban repartidos en tres *clusters* diferentes (*hin*, *dad*, y *cox*), conteniendo un total de 12 genes. Estos tres *clusters* se encuentran bastante alejados en el cromosoma de *P. putida* U (Figura 30).

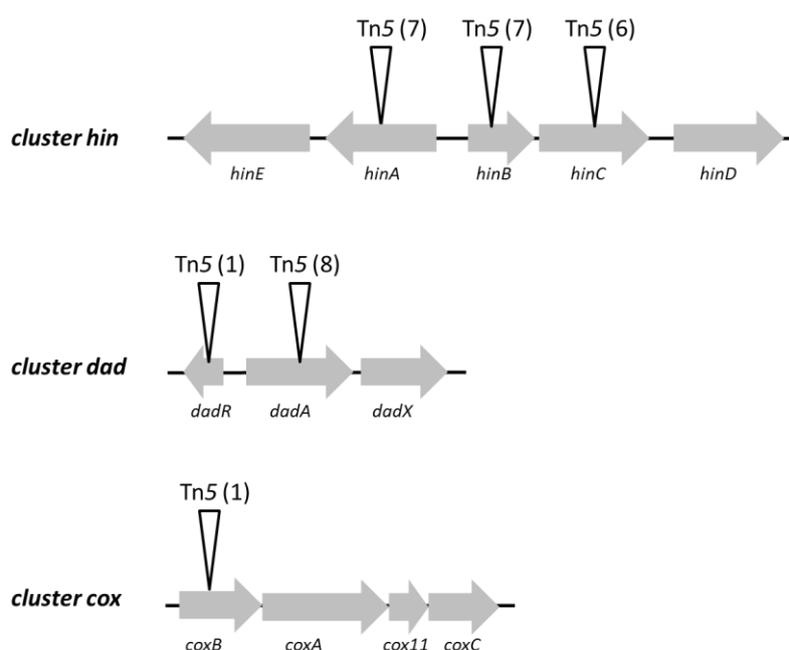


Figura 30. Esquema de la organización génica de los tres *clusters* (*hin*, *dad* y *cox*) implicados en la transformación de histamina en ImAA. También se muestra en el esquema los genes afectados por el transposón Tn5. En paréntesis se indica el número de mutantes en los que el transposón Tn5 se había insertado en el mismo gen.

5. ANÁLISIS DE LOS DIFERENTES CLUSTERS IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA EN *P. putida* U.

En este apartado se van a describir los tres *clusters* que intervienen en la conversión de histamina en ImAA. Se analizarán, por tanto, los diferentes marcos de lectura identificados (ORFs) y se realizará un análisis genético y bioquímico de las proteínas codificadas por esos ORFs. En aquellos casos en que se precise, se identificarán los genes que han sido disruptos

mediante el transposon Tn5 o mediante la recombinación del plásmido pK18::*mob* para establecer su función, determinando cuál de ellos codifican proteínas que participan en la asimilación de histamina. Además, se analizará el efecto que provoca la expresión en *trans* de determinados genes, utilizando los vectores pBBR1MCS-3 (pMC) o pBBR1MCS-5 (pMC5). Por último, se realizará un estudio comparativo de la organización genética de esos *clusters* en otros microorganismos.

5.1. Organización genética del *cluster hinEABCD (hin1)*.

La secuencia del cluster *hin1* en *P. putida* U se muestra en la **Figura 31**. Este *cluster* está formado por los genes *hinA*, *hinB*, *hinC*, *hinD* y *hinE*, y se refleja la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican, cuyas funciones se describirán en los sucesivos apartados.

```

1  TGCCTGCTCAACATGCGCCGTATCACACGGCGTCGCGGCTGTTACGCCATCGAGCAACCGCGCAATCCCCAGCG
   ACGGACGAGTTGTACGCGGCATAGTGTGCCGACGCGCCACAAGTGGGTAGCTCGTTGGCGCGTTAGGGGTCCG
-2  V A D R S N V G D L L R A I G L P

76  GGTAGCGTTTTTCAATGCATCCGGCAGCAGTGCATCGGGTAGTCTGGAAGCACACCGGGCGCAGGAAGCGGT
   CCAATCGCAAAAAGTTACGTAGGCCGTCGTCACGTAGCCCCATCAAGACCTTCGTGTGGCCCGCGTCTTCGCCA
-2  N A N K L A D P L L A D P Y N Q F C V P R L F R D

151  CGATGGCCAAGGTACCGACCGAGGTGCCGCGTGCCTCGGAGGTGGCCGGTAAGGCCCGCCATGCACCATTGCAT
   GCTACCGGTTCCATGGCTGGCTCCACGGCGCACGCACCTCCACCGGCCATTCCGGGCGGTACGTGGTAACGTA
-2  I A L T G V S T G R A D S T A P Y P G G H V M A D

226  CGGAAACCTCCACACCGGTGCGGTAGCCGTTGAGCAGCAGGCGCCCGGCCTTGCCTCCAGCAACGGCACGAGCG
   GCCTTTGGAGGTGTGGCCAGCCCATCGGCAACTCGTTCGTCGCGGGCCGGAACGCGAGGTGTTGCGGTGCTCGC
-2  S V E V G T P Y G N L L L R G A K R E L L P V L S

301  AGGCGAAGCGCGTAGGTTCATCAGGCTCGGCAATCAGCGTGGCGGTGAGTTGCCCTTGCAGGTGGCGCAGCGCTT
   TCCGCTTCCGCGCATCCAGTAGTCCGAGCCGTTAGTTCGACCCGCGAGTCAACGGGAACGTCACCGCGTCCGCAA
-2  A F A R L D D P E A I L T A T L Q G Q L H R L A E

376  CGGCCAGTTGCTCGGCGTCGGCCACCTCCACCACTACGGTGGTTCGGGCCGAATACTTCTTCTTGCAGCAGCGGGT
   GCCGGTCAACGAGCCGAGCCGGTGGAGGTGGTGTATGCCACCAGCCCGGCTTATGAAGAAGGACGTCGTCGCCCA
-2  A L Q E A D A V E V V V T T P G F V E E Q L L P D

451  CGCCGTTACGACGAGGCTTACGTCTGCCTTGAACAGCTGTGGCTGGGCCTGGTTGCCGTTGTGTGGCTGCCCGG
   GCGCAAGTCGTCGTCGCAATGCAGACGGAAGTGTGACACCCGACCCGGACCAACGGCCACACACCGACGGGCC
-2  G N L L L S V D A K F L Q P Q A Q N G T H P Q G A

526  CCAGGTGCTGGATAACCGGTTGCGCCAGCAGGTGCTGCACACCGTTCTGGTAGCTGCGCAGGGTACCGGCGTTCA
   GGTCCACGACCTATGGGCCACGCGGTCGTCACGACGTGTGGCAAGACCATCGACGCGTCCCATGGCCGCAAGT
-2  L H Q I G P H A L L H Q V G N Q Y S R L T G A N L

601  GCATGGTCTGCGGGCCCTGGTTCGGCCATGTGTGCCACCAGCGTTTGCACGAAATGCTCGAATTGCGGCGACTGGA
   CGTACCAGACGCCCCGGGACGACCGGTACACACGGTGGTTCGCAAACGTGCTTACGAGCTTAACGCGCGTACCT
-2  M T Q P G Q D A M H A V L T Q V F H E F Q P S Q I

676  TGCCACCACCAGGCCAGGTTGGTGCAGAACTGGCCGCAACCCATCACCACCGAGGCAGCCAGTTCGCCCGGCTA
   ACGGGTGGTGGTCCCGTCCCAACCACGCTTGTACCGGCGTGGGTAGTGGTGGCTCCGTCGGTCAAGCGGCGGAT
-2  G V V L G P N T C F Q G C G M V V S A A L E G A V

751  CCTGCTCGCCACGGGCTTGCAGCGCTGGGGCAGGACGATCACCAGGATTGATGCTGCTCATTTCGGCAAAATACGG
   GGACGAGCGGTGCCGAACGTCGCGGACCCCGTCTGCTAGTGGCTAACTACGACGAGTAAAGCCGTTTATGCC
-2  Q E G R A Q L A Q P L V I V P N I S S M E A F V P

```

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

826 GGATTGGCTGCGGGCGTGCCGCCCATGTGCGACAGGGCGCGGCCACCGCGCAGCGAGCCGGTGAAACCGACCG
CCTAACCAGCCCCGACGGCGCGGTACAGCGTGTCCCGCGCCGGTGGCGCGTCTCGGCCACTTTGGCTGGC
-2 I P Q P R A A A M D C L A R G G R L S G T F G V A

901 CCTGGATGGCCGGGTGCTTGACCAGCGCTTCGCCACGCCGGCACCGTAGATCAGGTTGAAAAACCCCGCGCA
GGACCTACCGGCCACGAACTGGTCGCGAAGCGGTGCGGCCGTGGCATCTAGTCCAACCTTTGTGGCGCGCGT
-2 Q I A P H K V L A E G V G A G Y I L N F V G A P M

976 TACCGTGTGGCCACCGCGCGGTCAATGGCGCCAGCCACATGGGCGGCAGTAAGCATGTGCCCGCTGTGGGCCT
ATGGCGACACCGGTGGCGCGCCGTTACCGCGGTGCGGTACCGCGCCGTCATTGCTACACGGGGACACCCGGA
-2 G S S A V A R D I A G A V H A A T L M H G S H A K

1051 TGAACACCACCGGGCAGCCAGCGGCCAGCGCGGAGGCGGTGTCCCGCCAGCAGTGGAGAAGGCCAGCGGGAAAGT
ACTTGTGGTGGCCCGTCCGTCGCGGTGCGCGCTCCGCCACAGGGCGGTGCTCACCTTCCCGTCCGCCCTTCA
-2 F V V P C G A A L A S A T D G G A T S F A L P F N

1126 TGCTGGCACCGAACACGGCCACCGGGCCGACGCCGATGCGGTACTGGCGCAGGTCGGACCGCGGCAGCGGGGTAC
ACGACCGTGGCTTGTGCCGCGCGGTGCGGTACGCCATGACCGCTCCAGCCTGCGCCGTCGCCCTATG
-2 S A G F V A V P G V G I R Y Q R L D P R P L P T R

1201 GCTGGGCGAGGCGACGGTTCGATGCGCGCGCGGTAGAAAGTGCCTCGGCGCACACCTCGGCAAACAGGCGCAGCT
CGACCCCGTCCCGTCCAGCTACCGCGCGCGCATCTCAGCGGAGCCGCGTGGTGGAGCGGTTTGTCCGCTCGA
-2 Q P L A R D I R A A Y F D G R R V V E A F L R L Q

1276 GGTGTGCTGGTACGGCTGCGTTTCGCCACGGATGCGGGCTTCGGGCGAGCGCGGTTTCGCGCATCACATGCTGGATGA
CCACGACCATGCCAGCGCAAGCGGTGCTACGCCCGAAGCCCGTCCGCGCAAGCGCGTAGTGTACGACTACT
-2 N S T R S R E G R I R A E P L A T E R M V H Q I F

1351 AGTCGTACCCAGTGCCTCCAGCTCGTTGGCAATGGCGTCGAGGAAAGCGGCACGCTGGGCCGGGCTGGTGTGCTGC
TCAGCAGTGGGTACCGCAGTTCGAGCAACCGTTACCGCAGCTCCTTTCGCGCTGCGACCCGCGCCGACCGAGC
-2 D D G L A D L E N A I A D L F A A R Q A P S T S R

1426 GGTAGGCGGGATAGGCGCGCTCGGCGGCCTGCACGGCAGCCTCTACTTCGTCGCGCGGTGCGCTGGTGGAAAGCGT
CCATCCGCCCTATCCGCGCGAGCCGCGAGTCCGTCGGAGATGAAGCAGCGCCAGCGGACCACTTCCGCA
-2 Y A P Y A A D A A Q V A A E V E D G T A Q H F A Y

1501 AAGGCAGCGGCTCCCGGTGTGGGCGTCGACGCTGTTCAGCAGCACGTCACCGTTGCCGCTGAGTTGGCCGGCGA
TTCCGTCGCGGAGGGCCACCCGCGAGTVCGACAAGTTCGTCGTCAGTGGCAACGCGGACTCAACCGCGCGT
-2 P L P E G G T H A D V S N L L V D G N G S L Q G A I

1576 TATGGTTCAGGCGATGTTTCGATGGACATTTTCGTTTCCCGTTGGCAATGACAGTCTGTCACGGGGACTGTAGGTG
ATACCAAGTCCGCTACAAGCTACCTGTAAGCAAAGGGCAACCGTACTGTCAGCAACGTGCCCTGACATCCAC
-2 H N L R H E I S M **HinE**

1651 GCGAACGGGGGCTGAATAATGATTAATGCGGATCGGGTGATAACGACCAGTTATCACCCAGCGTGTAGCGTCAC
CGCTTGCCCCCGACTTATTACTAATTACGCCTAGCCACTATTGCTGGTCAATAGTGGGTGCGACATCGCAGTG

1726 TCCGCCATCTGCAATTCCGGCAGCTTCACCCGAAACGCGCGGGTACGCCCCATCAGCACCACCAGGCCATGCCC
AGGCGGTAGACGTTAAGGCCGTCGAAGTGGGCTTTGCGCGCCAGTCCGGGTAGTCTGTTGGTCCGGGTACGGG
-1 E A M Q L E P L K V R F A R T L G M L V V L G M G

1801 ATCCAGCACAGGCCGATGGTGAACGACAGGCTGGTTCAGGCTGCTCCACAGCCATAGCGTGTGAGAAAGCCAGG
TAGGTGCTGTCGGCTACCACTTGTGTCGACAGTCCGACAGGTTGCGGTATCGCACGACTCTTTCGGGTCC
-1 M W C L G I T F S L S T L S S W L W L T S L F G L

1876 CCTGGGATGGCGCGTACAGCAGGTAGTTGCGGCCACCGCGCAGTTTCTGGTCCAGCAGATAGTGTGTTGACCACC
GGACCCTACCGCGCATGTCGTCATCAACGCGGTGGCGCGTCAAAGACCAGCTGGTCTATCAGAACTGGTGG
-1 G P I A G Y L L Y N R G G R L K Q D V L Y H K V V

1951 GCCAGGTTACCGCCGAAAAGGCGAACAGCGCGCAAAGCTGATCATGTTGGCCACGGTGTGAGGGTGTATCACC
CGGTCCAAGTGGCGGCTTTTCCGCTTGTGCGCGGTTTCGACTAGTACAACCGGTGCCACAGCTCCCACTAGTGG
-1 A L N V A S F A F L A G F S I M N A V T D L T I V

2026 AGGCGATCAGCGACAGCAGGCTGACCACCAGGATGGCAGTGGCTGGCACGCGTTTTTTTCGTCACCAAGTTGGCCG
TCCCGTGTGTCGTCGTCGACTGGTGGTCTACCGTACCGACCGTGGCGCAAAAAGCAGTGGTCAACCGCG
-1 L A I L S L L S V V L I A T A P V R K K T V L Q G

2101 AACGGCCGCGGCAACGCGCGTTCGCGGCCATGGCGAACAGCAGCGCGCACGCTGGCCTGGGACACCATGGCC
TTGCGCGCGCGTTCGCGCGCAGCGCGGTTACCGCTTGTGTCGCGCGTGTGCGACCGGACCCCTGTGGTACCGG
-1 F P R P L A G D R G M A F L V R S V S A Q S V M A

2176 GAGGCGAAGCAGCCGGCCACGTAGGTGGCAGTGAAGGCCGTTACAGCAGTTCGCGCCGACACGGCGCATCACA
CTCCGCTTGTGCGCGGTGTCATCCACCGTCACTTCCGGCAATGGTTCGTCGTCGCGCGGCTGTGCCGCGTGTGT
-1 S A F C G A V Y T A T F A T V L L E G G V R R M V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2251 TCCACCGAAGCCGAATCCGGGTCGGCGAAGCTGCCCCAGTCGGGGAACACCATCTGCGCGCAGTACGACACCACC
AGGTGGCTTCGGCTTAGGCCAGCCGCTTCGACGGGGTCAGCCCCTTGTGGTAGACGCGCGTCATGCTGTGGTGG
-1 D V S A S D P D A F S G W D P F V M Q A C Y S V V

2326 AGAAACAGCAAGCCGCCGATCAGCGAAACCGCCAGGATCGCCACCAGGAATACGGTAGGTGGGTTGGTCGTTTTCT
TCTTTGTCGTTCCGGCGCTAGTCGCTTTGGCGGTCTAGCGGTGGCCTTATGCCATCCAGCCCAACCAGCAAAGA
-1 L F L L G G I L S V A L I A V P I R Y T P N T T E

2401 TCGGCCATGGTCGAGACGGCATCAAACCCAGGAAGGACAGGCACAGCACGGCAGCGCGGTCATGATCAGCGGC
AGCCGGTACCAGCTCTGCGTAGTTGGGGTCCTTCCTGTCGTGTCGTGCCGTGCGGGCCAGTACTAGTCGCGC
-1 E A M T S V A D F G L F S L C L V A A G T M I L P

2476 ACGCTGAAGCCTTCGTGATGGAAGGGGGCGAGTAGCGACACCGGCTCCGCGTGCCCGCTGAGCTTGAGCAGCGAC
TGCGACTTCGGAAGCACTACTTCCCGGCTCATCGCTGTGGCCGAGGCGCAGGGCGACTCGAACTCGTCCCTG
-1 V S F G E H H F P A L L S V P E A H G S L K L V S

2551 AGGGCGACGAAGACGATGATGAACACCAGTTGCACCACTACCAGGATCCAGTTGACCCGGGTGATGGACTCGATG
TCCCGCTGCTTCTGCTACTTGTGGTCAACGTGGTGTAGTTCCTAGGTCAACTGGGCCACTACTGAGCTAC
-1 L A V F V I I F V L Q V V V L I W N V R T I S E I

2626 CCGATCAGGTTGAGGAAGGTGACCAGGGCAATTGAGCCTGCCACCCACACCAGGCGTGGATAGCCGGGAAGTAT
GGCTAGTCCAACTCTCCACTGGTCCCGTTAACTCGGACGGTGGGTGTGGGTCCGACCTATCGGCCCTTCATA
-1 G I L N L F T V L A I S G A V W V W A H I A P F Y

2701 TCCGACATGTAGATGCCGATCAGCAGGTAGCTGAGCAGCGGCAGGAAGATGTAGTCGAGCAGCAGTGTCCAGCCG
AGGTGTACATCTACGGCTAGTCGTCATCGACTCGTCGCGCTCCTTCTACATCAGTCTGTCACAGGTCCGGC
-1 E S M Y I G I L L Y S L L P L F I Y D L L L T W G

2776 GTAATAAAGCCGATGTGGCTGCCGAAGGCCCTTGCGCGTATAGGTGTAGACCGAGCCGAGTAGGGGTGGCCCTGA
CATTATTTCCGGCTACACCGACGGCTTCGGGAACGGCATAATCCACATCTGGCTCGGCCTCATCCCCACCCGACT
-1 T I F G I H S G F A K R T Y T Y V S G S Y P H A Q

2851 ACCATGCGGCCGTAGCTGTAGGCAGTCAGCAGCATGGCGCGAGGGTGAGCAGGTAGGCGGTGGGCAGGTGCCCT
TGGTACGCCGGCATCGACATCCGTCAGTCGTACCGCGCTCCCACTCGTCCATCCGCCACCCGTCACGGGA
-1 V M R G Y S Y A T L L M A A L T L L Y A T P L H G

2926 TTGGTCATCTGGGTGACCAGCCCGTAGGTGGTGAATACGGCCAGGGGCACCATGTAGGCCAGGCCGAACAGGACC
AACCAGTAGACCCACTGGTCGGGCATCCACCACTTATGCCGGTCCCGGTGATACATCCGGTCCGGCTGTCTCTGG
-1 K T M Q T V L G Y T T F V A L P V M Y A L G F L V

3001 AGGGCAGTCAGCCCATGGACTTGCGGAAGCGGCCGGTGTGGCGCAGGGATGCGCGCGGTGTATGTGAGGGG
TCCCGTCAGTCGGGTACTTGAACGCCTTCGCGGCCACAACCGGTCCTACGCGCCGCCACAGTACACTCCCC
-1 L A T L G M S K R F R G T N A C P H A A T D H S P

3076 CTATGGGCTGACTTGTGTTGTATGCATTGCTAACTCCTGGAAGGGGATGCAAGACACCGCGGTACGCGAGCAG
GATACCCGACATGAACAACAACATACGTAACGATTGAGGACCTTCCCTACGTTCTGTGGGCCATGCGCTCGTC
-1 S H A T S T T T H M **HinA**

3151 GCTCGTTACCGGTGGGTGAAGTGCAAGGAGTTCGAGCGGAAGGCTCGCAGCGCTGGGGCGGGTTGATGCTCCAC
CGAGCAATGGCCACCCACTTCACGTTCTCCAGCTCGCCTTCCGAGCGTCGCGACCCCGCCCAACTACGAGGGTG

3226 ACCCTGCAGGTACCCGGAATCACCTTTGGGGTGAGCGGTACAGCCTTGCCCGGCTCACCCCAAAGGGTGATTT
TGGGACGTCATGGGCCTTAGTGGGAAACCCACTCGCCCATGTGCGAACGGGGCCAGTGGGGTTTCCCACTAAA

3301 CGGCGTCTGCGGTGGCGTGGGAGTATCTGGTCAACAACGCACCGCACTGGCGGGGTGCCACTGAATAGAAACGG
GCCGACAGCCACCGCACCTCATAGACCAGTTGTTGCGTGGCGTGACCGCCGCCACGGTGACTTATCTTTGGC
+2 **HinB** V T N Q L L S E Q W F E H L A K V T E A I G

3376 CAGGCCACAGTACTAATCAATTGCTTTTTCAGAACAGTGGTTCGAGCACCTGGCCAAGGTACCGAGGCAATCGG
GTCCGGGTGCTACTGATTAGTTAACGAAAGTCTTGTACCAAGCTCGTGGACCGGTTCCAGTGGCTCCGTTAGCC
+2 R P G F A A N L F A A L G V I R P I Q A T T V Y L

3451 CCGACCGGGCTTTGCCGCTAACCTGTTTTCGCGCACTTGGCGTTATCCGGCCGATCCAGGCGACCGGTGTACCT
GGCTGGCCCCGAAACGGCGATTGGACAAACGGCGTGAACCGCAATAGGCCGGCTAGGTCCGCTGGTCCACATGGA
+2 Y P H D G M P C A L F E Q D D K A P W Q P E G N V

3526 GTACCCGACGACGGCATGCCTTGTGCGCTGTTTCGAGCAGGACGACAAGGCGCCCTGGCAGCCTGAGGGCAATGT
CATGGGCGTGTGCGGTACGGAACACGCGACAAGCTCGTCTGCTGTTCCGCGGGACCGTCCGACTCCCGTTACA
+2 S R Y L S G F Y L L D P F Y G A C V E Q V A S G C

3601 CAGCCGCTACTTGTCCGGCTTCTACCTGCTCGACCCGTTTACGGTGCCTGTGTGGAGCAGGTAGCGTCCGGGTG
GTCGGCGATGAACAGGCCGAAGATGGACGAGCTGGGCAAGATGCCACGGACACACCTCGTCCATCGCAGCCCCAC
+2 Y G L F E V A P D H F E V S E Y Y Q S F Y R H S H

3676 CTATGGGTTGTTTCAAGTGGCACCCGACCATTTTCAGGTCAGCGAGTATTACCAGTCGTTCTACCGGCACTCGCA
GATACCCAACAAGCTTACCGTGGGCTGGTAAAGCTCCAGTCGCTCATAATGGTCAGCAAGATGGCCGTGAGCGT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

+2 L E D E L N Y I L Q V A P G Q S L A V S L A F T D
3751 CCTGGAGGATGAGCTCAACTACATCCTGCAGGTTGCGCCGGGGCAGAGCCTGGCGGTGTCGCTGGCGTTCCACCGA
GGACCTCTACTCGAGTTGATGTAGGACGTCCAACGCGGCCCTCTCGGACCGCCACAGCGACCGCAAGTGGCT

+2 K L D A H T R E L Y G R I T P W V L A V L S K H F
3826 CAAGCTGGATGCACACACCCGCGAGCTGTACGGGCGCATCACGCCTTGGGTGCTGGCGGTGCTGAGCAAGCACTT
GTTGACCTACGTGTGTGGGCGCTCGACATGCCCGGTAGTGCGGAACCCACGACCGCCACGACTCGTTTCGTGAA

+2 A G L D S R A A R F E N I L E Q R I H A A L N N F
3901 CGCCGGGCTGGACAGCCGCGCGCGCTTCGAGAACATCCTCGAACACGCATCCACGCGCGCTGAACAACTT
GCGGCCGACCTGTGCGGCGGCGCGGAAGCTCTGTAGGAGCTTGTTCGCTAGGTGCGGCGGACTTGTGAA

+2 G S S L L T E R E C R I A Q L I L R G H S T K S L
3976 CGGAGCTCGTGTGACCGAGCGTGAATGCCGTATCGCCAGTTGATCCTGCGTGGCCACTCGACCAAGTCGCT
GCCGTCGAGCGACGACTGGCTCGCACTTACGGCATAGCGGGTCAACTAGGACGCACCGGTGAGCTGGTTCAGCGA

+2 A E R L G V S E D T I K S H R K N V Y A K L D I G
4051 GGCCGAGCCCTGGGGGTGTCGGAAGACACCATCAAGTGCACCCGCAAGAACGTCTACGCCAAGTCGACATCGG
CCGCTCGCGGACCCACAGCCTTCTGTGGTAGTTCAGCGTGGCGTCTTTCGAGATGCGGTTTCGAGCTGTAGCC

+2 T Q S E L F S L F I D A L A N A Q G V L G K D P L
4126 TACCAGTCCGAGCTGTTTTCCCTGTTTCATCGACGCGCTGGCCAATGCCAGGGGCTGCTGGGCAAGGACCCGCT
ATGGGTACGGCTCGACAAAAGGGACAAGTAGCTGCGCGACCGGTTACGGGTCCCGCACGACCCGTTCTTGGGCGA

+2 E S Y M G K L R █ **HinC** M N
4201 GGAAAGCTACATGGGCAAGCTGCGCTGAGCGCGGCCACCTGCAACCCACCGCAAGGAAAACCAACAATGAA
CCTTTCGATGTACCCGTTTCGACGCGACTCGCGGCCGGTGGGACGTTGGGGTGGCGTTTCCTTTTGGTTGTTACTT

+2 A P F A P Q R Q T R D Y Q A A D A A H H I H A F L
4276 TGCGCCTTTTCGCCCCGCAACGCCAGACCCGCGACTACCAGGCGCGATGCCGCGACCATATCCATGCCTTCCT
ACCGGAAAAGCGGGCGTTCGCGTCTGGGCGCTGATGGTCCGTCGGCTACGGCGCGTGGTATAGGTACGGAAGGA

+2 D Q K A L N A E G P R V I V G G E R L H L W D S E
4351 CGACCAGAAGCGTGAATGCCGAAGGGCGAGGTTGATCGTGGTGGGCAACGCCTGCACCTGTGGGACAGCGA
GCTGGTCTTCCGCGACTTACGGCTTCCCGCTCCCACTAGCAGCCACCGCTTGGCGACGTGGACACCCCTGTCGCT

+2 G K R Y L D G M S G L W C T Q L G Y G R R D L T V
4426 GGGCAAGCGCTACCTGGATGGCATGTCTGGCCTGTGGTGCACCCAGCTCGGCTACGGGCGCGCGACTGACTGT
CCGTTTCGCGATGGACCTACCGTACAGACCGGACACCACGTTGGTTCGAGCGATGCCCGCGCGCTGGACTGACA

+2 A A A T Q M D Q L A Y Y N M F F H T T H P A V I E
4501 CGCTGCCGCCACGCAGATGGACCAGCTGGCGTACTACAACATGTTTTTCCACACCACCCACCGGGGCTGATCGA
GCGGCGCGGTGCGTCTACCTGGTCGACCGCATGATGTTGTACAAAAAGGTGTGGTGGGTGGGCCGCCACTAGCT

+2 L S E L L F S L L P G H Y S H A I Y T N S G S E A
4576 ACTGTCCGAGCTGCTGTTTCAGCCTGTGCCCCGGCCACTACAGCCAGCGATCTACACCAACTCAGGCTCTGAAGC
TGACAGGCTCGACGACAAGTCGGACGACGGCCGGTGTGTCGGTGCCTAGATGTGGTTGAGTCCGAGACTTCCG

+2 N E V L I R T V R R Y W Q V V G Q P N K K V M I G
4651 CAACGAAGTGTGATCCGTACCGTACCGCGCTACTGGCAAGTGGTGGGCGAGCCGAAACAAGAAGGTGATGATTG
GTTGCTTCAACAATAGGCATGGCATGCGGCGATGACCGTTCCACAGCCCGTCCGCTTGTTCCTTCCAGTACTAACCC

+2 R W N G Y H G S T L A A T A L G G M K F M H E M G
4726 CCGCTGGAACGGTTACCACGGCTCGACCTGGCGGCCACGGCGCTGGGCGGCATGAAGTTCATGCACGAAATGG
GGGACCTTGCCAATGTTGCCAGCTGGGACCGCCGGTGGCGGACCCGCGTACTTCAAGTACGTGCTTTTACCC

+2 G L I P D V A H I D E P Y W Y A E G G E L T P A E
4801 CGGGCTGATCCCGATGTGGCGCACATCGACGAACCGTACTGGTACGCCGAGGTTGGCGAGCTGACCCCGGCCA
GCCCAGTACGGGCTACACCGGTGTAGCTGCTTGGCATGACCATGCGGCTCCCAACCGCTCGACTGGGCGCGCT

+2 F G R R C A L Q L E E K I L E L G A E N V A G F I
4876 GTTCCGCGCGCTGCGCCTTGCAGCTGGAGGAAAAATCCTCGAACTGGGCGCGGAGAACGTTGCCCGCTTTAT
CAAGCCGGGCGGACGCGGAACGTGACCTCCTTTTTTAGGAGCTTGACCCGCGGCTCTTGCACGCGCCGAAATA

+2 A E P F Q G A G G M I F P P E S Y W P E I Q R I C
4951 CGCCGAGCCGTTCCAGGGCGCAGGCGGCATGATCTTCCCGCCGAAAGCTACTGGCCGAAATCCAGCGCATCTG
GCGCTCGGCAAGGTCCCGCTCCGCGTACTAGAAAGGGCGGCTTTCGATGACCGGCCTTTAGGTCGCGTAGAC

+2 R Q Y D V L L C A D E V I G G F G R T G E W F A H
5026 CCGCAGTACGACGTGCTGTTGTGCGCCGATGAGGTGATGGTGGCTTTGGCCGACCGGCGAGTGGTTTCCCA
GGCGGTCTGCTGCACGACAACACGCGGCTACTCCACTAACCCAGAAACCGGCGTGGCCGCTCACCAACGGGT

+2 E Y F G F E P D T L S I A K G L T S G Y V P M G G
5101 TGAATACTTCGATTCGAGCCCGACCCCTGTCGATCGCAAGGGCCTGACCAGCGGCTATGTGCCATGGGGTGG
ACTTATGAAGCCTAAGCTCGGGCTGTGGGACAGCTAGCGGTTCCCGGACTGGTTCGCGATACACGGGTACCCACC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

+2 L V L S K R I A E A L V E R G G V F A H G L T Y S
5176 CCTGGTGTGAGCAAGCGCATTGCCGAGGCGCTGGTGGAACTGGCGGGGTGTTTGCCACGGCCTGACCTATTC
GGACCACGACTCGTTCGCGTAACGGCTCCGCGACCACCTTGCACCGCCCCACAAACGGGTGCCGGACTGGATAAG

+2 G H P V A A A V A I A N L K A L R D E G I V T Q V
5251 CGGCCACCCGGTGGCGGGCGGTGGCGATTGCCAACCTGAAGGCGCTGCGCGACGAAGGCATCGTACCCAGGT
GCCGGTGGGCCACCGCCCGCCACCGCTAACGGTTGGACTTCCGCGACGCGCTGCTTCCGTAGCAGTGGGTCCA

+2 K D D T G P Y L Q R I L R E V F A D H P L I G Q V
5326 GAAGGATGACACCGGGCCGTACCTGCAGCGCATCCTGCGCGAGGTGTTCCGCGACCACCCGTTGATCGGCCAGGT
CTTCTACTGTGGCCCGCATGGACGTGCGGTAGGACGCGCTCCACAAGCGGCTGGTGGCAACTAGCCGGTCCA

+2 Q G A G L V A A L Q F A E H K P T R K R F A N E N
5401 GCAGGGCGCCGGTGGTGGCAGCGTTGCAGTTCGCGGAGCACAAGCCGACGCGCAAACGCTTCGCCAACGAGAA
CGTCCCGCGGCCAACACCGTCGCAACGTCAAGCGGCTCGTGTTCGGCTGCGCGTTTGCGAAGCGGTGTGCTCTT

+2 D L A W Q C R T F G F E E G V I I R S T L G R M I
5476 CGACCTGGCCTGGCAATGCCGCACTTTTGGTTTCGAGGAAGGCGTGATCATTCCGCTCGACCCTGGGCCGGATGAT
GCTGGACCGGACCTTACGGCGTGAACCAAGCTCCTTCCGCACTAGTAAGCGAGCTGGGACCCGGCCTACTA

+2 M A P A L I A N H S E L D E L V E K T R I A V D R
5551 CATGGCGCCGGCCTTGTATCGCAACACAGCGAGCTGGATGAGCTGGTAGAGAAAACCCGATTGGCCGTGGACCG
GTACCGCGCCGGAACTAGCGGTGGTGTGCTCGCTCGACCTACTCGACCATCTCTTTGGGCGTAACGGCACCTGGC

+2 T A R L V G K L ■
5626 CACCGCTCGGTTGGTTGGCAAGCTCTAAGCCGTTGCCAAGGGCAACCCGTTTCCCCTGTGGGAGCGGGCATGCC
GTGGCGAGCCAACCAACCGTTTCGAGATTCGGCAACGGTTCCCGTTGGCCAAAGGGGACACCCTCGCCGTACGGG

5701 GCAAACACCGGCGAAGCCGGTGCATCCTTCGTGTGCGCTGATTTCGCGGGCACGCCGCTCCCACAGAGGAGGCG
CGTTTGTGGCCGCTTCGGCCACGGTAGGAAGCACAGCGGACTAAGCGCCGTCGCGGGCAGGGTGTCTCCTCCGC

+3 **HinD**
5776 CGGCGCGCTGCGGACTGTGTGGTACCTGTTACTTCCGCAAAAATGATCGCCACTGCGGTGCGCTGGAGTACAAA
GCCGCGCAACGCCTGACACACCATGGACAATGAAGCGTTTTTTACTAGCGGTGACGCCAGCGGACCTCATGTTTT

+3 M Y T L E F W Q Q R A S D L Y L P S Q A L I N G K
5851 TGTACACCTCGAATTCTGGCAACAACGCGCCTCGGACCTGTACCTGCCATCCCAGGCGTGATCAACGGCAAAC
ACATGTGGGAGCTTAAGACCGTTGTTGCGCGGAGCCTGGACATGGACGGTAGGGTCCGCGACTAGTTGCCGTTTTG

+3 P V N A Q D G A T F A A I N P A T N T V L A Q V A
5926 CCGTCAACGCACAGGATGGCGCCACGTTCCGCGCCATCAACCCCGCAACCAACCCGTAAGTGGCCAGGTGCGTG
GGCAGTTGGGTGTCTTACCAGCGGTGCAAGCGCGGTAGTTGGGGCGTTGGTTGTGGCATGACCGGGTCCAGCGAC

+3 A C G Q A E V D L A V A S A R R A F E Q G V W P R
6001 CCTGCGGCAAGCCGAGGTGCGACCTTGCCTGGCCAGCGCACGTCGGGCTTCGAACAAGGCGTGTGGCCGCGCA
GGACGCCGTTTCGGCTCCAGCTGGAACGGCACCGGTGCGGTGCAGCCCGGAAGCTTGTTCGCGAGACCGGCGGT

+3 M A P G E R K K V L L R L A E L I M A H R E E L A
6076 TGGCCCCAGGCGAGCGCAAGAAGTGTGCTGCTGCGCTGGCCGAGCTGATCATGGCCATCGCGAAGAAGTGGCAT
ACCGGGTCCGCTCGGTTCTTCCACGACGACGCGGACCGGCTCGACTAGTACCGGGTAGCGCTTCTTGACCCTGA

+3 L L D S L N M G K P V V D A Y N I D V P G S A H V
6151 TGCTTACTCGCTGAACATGGGCAAGCCGGTGGTGGACGCTACAAATCGACGTGCCGGGCTCGGCCATGTGT
ACGAACTGAGCGACTTGTACCCGTTCCGGCCACCCTGCGGATGTTGTAGCTGCACGGCCCGAGCCGGGTACACA

+3 F A W Y G E A L D K L Y D Q V A P T A A N A L A T
6226 TCGCTGGTACGGCGAGGCGCTGGACAAGCTGTATGACAGGTGGCGCCACTGCTGCCAATGCGTGGCTACCA
AGCGGACCATGCCGCTCCGCGACCTGTTGACATACTGGTCCACCGGGGTGACGACGGTTACGGCACCGATGTT

+3 I T R E A L G V V A A V V P W N F P L D M A A W K
6301 TCACCCGGAAGCCCTCGGCGTGGTTCGCTGCCGTTGGTGCATGGAACCTTCCCGCTCGACATGGCCGCTGGAAGC
AGTGGGCGCTTCGGGAGCCGACACGCGACCGGACCGGTTACCTTGAAGGGGAGCTGTACCGGCGGACCTTCG

+3 L A P A L A A G N S V V L K P A E Q S P F S A L R
6376 TCGCCCCGCGCTGGCTGCCGTTAACAGCGTGGTGTCAACCTGCTGAACAATACCGTCTCGGCCCTGCGCC
AGCGGGGCGCGACCGACGGCCATTGTGCGACACGAGTTTGGACGACTTGTAGTGGCAAGAGCCGGGACCGGG

+3 L A Q L A L E A G V P E G V L N V V P G L G E Q A
6451 TGGCCAGCTGGCCTGGAAGCCGGTGTGCCGGAAGGCGTGCTGAACGTTGGTGCCTGGCTGGGCGAGCAGGCTG
ACCGGGTTCGACCGGACCTTCCGGCCACAGGCTTCCGCGACTTGCACCAGGACCGAACCCGCTCGTCCGAC

+3 G Q A L G L H P D V D C L V F T G S T Q V G K Y F
6526 GGCAGGCGTGGGCTGCATCCGATGTGGATTGCTGGTGTTCACCGGCTCCACCCAGGTGGGCAAGTACTTCA
CCGTCCGCGACCCGGACGTAGGCTACACCTAACGGACCAAGTGGCCGAGGTGGGTCCACCCGTTTCATGAAGT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

```
+3 M Q Y S A Q S N L K Q V W L E C G G K S P N L V F
6601 TGCAGTACTCGGCGCAGTCCAACCTCAAGCAGGTGTGGCTGGAGTGTGGCGGCAAGAGCCCCAACCTGGTGTTCG
ACGTCATGAGCCCGCTCAGGTTGGAGTTCGTCCACACCGACCTCACACCCCGTTCTCGGGGTTGGACCACAAGC

+3 E N C Q D L D L A A E K A A F G I F F N Q G E V C
6676 AAACTGCCAGGACCTGGACCTGGCGGCGGAAAAGGCCGATTCGGTATTTTCTTCAACCAGGGCGAGGTGTGT
TTTTGACGGTCTCGACCTGGACCGCCGCTTTTCCGGCGTAAGCCATAAAAAGAAGTTGGTCCCCTCCACACAA

+3 S A N S R L Y V Q R S I H D E F V E R L Q A K A R
6751 CGGCCAACTCGCGGCTGTACGTGCAGCGCTCCATCCATGACGAGTTTGTGAGCGCCTGCAAGCCAAAGCCCGCC
GCGGTTGAGCGCCGACATGCACGTGCGGAGGTAGGTACTGCTCAAACAGCTCGCGGACGTTCCGTTTCGGGCGG

+3 Q W L P G N P L D P A S R A G A I V D A E Q T G R
6826 AGTGGTTGGCCGGCAACCCGCTGGACCCGCGGAGCCGTGCTGGTGCATTTGTGATGCCGAACAAACCGGCGCG
TCACCAACGGCCCGTTGGGCGACCTGGGCGCTCGGCACGACACCGGTAACAGCTACGGCTTGTTCGGCCGCGT

+3 I E A A I V R A G Q E G A R L V C G G R R L T I E
6901 TCGAAGCCGCCATTTGTGCGCGCCGGGCAAGAGGGCGCACGGTTGGTGTGTGGCGGTCGGCGCCTGACCATCGAAG
AGCTTCGGGGTAACACGCGCGCCGCTTCTCCCGGTGCCAACACACACCCGCGAGCCGCGGACTGGTAGCTTC

+3 G A D N Y I E P T I F A G V H G R M S L A R E E V
6976 GGGCGGACAACATACATCGAGCCGACAATTTTGGCCGGTGTCCATGGCCGCATGAGCCTGGCGCGGGAGGAAGTGT
CCCGCCTGTTGATGTAGCTCGGCTGTTAAAAACGGCCACAGGTACCGGCGTACTCGGACCGCGCCCTCCTTCA

+3 F G P V L A I S A F D T E E E A V R L A N D S I Y
7051 TCGGGCCGGTGTGGCAATCAGCGCCTTCGACACGGAAGAAGAGCGGTGCGCCTGGCCAACGACAGTATCTATG
AGCCCGGCCACGACCGTTAGTCGGGAAGCTGTGCCTTCTTCTCGCCACGCGGACCGGTTGCTGTCATAGATAC

+3 G L A A S V W S D D F N Q V H R V A R A L K A G T
7126 GCCTGGCGGCTTCGGTGTGGAGCGATGACTTCAACCAGGTGCACCGGTTAGCGCGGGCGTTGAAAGCCGGTACCC
CGGACCGCCGAAGCCACACCTCGCTACTGAAGTTGGTCCAGTGGCCCATCGCGCCCGCAACTTTCGGCCATGGC

+3 V S V N T V D A L D V T V P F G G G K Q S G F G R
7201 TGTCTGTGAACACGGTAGACGCGCTGGATGTGACGGTGCCTTTCGGCGGTGGCAAGCAGTCGGGGTTTCGGGCGG
ACAGACACTTGTGCCATCTGCGCGACCTACACTGCCACGGAAAGCCGCCACCGTTTCGTCAGCCCCAAGCCCGCGC

+3 D L S L H S F D K Y S Q L K T T W Y Q L R G ■
7276 ACCTGTCTGTCATTCGTTTCGATAAGTATTCGCAGCTCAAGACCACCTGGTACCAGCTGCGCGGCTGATATCACC
TGACAGCAACGTAAGCAAGCTATTCATAAGCGTTCGAGTTCGTTGGTGGACCATGGTTCGACGCGCCGACTATAGTGG
```

Figura 31. Secuencia de nucleótidos del *cluster hin1* donde se localizan los genes *hinA*, *hinB*, *hinC*, *hinD* y *hinE*, así como la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican cada uno de esos genes.

5.1.1. Transporte de histamina.

5.1.1.1. Gen *hinA*.

Como ya se ha indicado, mediante mutagénesis con el transposón Tn5 se obtuvieron diversos mutantes incapaces de degradar la histamina y que no acumulaban ningún intermediario. En estos siete mutantes se identificó el punto de inserción del transposón siguiendo los protocolos descritos en los apartados 10.1.1 y 10.1.2 de Materiales y Métodos. Comprobamos que en todos ellos se había interrumpido el gen *hinA* (**Tabla 12**) y por ello los hemos denominado *P. putida* U Δ *hinA::Tn5*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes *P. putida* U Δ hinA::Tn5.

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinA</i>	
Mutante 4, 23	3076 CTATGGGCTGTACTTGTGTGTT Tn5 GTATGCATTGCTAACTCCTGGAAGGGGATGCAAGACACCGCGGTA GATACCCGACATGAACAACAA Tn5 CATAACGTAACGATTGAGGACCTTCCCCTACGTTCTGTGGCGCCAT -1 S H A T S T T T H M
Mutante 10, 58	2776 GTAATAAAGCCGATGTGGCTGCCGAAGGCCTTGC CGGTATAGGTGTAGAC Tn5 CGAGCCGGAGTAGGGG CATTATTTTCGGCTACACCGACGGCTTCCGGAACGCGCATATCCACATCTG Tn5 GCTCGGCCTCATCCCC -1 T I F G I H S G F A K R T Y T Y V S G S Y P
Mutante 24, 44	2551 AGGGCGACGAAGACGATGATGAACAG Tn5 CAGTTGCACCCACTACCAGGATCCAGTTGACCCGGGTGATG TCCCGCTGCTTCTGCTACTACTTGTG Tn5 GTCAACGTGGTGATGGTCCCTAGGTCAACTGGGCCACTAC -1 L A V F V I I F V L Q V V V L I W N V R T I
Mutante 60	2251 TCCACCGAAGCCGAATCCGGGTCGGCGAAGCTGCCCCAGTCGGGGAACACCATCTGCGCG Tn5 CAGTAC AGGTGGCTTCGGCTTAGGCCAGCCGCTTCGACGGGGTCAGCCCCTTGTGGTAGACGCGC Tn5 GTCATG -1 D V S A S D P D A F S G W D P F V M Q A C Y

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 31**.

Con el fin de determinar si la incapacidad de *P. putida* U Δ hinA::Tn5 para crecer en MMh, se debía a la alteración de la secuencia de este gen *hinA* tras la inserción del transposón, o si se debía a un efecto polar causado por el Tn5 sobre la expresión de algún gen situado corriente abajo de este gen, se llevó a cabo la expresión heteróloga de *hinA* en el mutante *P. putida* U Δ hinA::Tn5. Para ello se procedió a clonar este gen en *trans* siguiendo el protocolo explicado en el apartado 11 de Materiales y Métodos. El primer paso consistió en amplificar el gen *hinA* mediante PCR (**Tabla 13**) y clonarlo mediante los sitios de restricción *ApaI/SacI* en el plásmido pBBR1MCS-3 (pMC) (Kovach *et al.*, 1995). La construcción así obtenida, pMChinA, se transfirió a la cepa mutante *P. putida* U Δ hinA::Tn5 mediante conjugación triparental (Herrero *et al.*, 1990).

Tabla 13. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *hinA* en el mutante *P. putida* U Δ hinA::Tn5.

Nombre del Primer	Secuencia
HinA.F	GCTGGTTGCTGGTGC GGCTGCGTTTCG
HinA.R	GGGCGCTTCTCATCCTGCTCG

La cepa recombinante (*P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pM*ChinA*), en la que el gen *hinA* se expresaba bajo el control del promotor del plásmido, recuperaba su capacidad para crecer en MMh (con un retraso de 6 horas respecto a la cepa control *P. putida* U Δ ::Tn5). Sin embargo, la cepa mutante transformada solamente con el plásmido, seguía sin asimilar la histamina (**Figura 32**). Este hecho ponía de manifiesto que la construcción pM*ChinA* era funcional y que el crecimiento observado en la cepa mutante no se debía a la existencia de información preexistente en el plásmido previa a la clonación del gen *hinA*. Ambas cepas crecían de la misma forma en MM suplementado con ImAA 10 mM o histidina 10 mM (**Figura 32**).

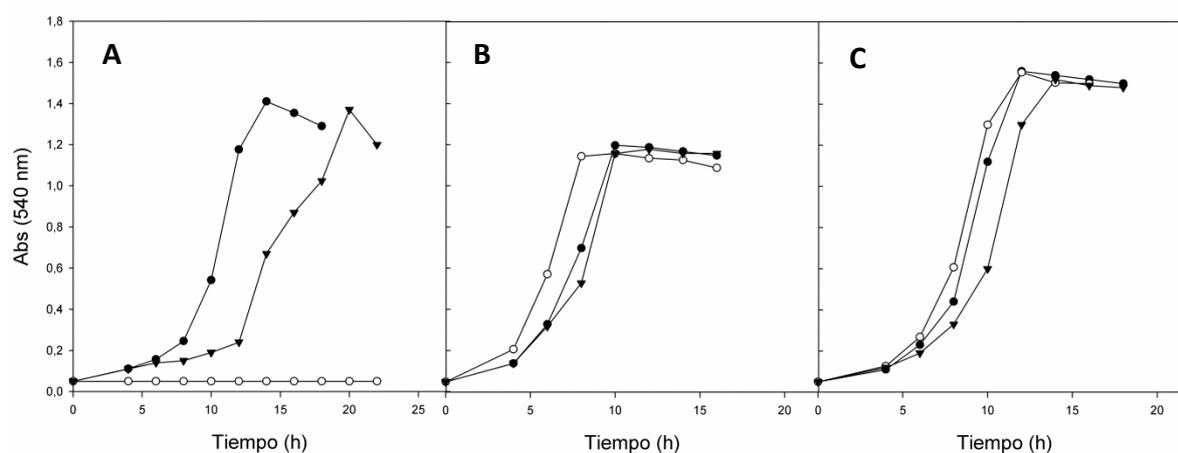


Figura 32. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de *P. putida* U control (●), de *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pMC (○) y de *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pM*ChinA* (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM.

En el caso hipotético de que el gen que codifica la proteína requerida para este paso metabólico, se encontrase inmediatamente corriente abajo de este gen *hinA* (que se encuentra interrumpido por el transposón) y que compartieran ambos el mismo promotor, la expresión heteróloga del gen *hinA* no debería haber conferido a este mutante *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 la capacidad de degradar la histamina. Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que este gen *hinA* codifica una proteína que desempeña una función imprescindible para el catabolismo de histamina y que no se afecta en este mutante ninguna otra función metabólica necesaria para el crecimiento en MM cuando se añaden otras fuentes de carbono tales como histidina o ImAA (**Figura 32**).

La composición, número y secuencia de aminoácidos, peso molecular y punto isoeléctrico de la proteína HinA se indican a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinA																					
MHTTTSTAHSPSHDTAAHPCANTGRFRKSMGL TALVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTKGHLF TAYLLTLAAMLLTAYSYGRMVQAHYPYSGSVYT YTRKAFGSHIGFITGWTLLEDYIFLPLLSYLL IGIYMSEYFPAIHAWVWVAGSIALVTFLNLIG IESITRVNWILVVVQLVFIIVFVALSVLKLSG HAEPVSLAPFHHEGFSVPLIMTGAAVLCLSF LGFDVSTMAEETTNPYRIPVAILAVSLIGG LLFLVVSYCAQMVFPDWGSFADPDSASVDVMS RVGGELLVTAFTATYVAGCFASAMVSQASVSR VLFAMGRDGLPRPFGQLVTKKRVPTAILVV SLLSLIALVITLDTVANMISFGALFAFSAVNL AVVKHYLVDQKLRGGRNYLLYGAIPLGLFLST LWLWSSLTSLSFTIGLCWMMGLVVMGLTRA FRVKLPELQMAE	460 aminoácidos Mw: 49772,98 pI: 9,01 Composición: <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>A 48</td> <td>R 16</td> <td>N 7</td> <td>D 10</td> <td>C 5</td> </tr> <tr> <td>Q 8</td> <td>E 9</td> <td>G 36</td> <td>H 12</td> <td>I 23</td> </tr> <tr> <td>L 68</td> <td>K 9</td> <td>M 18</td> <td>F 27</td> <td>P 19</td> </tr> <tr> <td>S 36</td> <td>T 36</td> <td>W 8</td> <td>Y 18</td> <td>V 47</td> </tr> </table>	A 48	R 16	N 7	D 10	C 5	Q 8	E 9	G 36	H 12	I 23	L 68	K 9	M 18	F 27	P 19	S 36	T 36	W 8	Y 18	V 47
A 48	R 16	N 7	D 10	C 5																	
Q 8	E 9	G 36	H 12	I 23																	
L 68	K 9	M 18	F 27	P 19																	
S 36	T 36	W 8	Y 18	V 47																	

Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de la proteína HinA con otras existentes en la base de datos (NCBI Resource Coordinators, 2017), se observó que tenía homología con diferentes transportadores anotados en esta base de datos como: (i) permeasa perteneciente a un transportador de tipo ABC implicado en la toma de aminoácidos; (ii) como un importador de putrescina y (iii) como un nuevo tipo de transportador denominado PAAT (Probable Transportador de Aminoácidos).

La **Figura 33** muestra la homología existente entre HinA y otros transportadores ABC.

HinA.PpU	MHTTTSTAHSPSHDTAAHPCANTGRFRKSMGLTALVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTK	60
PermABC.H8234	MHTTTSTAHSPPAHDTAAHPGANTGRFRKSMGLTALVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTK	60
PermABC.Pm	MHTTTSTAHSPPASHAPSHPGTNTGRFRKSMGMTALVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTK	60
PermABC.Pf	MNTITNVADTPVHQPTQP-TSSRRFRQPLGLVGLVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTK	59
PermABC.Tb	-----MKTPQPTSGGTRLQRVLGLPSLVLFGLAYMVPLTVFTTYGIVTELTE	47
PermABC.Ro	-----MTVRPGPHNLSDHGPHQHETELKRVLGMPSLVFFGLAYMVPLTVWTTYGVVTTSTE	55
	: .::: :*: .**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* *:	
HinA.PpU	GHLPTAYLLTLAAMLLTAYSYGRMVQAHYPYSGSVYTYTRKAFGSHIGFITGWTLLEDYIF	120
PermABC.H8234	GHLPTAYLLTLAAMLLTAYSYGRMVQAHYPYSGSVYTYTRKAFGSHIGFITGWTLLEDYIF	120
PermABC.Pm	GHLPTAYLLTLAAMLLTAYSYGRMVQAHYPYSGSVYTYTRKAFGSHIGFITGWTLLEDYIF	120
PermABC.Pf	GHLATAYLLTLAAMLLTAYSYGCMVKAHPYSGSVYTYTRKAFGASFGFIAGWTLLEDYIF	119
PermABC.Tb	GHLPGAYVVTLIAMLFATYGYGRMVQAHYPYAGSAYTYAQSFQPHVGFMTGWALMLDYVF	107
PermABC.Ro	GHLPAAYIVTTLAAMLLTAYSYGRMVVAHPRAGSAYAYAKSAFGKAVGFIVGWVLLDYIF	115
	*** **:.* ***:**.* ** ** ** ** :*.*:*:*:*. ** .**:*:*:*:*:*:	
HinA.PpU	LPLLSYLLIGIYMSEYFPAIHAWVWVAGSIALVTFLNLIGIESITRVNWILVVVQLVFI	180
PermABC.H8234	LPLLSYLLIGIYMSEYFPAIHPWVWVAGSIALVTFLNLIGIESITRVNWILVVMQLVFI	180
PermABC.Pm	LPLLSYLLIGIYMSEYFPAIHAWVWVAGSIALVTFLNLIGIESITRVNWILVVAQLVFI	180
PermABC.Pf	LPLLSYLLIGIYLSYFPTVPTAVVVLGSIALVTALNLVIGIESITRVNWVLIQAQLVFI	179
PermABC.Tb	LPMINYLVIIGIYLHEAFPAVPTWVFILAAIILVTGLNVLGIRMVSRMNFILIAVQAIFLA	167
PermABC.Ro	LPMICYLVIGLYMHDFPSIPMMWVIGSVLLTLLNIGIRVIAGVNFIFIAAQVFVIA	175
	:: **:*:*:*: : ***: : : : : *.* ***:** . : : *:*:*:*:* * :*:	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinA. PpU	VFVALSVLKLSGHAEPVSL LAPFHHEGFSVPLIMTGA AVLCLSFLGFDAVSTMAEETTNP	240
PermABC. H8234	VFVALSILKLSGQAEPVSL LAPFHHEGFSAPLIMTGA AVLCLSFLGFDAVSTMAEETTNP	240
PermABC. Pm	VFVALSVLKLNGQAEPVSL LAPFHHEGFNVPLIMTGA AVLCLSFLGFDAVSTMAEETSNP	240
PermABC. Pf	VFVALSIHNLSGQAEPVSL LKPFHHEGFSVPLIMTGA AVLCLSFLGFDAVSTMAEETPDP	239
PermABC. Tb	VFLVLA LR TAAGQPVP-SLTAPFFDGETDFSKI FAGAAILCLSFLGFDAVSTLSEETHDP	226
PermABC. Ro	VFVVL SVRKLGESGVH-SFTTPFLSSGMNVA AVFGGAAI LALSFLGFDAVSTLSEETKNP	234
	:. *: . * : ** . : : * : * . * : * : * : * : * : * : * : *	
HinA. PpU	TYRIPVA I L A V S L I G G L L F L V V S Y C A Q M V F P D W G S F A D P D S A S V D V M R R V G G E L L V T A F T	300
PermABC. H8234	TYRIPVA I L A V S L I G G L L F L V V S Y C A Q M V F P D W G S F V D P D S A S V D V M R R V G G E L L V T A F T	300
PermABC. Pm	TYRIPVA I L A V S L I G G L L F L V V S Y C A Q M V F P D W G S F A D P D S A S V D V M R R V G G E L L V T A F T	300
PermABC. Pf	RRTIPQAI MAVSLIGGLLFLVVS YCAQMVFP EWNSFADPDSASVDVMRRVGGELLVSAFT	299
PermABC. Tb	RRRVPLA IMVATLAGGVIYIVVS YVGH LAF PQWQSFSNVDSASLDVMQHVGGLLTAFFT	286
PermABC. Ro	TVRIPRA I L L C T V L G G A L Y I L E S Y I G H L I F P D Y T L F S S V D V A T V D V M K H V G G D L L N S F F T	294
	: * * : : : * * : : : * * : : : * . * * : : * : * * : * * * : * * * : * * : * *	
HinA. PpU	ATYVAGCFASAMVSQASVSRVLFAMGRD GALPRP-FGQLVT KKRVPATAI L VVSLLSLIA	359
PermABC. H8234	ATYVAGCFASAMVSQASVSRVLFAMGRD GALPRA-FGQLMT KKRVPATAI L VVSLLSLIA	359
PermABC. Pm	ATYVAGCFASAMVSQASVSRVLFAMGRD GALPRA-FGQLVT KKRVPATAI L VVSLMSLIA	359
PermABC. Pf	ATYVAGCFASAMVSQASVSRVLFAMGRD GALPRV-FGKLV TTKRVPANA IMLVSLFLSLIA	358
PermABC. Tb	AAYIAGAFASAMASQASVSRILYAMGRD GVL PKGFFGYLHPRFRNPSRATLAVGVLSLVA	346
PermABC. Ro	AAYVAGCFASALASQASVSRILFAMGRD GVL PKPIFGHLHPRFRTPVVPNI I V G A L G L S A	354
	:. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HinA. PpU	LVITLDTVANMISFGALFAFSAVNLAVVKHYLVDQKLRGGRNYLLYGAI PGLGFLSTLWL	419
PermABC. H8234	LVITLDTVANMISFGALFAFSAVNLAVVKHYLVDQKLRGGRNYLLYGAI PGLGFLSTLWL	419
PermABC. Pm	LVITLDTVANMISFGALFAFSAVNLAVVKHYLVDQKLRGGRNYLLYGAI PGLGFLSTLWL	419
PermABC. Pf	LFISLDTVANMISFGALFAFSAVNLAVIKHYLGDQKLRGTRNYLLYAALPGLGFLSTLWL	418
PermABC. Tb	LVISLELASTMISFGALVAFS FVNLSVIKHYVWDEGRRTAADLFRYGLLPAIGFLLCWL	406
PermABC. Ro	LFISLEKASSMISFGALAAFTFVNLA VIKHYVIDKGKRS PGDLLRYALV PGLGVAFNAYL	414
	:. * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
HinA. PpU	WSSLTSLSFTIGLCWGMGLVVL MGLTRAFRVKLP ELQMAE-----	460
PermABC. H8234	WSSLTSLSFTIGLCWGMGLVVL MGLTRAFRVKLP ELQMAE-----	460
PermABC. Pm	WSSLTSLSFTIGLCWGMGLVVL MGLTKAFRVKLP ELQMAE-----	460
PermABC. Pf	WTSLSGLSFTIGLCWMA LGLLCLLCLTRGFRV RMPDLQMAE-----	459
PermABC. Tb	WTSLSGMTFVVGLSWVGFGFIYLVALTRMFTQRPELRLGEIDLEDEAASVPVAGS--	462
PermABC. Ro	WTSLSGPTFAIGLTWLVAVG VAYLLTLTRGFSRVPDLSMDKADHEGNGDIEVAAQAAR	472
	:. * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura 33. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinA de *P. putida* U y de las proteínas anotadas como permeasas de transportadores ABC en microorganismos, tales como *P. putida* H8234 (H8234), *P. monteilli* (Pm), *P. fluorescens* (Pf), *Thermobispora bispora* (Tb) y *Rhodococcus opacus* (Ro). Los signos de puntuación localizados debajo de las secuencias de aminoácidos indican: (*) los residuos son idénticos, (:) sustituciones conservativas que no afectarían al comportamiento de la proteína, (.) sustituciones menos conservativas y () sustituciones nada conservativas que indican un cambio importante en el aminoácido, ya que son muy diferentes entre ellos. Las líneas entre residuos dentro de las secuencias, representan la ausencia de un aminoácido; esto puede ser debido a un proceso de delección, translocación, etc. 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.

Como se deduce del alineamiento recogido en la **Figura 33**, HinA tiene porcentajes mayores de identidad con permeasas de las especies que pertenecen al mismo género, tales como con las de *P. monteilli* (96%), *P. fluorescens* (82%) y *P. putida* H8234 (98%). En las especies pertenecientes a otros géneros, *Rhodococcus opacus* y *Thermobispora bispora*, el

porcentaje de identidad es mucho menor (aproximadamente del 50%). La característica común de todas estas permeasas y de HinA es la presencia de doce hélices α de transmembrana, identificadas por medio de la aplicación *Phyre2* (**Figura 34**) (Kelley *et al.*, 2015).

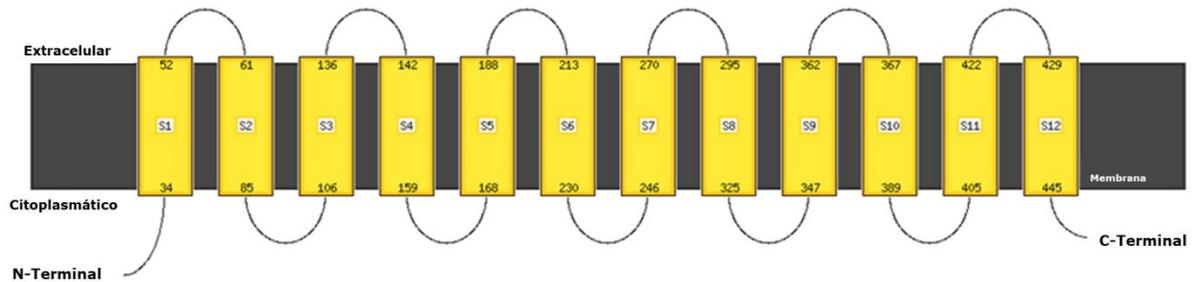


Figura 34. Predicción de la posible estructura secundaria de HinA de *P. putida* U.

Como se ha mencionado, HinA también tiene homología con proteínas anotadas como importadores de putrescina (PuuP) en diferentes microorganismos. El transportador de putrescina de *E. coli* ha sido caracterizado demostrándose que participa específicamente en el transporte de esta molécula (Kurihara *et al.*, 2009). Dentro del género *Pseudomonas*, en *P. aeruginosa*, se ha estudiado la degradación de esta poliamina (Chou *et al.*, 2008; Winsor *et al.*, 2009), mientras que en *P. putida*, aunque no se ha analizado el catabolismo de esta amina, se ha identificado un gen que en *P. putida* KT2440 y en *P. putida* S12, codifica una proteína que ha sido anotada también como importador de putrescina (Nelson *et al.*, 2002; Bandounas *et al.*, 2011). La secuencia de la proteína PuuP de *P. putida* U, identificada por homología con el importador PuuP descrito en *P. putida* KT2440, posee la estructura indicada en la **Figura 35**.

HinA.PpU	MHTTTSTAHS PSHDTAAHPCANTGRFRKSMGLTALVLFGLAYMVPLAVFTTYGLVTQMTK	60
PuuP.PpU	-----MQPDHSASNGQLRKTLRLWHV I I IGLAYLTPMTVFDTFGIVSGITA	47
PuuP.KT	-----MQPDHSASNGQLRKTLRLWHV I I IGLAYLTPMTVFDTFGIVSGITA	47
PuuP.S12	-----MQPDHSASNGQLRKTLRLWHV I I IGLAYLTPMTVFDTFGIVSGITA	47
PuuP.Pa	-----MSNPPPTAERTQLRKSLKLWQ I VMIGLAYLTPMTVFDTFGIVSGISQ	47
PuuP.Ec	-----MAINSPLNIAAQPGKTRLRKSLKLWQVMMGLAYLTPMTVFDTFGIVSGISD	52
	:*:*:*: * :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*	
HinA.PpU	GHLPTAYLLTLAAMLLTAYSYGRMVQAHPSYSGSVYTYTRKAFGSHIGFITGWTL LLDYIF	120
PuuP.PpU	GHVPSAYILALAGILFTAVSYGTLVKRFPQSGSAYTYTQRAINPHVGFVWGSSLLDYLL	107
PuuP.KT	GHVPSAYILALAGILFTAVSYGTLVKRFPQSGSAYTYTQRAINPHVGFVWGSSLLDYLL	107
PuuP.S12	GHVPSAYILALAGILFTAVSYGTLVKRFPQSGSAYTYTQRAINPHVGFVWGSSLLDYLL	107
PuuP.Pa	GHVPTAYLLALAGVLF TAI SYGKLV RQFP TAGSAYTYAQRAINPHVGFVWGSSLLDYLF	107
PuuP.Ec	GHVPASYLLALAGVLF TAI SYGKLV RQFP EAGSAYTYA QKSINPHVGFVWGSSLLDYLF	112
	**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*	

de que la proteína HinA no es un transportador de putrescina, es que el mutante afectado en el gen que codifica este transportador (*P. putida* U Δ hinA::Tn5) crece perfectamente en medios que contienen putrescina como única fuente de carbono (**Tabla 40** correspondiente al apartado 8 de Resultados y Discusión).

La existencia de cierta homología entre el transportador de histamina HinA y el importador de putrescina (PuuP), se debe a que ambos pertenecen a la misma superfamilia proteica de transporte APC (transportadores de Aminoácidos, Poliaminas y Cationes orgánicos). Esta superfamilia está presente tanto en eucariotas como en procariotas. El tamaño de estas proteínas varía entre 350 y 850 aminoácidos, aunque en procariotas suelen ser un poco pequeñas. Se han descubierto 250 miembros dentro de esta superfamilia que funcionan como simporte soluto-cación y antiporte soluto-soluto, y la mayoría poseen también doce dominios de transmembrana (Reig *et al.*, 2007). HinA posee una secuencia conservada que está presente en la familia de proteínas APA (Antiporte Poliamina-Aminoácido) (Jack *et al.*, 2000), siendo [FMVIL]-X(2)-[VCTSAG]-[LIVMA]-[LIVMSAN]-X-[TCLM]-[MFSVIL]-[FW]-[VCGAS]-[FY]-[TDVIL]-G-[WMVIL] -[EAI]-[LBCAS]-[AFVIL]. En la proteína HinA esta secuencia comprende desde el aminoácido 213 hasta el 230 (IMTGA AVLCLSFLGFD AV). Sin embargo, no existen otros aminoácidos que se conservan en todos los miembros de la familia APA, como son un residuo de asparragina (posición 101 en el transportador AdiC y 102 en el transportador PotE en *E. coli*) y un residuo de triptófano (posición 293 en el transportador AdiC y 292 en el transportador PotE en *E. coli*) (Gao *et al.*, 2009; Kowalczyk *et al.*, 2011).

El gen *hinA* también tiene homología con el gen ortólogo de *P. putida* KT2440, el cual está anotado como un supuesto transportador de aminoácidos (PAAP) (Nelson *et al.*, 2002), que también pertenece a la superfamilia APC. La familia PAAP carece de miembros funcionalmente caracterizados, aunque la mayoría de los genes que codifican transportadores de este tipo, se encuentran en *clusters* que codifican enzimas del metabolismo de aminoácidos, tales como proteasas, proteínas de esporulación, aminotransferasas, oxidoreductasas de aminoácidos y oxoácidos y aminoacil-tRNA sintetasas. Además, los transportadores de esta familia suelen poseer diez hélices α de transmembrana (Vastermark *et al.*, 2014). Aunque HinA se encuentra en un *cluster* donde también existe una aminotransferasa, a diferencia de los miembros de esta familia, posee doce hélices α de transmembrana (**Figura 34**).

En resumen, los estudios comparativos nos permiten concluir que aunque este transportador podría pertenecer a la superfamilia de transportadores APC, los datos estructurales de los que disponemos no nos permiten clasificarlo dentro de una de las familias incluidas en esta superfamilia.

- **Caracterización del sistema de transporte de histamina.**

Como hemos visto, el mutante afectado en el transportador (*P. putida* U Δ hinA::Tn5) no crecía en MMh como única fuente de carbono cuando se incubaba durante 20 h. Sin embargo, a partir de las 30 h y hasta las 72 h crece y agota la histamina del medio (**Figura 36**). Este resultado sugiere que la histamina podría ser tomada por otro transportador, aunque fuese de una forma menos eficiente que la dependiente de HinA.

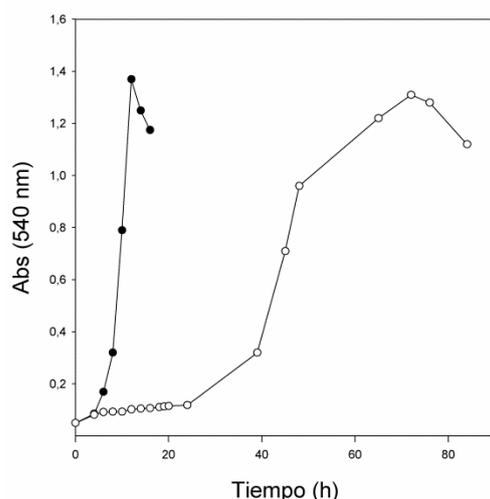


Figura 36. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●) y del mutante *P. putida* U Δ hinA::Tn5 cuando se cultivaban en MMh.

Con objeto de establecer el papel de HinA en el transporte de histamina, estudiamos la toma de 1-³H-histamina (12.54 Ci/mmol, 0.464 TBq/mmol) tanto en *P. putida* U como en el mutante *P. putida* U Δ hinA::Tn5 cultivados en MM que contenía histamina (20 mM) y ácido succínico (40 mM) (MMHS). Este experimento se realizó tal y como se indica en el apartado 17 de los Materiales y Métodos. Como puede apreciarse en la **Tabla 14**, *P. putida* U Δ hinA::Tn5 apenas transportaba histamina (5%), lo que demuestra que HinA es un transportador de histamina. Además, la capacidad de transportar se reestableció cuando se

expresaba en *trans* el gen *hinA* en la cepa *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pMChinA (98%) (**Tabla 14**).

Tabla 14. Estudio del transporte de histamina en el mutante *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pMChinA y en el recombinante *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5 pMChinA cuando ambos se cultivaron en MMHS.

MUTANTE	% Transporte
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinA</i> ::Tn5	5%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinA</i> ::Tn5 pMChinA	98%

El 100% del transporte equivale a 180 pmoles/min.

A continuación, se procedió al estudio de la toma de histamina en la cepa *P. putida* U, y a la comprobación de si realmente había más de un sistema de transporte para esta amina. Para ello, se analizó el transporte cuando esta cepa se cultivaba en MM suplementado con histamina 20 mM (MMH), en MM suplementado con succinato 40 mM (MMS) o en MMHS. Cuando *P. putida* U se cultivó en MMH, la velocidad de transporte fue diferente a la observada cuando se cultivó en MMS, sugiriendo que la toma de histamina ocurría por medio de dos sistemas de transporte distintos. Además, cuando se añadió al medio succinato como única fuente de carbono se observó una mayor velocidad de transporte (**Tabla 15**). Sin embargo, en la cepa *P. putida* U cultivada en MMHS, la velocidad de transporte fue la misma que cuando crecía en MMH, indicando, que, a pesar de que hubiese succinato en el medio, podía estar funcionando el mismo sistema de transporte en ambas condiciones.

Tabla 15. Transporte de histamina de la cepa *P. putida* U cuando se cultivaba en MMH, MMS o MMHS.

Medio de cultivo	Velocidad de transporte
MMH	180 pmoles/min.
MMS	600 pmoles/min.
MMHS	180 pmoles/min.

Parece, por lo tanto, que hay dos sistemas de transporte, uno constitutivo que tiene lugar cuando no hay histamina en el medio (MMS), y otro inducible que aparece cuando esta amina biogénica está presente en el medio (MMH o MMHS). Para confirmar esta hipótesis, se procedió a estudiar el efecto que tenían sobre estos sistemas algunos efectores (aminas, aminoácidos y azúcares) (**Tabla 16**). Cuando *P. putida* U se cultivó en MMS, el sistema de transporte de histamina apenas se veía afectado por las aminas (bencilamina, dopamina, tiramina, feniletilamina, etc), y era inhibido por algunos aminoácidos (arginina, glutamina,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

leucina, etc.). Sin embargo, cuando esta cepa se cultivaba en MMH, el sistema de transporte que tenía lugar era estimulado por algunos aminoácidos, pero era inhibido fuertemente por las aminas (**Tabla 16**). Este mismo efecto ocurría cuando *P. putida* U se cultivaba en MMHS, lo que indicaba que tenía lugar el mismo sistema de transporte que en las condiciones anteriores, y que por tanto, cuando hay histamina en el medio se induce un sistema de transporte, el cual se inhibe por otras aminas. Los azúcares apenas tenían efecto cuando había histamina en el medio, mientras que cuando *P. putida* U se cultivaba en MMS el transporte de histamina era ligeramente estimulado (**Tabla 16**).

Tabla 16. Caracterización de los sistemas de transporte existentes en *P. putida* U para la toma de histamina estudiando el efecto que ejercen aminas, aminoácidos y azúcares.

CONDICIONES	MMS	MMHS	MMH	CONDICIONES	MMS	MMHS	MMH
AMINAS				AMINOÁCIDOS			
Bencilamina	82%	34%	32%	Arginina	54%	101%	120%
Dopamina	82%	30%	28%	Glutamina	74%	146%	138%
1-feniletilamina	97%	37%	36%	Leucina	44%	101%	117%
β -feniletilamina	92%	42%	33%	Lisina	80%	120%	132%
Tiramina	79%	40%	31%	Triptófano	84%	100%	110%
4-fenilbutilamina	80%	35%	29%	CONDICIONES			
3-hidroxitiramina	88%	29%	30%	AZÚCARES			
Triptamina	77%	31%	30%	Glucosa	120%	102%	109%
CONTROL (sin adición): 100% MMS: 600 pmoles/min. MMHS: 180 pmoles/min. MMH: 180 pmoles/min.				Fructosa	133%	107%	100%
				Manitol	110%	105%	109%
				Sacarosa	128%	103%	78%

De esta manera, se pudo concluir que el transporte de histamina en esta bacteria tiene lugar por medio de al menos dos sistemas: (i) uno denominado transportador de histamina constitutivo (HCS) el cual sería responsable del transporte de histamina cuando *P. putida* U crece en un medio que contiene succinato pero no histamina como única fuente de carbono y (ii) un sistema de transporte de histamina inducible (HIS) que está presente cuando esta cepa se crece en un medio al que se le ha añadido histamina.

Una vez establecida la existencia de los dos sistemas, pasamos a caracterizar aquel que se inducía por histamina (HIS). En primer lugar tratamos de determinar si en este caso el transporte de histamina transcurría mediante un mecanismo de difusión facilitada, es decir, que no requería energía para atravesar la membrana, o si, por el contrario, se trataba de un sistema de transporte activo dependiente de energía. Los requerimientos energéticos de HIS se establecieron analizando el efecto de determinados inhibidores metabólicos y protonóforos sobre la capacidad de la velocidad de transporte. Las moléculas probadas y los resultados obtenidos están recogidos en la **Tabla 17**. Cuando se disipa el gradiente de protones utilizando los protonóforos CCCP y el 2,4-DNF, se produce una fuerte inhibición del transporte de histamina (96% y 79%, respectivamente), lo que indica que se requiere un estado de alta energía necesario para que el transporte sea eficaz. Además, los inhibidores metabólicos tales como el cianuro potásico, y sobre todo la azida sódica, inhibieron potentemente el transporte de histamina (68% y 97%, respectivamente) (**Tabla 17**). Estos resultados, unidos a la falta de inhibición causada por arseniato sódico, permiten concluir que el transporte de histamina mediado por el sistema HIS **es un transporte activo, dependiente de un estado energizado de la membrana** generado por la cadena de transporte electrónico y que **no utiliza la hidrólisis de ATP intracelular o algún otro compuesto fosforilado como fuente de energía**. Observaciones similares han sido descritas para otros sistemas de transporte (Fernández-Cañón *et al.*, 1989; Minambres *et al.*, 1992; Schleissner *et al.*, 1994).

Tabla 17. Efecto de diferentes moléculas con grupos tiol, de reactivos modificantes de grupos tiol, de agentes desacoplantes y de inhibidores metabólicos sobre el sistema HIS de *P. putida* U.

MOLÉCULAS QUE PROTEGEN O REACCIONAN CON GRUPOS TIOL		DESACOPLADORES E INHIBIDORES METABÓLICOS	
Efector	% Transporte	Efector	% Transporte
Control (sin adición)	100% ^a	2,4-DNF	21%
2-mercaptoetanol	54%	Azida sódica	3%
Ditiotreitól	76%	CCCP	4%
GSH	79%	Arseniató sódico	88%
Iodoacetato	14%	Cianuro potásico	32%
p-cloromercuribenzoato	12%		

GSH, glutatión reducido; CCCP, carbonil cianida 3-clorofenilhidrazona; 2,4-DNF, 2,4-Dinitrofenol;

a. El 100% del transporte equivale a 180 pmoles/min.

Para establecer la presencia de grupos SH funcionales en el sistema HIS responsable del transporte de histamina, se estudió el efecto causado por diferentes moléculas que protegían o reaccionaban con grupos tiol (**Tabla 17**). Comprobamos que al ensayar el transporte de histamina en presencia de compuestos protectores de grupos SH tales como monotioles (glutatión reducido y mercaptoetanol) y como ditioles (ditiotreitól), no se observa efecto estimulador sobre la actividad de este sistema de transporte HIS, lo que sugiere que no es imprescindible la presencia de un ambiente extracelular de grupos tioles reducidos para la incorporación de histamina. Dentro de estos reactivos, los que causan un mayor efecto inhibitorio, son los denominados compuestos modificantes del grupo SH (iodoacetato, p-cloromercuribenzoato), sugiriendo la necesidad de grupos SH libres para mantener la actividad de HIS. Efectos similares han sido descritos en otros sistemas de transporte (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1987; Fernández-Cañón *et al.*, 1989; Schleissner *et al.*, 1994).

Posteriormente, se cultivó la cepa *P. putida* U en MM suplementado con las siguientes fuentes de carbono: 20 mM de histamina (MMH), 20 mM de histidina (MMHis) o 30 mM de ImAA (MMIm). Se pretendía establecer el efecto que algunos análogos estructurales de la histamina (histidina), o los catabolitos de ambos (ImAA y ácido urocánico), ejercían sobre el transporte de histamina en cada una de las condiciones (**Tabla 18**). Los resultados muestran que el sistema de transporte HIS apenas está afectado en presencia de histidina o de su intermediario catabólico (ácido urocánico), y como es lógico, no se detectó transporte cuando se puso la histamina como efector, la cual inhibe la toma de histamina en las otras dos condiciones (MMHis y MMIm). La histidina solamente impedía el transporte de histamina cuando la cepa *P. putida* U se cultivaba en MMHis, y en estas condiciones, también se inhibía ligeramente el transporte con ácido urocánico (62%), pero no con ImAA (97%). El transporte de histamina cuando *P. putida* U se cultivaba en MMIm se reducía en presencia de ImAA (53%) (**Tabla 18**). Con estos resultados, se puede concluir que en *P. putida* U se inducían otros dos sistemas de transporte diferentes, específicos para histidina o ImAA, que también son capaces de tomar la histamina.

La existencia en *P. putida* U de otros mecanismos de transporte que pueden estar implicados en la toma de histamina, justifica el hecho de que cuando se muta el gen *hinA*, esta cepa (*P. putida* U Δ *hinA*::Tn5), aunque mucho más lentamente, aún sea capaz de degradar histamina (**Figura 36**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Estudio del transporte de histamina en *P. putida* U cuando se cultivaba en MMH, MMHis o MMIm y análisis del efecto causado por diferentes moléculas estructuralmente relacionadas con la histamina sobre el sistema HIS.

Condiciones Efector	MMH	MMHis	MMIm
Control (sin efector)	100% ^a	100% ^b	100% ^c
Ácido urocánico	100%	62%	101%
ImAA	74%	97%	53%
Histamina	3%	8%	5%
Histidina	101%	0%	103%

a. El 100% de transporte equivale a 180 pmoles/min.

b. El 100% de transporte equivale a 220 pmoles/min.

c. El 100% de transporte equivale a 400 pmoles/min.

5.1.2. Desaminación de la histamina.

5.1.2.1. Gen *hinC*.

En seis mutantes que tampoco transformaban la histamina (**Figura 28**), el transposón se había insertado en varias posiciones del gen *hinC* (**Tabla 19**). Estos mutantes, denominados *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5, tenían afectados un gen que se encuentra corriente abajo del gen anterior (*hinA*) y que se transcribe en sentido contrario (**Figura 30**).

Tabla 19. Identificación del punto de inserción en los diferentes mutantes afectados en el gen *hinC* (*P. putida* U Δ *hinC*::Tn5).

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinB</i>	
Mutante 9	+2 D L A W Q C R T F G F E E G V I I R S T L G 5476 CGACCTGGCCTGGCAATGCCGCACTTTTGGTTTCGAGGAAGGCGTGATCATTCGCTCGA Tn5 CCCTGGG GCTGGACCGGACCGTTACGGCGTGAAAACCAAGCTCCTCCGCACTAGTAAGCGAGCT GGGACCC
Mutante 12	+2 L I R T V R R Y W Q V V G Q P N K K V M I G 4660 GTTGATCCGTACCGTACGCCGCTACTGGCAAGTGGTCGGGCAGCCGAACAAGAAGGT Tn5 CATGATTGG CAACTAGGCATGGCATGCGGCGATGACCGTTCACCAGCCCCGTCGGCTTGTCTTCCA GTACTAACC
Mutante 14, 38	+2 G K R Y L D G M S G L W C T Q L G Y G R R D 4426 GGGCAAGCGCTACCTGGATGGCATGTCT Tn5 GGCTGTGGTGCACCCAGCTCGGCTACGGGCGCCGCGA CCCGTTCGGATGGACCTACCGTACAGA CCGGACACCACGTGGGTCGAGCCGATGCCCGGGCGCT
Mutante 19	+2 D V L L C A D E V I G G F G R T G E W F A H 5035 CGACGTGCTGTTGTGCGCCGATGAGGTGATTGGTGGCTTTGGCCGCACCGGCGAGTGG Tn5 TTGCCCCA GCTGCACGACAACACGCGGCTACTCCACTAACCCAGAAACCGGCGTGGCCGCTCACC AAACGGGT
Mutante 61	+2 P D V A H I D E P Y W Y A E G G E L T P A E 4810 CCCGATGTGGCGCACATCGACGAACCGTACTGGTACGCCGAGGGTGGCGAGCTGACC Tn5 CCGGCCGA GGGCTACACCGCGTGTAGCTGCTTGGCATGACCATGCGGCTCCACCGCTCGACTGG GCGCGGT

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 31**.

Para comprobar si el mutante afectado en el gen *hinC* (*P. putida* U Δ *hinC*::Tn5) recuperaba su función original, se llevó a cabo la clonación del gen en *trans* de la misma forma que con el gen anterior. Para ello, el gen *hinC* fue amplificado mediante PCR (**Tabla 20**) y clonado en el plásmido replicativo pMC, que había sido digerido con la enzima de restricción *KpnI*. Previamente, con el fin de comprobar que dicho gen se había insertado en la orientación correcta (bajo el promotor del plásmido pMC), se utilizó la enzima de restricción *PstI*, la cual corta internamente en el gen.

Tabla 20. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *hinC* en el mutante *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5.

Nombre del Primer	Secuencia
HinC.F	CCGAGCTGTTTTCCCTGTTTCATCGACGC
HinC.R	TGTGCGTTGACGGGTTTGCCGTTGATCAG

A continuación, se transfirió la construcción pMChinC a la cepa mutante mediante conjugación triparental. La cepa *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 pMChinC que ahora expresaba el gen *hinC* bajo el promotor del plásmido, era capaz de crecer en MMh, aunque con algo de retraso con respecto a la cepa control (**Figura 37**). Comprobamos, además, que la cepa mutante *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5, que había sido transformada con el plásmido pMC vacío no era capaz de crecer en el medio conteniendo histamina como única fuente de carbono. Sin embargo, ambas cepas crecían igual que la cepa control en MM suplementado con 10 mM de histidina o con 10 mM de ImAA (**Figura 37**).

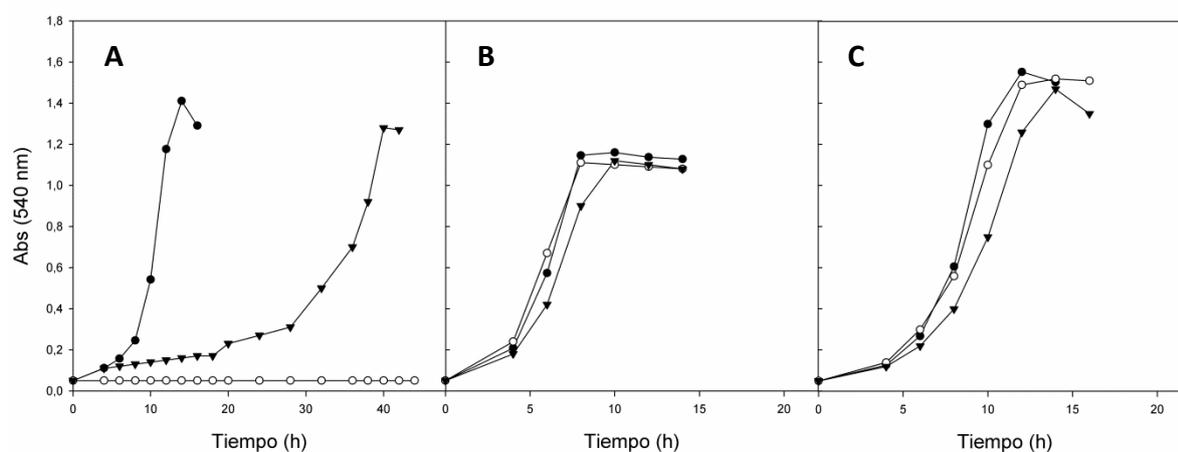


Figura 37. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa control (●), del mutante *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 pMC (○) y del mutante complementado con el gen *hinC* (*P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 pMChinC) (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este gen codifica una proteína, HinC, cuya masa molecular, punto isoelectrico, secuencia, composición y número de aminoácidos aparecen a continuación.

HinC																					
MNAPFAPQRQTRDYQAADAHHIHAFLDQKALNAE GPRVIVGGERLHLWDSEGKRYLDGMSGLWCTQLGY GRRDLTVAAATQMDQLAYYNNMFFHTTHPAVIELSE LLFSLLPGHYSHAIYTNNGSEANEVLIRTVRRYWQ VVGQPNKKVMIGRWNGYHGSTLAATALGGMKFMHE MGGLIPDVAHIDEPYWYAEGGELTPAEFGRRCALQ LEEKILELGAENVAGFIAEPFQAGGMIFFPPESYW PEIQRICRQYDVLLCADEVIGGFGRTGEWFAHEYF GFEPDTLSIAKGLTSGYVPMGGLVLSKRIAEALVE RGGVFAHGLTYSGHPVAAAVAIANLKLARDEGIVT QVKDDTGPYLQRILREVFADHPLIGVQVQAGLVAA LQFAEHKPTRKRANENDLAWQCRTFGFEEGVIIR STLGRMIMAPALIANHSELDELVEKTRIAVDRTAR LVGKL	460 aminoácidos																				
	Mw: 50884,06 pI: 5,95																				
	Composición:																				
	<table style="margin: auto; border: none;"> <tr> <td>A 51</td> <td>R 29</td> <td>N 12</td> <td>D 19</td> <td>C 5</td> </tr> <tr> <td>Q 19</td> <td>E 34</td> <td>G 48</td> <td>H 17</td> <td>I 25</td> </tr> <tr> <td>L 45</td> <td>K 14</td> <td>M 12</td> <td>F 20</td> <td>P 20</td> </tr> <tr> <td>S 15</td> <td>T 22</td> <td>W 8</td> <td>Y 17</td> <td>V 28</td> </tr> </table>	A 51	R 29	N 12	D 19	C 5	Q 19	E 34	G 48	H 17	I 25	L 45	K 14	M 12	F 20	P 20	S 15	T 22	W 8	Y 17	V 28
A 51	R 29	N 12	D 19	C 5																	
Q 19	E 34	G 48	H 17	I 25																	
L 45	K 14	M 12	F 20	P 20																	
S 15	T 22	W 8	Y 17	V 28																	

HinC tiene una elevada homología con las transaminasas, llamadas también aminotransferasas, que catalizan las reacción de interconversión de aminoácidos y de aminos intracelulares, llevando a cabo la reacción que convierte un aminoácido en su correspondiente α -cetoácido por medio de la transferencia de un grupo α -amino de un aminoácido (o amina como se ha visto en este trabajo), a su posible aceptor, normalmente α -cetoglutarato, aunque el piruvato y el oxalacetato son también aceptores usados por transaminasas (Peralta *et al.*, 2016). Todos los organismos tienen varios genes que codifican transaminasas. La nomenclatura internacional correspondiente a estos grupos de transaminasas las indica como EC 2.6.1.x donde x va de 1 a 86, definiendo cada número un tipo distinto de aminotransferasa. Originalmente, se dividían en seis clases, aunque más tarde, la clase I, se dividió, a su vez, en dos subgrupos (Ward and Wohlgemuth, 2010).

La aminotransferasa caracterizada en este trabajo (HinC) pertenece a la clase III, estando dentro de este grupo las transaminasas de los siguientes compuestos: putrescina (EC 2.6.1.82), acetilornitina (EC 2.6.1.11), ornitina (EC 2.6.1.13), glutamato-1-semialdehído (EC 5.4.3.8), D-fenil-glicina (EC 2.6.1.72), diamino-butirato (EC 2.6.1.62), alanina-glioxilato (EC 2.6.1.44), 4-aminobutirato (EC 2.6.1.19), L-lisina (EC 2.6.1.36), β -alanina (EC 2.6.1.18) y taurina (EC 2.6.1.77) (Rausch *et al.*, 2013).

A estas transaminasas (clase III), se las denomina ω -transaminasas, por la posición que ocupa el grupo amino que se va a transferir respecto al átomo de carbono unido al grupo

carboxilo. En este grupo se incluyen las amino-piruvato transaminasas, que transfieren un grupo amino de una amina al piruvato generándose alanina (Malik *et al.*, 2012; Cassimjee *et al.*, 2015). Una reacción de este tipo se muestra en la **Figura 38**.

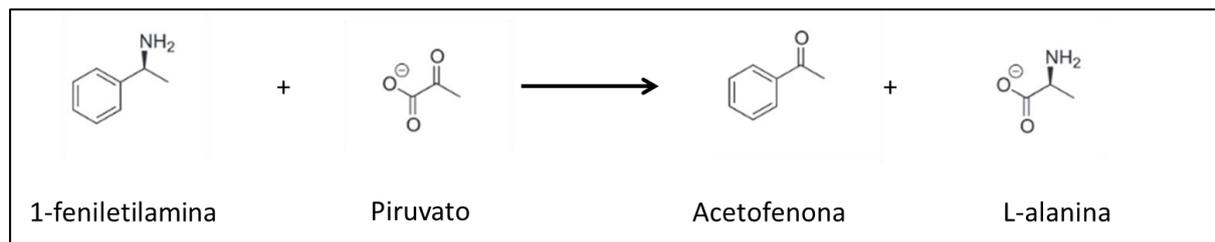


Figura 38. Reacción catalizada por una ω -aminotransferasa.

Esta reacción (**Figura 38**) necesita la presencia de un cofactor, el piridoxal-5-fosfato (PLP) y el mecanismo que tiene lugar se detalla a continuación: i) la lisina presente en el centro activo de la enzima se une con el PLP formando una base de Schiff (**a**, aldimina interna); ii) a continuación, se une el sustrato con un grupo amino (1-feniletilamina) originándose una nueva base de Schiff (**b**, aldimina externa), reemplazándose el residuo de lisina en el compuesto anterior iii); después, el átomo de carbono pierde un hidrógeno obteniéndose un intermediario quinoide (**c**), que tras una reprotonación, deriva en una cetimina (**d**), quien se hidroliza, formándose una acetona (**e**, acetofenona) y piridoxamina-5-fosfato (**f**, PMP). La transaminación finaliza (iv) cuando se transfiriere el grupo amino del PMP a una molécula aceptora (**g**, piruvato), generando L-alanina (**k**) que se libera (**Figura 39**) (Koszelewski *et al.*, 2010; Cassimjee, 2012; Cassimjee *et al.*, 2015).

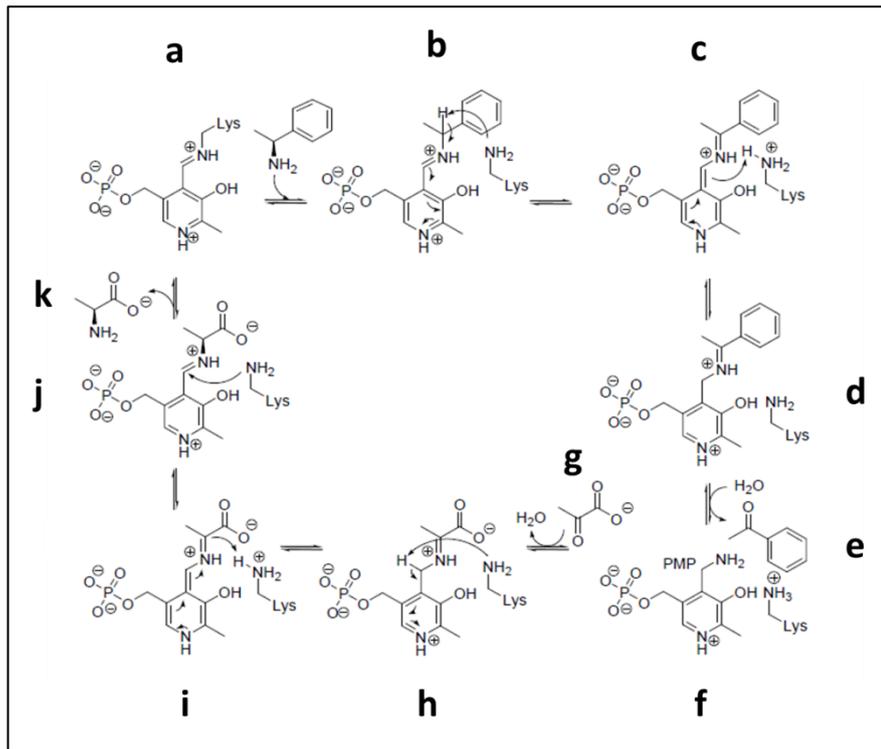


Figura 39. Mecanismo de reacción de la ω-transaminasa. El compuesto donador del grupo amino es la 1-feniletilamina, que reacciona con el PLP, generándose PMP y la acetofenona. La transaminación finaliza transfiriéndose el grupo amino de PMP a una molécula aceptora, el piruvato, obteniéndose L-alanina y la regeneración de PLP. Los intermediarios son: a, aldimina interna; b, aldimina externa; c, intermediario quinoide; d, cetimina; e, acetofenona; f, PMP; g, piruvato; h, cetimina; i, intermediario quinoide; j, aldimina externa; k, L-alanina (Modificado de Cassimjee, 2012).

Este tipo de transaminasas se conocen muy bien en *Alcaligenes (Achromobacter) denitrificans* (Yun *et al.*, 2004), y en *P. putida*, donde han sido bien caracterizadas (Yonaha *et al.*, 1992). También se ha estudiado profundamente en *Vibrio fluvialis* (Shin *et al.*, 2003) y en *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000). En la **Figura 40** se compara HinC con estas proteínas y se indican los aminoácidos que constituyen secuencias consenso. Como puede apreciarse, el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de estas enzimas no es muy alto (30%). Esta clase de aminotransferasas tienen un motivo característico (G-X-G-X-X-G) que corresponde a la secuencia de unión a nucleótidos (Naranjo *et al.*, 2005). En HinC este dominio está bastante conservado G-F-G-R-T-G (GFGRTG) y se encuentra comprendido entre el aminoácido 267 y 272 (**Figura 40**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hinC.PpU	WQCRTFGFEEGVIIRSTLGRMIMAPALIANHSELDELVEKTRIAVDRTARLVGKL	460
AT.Pp	----MALWKAGFYVRFGGDTLQFGPTFNARPEELDRLFDVAVGEVLNKLDD----	449
AT.Pa	----MKLWQQGFYVRFGGDTLQFGPTFNARPEELDRLFDVAVGEALNGIA-----	448
AptA.Ad	----QKCFDTGLMVRYTGDILAVSPPLIVDENQIQIFEGIGKVLKEVA-----	440
AT.Vf	NTCTDL----GLICRPLGQSVVLCPPFILTEAQMDDEMFDKLEKALDKVFAEVA--	453
	 * . * : . * : : : : : : : : . . .	

Figura 40. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinC de *P. putida* U y de las aminotransferasas de: *P. putida* (Pp), *P. aeruginosa* PAO1 (Pa), *A. denitrificans* (Ad) y *V. fluvialis* (Vf). El dominio de unión a nucleótidos (GXGXXG) aparece sombreado en gris. Los residuos que son necesarios para la unión del sustrato se indican con ■. Los residuos que participan en la interacción con el PLP se señalan con una flecha.

En *P. putida* U, HinC sería la enzima responsable de la desaminación de histamina, y por tanto la que generaría el imidazolacetaldehído (ImAdh) y la L-alanina. Se han descrito otras enzimas que catalizan la reacción de desaminación, obteniendo ImAdh, y que se denominan histamina deshidrogenasas (HDHs) e histamina oxidasas (HODs). Las más estudiadas son las de *Nocardiodes simplex* (Limburg *et al.*, 2005), *Arthrobacter crystallopoietes* (Sekiguchi *et al.*, 2004), *Rhizobium* spp. (Bakke *et al.*, 2005) y *Brevibacterium linens* (Leuschner *et al.*, 1998) (**Figura 41**).

hinC.PpU	-----MNAPFAPQR-----QTRDYQAADAA---HHIH-----	24
HDH.Ns	MTEQPAVAAPYDVLFEFVQIGPFTTKNRFYQVPHCNGMGYRDPASAQASMRKIKAEGGWSA	60
HDH.Rs	----MRDNKYDILFEFVRIGPHIAKNRFYQVPHCNGGGYRDPASAAAAMRGIKSEGGWGV	55
HOD.Ac	-----	0
HOD.Bl	-----	0
	↓	
hinC.PpU	AFLDQKALNAEGPRVIVGGERLHLWDSEGKRYLDGMSGLWCTQLGYGRRDLTVAAATQMD	84
HDH.Ns	VCTEQVEI--HATSDIAPFIELRIWDDQDLPALKRIADAIHEGGGLAGI-----	107
HDH.Rs	IFTEQTEM--HHTSEITPFIELRLWEDKDIPLRRMSDAMKVHGALAGI-----	102
HOD.Ac	-----	0
HOD.Bl	-----	0
hinC.PpU	QLAYYNMFHHTTHPAVIELSELFLSLLPGHYSHAIYTNNGSEANE---VLIRTVRRYQWV	141
HDH.Ns	ELAHNGMNA----PNQ---LSRETPLGPGHLPVAPDTIAPIQARAMTKQDIDDLRRWHRN	160
HDH.Rs	QLAYSGING----PNF---YTKEVPLAPSALPIRTFTNDPVQARALDKQDIKNLRRWFVN	155
HOD.Ac	-----MAEYLLPGTALTQHPL--EQLTAMEIQEARRILAE	33
HOD.Bl	-----MSCHSSAPVAEATTATPF--TLPTEAEIRAVTAVLRS	35
	* * *	
hinC.PpU	VGQPNKKV-----MIGRWNGYHGSTLA-----	163
HDH.Ns	AVRRSIEAGYDIVVYGAHGYSVHFLSKRYNQRTEYGGGLENRMRLRLLEDTLDE	220
HDH.Rs	AAKRSKIAGFDLICLYGAHGFGIFQHFLSRATNQRTEYGGGLENRSRFAREVVEDIKEA	215
HOD.Ac	AGLVSDATRFAYLGLVEPPKS-----ALHEDATNTARLVRAMLWDAG--	75
HOD.Bl	AGQFPDSARMAYVGLLDPVRG-----TDRTTA-EVDRRFRAFILDKS--	76

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hinC.PpU	-----ATA----L-----GGMKFMHEMGGLIPDVAHIDEPYWYAE GGEL	198
HDH.Ns	CAGRAAVACRITVEEE----ID-G-GITREDIEGVLRELGELPDLWDFAMGSWEGDSVTS	274
HDH.Rs	VGDTTAITMRVSLDET----IGEL-GFSNAEVREFVEMNANLPDLWDLAQGTWEDCSGSPS	270
HOD.Ac	--LSRSLDVRVSLTTGQVLDQRELNPAVDGQLPVLLEEFEEIIEDI-LAEDPQWKALAAAR	132
HOD.Bl	--AGTARDIVVSATREAVESVAEVDSTQEGEFPMEEEEFEVVEEV-LAADPTWLASLEKR	133
	. . . : : *	
hinC.PpU	TPAEFGRRCALQLEEKILELGA----ENVAG-----FIAEFPQGAGGMIFFP--	241
HDH.Ns	RFAPTEGRQEEFV--A-----GLKK-----LTTKPVVGVGRFTSPDAM	309
HDH.Rs	RFKEEGAQEILV--K-----GIRE-----LSSKPVVGVGRFTSPDVM	305
HOD.Ac	GLTPSQVRVA-PLSAGVFEYENEEGKRLRLRGLGFRQDHPGDHAWAHPIDGLVAF--VDVE	189
HOD.Bl	GLPVEEV RVA-PLSAGVFEYPEEKGRRLRGLAFHQHESDSAWAHPIDGLVAY--VDVT	190
	: : : . * *	
hinC.PpU	-----ESY-----	244
HDH.Ns	VRQIKAGILDLIGAARPSIADPF-----	332
HDH.Rs	ARMVVRQGVLDFIGCARPSIADPF-----	328
HOD.Ac	NRRV-NHLIDDGPVPEINGNYTEAAVHVELRDLKPIEITQPEGPSFTL-EGNLLSWA	247
HOD.Bl	NKAV-DQILDLENVVPVSEHGNYTPELTGPVRTQKPI SITQPDGPSFTVTEGNHIEWE	249
	:	
hinC.PpU	-----WPEI-----	248
HDH.Ns	-----LPNKIRDGR	341
HDH.Rs	-----LPKKIEEGR	337
HOD.Ac	GWDLRVGFDAREGLVLHQLHHTHNGRRRPLVHRASISEMVPYPYGDPSYRSWQNYFDSGE	307
HOD.Bl	KWSFDVGFDMREGLVLHNIADFDDGERRRITLDRAAIAEMVVPYGDPSVRSWQNYFDTGE	309
	:	
hinC.PpU	-----QRICRQ-----YDVLLCADEVIG-----GFRG	270
HDH.Ns	L-----NLIRECIG-----CNICVSGDLTMSPIRCTQNPSM	372
HDH.Rs	I-----EDIRECIG-----CNICITGDMTMSISRCTQNPTF	368
HOD.Ac	YLVRDANSLKLGCDCLGDITYMSPV VADDFGNPRTIDNGICIH EEDAGI-----LWKH	361
HOD.Bl	YLVGQWANSLELGCDCDCLGDITYLSPWVANNLGEPRQIKNGICMHEEDASI-----LAKH	363
	* : : : .	
hinC.PpU	TGEWFAHEYFGFEPDTLSIAKG---LTSGYV-PMGG----LV---LSKRIAEALVERG	317
HDH.Ns	GEEWR---RGWHPERIRAKESDARVLVVGAG-PSGLEAARALGVRGYDVVLA EAGRDLG	427
HDH.Rs	MEEWR---KGWHPERMAKAGDSNTVLVVGAG-PAGLEATRALS LRGYDVTLAEATTTLG	423
HOD.Ac	TDEWAGSNEV-----RRNRRLVVSFFT TVGN YDYGFWYLYLDGTIEFEAKATG	410
HOD.Bl	SDLWSGVAYT-----RRNRRFVVSFFT TVGN YDYGFWYLYLDGTIEFEAKATG	412
	* : . . * . : *	
hinC.PpU	GVFAHGLTYSGHPVAAVAIANL KALRDEGI V TQVKDDTGPYLQRILREV FADHPLIGQV	377
HDH.Ns	GRVTQES-----ALPGLSA---WGRVKEYRE--AVLAELPNVEIYRES PMTG--	469
HDH.Rs	GRVARER-----LLPGLSA---WGRVVDYRQ--YQISQRTNVETYFDSRLTA--	465
HOD.Ac	IVFTAALP-DKEYAYASEIAPGLGA-----PFHQHLFSARLDMMI	449
HOD.Bl	VVFTSALP-NGSTDFASEIAPGLGA-----PFHQHLFGARLDFAL	451
	.: * * : :	
hinC.PpU	QGAGL-----VAALQFAEHKPTRKR FANENDLAWQCRTFGFE EGVIIRST-----L--	423
HDH.Ns	-----DDIVEFGFEHVI TATGATWR TDGVAR	495
HDH.Rs	-----EDVLGFGFEHVAIATGSHWR RDGVAR	491
HOD.Ac	DGATNRVEELDLVRLPKGPGNPHGNAFTQKRTLLARE-SEAVRDADGTKGRVWHI SNPDS	508
HOD.Bl	DGGKCRVEEEDVVR LPVSQDNPRGNAFSRRTILATE-SAAQRDADQSKARTVWVTNPES	510
	
hinC.PpU	-----GRMIMA-PALIANHSELDELVEKTRIAVDRTARLVGKL-----	460
HDH.Ns	FHTTALPIAEGMQVLG-PDDL FAGRLP---DGKKVVVYDDDHY YLGGVVAELLAQKGYEV	551
HDH.Rs	QHVVPMPI DPSMTVWT-PDDIMAKVHPENLSGKTVVVYDDDHY YMGGVMAEVMKAGAKV	550
HOD.Ac	RNQLGHVPVGYTLYPEGSP T LAMA----DDSSIASRAAFARHHLWVTRHAE EEL Y AAGDFV	564
HOD.Bl	TNRLGEPVGYKLHPMGLPTLLAA----EDTSIHRRATFASKSLVWSQYHEDERYPTGDFP	566
	* . :	
hinC.PpU	-----	460
HDH.Ns	SIVTPGA-----QVSSWTNNTFEVNRIQRRLIENGV	582
HDH.Rs	IILVTSSA-----YVSDWTRNTLEQGA IHVRLDDLGV	581
HOD.Ac	NQHPPGAGLPAYVAQDRDINGQDLVVWHSFGLTHFPRPEDWPI MPVDTTGFT--LKPHGF	622
HOD.Bl	NQHPPGHAGLPAWTAADRSVDGEDIVVWHSFGLTHFPRVEDWPI MPVDTVGFK--LRPEGF	624

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hinC.PpU	-----	460
HDH.Ns	ARVTDHAVVAVGAGGVTVRDTYAS-IERELECDTVVMVTARLPREELYLDLVARRDA---	638
HDH.Rs	DIRLNRGVTAIRAGEVETNCVYTG-KRSAIGCDAVLMVASRTSEDQLFNDLIARQGDWPD	640
HOD.Ac	I--DDQHLLNVPASPAGAHCGVTGGSECTHGARGVTAVAH--SRGPDFTGGGQDQGH-PC	677
HOD.Bl	F--DRSPVLDVPAPESGPTCCDS-----	645
hinC.PpU	-----	460
HDH.Ns	GEIASVRGIGDAWAPGTIAAAVWSGRRAE-----EFDAVLPSNDEVPPFRREVTQLA--	690
HDH.Rs	AGIKSVKIIIGDAAAPAPIAWATYAGHRYAR-----ELDTP-DIGDDLPPFRREVTQLEPA	693
HOD.Ac	D--DVRRAVGHCSPPRRIWSPGWRAPGSSAPRAPACARLRICGCGCRCPN-----	725
HOD.Bl	-----	645

Figura 41. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinC de *P. putida* U y de las proteínas HDH (histamina deshidrogenasa) y HOD (histamina oxidasa) en diferentes microorganismos: *N. simplex* (Ns); *Rhizobium* spp. (Rs); *A. crystallopoietes* (Ac) y *B. linens* (Bl). Los residuos de unión a sustrato están sombreados en gris, y los conservados en la proteína HinC están señalados con una flecha.

Observando el alineamiento de la **Figura 41** se puede deducir que el porcentaje de identidad de HinC frente a los otros dos tipos de proteínas, es del 20%, aproximadamente. Dos residuos presentes en las HDHs necesarios para la unión del sustrato se encuentran en la proteína HinC (Q29 y D262) (**Figura 41**) (Fujieda *et al.*, 2004). HinC, a diferencia de lo que ocurre con algunas HDHs o HODs, usa fundamentalmente la histamina como sustrato, ya que el mutante *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 afectado en el gen que codifica esta proteína, crece perfectamente en otras aminas biogénicas tales como putrescina, cadaverina, tiramina y feniletilamina (ver **Tabla 40** en el apartado 8 de esta misma sección).

5.1.3. Otros ORFs presentes en el *cluster hin*.

La secuenciación de las zonas adyacentes al gen *hinC* y *hinA*, permitió identificar otros ORFs que tenían homología con aldehído deshidrogenasas (ALDHs). Estas enzimas catalizan la oxidación irreversible de una gran cantidad de aldehídos. Algunas tienen una elevada especificidad de sustrato, mientras que otras reconocen numerosos aldehídos (Perozich *et al.*, 1999). De forma general, todas las ALDHs requieren como coenzimas NAD(P)⁺. Así, aunque la mayoría utilizan NAD⁺, algunas son específicas de NADP⁺, y otras, usan ambas coenzimas (Perozich *et al.*, 2000; Hempel *et al.*, 2001). La variedad de ALDHs que existen es muy elevada debido a que los aldehídos son compuestos químicos muy abundantes en la naturaleza. Además, debido a que algunos de ellos presentan gran toxicidad,

aunque sean en concentraciones muy bajas, su presencia está bastante regulada para evitar su efecto nocivo sobre la bacteria.

5.1.3.1. Gen *hinD*.

Adyacente al gen *hinC*, se encuentra el gen *hinD*, que codifica una proteína, HinD, cuya masa molecular, punto isoeléctrico, secuencia, composición y número de aminoácidos aparecen a continuación.

HinD	
	497 aminoácidos
	Mw: 53455,71 pI: 5,20
	Composición:
	A 73 R 26 N 20 D 25 C 6
	Q 27 E 29 G 41 H 7 I 15
	L 52 K 16 M 7 F 20 P 23
	S 26 T 18 W 9 Y 12 V 45
MYTLEFWQQRASDLYLPSQALINGKPVNAQDG ATFAAINPATNTVLAQVAACGQAEVDLAVASA RRAFEQGVWPRMAPGERKKVLLRLAELIMAHR EELALLDSLNMGKPVVDAYNIDVPGSAHVFAW YGEALDKLYDQVAPTAANALATITREALGVVA AVVPWNFPLDMAAWKLAPALAAGNSVVLKPAE QSPFSALRLAQLALEAGVPEGVLNVVPLGEGQ AGQALGLHPDVEDCLVFTGSTQVGKYFMQYSAQ SNLKQVWLECGGKSPNLVFENCQDLDLAAEKA AFGIFFNQGEVCSANSRLYVQRSIHDEFVERL QAKARQWLPGNPLDPASRAGAIVD AEQTGRIE AAIVRAGQEGARLVCGGRRLTIEGADNYIEPT IFAGVHGRMSLAREEVFGPVLAI SAFDTEEEA VRLANDSIYGLAASVWSDDFNQVHRVARALKA GTVSVNTVDALDVTVPFGGGKQSGFGRDLSLH SFDKYSQLKTTWYQLRG	

HinD posee homología con una aldehído deshidrogenasa que interviene en la ruta catabólica de putrescina y de cadaverina en *E. coli* (PuuC) (Kurihara *et al.*, 2009) y en *P. aeruginosa* PAO1 (Chou *et al.*, 2008, 2013; Yao *et al.*, 2011). Este tipo de deshidrogenasas se ha caracterizado también en *K. pneumoniae*, observándose que reconoce un gran número de sustratos, entre los que se incluyen tanto aldehídos aromáticos como alifáticos (valeraldehído, butiraldehído, isovaleraldehído, 3-hidroxi propionaldehído, propionaldehído y acetaldehído) (Raj *et al.*, 2010).

El alineamiento de las secuencias correspondiente a las enzimas anteriormente citadas y HinD se muestra en la **Figura 42**.

HinD.PpU	---MYTLEFWQQRASDLYLPSQALINGKPVNAQDGATFAAINPATNTVLAQVAACGQAEV	57
PuuC.PpU	-MTTLTRADWEQRAQQLKIEGRAFINGEYTDASGETFECLSPVDGRFLAKVASCDLADA	59
PauC.Pa	-MTTLTRADWEARAKDLKIEGRAFVNGEYSNAASGETFDCLSPVDGRFLAKVASCDLADA	59
PuuC.Ec	-MNFHHLAYWQDKALSLAIENRLFINGEYTA A AENETTFETVDPVTQAPLAKIARGKSVDI	59
PuuC.Kp	MMNFQHLAYWQEKAKNLAIETRLFINGEYCAAADNTTFETIDPAAQQT LAQVARGKKADV	60
	* : * . * : : : * * : * . . * * : . * . * * : * . : :	

En *P. putida* U, hay otra aldehído deshidrogenasa denominada PpuC, que tiene mayor porcentaje de identidad con respecto a las enzimas PpuC de otros microorganismos que la proteína HinD (**Tabla 21**). Este hecho sugiere que en *P. putida* U, PpuC es la enzima que realmente participa en la degradación de putrescina y cadaverina, mientras que HinD será la aldehído deshidrogenasa implicada en la ruta catabólica de histamina.

Tabla 21. Porcentajes de identidad entre las dos aldehído deshidrogenasas con respecto a las de los otros microorganismos.

	PpuC.Pa	PpuC.Ec	PpuC.Kp	HinD.PpuU	PpuC.PpuU
HinD.PpuU	53%	49%	51%	-	53%
PpuC.PpuU	86%	59%	59%	53%	-

Pa, *P. aeruginosa* PAO1; Ec, *E. coli*; Kp, *K. pneumoniae*; PpuU, *P. putida* U.

Tras analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína HinD se identificó un dominio denominado **Aldedh** (de **Aldehído deshidrogenasa**), así como diferentes motivos que están muy conservados en otras ALDHs (Steinmetz *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 2005). Este dominio Aldedh, que comprende casi toda la proteína (desde el aminoácido 31 al 490), es típico de las proteínas pertenecientes a la familia de deshidrogenasas que utilizan aldehídos como sustratos y NAD(P)⁺ como cofactor (Steinmetz *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 2005). En cuanto al sitio de unión de la coenzima, se encontró en HinD una secuencia consenso típica de unión a NAD(P)⁺ en ALDHs, GLGEQAG (la secuencia consenso es GXGXXXG, siendo X cualquier aminoácido) (Hidalgo *et al.*, 1991), que se extiende desde el aminoácido 220 al 226, encontrándose entre el motivo 3 y motivo 4 en todas las ALDHs comparadas (**Figura 42**). Además, en esta proteína se identificaron diez motivos presentes en este tipo de deshidrogenasas bacterianas (**Tabla 22**) (Perozich *et al.*, 1999; Jo *et al.*, 2008), siendo los motivos 5 y 6 los más importantes, ya que contienen los residuos de ácido glutámico (E264) y cisteína (C300), que forman parte del centro activo de la enzima (**Figura 42**) (Weretilnyk and Hanson, 1990). Como se puede ver en la **Figura 42** los primeros aminoácidos del dominio 7 no se conservan en todas las ALDHs (Jo *et al.*, 2008; Raj *et al.*, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 22. Secuencia consenso de los motivos conservados en las ALDHs y localización en la secuencia de aminoácidos de HinD.

Motivo	Secuencia consenso	Secuencia HinD
1	[PAST]-[WFI]-[NE]-[FYGALV]-[PTL]	164-PWNFP-168
2	[APNCI]-[LIAMV]-[AVSLCIMG]-[ACTLMVGF]-G-[NCDI]-[TAVCSPG]-[VAIMFCLTGY]-[VIL]-[LVMIWAFHCY]-[KH]-[PTVGHMS]-[ASDHP]-[EPSADQGILT]	179-ALAAGNSVVLKPAE-192
3	[GRKPWHSAY]-[FLEIVQNARMHK]-[PG]-[PLAKDIEVSRF]-[GNDE]-[VLIAT]-[VLIFYAC]-[NGLQSHAT]-[VILYAQGFST]-[IVLMS]	209-GVPEGVLNVV-218
4	[IVLGFY]-[SATMNLFHQ]-[FYLA]-[TVIL]-G-[SGEN]-[TSVRINDEPAQK]-[EAPRQGKTVNLDH]-[VTIASGM]-[GAFI]	238-LVFTGSTQVG-247
5	[LAMFGS]-[ENLQF]-[LTCMAGI]-[GS]-[GA]-[KNLMQSHIV]-[SNADC]-[PAHFTSWV]-[CNLFMGIVAHST]-[IVLYFA]-[VIAMT]-[FDLMHCANYV]-[DAESKPRNT]-[DSNTAEV]-[ACVISTEY]-[DNLERA]	263-LECGGKSPNLVFENCQD-279
6	[FYVLMA]-[FGYLRMDAQETWSVIKP]-[NHSTYFACI]-[QASNHTCMG]-G-[QE]-[CRVITKSAND]-[CR]	293-FFNQGEVC-300
7	[GDTSKAC]-[YFNARTHCLSWV]-[FYLWVIS]-[IVLFYM]-[QEAPKGRMYNHLSWYV]-[PA]-[TACHLMY]-[VIL]-[FLIVWN]	378-DNYIEPTIF-386
8	[EKTDRQGS]-E-[IVTLNFSP]-F-[GA]-[PS]-[VILCF]	398-EEVFGPV-404
9	[NRST]-[DNASEQTKRCGI]-[TSRVNALCQGIK]-[EPDTGQIKVRFSHYNCL]-[YFKQVM]-[GPA]-[LNMV]-[ASTGVQCF]-[AGSLTFC]-[AGYSCT]-[VILFAMS]-[FHWYIVLEM]-[TSAG]-[KRNSQTEAHDP]-[DNSILEAKT]	421-NDSIYGLAASVWSDD-435
10	[PASW]-[FWYAHV]-[GTQS]-G-[FVYESNIMTAWRQ]-[KGRN]-[MQARELNSKGHDPT]-[STM]-[GFLS]-[IFNTLMYGSHRVQ]-[GDNHRSY]-[RDPSAGKTE]	465-PFGGGKQSGFGR-476

5.1.3.2. Gen *hinE*.

El gen *hinE*, que se transcribe en el mismo sentido que el gen *hinA*, codifica una proteína HinE que también posee homología con ALDHs, concretamente, con α -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasas (CGSALDHs). La masa molecular, el punto isoeléctrico, la composición, la secuencia y el número de aminoácidos de esta enzima aparecen a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinE	
MSIEHRLNHIAGQLSGNGDVLLNSVDAHTGEP LPYAFHQATGDEVEAAVQAADAAYPAYRSTSP AQRAAFLDAIANELDALGDDFIQHVRETALP EARIRGERSRSTSNQLRFLAEVVRRGDFYAARI DRALPQRTPLPRPDLRQYRIGVGPVAVFGASN FPLAFSTAGGDTASALAAGCPVVFKAHSGHML TAAHVAGAIIDRAVASSGMPAGVFNLIYGAGVG EALVKHPAIQAVGFTGSLRGGRALCDMAAARP QPIPVFAEMSSINPVIVLPQALQARGEQVAGE LAASVVMGCGQFCTNPGLVVGIQSPQFEHFVQ TLVAHMADQGPQTMLNAGTLRSYQNGVQHLLA HPGIQHLAGQPHTGNQAQPQLFKADVSLLLNG DPLLQEEVFGPTTVVVEVADAEQLAEALRHLQ GQLTATLIAEPDDLRAFASLVPLLERKAGRLL LNGYPTGVEVSDAMVHGGPYPATSDARGTSVG TLAIDRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLG IARLLDGVNSRDAV	526 aminoácidos <hr/> Mw: 55452.97 pI: 5,77 <hr/> Composición: A 78 R 32 N 18 D 27 C 5 Q 31 E 22 G 49 H 17 I 18 L 57 K 5 M 10 F 20 P 36 S 25 T 23 W 0 Y 10 V 43

Las CGSALDHs son dependientes de NAD(P)⁺ y catabolizan la conversión del semialdehído del ácido α -cetoglutarico a α -cetoglutarato. Se ha observado que estas enzimas participan en las etapas finales de las rutas metabólicas de L-hidroxiprolina, de D-glucarato y D-galactarato y de L-arabinosa (Watanabe *et al.*, 2007).

Se han descrito que hay varios genes que codifican CGSALDHs en el genoma de cada microorganismo (Adams and Rosso, 1967; Watanabe *et al.*, 2007). En *P. putida* U hay otros dos genes que codifican dos proteínas pertenecientes a este tipo (CGSALDH2 y CGSALDH3) además de *hinE*. Estos genes se encuentran en *loci* que codifican enzimas responsables de la degradación del galactarato (CGSALDH2.PpU) y de la prolina (CGSALDH3.PpU). El gen ortólogo de *hinE* en *P. putida* KT2440 se encuentra dispuesto de la misma manera que en *P. putida* U, mientras que en *P. aeruginosa* PAO1 está rodeado de genes que codifican proteínas cuyas funciones son desconocidas. El alineamiento de las secuencias de estas proteínas se muestra en la **Figura 43**.

HinE . PpU	-MSIEHRLNHIAGQLSGNGDVLLNSVDAHTGEP	59
CGSALDH . KT	-MSIEHRLNHIAGQLSGHGDVLLHSLDAHTGETLPYAFHQATGDEVEAAAQAAEVAYPSY	59
CGSALDH . Pa	-MTAILGHNFIFGGARSAGTFLFLQSLDAASGEALPYRFVQATPEEVDAAAEAAAASAYPHY	59
CGSALDH2 . PpU	--MPLTGYMLIGQTPVTGSREAIRGIDPATGQPLEPAYLGGTGEHVAQACALAWAAFDGY	58
CGSALDH3 . PpU	-MPEILGHNFIAQRSAAGPQRLQSLDASTGEALPYSFAQATEAEVDAQAAKAAAAFAEF	59
CGSALDH . Sm	MIFTPKGKHLVAGEWLDGAGTF----ASAPAHGPAHDFAVGTVELVNRACEAAEEAFWTY	56
FALDH . Vh	-----MNPQTDNVFYATNAFTGEALPLAFPVHTEVEVNQAATAAAKVARDF	46
	. . : * * * * . :	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinE . PpU	RGTSVGTLAIDRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLGIARLLDGVNSRDAV-	526
CGSALDH . KT	RGTSVGTLAIDRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLGIARLLDGVNSRDAV-	526
CGSALDH . Pa	RGTSVGTLAIDRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLGIARLLDGVNSRDAV-	527
CGSALDH2 . PpU	RTTSVGTAAILRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLGIARLLDGVNSRDAV-	525
CGSALDH3 . PpU	RGTSVGTLAIDRFLRPVCFQNYPDALLPDALKNANPLGIARLLDGVNSRDAV-	526
CGSALDH . Sm	GATSVGTMSIRRFRLRPVAYQNPEDLLPEDFLG-----	505
FALDH . Vh	ASTSVGAEAIHRWLRPVAYQALPESLLPDSLKAENPLEIARAVDGAHNS---	510
	****: : * * : **** . : * * : * * : :	

Figura 43. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinE y de las proteínas CGSALDHs de *P. putida* U y de diferentes microorganismos: *P. putida* KT2440 (KT), *P. aeruginosa* PAO1 (Pa), *S. meliloti* y *V. harveyi* (Vh). La zona de unión (GXGXXXG) a NAD(P)⁺ aparece subrayada. La secuencia de los motivos donde figuran los residuos de ácido glutámico y cisteína (señalados con una flecha) están sombreados en gris. Los residuos que participan en la unión a NADP⁺ se indican con ■.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína HinE permitió identificar el dominio Aldedh que comprende casi toda la proteína (desde el aminoácido 24 hasta el 466) que es típico de las proteínas pertenecientes a la familia ALDHs que utilizan aldehídos como substratos (Steinmetz *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 2005). Los dominios donde se encuentran el ácido glutámico (E264) y la cisteína (C301) que forman parte del centro activo se conservan en todas las secuencias comparadas (**Figura 43**) (Weretilnyk and Hanson, 1990).

En cuanto al sitio de unión de la coenzima se encontró una secuencia consenso típica de unión a NAD(P)⁺, que se extiende desde el aminoácido 207 hasta el 213 (SSGMPAG), aunque hay una variación, ya que la primera glicina es una serina en la proteína HinE (**Figura 43**). Otros residuos de gran importancia, y que se han observado en una aldehído deshidrogenasa (FALDH) que oxida aldehídos alifáticos para dar ácidos grasos en *V. harveyi*, son una lisina (K172), una treonina (T175) y una arginina (R210), los cuales en esta enzima interactúan con el grupo fosfato y el grupo hidroxilo del NADP⁺ por medio de puentes de hidrógeno (Watanabe *et al.*, 2007). La lisina esta conservada en HinE (K185), encontrándose presente en todas las ALDHs, tanto NAD⁺ como NADP⁺ dependientes. Sin embargo, la treonina es un aminoácido que esta únicamente presente en las ALDHs dependientes de NADP⁺, pudiendo ser una serina tal como ocurre en HinE (S188). La arginina no aparece en HinE, aunque si se encuentra en la secuencia de aminoácidos de la proteína CGSALDH2 de *P. putida* U y de la proteína de *S. meliloti* (Watanabe *et al.*, 2007; White *et al.*, 2012; Buchhaupt *et al.*, 2013). De esta manera, podría sugerirse que HinE es una ALDH dependiente de NADP⁺, mientras que HinD sería una ALDH dependiente de NAD⁺ porque en su secuencia de aminoácidos solo está presente la lisina (K189).

5.1.3.3. Disrupción de los genes *hinD* y *hinE*.

El análisis de secuencia de *HinD* y *HinE* podría sugerir que estas proteínas eran las responsables de llevar a cabo la oxidación del ImAdh (producto de la desaminación de histamina generado por la enzima *HinC*) a ImAA. Con el fin de determinar si estos dos ORFs estaban implicados en la degradación de histamina en *P. putida* U, se llevó a cabo su disrupción, mediante recombinación homóloga, usando para ello una construcción que contenía en el vector pK18::*mob*, un fragmento interno del gen (bien del gen *hinD* o *hinE*). Para la elaboración de la construcción *hinD*::pK18::*mob*, se amplificó un fragmento de este gen (**Tabla 23**) y se clonó en el plásmido por medio de los cortes enzimáticos *Bam*HI/*Eco*RI. A continuación, mediante una conjugación triparental, se obtuvo el mutante *P. putida* U Δ *hinD*::pK18::*mob*. El mismo proceso se siguió para disrumpir el otro gen (*hinE*). Primero se amplificó un fragmento interno del gen *hinE* mediante PCR (**Tabla 24**), y a continuación se clonó en el plásmido pK18::*mob* mediante los cortes enzimáticos *Bam*HI/*Eco*RI. Una vez se obtuvo esa construcción, se introdujo en *P. putida* U mediante conjugación triparental, obteniéndose la cepa *P. putida* U Δ *hinE*::pK18::*mob*.

Tabla 23. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento interno del gen *hinD*.

Nombre del Primer	Secuencia
HinD.Dis.F	CCGGATGTGGATTGCCTGGTGTC
HinD.Dis.R	CGGCCCGAACACTTCTCCC

Tabla 24. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento interno del gen *hinE*.

Nombre del Primer	Secuencia
HinE.Dis.F	GCACGAAATGCTCGAATTGCGGCGACTGG
HinE.Dis.R	ACCTGCGCCAGTACCGCATCGGCGTC

El mutante *P. putida* U Δ *hinE*::pK18::*mob* no tenía alterada su capacidad para asimilar histamina ya que crecía bien en MMh (**Figura 44**). Este hecho ponía de manifiesto que este ORF no codificaba ninguna proteína esencial para el catabolismo de este compuesto.

En cambio, el mutante disrupto afectado en el gen *hinD*, *P. putida* U Δ *hinD*::pK18::mob si tenía alterada su capacidad en la degradación de histamina, retrasándose en su crecimiento cuando se cultivaba en MMh a diferencia de lo que se observaba en el otro mutante disrupto, *P. putida* U Δ *hinE*::pK18::mob (**Figura 44**). La incapacidad del mutante *P. putida* U Δ *hinD*::pK18::mob para desaminar la histamina como la cepa control se debía a la alteración por disrupción de la secuencia del gen *hinD*, que impedía de este modo su correcta expresión y no a un efecto polar que impidiera la expresión de otro gen situado corriente abajo, ya que el siguiente gen (codifica un receptor de sideróforo) se expresa en sentido contrario al gen *hinD*.

Estos dos mutantes disruptos presentan la misma cinética de crecimiento que la cepa de *P. putida* U control cuando se cultivaron en MM suplementado con otras fuentes de carbono (histidina 10 mM o ImAA 10 mM) (**Figura 44**).

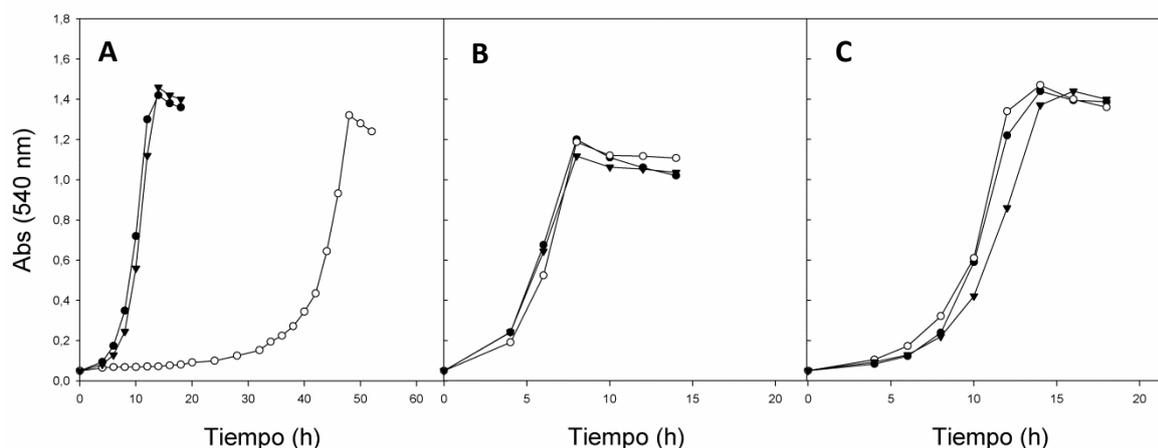


Figura 44. Curvas de crecimiento (medidas como Ab_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●), del mutante disrupto *P. putida* U Δ *hinD*::pK18::mob (○) y del mutante disrupto *P. putida* U Δ *hinE*::pK18::mob (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM

Estos resultados nos permiten concluir que: (i) el gen *hinD* codifica una aldehído deshidrogenasa responsable de llevar a cabo la oxidación del ImAdh (producto de desaminación de la histamina generado por acción de la proteína HinC) a ImAA y (ii) el gen *hinE* no contiene información codificante para ninguna proteína implicada en la degradación de histamina, o que la función desempeñada no es esencial en dicho proceso catabólico, pudiendo ser que supliera, cuando se requiriese, a HinD.

5.1.4. Regulación de la ruta *hin*.

5.1.4.1. Gen *hinB*.

En otros siete mutantes diferentes a los anteriores y que tampoco degradaban histamina, el transposón Tn5 se había insertado en el gen *hinB*. Todos ellos los denominaremos genéricamente como *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5. El gen *hinB* se encuentra situado entre los genes *hinA* y *hinC*. La identificación del punto de inserción en estos mutantes afectados en este gen se muestra en la **Tabla 25**. Hay un punto en la secuencia de este gen (posición 3626) en el que la frecuencia de inserción del transposón es más elevada ya que como puede comprobarse, el Tn5 se ha integrado tres veces (mutantes 52, 56 y 57) (**Tabla 25**).

Tabla 25. Descripción de la secuencia en la que se ha insertado el transposón Tn5 en los mutantes afectados en el gen *hinB* (*P. putida* U Δ *hinB*::Tn5).

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>hinB</i> .	
Mutante 6	+2 V T N Q L L S E Q W F E H L A K V T E 3376 CAGGCCACAG ■ Tn5 ■ TGACTAATCAATTGCTTTCAGAACAGTGGTTCGAGCACCTGGCCAAGGTCACCGA GTCCGGGTGTC ■ ■ ACTGATTAGTTAACGAAAGTCTTGTCCACCAAGCTCGTGGACCGGTTCCAGTGGCT
Mutante 22	+2 K L D A H T R E L Y G R I T P W V L A V L S 3826 CAAGCTGGATGCACACCCCGGAGG ■ Tn5 ■ TGTCAGGGCGCATCACGCCTTGGGTGCTGGCGGTGCTGAG GTTTCGACCTACGTGTGTGGGCGCTCG ■ ■ ACATGCCCGGTAGTGCGAACCCACGACCGCCACGACTC
Mutante 25	+2 Y G L F E V A P D H F E V S E Y Y Q S F Y R 3676 CTATGGGT ■ Tn5 ■ TGTTTCAAGTGGCACCCGACCATTTTCGAGGTCAGCGAGTATTACCAGTCGTTCTACCG GATACCA ■ ■ ACAAGCTTACCCTGGGCTGGTAAAGCTCCAGTCGCTCATAATGGTCAGCAAGATGGC
Mutante 52, 56, 57	+2 S R Y L S G F Y L L D P F Y G A C V E Q V A 3601 CAGCCGCTACTTGTCCGGCTTCTACCTGCTCGACCG ■ Tn5 ■ GTTCTACGGTGCCTGTGTGGAGCAGGTAGC GTCGGCGATGAACAGGCCGAAGATGGACGAGCTGGG ■ ■ CAAGATGCCACGGACACACCTCGTCCATCG
Mutante 55	+2 S R Y L S G F Y L L D P F Y G A C V E Q V A 3601 CAGCCGCTACTTGTCCGGCTTCTACCTGCTCGACCCGTTCTACGG ■ Tn5 ■ TGCCTGTGTGGAGCAGGTAGC GTCGGCGATGAACAGGCCGAAGATGGACGAGCTGGCAAGATGCC ■ ■ ACGGACACACCTCGTCCATCG

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 31**.

Con el fin de determinar si los mutantes afectados en este gen recuperaban su función original, se procedió a la clonación del gen en *trans* siguiendo el mismo protocolo que con los genes anteriores. Para ello, el gen *hinB* de *P. putida* U fue amplificado mediante PCR (**Tabla**

26) y transformado en el plásmido replicativo pMC mediante los cortes de restricción *ApaI/XbaI*. El plásmido recombinante se transfirió a los mutantes *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 mediante conjugación triparental.

Tabla 26. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *hinB* en el mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5

Nombre del Primer	Secuencia
HinB.F	TTGGCGCAGGGATGCGCGGCGGTGTC
HinB.R	TTGCCCTCGCTGTCCACAGGTGCAGGC

A pesar de que el gen clonado se expresaba en *trans*, la cepa recombinante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 pM*ChinB* no era capaz de crecer en MMh (**Figura 45**), lo que indica que la construcción pM*ChinB* no revertía la función metabólica perdida. Este hecho pudiera ser debido a que el gen *hinB* pertenece a una unidad transcripcional formada por diferentes genes, los cuales no se expresan debido al efecto polar de la inserción del transposón Tn5. En tal caso, la expresión del gen *hinB* no podría revertir la función perdida.

Para intentar revertir la función, se procedió a expresar el *cluster hinI* (**Figura 31**), que contenía, además del gen *hinB*, los genes *hinA*, *hinC*, *hinD* y *hinE*. Para ello, se procedió a amplificar el gen *hinE* mediante PCR (**Tabla 27**). El producto de amplificación se clonó por medio de los cortes enzimáticos *EcoRI/BamHI* en el plásmido pK18::*mob*. Posteriormente, a través de la conjugación triparental se llevó a cabo la recombinación de la construcción obtenida en el genoma de *P. putida* U, y una vez conseguido, se digirió el DNA totalmente con la enzima de restricción *NheI*. A continuación, mediante una reacción de religación se obtuvo la construcción pK18::*mobhinI*.

Tabla 27. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la obtención de la construcción del pK18::*mobhinI*.

Nombre del Primer	Secuencia	Modificaciones
C.hin1.F	CGGAATTCGATCCGCATTGCGCAGGACCCGGTG	<i>EcoRI</i>
C.hin1.R	CGGGATCCCGGGCGGTGGTCAAGCACTATCTGGTC	<i>BamHI</i>

Una vez obtenida la construcción pK18::*mobhinI*, por medio de una conjugación triparental, ésta se transfirió al mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5. La cepa recombinante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

generada, *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 pK18::*mobhin1*, recuperaba la capacidad para crecer en MMh (Figura 45), lo que indicaba que: (i) se había restaurado la función metabólica perdida y (ii) el defecto de *hinB* solo puede ser compensado mediante la expresión de los genes pertenecientes al *cluster hinI*.

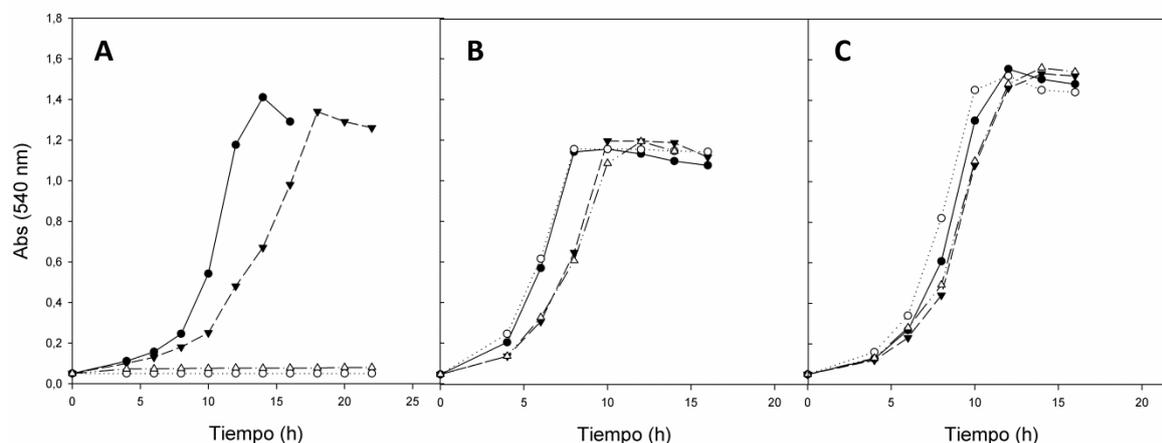


Figura 45. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●), de *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 pMChinB (○), de *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 pK18::*mob* (Δ) y de *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 pK18::*mobhin1* (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM.

A continuación, se indica el peso molecular, el punto isoeléctrico, la secuencia, la composición y el número de aminoácidos de la enzima HinB.

HinB					
VTNQLLSEQWFEHLAKVTEAIGRPGFAANLFA					
ALGVIRPIQATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKA					
PWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVASG					
CYGLFEVAPDHFVSEYYQSFYRHSLEDELN					
YILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDAHTRELYGRI					
TPWVLAVLSKHFAGLDSRAARFENILEQRIHA					
ALNCFGSSLLTERECRIAQLILRGHSTKSLAE					
RLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSFLF					
IDALANAQGVLGKDPLESYMGKLR					
280 aminoácidos					
Mw: 31361.5			pI: 5,69		
Composición:					
A 28	R 15	N 9	D 13	C 4	
Q 13	E 20	G 19	H 10	I 12	
L 36	K 10	M 2	F 15	P 11	
S 20	T 11	W 3	Y 13	V 6	

HinB tiene homología con proteínas anotadas como reguladores de tipo LuxR. Estos reguladores se dividen en dos grupos principales: los reguladores que pertenecen al sistema

sensorial de dos componentes, que son activados por fosforilación (por ejemplo FixJ de *S. meliloti*), y los reguladores que son activados por medio de unión a un autoinductor tal como, la N-acilhomoserina lactona (De Bruijn and Raaijmakers, 2009).

Basados en análisis del dominio N-terminal, la familia LuxR se puede dividir en, al menos, 4 grupos: FixJ, LuxR, LuxR de unión a ATP y reguladores de tipo LuxR con dominio efector autónomo (Balasubramanian *et al.*, 2013). Los reguladores de la familia LuxR tienen una estructura característica, un módulo C-terminal específico de sitios de unión a DNA y un dominio N-terminal de unión a autoinductores (Chen and Xie, 2011).

Cuando se compara LuxR (HinB) con sus homólogos (**Figura 46**) se observó que había muy pocos residuos que estuviesen presentes en todas las secuencias analizadas, concretamente, siete (Y48, W66, D83, P84, E206, G216, G227) (Whitehead *et al.*, 2001). HinB está bastante conservado en otras cepas de *P. putida*, tales como *P. putida* BIRD1, *P. putida* S16 y *P. putida* KT2440, donde el porcentaje de identidad es del 99%. También el grado de identidad es alto (99%) cuando se compara con el regulador LuxR de *Stenotrophomonas rhizophila*. Sin embargo, cuando se comparan con reguladores de este tipo presentes en otros microorganismos (Tra de *Agrobacterium tumefaciens*; LuxR de *Vibrio fischeri*; SpnR de *Serratia marcescens* y CarR de *Pectobacterium carotovorum*) los porcentajes de identidad son del 20%, 19%, 13% y 17%, respectivamente. La zona más característica y responsable de la unión con autoinductores es DPFY, y está comprendida entre el aminoácido 83 y 86 (**Figura 46**) (Shadel *et al.*, 1990; Chen and Xie, 2011).

HinB	--VTNQLLSEQWFEH-----LAKVTEAIGRPGFAANLFAALGVIRPI	40
Sr	--MTNQLLSEQWFEH-----LAKVTEAIGRPGFAANLFAALGVIRPI	40
S16	--MTDQLLSQQWFEH-----QAKVTEAIGRPGFAATLFAALGVIRPI	40
BIRD1	--MTNQLLSAQWFEH-----QAKVTEAIGRPGFAASLFAALGVIRPI	40
KT	--MTNQLLSEQWFEH-----QAKVTEAIGRPGFAASLFAALGVIRPI	40
TraR	-----MQHWLDKLTDLTAIE-SDQCTLEDALAGLAEQIGFGGYAYL-----NIQPG	45
Vf	MNIKNINANEKIIDKIKTCNNNKDINQC-LSEIA---KIIHCEYYLFAII-YPHSIIKP	54
SpnR	-----MFSAFNENQITITET-LREYIDRKLSSFGRLLEYAYT---VVSKKNPS	42
CarR	-----MDHE-IHSFIKRKLKGVGDVWFYSYF---MMSKNSTS	32
	. . :	
HinB	QATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKAPWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVASGCYGL	100
Sr	QATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKAPWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVASGCYGL	100
S16	QATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKAPWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVESGCYGL	100
BIRD1	QATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKAPWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVESGCYGL	100
KT	QATTVYLYPHDGMPCALFEQDDKAPWQPEGNVSRYLSGFYLLDPFYGACVEQVESGCYGL	100
TraR	HVRAITNYH-----PEWQSV---YFERNYSALDPVVKRAKSMKRTFTWAS	87
Vf	DVSLIDNYP-----EKWRKY---YDDAGLLEYDPVVDYSKSHHSPINWNV	96
SpnR	DVLIVSTYS-----DEWVEL---YRTNNFQLTDPVILTAFRRTPSPFAWDE	84
CarR	QPYIISNYP-----EAWMKE---YIKKEMFLSDPIIVASLARITPFSWDD	74
	. : * * * ** . :	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinB	FEVAPDHFVSEYYQSFYRH---SHLEDELNYILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDA-HTREL	156
Sr	FEVAPDHFVSEYYQSFYRH---SHLEDELNYILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDA-HTREL	156
S16	FEVAPDHFVSEYYQSFYRH---SHLEDELNYILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDG-QTRAL	156
BIRD1	FEVAPDHFVSEYYQSFYRH---SHLEDELNYILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDG-QSRTL	156
KT	FEVAPDHFVSEYYQSFYRH---SHLEDELNYILQVAPGQSLAVSLAFTDKLDG-QSRTL	156
TraR	EQEGS---RLSKPERSFYAHAADFGIRSGITIPIKTANGSMSMFTLASEKLTID-LDREI	143
Vf	FEKK----TIKKESPNVIKEAQESGLITGFSFPIHTASNGFGMLSFHSDKDI--YTDSL	150
SpnR	NITL----MSDLKFTKIFSLAKHYNI VNGFTFVLHDHMNNLTLLSVI IANNEQGELEARL	140
CarR	NDIV----TLRAKNQDVFISVQHDISSGYTFVLHDHDNNVATLSIANH-LEDANFEKCM	129
	
HinB	Y----GRITPWVLAVLSKHFAGLDSRAARFENILEQRIHAALNNFGSSLLTERECRIAQL	212
Sr	Y----GRITPWVLAVLSKHFAGLDSRAARFENILEQRIHAALNNFGSSLLTERECRIAQL	212
S16	F----ARITPWVLAVLSKHFAGLDSRAGRFENILEQRIHAALNNFGSSLLTERECRIAQL	212
BIRD1	F----GLITPWVLAVLGKHFAGLDSRAGRFENILEQRIHAALNNFGSSLLTERECRIAQL	212
KT	F----GLITPWVLAVLGKHFAGLDSRAGRFENILEQRIHAALNNFGSSLLTERECRIAQL	212
TraR	DAVAAATA----V-----AQLHARI-----AF-LQARPSAENAAAYLDPKEAAYLKW	184
Vf	F-LHASTNVPLML-----PS-----LVDNYQKINTTRKKSILTKREKECLAW	193
SpnR	T-FE-RGAIQILL-----IDINEQMYCFAGTSSSGRQRHHMDRVKPIFTPENEVLYW	191
CarR	K-NH-ENDLQMLL-----VNVHEKVMAYQRAINQD-NPPDNSRNALLSPRETEVFL	179
	: : *	
HinB	ILRGHSTKSLAERLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSLFDALANAQGVLGKDPL	272
Sr	ILRGHSTKSLAERLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSLFDALANAQGVLGKDPL	272
S16	ILRGHSTKSLAERLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSLFDALANAQGVLGKDPL	272
BIRD1	ILRGHSTKSLAERLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSLFDALANAQGVLGKDPL	272
KT	ILRGHSTKSLAERLGVSEDTIKSHRKNVYAKLDIGTQSELSLFDALANAQGVLGKDPL	272
TraR	IAVGKTMEEAADLEGVKYNSVRVKLAETKKRFDVHTTHTLALVIRRNL-----I-----	234
Vf	ASEGKSTWDISKILGCSERTVTFHLTNTQMKLNTNRCQSISKAILTGA-----INCPYL	248
SpnR	SSMGKTYGDIAAIAIGISISMVKFHMGNIVSKLGVSNARQAIRLGVELEL-----IKRQRA	246
CarR	VSSGRTYKEVSRILGISEVTVKHFHINNSVRKLDVINSRHAIKALELNL-----FHSPCE	234
	*:: . : * . : : : : : . . : :	
HinB	ESYMGKLR--	280
Sr	ESYMGKLR--	280
S16	ESYMGKLR--	280
BIRD1	ESYMGKLR--	280
KT	ESYMGKLR--	280
TraR	-----	234
Vf	KN-----	250
SpnR	R-----	247
CarR	PVVMKHM DAR	244

Figura 46. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinB de *P. putida* U y de las proteínas: LuxR de *P. putida* KT2440 (KT), de *P. putida* S16 (S16), de *P. putida* BIRD1 (BIRD1), de *Stenotrophomonas rhizophila* (Sr), de *Vibrio fischeri* (Vf); TraR de *Agrobacterium tumefaciens*; SpnR de *Serratia marcescens* y CarR de *Pectobacterium carotovorum*. El motivo conservado responsable de la unión con autoinductores aparece sombreado en gris.

El dominio C-terminal posee el motivo HTH (hélice-vuelta-hélice), que es el responsable de la unión a DNA en procariontes. Está formado por dos hélices α unidas por cuatro residuos, encontrándose un residuo de glicocola en la segunda posición (**Figura 47**). La segunda hélice α se denomina de reconocimiento porque determina la especificidad. Además, es necesaria una tercera hélice α para estabilizar esta estructura (**Figura 47**) (Huffman and Brennan, 2002).

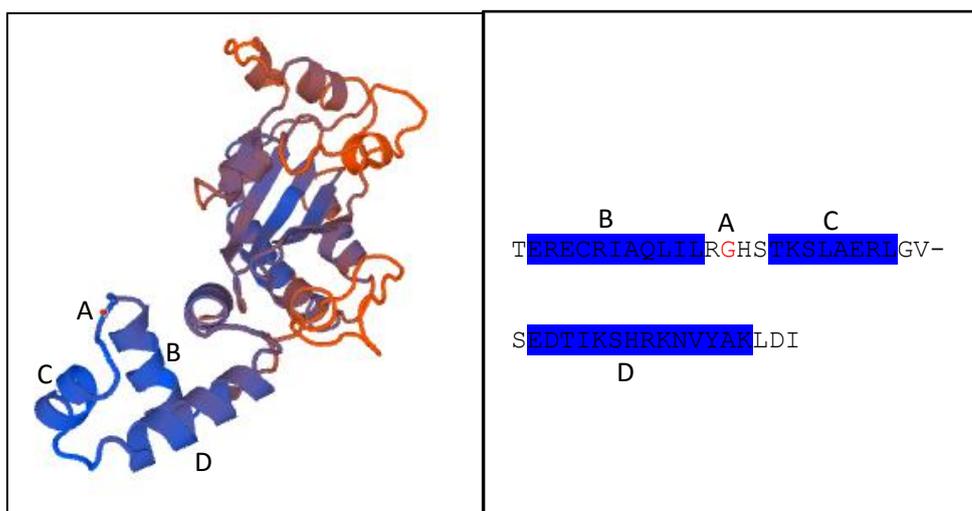


Figura 47. Identificación en la secuencia de aminoácidos de HinB de las tres hélices α (B, C y D) y del residuo de glicocola (A, punto rojo). (IZQUIERDA) Representación tridimensional del regulador con el programa *swissmodel* donde se muestran las dos hélices α (B y C) correspondiente al motivo de unión hélice-vuelta-hélice, con el residuo de glicocola (A, punto rojo) entre ambas hélices, y a continuación una tercera hélice α (D); (DERECHA) Parte de la secuencia donde se localizan las tres hélices α y la glicocola.

Los genes regulados por LuxR se dividen en tres clases en función de su afinidad. La clase I tienen baja afinidad por LuxR, requiriéndose altas concentraciones de reguladores. Los genes de la clase II necesitan un nivel intermedio de LuxR, mientras que genes de la clase III requieren baja concentración de LuxR ya que sus promotores tienen una alta afinidad por LuxR (Chen and Xie, 2011).

A la hora de estudiar que genes podría regular la enzima codificada a partir del gen *hinB*, lo primero que se observó, es que el mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 tiene afectado considerablemente (11%) la capacidad de transporte de histamina (**Tabla 28**).

Tabla 28. Estudio del transporte de histamina en el mutante que tiene afectado el gen que codifica el transportador (*P. putida* U Δ *hinA*::Tn5) y en el mutante afectado en el gen que codifica el regulador LuxR (*P. putida* U Δ *hinB*::Tn5) cuando se cultivaban en MMHS.

MUTANTE	% TRANSPORTE
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinA</i> ::Tn5	5%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinA</i> ::Tn5pM <i>ChinA</i>	98%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinB</i> ::Tn5	11%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinB</i> ::Tn5 pK18:: <i>mobhin1</i>	95%

El 100% del transporte equivale a 180 pmoles/min.

Estos resultados sugieren que este regulador afecta al transportador por dos razones: la primera es que se encuentra al lado del gen que codifica un transportador, expresándose en sentido contrario, y en segundo lugar porque en el estudio de la toma de histamina (**Tabla 28**), el transporte en el mutante con el Tn5 insertado en el gen *hinB* (*P. putida* U Δ *hinB*::Tn5), al igual que ocurre en el mutante *P. putida* U Δ *hinA*::Tn5, está muy afectado. Estos datos nos permiten proponer que HinB actúa como un activador de HinA y probablemente de los genes incluidos en el *cluster hin1*.

Esta hipótesis se corroboró al comprobar que para revertir la función perdida en el mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5, era necesario expresar una construcción donde se encontrasen otros genes, tales como *hinA*, *hinC* y *hinD*, lo que ponía en evidencia, que el regulador ejercía su efecto sobre dichos genes. Por esta razón, el siguiente abordaje experimental que se llevó a cabo consistió en estudiar la expresión mediante PCR-RT de esos genes (ver Materiales y Métodos). En la **Figura 48**, se observa como el mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5, tiene afectada su propia expresión (*hinB*) y que la ausencia de este gen afecta a la expresión del resto. Por tanto, este regulador además de actuar sobre el gen que codifica el transportador (*hinA*), como ya se había visto, ejerce una regulación sobre *hinC* y *hinD*, que se encuentran en el *cluster hin1*. Además, la interrupción del gen *hinB* también afecta a la expresión de otros genes (*dadA* y *coxB*) localizados en otros *clusters* y que también están implicados en el catabolismo de histamina (ver más adelante) (**Figura 48**).

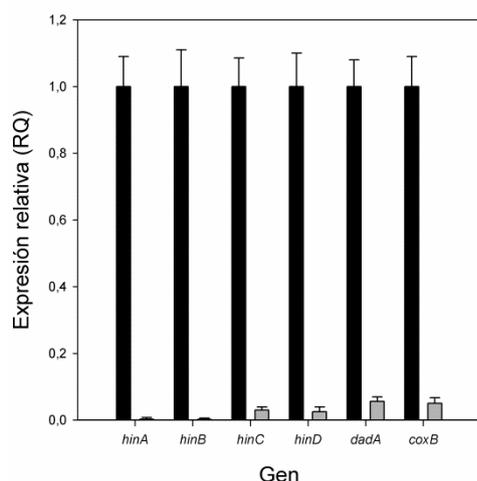


Figura 48. Estudio de la expresión de los genes *hinA*, *hinB*, *hinC*, *hinD*, *dadA* y *coxB* en *P. putida* U (barras negras) y en el mutante *P. putida* U Δ *hinB*::Tn5 (barras grises).

5.1.5. Análisis comparativo de otros posibles *cluster hin1* presentes en diferentes microorganismos.

El *cluster hin1* de *P. putida* U está constituido por un *cassette* catabólico de 7,3 kb. Otros probables *clusters* homólogos han sido encontrados en otros microorganismos, principalmente, de especies pertenecientes a *Pseudomonas*. En las cepas *P. putida* KT2440 y *P. putida* S12, la organización de los genes no varía respecto a la descrita en *P. putida* U (**Figura 49**).

En *P. aeruginosa* PAO1, los homólogos de los genes *hinC* y *hinD* están separados por el gen *pa0220* que codifica un transportador de la familia APC, familia a la que corresponde el transportador de histamina. Sin embargo, el gen que codifica el transportador que posee más grado de identidad con el *hinA* es el gen *pa0322* (**Figura 49**).

En *P. fluorescens* NZ007, la organización de los genes es algo distinta. Los genes homólogos a *hinB*, *hinC*, *hinA* y *hinD* se encuentran en un *cluster*, mientras que en otro lugar del genoma se encuentra el gen homólogo de *hinE*. Otra diferencia, es el orden y la orientación de los genes, que difiere con respecto a la organización en *P. putida* U (**Figura 49**).

En *Stenotrophomonas rhizophila*, se ha observado que la organización de los genes es idéntica a la descrita en *P. putida* U. Mientras que en *Raoultella ornithinolytica* B6 no se encuentra un gen homólogo a *hinB* dentro del *cluster hin1*. Únicamente están presentes los genes homólogos de *hinC* y *hinD*, que se encuentran contiguos. En otras enterobacterias como *E. coli*, no se hallan genes homólogos a los del *cluster hin1*, siendo los más parecidos los genes involucrados en la degradación de putrescina (anotados en *P. putida* como *puuP* y *puuC*) y de los cuales hemos hablado.

Tras la comparación del *cluster hin1* (o equivalentes) en diferentes microorganismos, cabe concluir que los genes homólogos de *hinC* y *hinD* siempre se encuentran adyacentes (o con un gen por medio), lo que sugiere que las enzimas HinC y HinD son las que catalizan la reacción de transaminación de la histamina, y la posterior oxidación del aldehído precursor del ImAA.

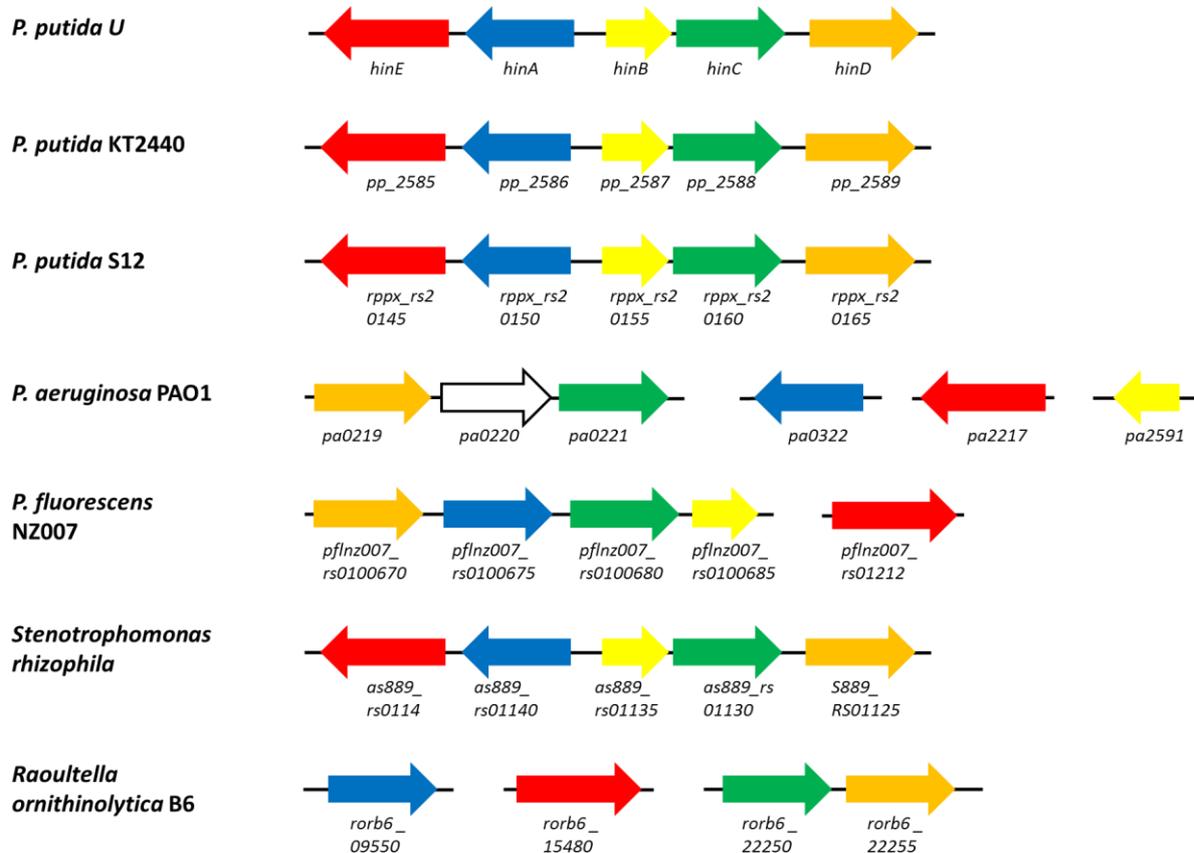


Figura 49. Comparación del *cluster hinI* implicado en el transporte y desaminación de la histamina, y su posterior oxidación en *P. putida* U con otros probables *clusters hinI* identificados por homología de secuencia en otros microorganismos. Los genes son nombrados como están anotados en la base de datos NCBI. El color indica el gen con el que tienen más grado de identidad: rojo (*hinE*), azul (*hinA*), amarillo (*hinB*), verde (*hinC*), naranja (*hinD*). Las referencias de las secuencias son: *P. putida* KT2440 (Z_LT799039), *P. putida* S12 (NZ_CP009974.1), *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516.2), *P. fluorescens* (NZ_AKBR01000012), *Stenotrophomonas rhizophila* (NZ_LNNI01000002), *Raoultella ornithinolytica* B6 (CP004142).

5.2. Organización genética del *cluster dad*.

Algunos mutantes aunque eran incapaces de degradar histamina cuando se cultivaban en MMh, si lo hacían cuando se añadía al cultivo otra fuente de carbono precursora de piruvato. El análisis del punto de inserción del transposón Tn5 reveló que en todos estos mutantes se encontraba en un fragmento de DNA que constituye el *cluster dadRAX* (Lobočka *et al.*, 1994; He *et al.*, 2011).

A continuación, se muestra la secuencia de nucleótidos del *cluster dadRAX* formado por los genes *dadR*, *dadA* y *dadX*, así como la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican (**Figura 50**).

```

1 ACAACCCGCGCAGGTGCTGGTCTAGCCTCAGTCCGGGATCGGCAGGCAGAGGCTTTCCTTCCACCTCTCCATCACG
  TGTGGGCCGTCACGACCAGATCGGAGTCAGGCCCTAGCCGTCCTCCGAAAGGAAGTGGAGAAGGTAGTGC
-3      ■ D P I P L C L S E K V E E M V

76 ATGTAGCTCTTCGATTTCGCGCACGTGCGGCAGCTTCAGCAAGATGTCGCCAAGCAGCTTGCGGTACGACGCCATC
  TACATCGAGAAGCTAAGCGCGTGCACGCCGTCGAAGTCGTTCTACAGCGGTTGTCGAACGCCATGCTGCGGTAG
-3 I Y S K S E R V H P L K L L I D G L L K R Y S A M

151 TCCGAAATGCGCGCCTTACCAGGTAGTCGAAGTCACCTGACACCAGGTGGCATTCCAGCACGTGGGGCAGCTTC
  AGGCTTTACGCGCGGAAGTGGTCCATCAGCTTCACTGGACTGTGGTCCACCCTAAGGTGTCACCCCGTCGAAG
-3 E S I R A K V L Y D F D G S V L H C E L V H P L K

226 AAGACCGCGCGCGGAACCTCTCGAAGGTGTCGCCCCACTTGTAGTCCAGGCTGATTTCCACGAACACCAGCAGG
  TTCTGGCGCGCGCCTTGAGGAGCTTCCACAGCGGGCTGAACATCAGGTCGACTAAAGGTGCTTGTGGTTCGTC
-3 L V A R R F E E F T D G S K Y D L S I E V F V L L

301 CTGCCCTTGAAGTGTGCGGGTTCAGACGGGCGTGTAGCCCATGATGATGCCCTCGCGCTCCAGCGCGCAACC
  GACGGGAATCCACGACGCCCAAGTCTGCCCGCAACATCGGGTACTACTACGGGAGCGCGAGGTCCGCGCGTTGG
-3 S G K L H Q P N L R A N Y G M I I G E R E L R R V

376 CGCTCGGTGCAAGGGGTGGTGGACAGCCCACTTTCGCCCCAGTTCGGTGAAGGAAATACGCCCGTCATTCTGC
  GCGAGCCAGTTCCTCCACACCTGTCGGGTTGAAAGAGCGGGTCAAGCCACTTCCCTTTATGCGGGCAGTAAGACG
-3 R E T C P T T S L G V K E G L E T F S I R G D N Q

451 AGGATCCGAGGATGTTACGGTCGATCTTGTCCAGTTCAGCTTGTCTGCTGGTGGTTCATAGGGGATGCC
  TCCTAGGCGTCTACAATGCCAGCTAGAACAGGTCAAGTGCGAACGAGACCACGCCCAAGAGTATCCCTTACGG
-3 L I R L I N R D I K D L E R K S Q H Q T R M DadR

526 CCTCCGTGAAAGGCGATTTTCCGAGAATTTCTCGCCAATAATAGGCTTTTATATAGTGAATTGCACTGGTCTCAA
  GGAGGCACTTCCGCTAAAACGGCTCTTAAGAGCGGTTATTTATCCGAAAATATATCACTTAACGTGACCAGAGTT

+3
601 ATTCCTATACTGCGCCATTCATGCCATATCAATAAAAGTCTGCGGCGTCCGCGGTGTGAGGGATATAACGATGC
  TAAGGATATGACGCGGGTAAGTACGGTATAGTTATTTTCAGACGCGCACGGCGCACACTCCCTATATTGCTACG

+3 R V L V L G S G V I G T A S A Y Y L A R Q G F E V
676 GAGTCTGGTACTTGGTAGCGGTGTAATCGGAACCGCAGTGCCTACTACCTGGCCCGCAAGGTTTCGAAGTGA
  CTC AAGACCATGAACCATCGCCACATTAGCCTTGCGGTCACGGATGATGGACCGGGCCGTTCCAAGGCTCACT

+3 T V V D R Q P A V A M E T S F A N A G Q I S P G Y
751 CGGTGGTCGACCGCCAGCCGGCGGTGGCCATGGAACCAAGTTTTGCCAACGCGCCAGATCTCGCCCGGCTATG
  GCCACAGTGGCGGTGCGCCGCCACCGGTACCTTTGGTCAAACGGTTGCGGCGGTTAGAGCGGGCCGATAC

+3 A S P W A A P G V P L K A I K W L L E R H A P L A
826 CCTCGCCCTGGGCGCCCCAGGCGTGCCTGAGGCAATCAAGTGGTGTGAGCGCCACGCTCCCTGGCCCA
  GGAGCGGACCCCGCGGGTCCGCACGGCAGTTCGGTAGTTTCCAGCACGACCTCGCGGTGCGAGGGGACCGGT

+3 I K L T G D V D Q Y L W M A Q M L R N C T A S R Y
901 TCAAGCTCACCGGCGACGTCGACCACTGCTGGATGGCACAGATGCTGCGCAACTGCACCGCCAGCCGTTACG
  AGTTCGAGTGGCCGCTGCAGCTGGTCATGGACACCTACCGTGTCTACGACGCGTTGACGTGGCGGTGCGCAATGC
  
```

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

+3 A V N K E R M V R L S E Y S R D C L D E L R A E T
976 CCGTGAACAAGGAGCGCATGGTGCCTGTCCGAGTACAGCCGCGACTGCCTGGACGAAGTGGCGCCGAAACCG
GCCACTTGTTCCTCGCTACCACGCGGACAGGCTCATGTCCGGCGCTGACGGACCTGCTTGACGCGCGGCTTTGGC

+3 G I A Y E S R S L G T T Q L F R T Q A Q V D A A A
1051 GCATTGCCTACGAAAGCCGCTCTTTGGGTACCACCCAGCTGTTCCGCACCCAGGCCAGGTGGATGCCGCGGCCA
CGTAACGGATGCTTTCGGCGAGAAACCCATGGTGGTTCGACAAGCGTGGGTCCGGTCCACCTACGGCGCGCTT

+3 K D I A V L E Q S G V P Y E L L D R E G I A R V E
1126 AGGATATTGCCGTGCTCGAGCAGTCCGGCGTGCCTTACGAACTGCTGGACCCGAGGGTATTGCCCGCGTCAAC
TCCTATAACGGCACGAGCTCGTACGGCCGACGGAATGCTTGACGACCTGGCGCTCCATAACGGCGCGAGCTTG

+3 P A L A G V K D I L A G A L R L P N D Q T G D C Q
1201 CCGCCCTGGCTGGCGTGAAGGACATTCTGGCCGGCGCCCTGCGCCTGCCTAACGACCAGACCGGGCAGTCCAGC
GGCGGGACCGACCCACTTCTGTAAAGACCGCCGCGGGACGCGGACGGATTGCTGGTCTGGCCGCTGACGGTCC

+3 L F T T K L A D M A I K L G V E F R F G Q D I Q R
1276 TGTTACCACCAAGCTCGCCGACATGGCCATCAAGCTGGGTGTGGAGTTCCGTTTTGGTCAGGACATCCAACGCC
ACAAAGTGGTGGTTTCGAGCGGCTGTACCGGTAGTTGACCCACACCTCAAGGCAAACAGTCCCTGTAGGTTGGC

+3 L D F A G D R I N G V W I D G K L E T A D R Y V L
1351 TGGACTTCGCGGGCGACCCGATCAATGGCGTGTGGATCGACGGCAAGCTGGAAACCGCCGACCCGCTACGTGCTGG
ACCTGAAGCGCCCGCTGGCGTAGTTACCGCACACCTAGCTGCCGTTTCGACCTTTGGCGGCTGGCGATGCACGACC

+3 A L G S Y S P Q M L K P L G I K A P V Y P L K G Y
1426 CGCTGGGCGAGTACTCGCCGACAGATGCTCAAGCCGCTGGGCATCAAGGCGCCGGTACCCGCTGAAGGGCTACT
GCGACCCGTCGATGAGCGGCTCTACGAGTTCGGGACCCGCTAGTTCCGCGGCCACATGGGCGACTTCCCGATGA

+3 S L T V P I T N G D M A P T S T I L D E T Y K V A
1501 CGCTGACCGTACCGATTACCAACGGCGACATGGCCCCGACTTCGACCATTCCTCGACGAGACCTACAAGGTCCGCA
GCGACTGGCATGGCTAATGGTTGCCGCTGTACCGGGCTGAAGCTGGTAAGAGCTGCTCTGGATGTTCCAGCGCT

+3 I T R F D N R I R V G G M A E I A G F D L S L N P
1576 TCACCCGTTTCGACAACCGTATCCGGGTGGGCGGCATGGCTGAAATCGCCGGTTTTTGACCTGTCCGTGAACCCGC
AGTGGGCAAAGCTGTTGGCATAGGCCACCCGCGCTACCGACTTTAGCGGCCAAAACCTGGACAGCGACTTGGGGC

+3 R R R E T L E M I V N D L Y P R G G D L S Q A S F
1651 GTCGGCGCAAACGCTGGAGATGATCGTCAACGACCTTTATCCTCGCGGTGGTGACCTGAGCCAGGCCAGTTTCT
CAGCCGCGCTTTGGACCTCTACTAGCAGTTGCTGGAATAAGGAGCGCCACCACTGGACTCGGTCCGGTCAAAGA

+3 W T G L R P A T P D G T P I V G A T A F R N L F L
1726 GGACCGGCTGCGCCCGGACCCCGGACGGCACGCCGATCGTTGGTGCCACGGGCTTCGCAACCTGTTCTCTGA
CCTGGCCGACGCGGGCCGCTGGGGCCTGCCGTGGGCTAGCAACCACGGTGGCGCAAGGCGTTGGACAAGGACT

+3 N T G H G T L G W T M A C G S G R L L A D L I A R
1801 ACACCGGTACGGTACCCTGGGCTGGACCATGGCGTGGCGCTCCGGTCCGCTGCTGGCCGACCTGATTGCGCGCA
TGTGGCCAGTGCCATGGGACCCGACCTGGTACCGCACCCGAGGCCAGCGGACCGGCTGGACTAACGCGGCT

+3 K K P Q I S A E G L D I S R Y G N S R E A T K H G
1876 AGAAACCGCAGATCAGTGCAGGAGCCTGGACATTTCCCGTTATGGCAACAGCCGGAAGCGACCAAGCACGGGC
TCTTTGGCGTCTAGTCACGGCTTCCGGACCTGTAAGGGCAATACCGTTGTCGGCCCTTCGCTGGTTCTGTCGCC

+3 Q G A P V H Q Q ■
1951 AGGGCGCGCGGTTACACGACGTAAGGCTGCACCGGCTTTTCGCGGGCTCGCCCGCTCCACAGGTACTGC
TCCCGCGCGCCAAAGTGGTCTCATTTTCGGACGTGGCCGAAAAGCGCCGAGCGGGCGAGGGTGTCCATGAC

2026 ACAGTTTTCAATACCTGTGATGCTCCTGTGGAGCGGGCGAGCCCGCAAGAATCCAGCACCGATTCAACCCGAA
TGTCAAAAGTTATGGACACTACGAGGACACCTCGCCCGCTCGGGCGCTTCTTAGGTCGTGGCTAAAGTTGGGCTT

DadX M R P A R A L I D L Q A L R H N Y R L

2101 CCACCATAAGGCAGCCGATGCTCCCGCCGCGCCCTGATCGACCTCCAGGCCCTGCGCCACAACCTACCGTCT
GGTGGTATTCCGTCGGCGGTACGCAGGGCGGGCGGGACTAGCTGGAGGTCCGGGACCGGCTGTTGATGGCAGA

+2 A R E L T G A K A L A V I K A D A Y G H G A V R C
2176 GGCCCGTGAAGTACCGGTGCCAAAGCCCTCGCAGTATCAAGGCCGACGCTATGGCCACGGTGGCGTACGCTG
CCGGGCACTTGACTGGCCACGGTTTCGGGAGCGTACTAGTTCCGGCTGCGGATACCGGTGCCACGGCATGCGAC

+2 A L A L E A E A N G F A V A C I E E A L E L R A A
2251 CGCCCTGGCCCTGGAGGCCAAGCCAACGGCTTTGCCGTGGCCTGCATCGAAGAGGCGCTGGAGTTGCGCGCCGC
GCGGGACCGGACCTCCGGCTTCGGTTGCCGAAAACGGCACCGGACGCTAGCTTCTCCGCGACCTCAACGCGCGGGC

+2 G I K A P V L L L E G F F E A S E L A L I A E H D
2326 CCGTATCAAGGCCCGGTGCTGTTGCTGGAAGGCTTCTCGAAGCCAGCGAGCTGGCGCTGATTGCCGAGCACGA
GCCATAGTTCCGGGGCCACGACAACGACCTTCCGAAGAAGCTTCGGTCCGCTCGACCGGACTAACGGCTCGTGCT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 29. Localización del punto de inserción de los diferentes mutantes afectados en el gen *dadA* (*P. putida* U Δ *dadA*::Tn5).

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>dadA</i>	
Mutante 1	<pre> +3 A S P W A A P G V P L K A I K W L L E R H A 826 CCTCGCCCTGGGCCGCCAGGCGTGCC Tn5 GCTGAAGGCCATCAAGTGGCTGCTGGAGCGCCACGCTC GGAGCGGGACCCGGCGGGTCCGCACGG CGACTTCCGGTAGTTCACCGACGACCTCGCGGTGCGAG </pre>
Mutante 20,30	<pre> +3 V L G S G V I G T A S A Y Y L A R Q G F E V 684 G T A C T T G G T A G C G G T G T A A T C G G A A C C G C C A G T G C C T A C T A C T T G G C C C G G C A A G G T T T C G A A G Tn5 T G C A T G A A C C A T C G C C A C A T T A G C C T T G G C G G T C A C G G A T G A T G G A C C G G C G G T T C C A A A G C T T C A C </pre>
Mutante 33	<pre> +3 A S P W A A P G V P L K A I K W L L E R H A 826 C C T C G C C C T G G G C C G C C C A G G C G T G C C G T G A A G G C C A T C A A G T G G L T G C T G G A G C G C C A C G C T Tn5 C G G A G C G G G A C C C G G C G G G T C C G C A C G G C G A C T T C C G G T A G T T C A C C G A C G A C C T C G C G G T G C G A A C </pre>
Mutante 34	<pre> +3 A S P W A A P G V P L K A I K W L L E R H A 826 C C T C G C C C T G G G C C G Tn5 C C C C A G G C G T G C C G C T G A A G G C C A T C A A G T G G C T G C T G G A G C G C C A C G C T C G G A G C G G G A C C C G G C G G G T C C G C A C G G C G A C T T C C G G T A G T T C A C C G A C G A C C T C G C G G T G C G A G </pre>
Mutante 59	<pre> +3 N T G H G T L G W T M A C G S G R L L A D L 1801 A C A C G G G T C Tn5 A C G G T A C C C T G G G C T G G A C C A T G G C G T G C G G C T C C G G T C G C C T G C T G G C C G A C C T G A T G T G C C A G T G C C A T G G G A C C C G A C C T G T A C C G C A C G C C G A G G C C A G C G G A C G A C C G G T G G A C T </pre>
Mutante 65	<pre> +3 A S P W A A P G V P L K A I K W L L E R H A 826 C C T C G C C C T G G G C Tn5 C G C C C C A G G C G T G C C G C T G A A G G C C A T C A A G T G G C T G C T G G A G C G C C A C G C T C G G A G C G G G A C C C G G C G G G T C C G C A C G G C G A C T T C C G G T A G T T C A C C G A C G A C C T C G C G G T G C G A G </pre>
Mutante 66	<pre> +3 G I A Y E S R S L G T T Q L F R T Q A Q V D 1051 G C A T T G C C T A C G A A A G C C G C T C T T T G G G T A C C A C C A G C T G T T C C G C A C C C A G Tn5 G C C C A G G T G G A T G C G T A A C G G A T G C T T T C G G C G A G A A A C C C A T G G T G G G T C G A C A A G G C G T G G G T C G G G T C C A C C T A C </pre>

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 50**.

Para determinar si el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 recuperaba su función original, se procedió a la expresión heteróloga del gen *dadA*. Para ello se amplificó dicho gen de *P. putida* U mediante PCR (**Tabla 30**). A continuación, dicho fragmento se clonó directamente en el plásmido pGEM[®]-T easy. Después se introdujo en el plásmido pBlueScript KS utilizando los sitios de restricción *SpeI/NotI*, y por último, mediante los cortes enzimáticos *ApaI/SacI*, se obtuvo la construcción pMC*dadA*.

Tabla 30. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *dadA* en el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5.

Nombre del Primer	Secuencia
DadA.F	GCGGGCGAGCCCGCGAAAAGGCCGG
DadA.R	GCAGGATCCGCAGGATGTTACGGTCG

La contrucción así obtenida, pMC*dadA* se transfirió mediante conjugación triparental al mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5. La nueva cepa recombinante (*P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 pMC*dadA*) en la que el gen *dadA* se expresaba bajo el control del plásmido recuperaba su capacidad para crecer en MMh aunque con cierto retraso con respecto al control (**Figura 51**). Se comprobó que cuando se transformaba el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 con el plásmido vacío pMC, este no era capaz de asimilar la histamina en el mismo periodo, demostrándose así que se estaba expresando *dadA*. Esta cepa, al igual que la que contenía el gen en *trans*, es capaz de degradar la histidina y el ImAA como la cepa control (**Figura 51**).

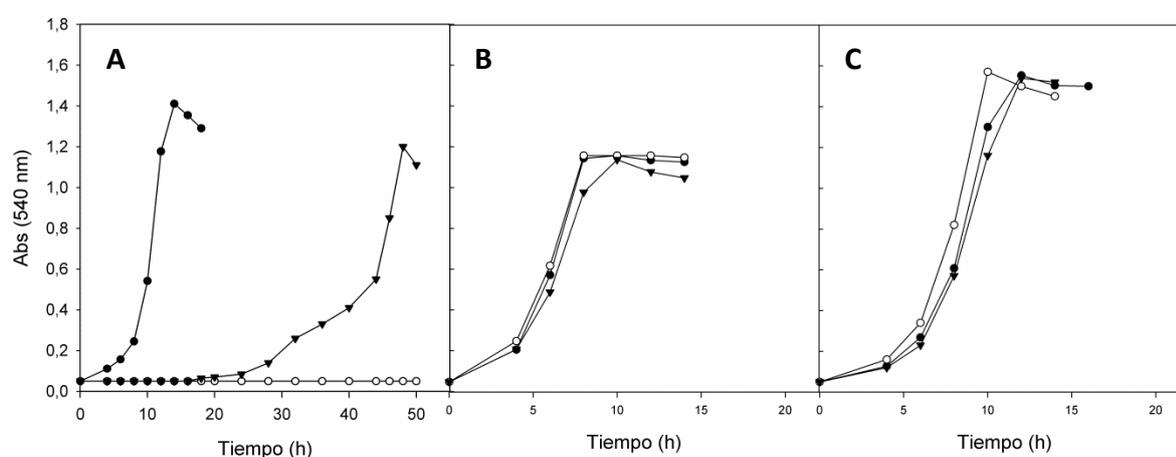


Figura 51. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de *P. putida* U control (●), del mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 PMC (○) y de *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 pMC*dadA* (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA y (C) histidina 10 mM.

Se ha comprobado que para que tenga lugar la actividad de la enzima DadA (subunidad pequeña de una deshidrogenasa de D-aminoácidos), se requiere la subunidad grande, la cual se desconoce hasta el momento (He *et al.*, 2011). El hecho de que la actividad de la subunidad pequeña se exprese desde un plásmido, y no desde el propio genoma, puede que dificulte la interacción entre ambas y esa sea la causa del retraso observado en el crecimiento (**Figura 51**).

La secuencia, la composición, el número de aminoácidos, así como el peso molecular y el punto isoeléctrico de la proteína DadA se detallan a continuación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DadA					
	434 aminoácidos				
	Mw: 47313,17	pI: 8,22			
MRVLVLGSGVIGTASAYYLARQGFEVTVVDRQ PAVAMETSFANAGQISPGYASPWAAPGVPLKA IKWLLERHAPLAIKLTGDVDQYLWMAQMLRNC TASRYAVNKERMVRLSEYSRDCLDELRAETGI AYESRSLGTTQLFRTQAQVDAAAKDIAVLEQS GVPYELLDREGIARVEPALAGVKDILAGALRL PNDQTGDCQLFTTKLADMAIKLGVEFRFGQDI QRLDFAGDRINGVWIDGKLETADRYVLALGSY SPQMLKPLGIKAPVYPLKGYSLTVPITNGDMA PTSTILDETYKVAITRFDNRIRVGGMAE IAGF DLSLNPRRRETLEMIVNDLYPRGGDLSQASFW TGLRPATPDGTPIVGATAFRNFLNTGHGTLG WTMACGSGRLLADLIARKKPQISAEGLDISRY GNSREATKHGQGAPVHQQ	Composición: A 48 R 32 N 12 D 26 C 4 Q 19 E 20 G 41 H 4 I 23 L 47 K 16 M 11 F 12 P 22 S 22 T 28 W 6 Y 15 V 26				

Esta deshidrogenasa se ha estudiado en muchos microorganismos, tales como *E. coli* (Lobocka *et al.*, 1994), *P. aeruginosa* PAO1 (He *et al.*, 2011), *E. aerogenes* (Janes and Bender, 1998) y *S. typhimurium* (Wasserman *et al.*, 1983). En la **Figura 52** se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína DadA en los microorganismos mencionados. Los porcentajes de identidad de esta proteína en *P. putida* U frente a las que se encuentran en *P. aeruginosa* PAO1, en *E. coli*, en *E. aerogenes* y en *S. typhimurium*, son del 85%, 63%, 62% y 61%, respectivamente.

	βββββ αααααααααααααα ββββββ	
DadA. PpU	MRVLVLGSGVIGTASAYYLARQGFEVTVVDRQPAVAMETSFANAGQISPGYASPWAAPGV	60
DadA. Pa	MRVLVLGSGVIGTASAYYLARAGFEVVVDRQDGPALLETSFANAGQVSPGYASPWAAPGI	60
DadA. Ec	MRVVLGSGVVGVASAWYLNQAGHEVTVIDREPGAALETSAANAGQISPGYAAPWAAPGV	60
DadA. Ea	MRVVLGSGVVGVASAWYLSQAGHDVTVIDRQPGPAEETSAANAGQISPGYAAPWAAPGV	60
DadA. St	MRVVLGSGVVGVTSAWYLSQAGHDVTVIDRESGPAQETSAANAGQISPGYAAPWAAPGV	60
	:**.*.:**:* : *.:*.*:**: . * ** * :*****:*****:*****:	
DadA. PpU	PLKAIKWLLERHAPLAIKLTGDVDQYLWMAQMLRNC TASRYAVNKERMVRLSEYSRDCLD	120
DadA. PAO1	PLKAMWLLKHPALAIKLTSDPSQYAWMLQMLRNC TAERYAVNKERMVRLSEYSRDCLD	120
DadA. Ec	PLKAIKWMFQRHAPLAVRLDGTQFQLKMMWQMLRNC DTRHYMENKGRMVRLAEYSRDCLK	120
DadA. Ea	PLKAIKWMFQRHAPLAIGLDGTSFQLKMMWQMLRNC DTRHYMENKGRMVRLAEYSRDCLK	120
DadA. St	PLKAIKWMFQRHAPLAVRLDGTQFQLKMMWQMLRNC DTRHYMENKGRMVRLAEYSRDCLK	120
	::***:***: * . * ** * : : * ** * :*****:*****:	
DadA. PpU	ELRAETGIAYESRSLGTTQLFRTQAQVDAAAKDIAVLEQSGVPYELLDREGIARVEPALA	180
DadA. PAO1	ELRAETGIAIEGRTLGTQLFRTQAQLDAAGKDIAVLEERSGVPYEVLDREGIARVEPALA	180
DadA. Ec	ALRAETNIQYEGRQGGTLQLFRTEQQYENATRDI AVLEDAGVPYQLLESSLAEVEPALA	180
DadA. Ea	ALRDTTGIQYEGRQGGTLQLFRTEQQYENATRDI AVLEDAGVPYQLLEAKRLAEVEPALA	180
DadA. St	TLRAATGIEYEGRQGGTLQLFRTEQQYENATRDI AVLEDAGVPYQLLESSLAEVEPALA	180
	** *.* **.* ** * : * :***** :*****:*. :*.*****	
DadA. PpU	GVKDILAGALRLPNDQTGDCQLFTTKLADMAIKLGVEFRFGQDIQRLDFAGDRINGVWID	240
DadA. Pa	KVADKLVGALRLPNDQTGDCQLFTTTLAEMAKGLGVEFRFGQNIERLDFAGDRINGVLVN	240
DadA. Ec	EVAKHLTGGLQLPNDETGDCQLFTQNLARMAEQAGVKFRFNTVPDQLLCDGEQIYGVKCG	240
DadA. Ea	EVSHKLTGGLRLPNDETGDCQLFTTTLAAMADQAGVTRFNTAVDALLHEGDRIAGVKCG	240
DadA. St	EVAKHLTGGLRLPNDETGDCQLFTQRLARMAEQAGVTRFNTVPVEKLLYENDQIYGVKCA	240
	* . *.*.*:*****:*****.* ** ** * : : * ** * :*****:*****:	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DadA.PpU	GKLETADRYVVLALGSYSPQMLKPLGKAPVYPLKGYSLTVPITNGDMAPTSTILDETYKV	300
DadA.Pa	GELLTADHYVVLALGSYSPQLLKLPLGKAPVYPLKGYSLTVPITNPEMAPTSTILDETYKV	300
DadA.Ec	DEVIKADAYVMAFGSYSTAMLKGI-VDIPVYPLKGYSLTIPIAQEDGAPVSTILDETYKI	299
DadA.Ea	MRIIKGDAYVMAFGSYSTAMLKGL-VDIPVYPLKGYSLTIPIAQEDGAPVSTILDVITYTI	299
DadA.St	DEIIKADAYVMAFGSYSTAMLKGI-VDIPVYPLKGYSLTIPIVEPDGAPVSTILDETYKI	299
	.: ..* **:*.**** :** : :. *****:*.:. : *.***** **:	
DadA.PpU	AITRFDNRIRVGGMAEIIAGFDLSLNPRRRETLEMI VNDLYPRGGDLSQASFWTGLRPATP	360
DadA.Pa	AITRFDQRIRVGGMAEIIAGFDLSLNPRRRETLEMITDLYPEGGDISQATFWTGLRPATP	360
DadA.Ec	AITRFDNRIRVGGMAEIVGFNTELLQPRRETLEMVVRDLYPRGGHVEQATFWTGLRPMTP	359
DadA.Ea	AITRFDQRIRVGGMAEIVGFNKTLQPRRETLEMVVRDLFPRGGHVEQATFWTGLRPMTP	359
DadA.St	AITRFDKRIRVGGMAEIVGFNTDLLQPRRETLEMVVRDLFPRGGHIEQATFWTGLRPMTP	359
	*****:*****. **: * *****: . **:*.**.: . **:***** **	
DadA.PpU	DGTPIVGATAFRNLFLNTGHGTLGWTMACGSGRLLADLIARKKPQISAEGLDISRYGNSR	420
DadA.Pa	DGTPIVGATRYRNLFLNTGHGTLGWTMACGSGRYLADLMAKKRPQISTEGLDISRYNSP	420
DadA.Ec	DGTPVVGRTFRKNLWLNTGHGTLGWTMACGSGQLSDLLSGRTPAIPYEDLSVARYSRGF	419
DadA.Ea	DGTPVVGRTAYKNLWLNTGHGTLGWTMACGSGQLISDLISGRTPAIPYDDLAVARYSPGF	419
DadA.St	DGTPVVGRTRYKNLWLNTGHGTLGWTMACGSGQLSDILSGRTPAIPYDDLAVARYRSDF	419
	****. ** * :. **:*****: :. *: : * * :. * :. ** .	
DadA.PpU	EATKHGQGAPVHQQ	434
DadA.Pa	ENAKNAHPAPAH--	432
DadA.Ec	TPSRPGHLHGAHS-	432
DadA.Ea	TPARPQHLHGAHN-	432
DadA.St	TPTPPQRLHSAHN-	432
	: :	

Figura 52. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína DadA de *P. putida* U y de otros microorganismos: *P. aeruginosa* PAO1 (Pa), *E. coli* (Ec), *E. aerogenes* (Ea) y *S. typhimurium* (St). La secuencia sombreada en gris corresponde con la zona de plegamiento $\beta\alpha\beta$ que está relacionada con el sitio unión a FAD.

En las proteínas analizadas existe bastante conservación de aminoácidos excepto en la zona C-terminal (**Figura 52**). En la zona N-terminal está presente una región que corresponde con la zona de plegamiento $\beta\alpha\beta$ en la que se encuentra el sitio de unión a FAD (Wierenga *et al.*, 1986; Lobočka *et al.*, 1994; Satomura *et al.*, 2015). La secuencia consenso contenida en el dominio estructural es algo semejante a: U₄G(G/A)GUXGL(X₂)LX₆U(L/V)UE donde U es un residuo hidrofóbico y X cualquier residuo (Wierenga *et al.*, 1986), siendo VLVLGSGVIGTASAYYLARQGFVTVVD que esta comprendida entre el aminoácido 3 y 30 en la proteína DadA de *P. putida* U (**Figura 52**). Esta zona N-terminal posee una elevada similitud con los dominios de unión de D-aminoácido oxidasas de distintos seres vivos (hombres, cerdos, ratones y hongos) (Lobočka *et al.*, 1994).

La enzima DadA cataliza la reacción de oxidación de D-alanina (producto generado por la enzima DadX) a piruvato, acoplada con la reducción del FAD a FADH₂ (He *et al.*, 2011), que participa en una cadena de transporte de electrones (ver apartado 5.3.1). Por lo tanto, esta enzima, además de participar en la regeneración del piruvato requerido para

desaminar la histamina, está involucrada en la generación de la energía requerida para el transporte.

- **Estudio de la acumulación de alanina.**

En bacterias G+, la L-alanina es utilizada directamente por la L-alanina deshidrogenasa, no siendo necesaria la racemización de este aminoácido, a diferencia de lo que ocurre en bacterias G- (He *et al.*, 2011). Se ha observado que el mutante afectado en la actividad D-aminoácido deshidrogenasa (*P. putida* U Δ *dadA*::Tn5) no es capaz de crecer en MM suplementado con alanina 20 mM como única fuente de carbono, mientras que otros mutantes estudiados, como por ejemplo, *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 son capaces de asimilarla como el control (**Figura 53**). Este resultado indica que el catabolismo de alanina en *P. putida* U tiene lugar tras una isomerización catalizada por una alanina racemasa (DadX, ver a continuación).

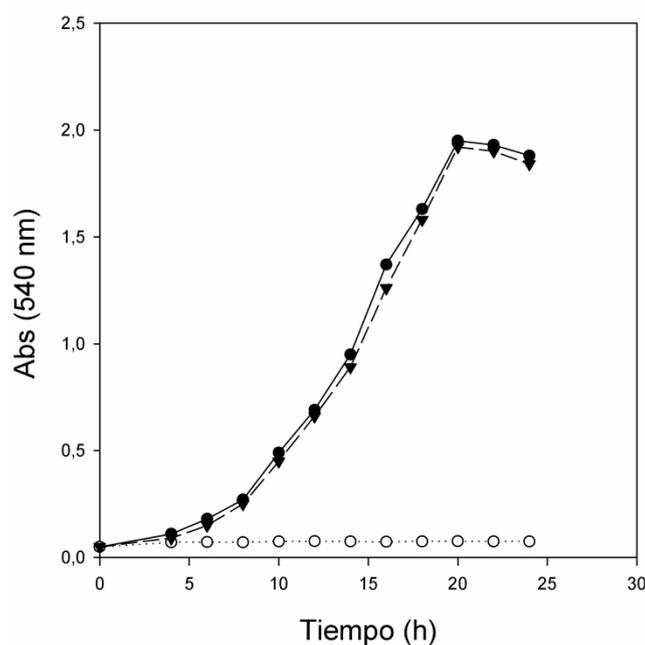


Figura 53. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●), de *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 (○) y de *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con L-alanina 20 mM.

El mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 al no ser capaz de catabolizar la alanina, la acumula, como se demuestra al analizar el caldo de cultivo de este tras crecer en MM suplementado con 4-OHAFA (10 mM) e histamina (10 mM) (**Figura 54**). Esta acumulación

es patente al analizar los caldos de cultivo por TLC (ver apartado de 13.2 de Materiales y Métodos). Para poder observar el acúmulo de alanina es necesario que se suplemente una fuente de carbono que, como el 4-OHAFa, genere piruvato. Este cetoácido es utilizado por HinC y transformado en L-alanina (**Figura 54**).

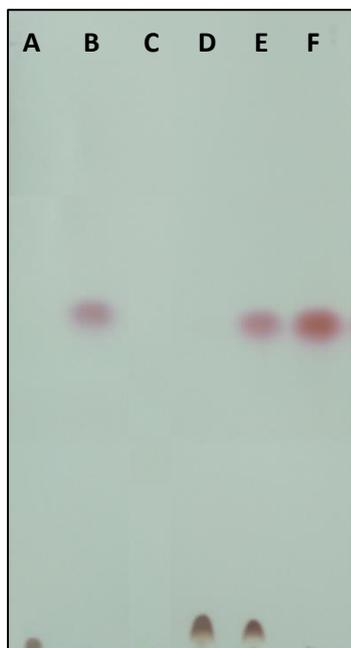


Figura 54. Placa de TLC. (A) Histamina; (B) L-alanina y (C) 4-OHAFa. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 10 mM. Muestras del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 cuando se cultivaba en MM suplementado con 4-OHAFa 10 mM + histamina 10 mM analizadas a las 0 h (D); 16 h (E) y 24 h (F).

Como se observa en la **Figura 54**, la histamina ($R_f=0,1$) y la alanina ($R_f=0,47$) se diferencian perfectamente con esta técnica cromatográfica y no hay ninguna clase de interferencia entre ambas. A las 16 h sigue habiendo histamina en el medio, pero al cabo de 24 h se ha degradado toda ella y se ha acumulado una gran cantidad de alanina (**Figura 54**).

Además de utilizar la técnica TLC, la alanina se ha identificado por medio de IR (**Figura 55**) y de RMN (**Figura 56**).

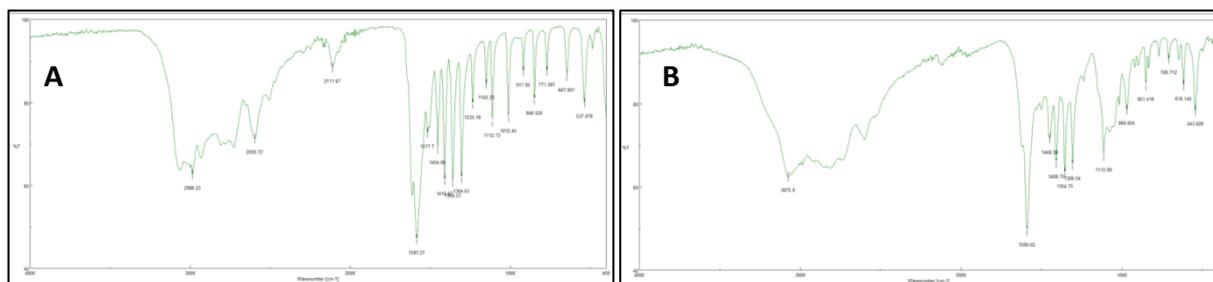


Figura 55. (A) IR de L-Alanina y (B) IR de la D/L-alanina acumulada por el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5.

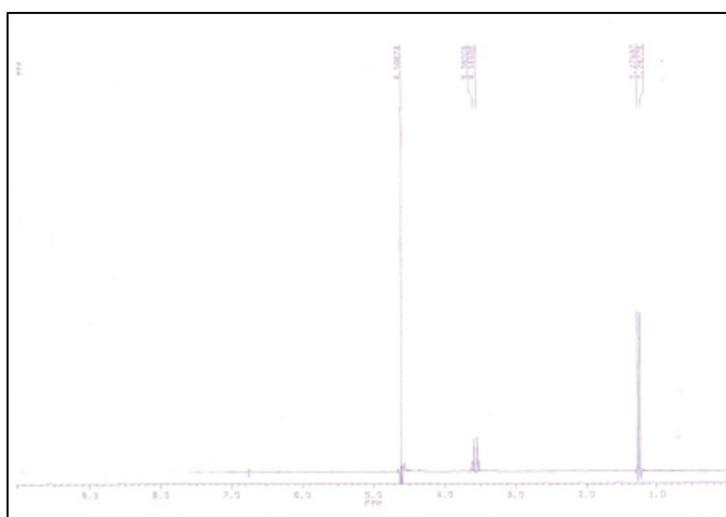


Figura 56. ¹H-RMN de la D/L-alanina acumulada por el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5

Ninguna de estas tres técnicas permite identificar si se acumula D-alanina o L-alanina. La inserción del transposón Tn5 en el gen *dadA*, podría estar interrumpiendo la expresión del gen que está a continuación, la alanina racemasa, encargada, como se detallará en el apartado siguiente, de la obtención de D-alanina a través de L-alanina. Para determinar los porcentajes de D-alanina y L-alanina, se siguió el protocolo explicado en el apartado 13.3 de Materiales y Métodos. El resultado obtenido indicó que el mutante afectado en el gen *dadA* acumulaba alanina y que el porcentaje de isómeros L y D correspondía a 55,2% y 44,8% (**Figura 57**, **Tabla 31**), lo que demostraba que la inserción del Tn5 no afectaba a la expresión del gen adyacente que codifica la alanina racemasa.

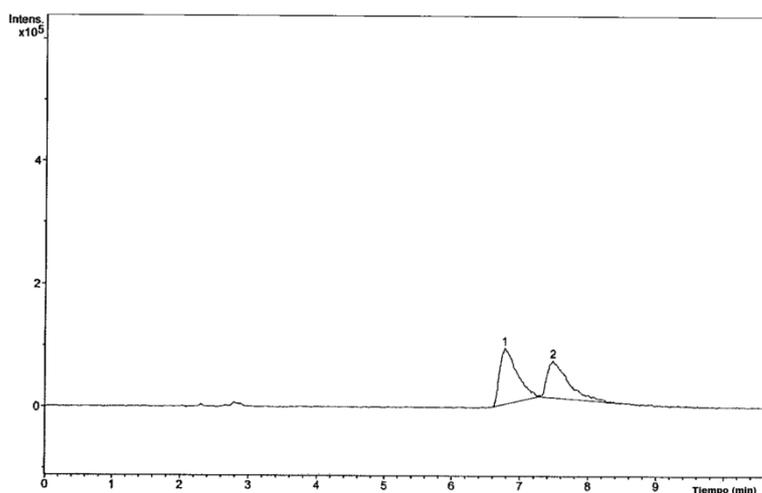


Figura 57. Separación de la L-alanina y D-alanina en el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5.

Además, se ha comprobado que la alanina racemasa posee la misma afinidad por la L-alanina que por la D-alanina, ya que en otro caso, el producto acumulado no podría ser mezcla racémica (Radkov and Moe, 2013).

Tabla 31. Resultados de la separación de la L-alanina y la D-alanina.

Muestra	Compuesto	Rt (min)	Rango (min)	Altura	Área	Fracción de área
1	L-alanina	6,8	6,6-7,3	92151	1607857	55,2%
2	D-alanina	7,5	7,3-8,6	61102	1304708	44,8%

Con el objetivo de confirmar el efecto estimulador de los aminoácidos sobre el sistema de transporte de histamina HIS (ver el apartado 5.1.1 de Resultados y Discusión), se procedió a estudiar la toma de esta amina biogénica por parte de la cepa *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5, que acumula alanina. Para ello, se siguió el mismo protocolo que con los mutantes anteriores, observándose una notable estimulación del transporte (500%) (**Tabla 32**), que podría justificarse por el hecho de que la concentración de alanina era mucho más alta (20mM) que en los experimentos realizados con efectores (0,5 mM). En cambio, un mutante que no es capaz de transformar la histamina, como por ejemplo, *P. putida* U Δ *hinC*::Tn5 (afectado en la transaminación de la histamina) apenas sufría cambios en la capacidad de transporte (**Tabla 32**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 32. Estudio del transporte de histamina en el mutante que tiene afectado el gen que codifica la deshidrogenasa (*P. putida* U Δ *dadA*::Tn5) y en el mutante afectado en el gen que codifica la aminotransferasa (*P. putida* U Δ *hinC*::Tn5) cuando se cultivaban en MMHS.

MUTANTE	% TRANSPORTE
<i>P. putida</i> U Δ <i>dadA</i> ::Tn5	500%
<i>P. putida</i> U Δ <i>dadA</i> ::Tn5 pMC <i>dadA</i>	98%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinC</i> ::Tn5	85%
<i>P. putida</i> U Δ <i>hinC</i> ::Tn5 pM <i>ChinC</i>	95%

El 100% del transporte equivale a 180 pmoles/min.

En resumen, la enzima DadA: (i) es la responsable de regenerar el piruvato necesario para que se lleve a cabo la desaminación de histamina catalizada por HinC; (ii) está acoplada a la cadena de transporte de electrones participando en la generación de la energía requerida para la toma de histamina y (iii) interviene en el catabolismo de alanina.

5.2.1.2. Gen *dadX*.

La secuenciación de la zona adyacente al gen *dadA* permitió identificar un ORF corriente abajo del gen mismo. Este ORF presentaba un alto grado de homología con el gen *dadX* que codifica la alanina racemasa, enzima que actuaría sobre el producto obtenido (L-alanina) en la reacción catalizada por HinC. La masa molecular, el punto isoelectrico, la secuencia, la composición y el número de aminoácidos de la enzima DadX aparecen a continuación.

DadX	
MRPARALIDLQALRHNYRLARELTGAKALAVI KADAYGHGAVRCALALEAEANGFAVACIEEAL ELRAAGIKAPVLLLEGGFFAESELALIAEHDWL CVVHSLWQLEAIEKTQLHKPLTIWLKLDGMH RVGLHPKDYHDAYQRLLASGKVSRIVLMShFA RADELDAATAQQIAVFEEAARQGLAAECSLRN SPGVLGWPQAPGDWVRPGLMLYGATPFEVPPQA QAARLQPVMTLQSRVIVSRELPAGEPVGYGAK FVSPRPTRVGVVAMGYADGYPRQAPNGTSVLV AGQRTQLIGRVSMMLNIDLTDVPPQATVGVSPV ELWKGQVLASEVAAQAGTIPYQIFCNLKRVR DYIGE	357 aminoácidos
	Mw: 38735,75 pI: 6,76
	Composición:
	A 52 R 24 N 6 D 15 C 5 Q 19 E 21 G 28 H 9 I 15 L 42 K 11 M 8 F 8 P 21 S 15 T 12 W 6 Y 10 V 30

Las alanina racemasas (EC 5.1.1.1) son enzimas dependientes de PLP, que catalizan la isomerización entre L-alanina y D-alanina (precursor esencial en la síntesis de la capa de peptidoglicano tanto en bacterias G+ como bacterias G-). Esta enzima está presente de forma ubicua en bacterias, aunque también se puede encontrar en eucariotas, tales como animales acuáticos, hongos (*Tolypocladium niveum*), levaduras y plantas (Strych *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2011).

Las bacterias pueden poseer una o dos alanina racemasas. Así, en *E. coli*, en *S. typhimurium* y en *P. aeruginosa* se ha observado que existen dos genes que codifican sendas alanina racemasas. El gen *arl* codifica una enzima que se expresa constitutivamente, que proporciona suficiente D-alanina para la biosíntesis de la pared celular. El otro, es un gen catabólico, *dadX*, que codifica una enzima cuya expresión es inducible por L-alanina, de tal manera que cuando hay una abundante concentración de L-alanina, la convierte en D-alanina que posteriormente se transforma en piruvato por acción de la deshidrogenasa (DadA, tal y como ya hemos indicado) (Strych *et al.*, 2000; Oikawa, 2006). En la mayoría de las bacterias G+ estudiadas, tales como *Bacillus stearohermophylus*, *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium glutamicum* y ciertas especies de micobacterias, existe un gen que codifica la alanina racemasa (Strych *et al.*, 2001; Pierce *et al.*, 2008). En un principio, se había observado que *Bacillus subtilis* solo tenía un gen que codificaba una alanina racemasa, aunque más adelante se demostró que había dos genes, *alr1(dal)* y *arl2(yncD)* (Pierce *et al.*, 2008). En la mayoría de las bacterias, lo habitual es encontrar solo uno, siendo lo más frecuente hallar el gen *alr*. Estudiando la organización de estos genes en *P. aeruginosa* y en *P. putida*, se comprobó que mientras el *locus dadRAX* estaba bien conservado en las diferentes cepas, el *locus alr* difiere de una especie a otra (Winsor *et al.*, 2011; Radkov and Moe, 2013).

Todas las alanina racemasas conocidas utilizan PLP como cofactor, mostrando un motivo bien conservado V(V/I)KA(D/N)(G/A)YGHG, que en DadX de *P. putida* U está comprendido entre el aminoácido 31 y el 40 (VIKAAAYGHG) (**Figura 58**) (Strych *et al.*, 2000, 2001; Pierce *et al.*, 2008). Dentro de esta zona, se encuentra una lisina (**K33**), que es necesaria para la isomerización de L-alanina a D-alanina, y que se une de forma covalentemente al PLP formando una aldimina interna. En el otro extremo de la proteína, hay una zona conservada [G/P]XXV[G/S]YGXX[WI], que en la enzima DadX de *P. putida* U se encuentra entre el aminoácido 248 y 257 (GEPVGYGAKF). En esta zona, se halla un residuo de tirosina (Y253) que es necesario para llevar a cabo la reacción inversa, esto es, la transformación de D-alanina en L-alanina. Además, se ha comprobado que los aminoácidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

H158 y R208 son importantes para estabilización de la reacción (**Figura 58**) (Sun and Toney, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Strych and Benedik, 2002; Bernardo-García *et al.*, 2016).

DadX. PpU	-----MRPARALIDLQALRHNYRLA	20
Alr. PpU	MPFRRTLLAASLALLITGQAPLYAAPPLSMDNGTNTLTVQNSNAWVEVSASALQHNIRTL	60
DadX. Pa	-----MRPARALIDLQALRHNYRLA	20
Alr. Pa	-----MRPLVATVDLSAIRHNYALA	20
DadX. Ec	-----MTRPIQASLDLQALKQNLISIV	21
Alr. EC	-----MQAATVVINRRALRHNLQRL	20
Alr. Bs	-----MSTKPFYRDTWAEIDLSAIKENVSNM	26
Alr2. Bs	-----MIKLCREVVIEVNLDAVKKNLRAI	24
Alr. Ms	-----MQTT-----EPMTPPAPLASAQTVIDLGAIDHNVRVL	32
Alr. Lp	-----MVVIGEHRHTQVTVDLQAIKTNISNE	26

:.. * : *

PLP

DadX. PpU	REL-T-GAKALAVIKADAYGHGAVRCAL-ALEAEANGFAVACIEEAELELRAAGIKAPVLL	77
Alr. PpU	QAEFLAGSKLCAVLKADAYGHGIGLVMPSTIAAQGVPCVAVASNEEARVVRASGFTGQLVR	120
DadX. Pa	REA-T-GARALAVIKADAYGHGAVRCAE-ALAAEADGFAVACIEEGLELREAGIRQPILL	77
Alr. Pa	KRC-APQRQAFAVVKANAYGHGAREVVT-ALHDDADGFAVACLEEAEEVRLHASARILL	78
DadX. Ec	RQA-ATHARVSVVKANAYGHGIERIWS-AIG-ATDGFALLNLEEAITLRERGWKGPILM	78
Alr. Ec	REL-APASKMVAVVKANAYGHGLETAR-TLP-DADAFGVARLEEALRLRAGGITKPVLL	77
Alr1. Bs	KKHIGEHVHLMVVKANAYGHGDAETAKAALDAGASCLAVAILDEAISLRKKGLKAPILV	86
Alr2. Bs	RRHIPHKSKIMAVVKANGYGHGSIEVARHALEHGASELAVASVEEGIVLRKAGITAPILV	84
Alr. Ms	REL-AGSADVMVVKADAYGHGALPVARTALAAGAAALGVATIPALALREGGITAPVLA	91
Alr. Lp	MAQKDELTELWAVVKANGYGHGIIQVAQAAKEAGATGFCVAILDEALALRAAGFAEPIV	86

: * : * : * * * * . . . * . : * : * : :

DadX. PpU	LEGFFEASELALIAEHDLCVVSLS-LWQLEAIEK---TQLHKPLTIWLKLD-SGMHRVGL	132
Alr. PpU	V-RLASLSELEDGLQYDMEELVGSAEFARQADAI--AARHGKTLRIHMALNSGMSRNGV	177
DadX. Pa	LEGFFEASELELIVAHDFVCVHC-AWQLEAIER---ASLARPLNVWLKMD-SGMHRVGF	132
Alr. Pa	LEGCFEASEYALAGQLRLDLVIQG-AEQGEAFLA---AGLDIPLNVWLKLD-SGMHRLGF	133
DadX. Ec	LEGFFHAQDLEIYDQHRLTTCVHS-NWQLKALQN---ARLKAPLDIYLKVN-SGMNRLGF	133
Alr. Ec	LEGFFDARDLPTISAQHFHTAVHN-EEQLAALEE---ASLDEPVTVMKLD-TGMHRLGV	132
Alr1. Bs	L-GAVPPEYVAIAAEYDVTTLTGYSVEWLQEAARH---TKKGSLSHFHLKVD-TGMNRLGV	140
Alr2. Bs	L-GFTSLSCVKKSAAWNITLSAFQVDWMKEANEILEKEASANRLAIHINVD-TGMGRLGV	142
Alr. Ms	WLHP-PGTFAPAIADVEVAVSS-RRQLEQVTA-AAAEVGRATATVTVKVD-TGLSRNGV	147
Alr. Lp	L-GITEPEYAPLVAEKDISLAVGTQDWTAAAILAANQVTTPLHVHLALD-TGMGRIGF	144

. . . : * : * * .

DadX. PpU	HPK-DYHDAYQRLLA---SGKVSRIVLMSHFARADELDADATAQQIA-----VFEEAR	181
Alr. PpU	EMA-TWSGRGEAL-QITDQKHLKL-VALMTHFAVEDKDDVRKGLAAFNEQTDWLIK HARL	234
DadX. Pa	FPE-DFSAAHERLRA---SGKVAK-IVMMSHFRADELDCPRTEEQLA-----AFAAAS	181
Alr. Pa	DPA-ALRAWHARLRS---HPGVRE-LNLSHFACADERNHPLTEQQLE-----SFLGLL	182
DadX. Ec	QPD-RVLTWVQQLRA---MANVGE-MTLMSHFAEAEHPDGI--SGAMA-----RIEQAA	180
Alr. Ec	RPE-QAEAFYHRLTQ---CKNVRQPVNIIVSHFARADEPKCGATEKQLA-----IFNTFC	182
Alr1. Bs	KTEEEVQNVMAIL-DR--NPRLKC-KGVFTHFATADEKERGYFLMQFERFKELIAPLPL-	195
Alr2. Bs	RTKEELLEVVKAL-KA--SKFLRW-TGIFTHFSTADEPDTTLTKLQHEKFISFLSFLKKQ	198
Alr. Ms	GAA-DYPEVLDVLRRAQADGAIRV-RGLMSHLVHGDDPENPFNGLQGQRLADMRVYAREH	205
Alr. Lp	QTPEELATAVTTLRQP--QSPFDF-EGIFTHFATADQADDTYFTHQLNNWKHLIAVVDE-	200

* . . : * : . . .

DadX. PpU	QGLAAECSLRNSPGVLGWPAQPDWVRPGLMLYGATPFEVPO-AQAARLQPVMTLQSRVI	240
Alr. PpU	DRSKLTLHAANSFATLEVPEARLDMVRTGGALFGDTPAR-----TEYKRAMQFKSHVA	288
DadX. Pa	QGLEGEISLRNSPAVLGWPKVPSDWVRPGIILYGATPFERAH-PLADRLRPVMTLESKVI	240
Alr. Pa	DLDFDQRS LANSAAVLTIPAAHMDWLRPGIMLYGSTPLADLS-AAELGLKPAMSLGAQLI	241
DadX. Ec	EGLECRRLSLSNAATLWHPEAHFDWVRPGIILYGASPSGQWRDIANTGLRPVMTLSSEII	240
Alr. Ec	EKPCGQRSIAASGGILLWQSHFDWVRPGIILYGVSPLDRSTGADFGCQPVMSLTSSLI	242
Alr1. Bs	--KNLMVHCANSAAGLRLKGGFFNAVRFGIMYGLRPSADMSDEIPFQLRPAFTLHSTLS	253
Alr2. Bs	GIELPTVHMCNTAAAIAPFEFSADMIRLGIGLYGLYPSAYIKQLNLVKLEPALS LKARIA	258
Alr. Ms	GVDYEV AHL CNS PAAMTRPD LAFEMVRPGISLYGLSPIPERG---DMGLRPAMTLKCPVA	262
Alr. Lp	--LPRYVHVSNSATSLWHQACNGNMVRFVGLYGLNPSGRE-LSAPYPLQPALSLTARLT	257

: : : * * : * . . : . . :

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DadX.PpU	SVRELPA-GEPVGYGAKFVSPRPTRVGVVAMGYADGYPRQAPNGTSSVLVAGQRTQLIGRV	299
Alr.PpU	AVHSYPA-GNTVGYDRFTFLARDSRLANITVGYSDGYRRVFTNKGHVLINGHRVPVVGKV	347
DadX.Pa	SVRDLPAG-GEFVGYGARYSTERSQRIGVVAMGYADGYPRHAADGTLVFDGKPGRLVGRV	299
Alr.Pa	SLREVAV-GESVGYGATWIAERPARIQTVSCGYADGYPRTPAGTTPVLVGGRRAILAGRV	300
DadX.Ec	GVQTLKA-GERVGYGGRYTARDEQRIGIVAAGYADGYPRHAPTGTTPVLVDGVRTMTVGTV	299
Alr.Ec	AVREHKA-GEFVGYGGTWWSERDTRLGVVAMGYADGYPRAAAPSGTTPVLVNGREVPIVGRV	301
Alr1.Bs	HVKLIRK-GESVSYGAEYTAEKDWTWIGTVPGYADGWLRKLGTD-ILVKGKRLKIAGRI	311
Alr2.Bs	YVKTMRTPEPTVSYGATYIAEPNEVIATLPIGYADGYSRALSNRGFVLRHGKRVVAGRV	318
Alr.Ms	LVRSVHA-GDGVSYGHRWVADRDTTLGLLP IGYADGVYRALSGRIDVLIKGRRRRAVGRI	321
Alr.Lp	FVKRLAR-GKSVSYGATYTAAQDEWIGTVPIGYADGYERRLQGFH-VLVDGEFCEIVGRV	315
	:: * . ** : : . : * * . ** * : : * * :	
DadX.PpU	SMDMLNIDLTDVPQ-ATVGSPELVWGWKQVLAS----EVAAGTIPYQIFCNL-KRVPRD	353
Alr.PpU	SMNTLMVDVTDVDFPD-VKGGNEVVLFGKQAGGEITQAEMEEINGALLADLYTVWGNPNKI	406
DadX.Pa	SMDMLTVDLTDHPQ-AGLGRVELWGPVNVPG----ALAAQFGSIPYQLLNL-KRVPRV	353
Alr.Pa	SMDMLAVDLSLPE-ARVGDPELVWGWGAGLSVD----EVARACGTLYEYLLSKVTARVPRR	355
DadX.Ec	SMDMLAVDLTPCPQ-AGIGTPVELWGWKEIKID----DVAAAAGTVGYELMCALALRVV	354
Alr.Ec	AMDMICVDLGPQAQ-DKAGDPVILWGEGLPVE----RIAEMTKVSAYELITRLTSRVAMK	356
Alr1.Bs	CMDQFMVELDQ--E-YPPGKVTTLIGRQGDYEYISMDEIAGRLETINYEVACTISSRVPRM	368
Alr2.Bs	TMDMIMVSLGENGE-GKQGDVVIYIGKQKGAELISVDEVAEMLNTINYEVVSTLSRRIPRF	377
Alr.Ms	CMDQFVVDLGPDADDVAVGDDAILFGPGANGEPQAQDWAELLDTIHYEVVTSRGRVTRT	381
Alr.Lp	CMDQLMVRPH--E-VPVGAQVTLVGTGARTISLQDIADYCGTIHYEACGLAPRVPRV	372
	* : : : : : * . : : *	
DadX.PpU	YIGE-----	357
Alr.PpU	LVD-----	409
DadX.Pa	YSGA-----	357
Alr.Pa	YSH-----	358
DadX.Ec	TV-----	356
Alr1.Ec	YVD-----	359
Alr.Bs	FLENGSIMEVRNPLLQVNISN	389
Alr2.Bs	YIRDGEIFKVSTPVLVYV----	394
Alr.Ms	YLPAGQQD-----	389
Alr.Lp	YID-----	375

Figura 58. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas alanina racemasas (DadX y Alr) de diferentes microorganismos: *P. putida* U (PpU); *P. aeruginosa* PAO1 (Pa); *E. coli* (Ec); *B. subtilis* (Bs); *Mycobacterium smegmatis* (Ms) y *Lactobacillus plantarum* (Lp). La zona conservada de unión del PLP aparece sombreada en gris. Los residuos de lisina y tirosina necesarios para la isomerización de la alanina están señalados en negrita. Otros residuos de interés para que transcurra la reacción de isomerización se marcan con ■.

La identidad de secuencia entre las enzimas Alr y DadX de un mismo microorganismo no es significativamente mayor que entre las enzimas de bacterias distintas (**Tabla 33**). La diferencia viene con respecto a la estructura. Mientras que las alanina racemasas de *S. enterica*, *T. thermophilus* y *Shigella* se han descrito como monómeros, en otros microorganismos, tales como *Geobacillus stearothermophilus*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Streptomyces lavendae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *S. pneumoniae*, *B. anthracis* y en *E. coli* se han descrito como formas díméricas. Los dímeros se forman a través de los dos residuos necesarios para la isomerización de la alanina (K33, Y253) (Strych and Benedik, 2002; Ju *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 33. Porcentaje de identidad entre las diferentes alanina racemasas de una misma bacteria y de diferentes bacterias.

	HinC.PpU											
HinC.PpU	100	Alr.PpU										
Alr.PpU	30,09	100	DadX.Pa									
DadX.Pa	70,59	28,37	100	Alr.Pa								
Alr.Pa	49,72	27,92	49,44	100	DadX.Ec							
DadX.Ec	47,73	28,45	48,86	43,50	100	Alr.Ec						
Alr.Ec	47,04	29,14	46,48	45,94	41,41	100	Alr.Bs					
Alr.Bs	32,47	23,90	31,61	36,39	34,01	30,95	100	Alr2.Bs				
Alr2.Bs	32,68	28,19	31,27	34,55	29,66	32,30	42,30	100	Alr.Ms			
Alr.Ms	35,03	37,06	35,88	32,11	30,11	37,85	34,15	32,71	100	Alr.Lp		
Alr.Lp	35,92	26,50	34,47	36,29	35,63	31,71	46,22	38,25	31,61	100		

PpU, *P. putida* U; Pa, *P. aeruginosa* PAO1; Ec, *E. coli*; Bs, *B. subtilis*; Ms, *M. smegmatis*; Lp, *L. plantarum*.

Con el fin de confirmar que el gen *dadX* (que codifica la alanina racemasa) se estaba expresando en el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5, se estudió si la mezcla racémica variaba en la cepa recombinante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 pMC*dadX*. Para llevar a cabo este experimento, se amplificó el gen de la alanina racemasa (*dadX*) mediante PCR (**Tabla 34**), se clonó en el plásmido pMC (digestión enzimática *ApaI/SacI*) y la construcción obtenida (pMC*dadX*) se introdujo en la cepa mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 por medio de una conjugación triparental.

Tabla 34. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *dadX*.

Nombre del Primer	Secuencia	Modificaciones
DadX.F	ATGCGCGCCATGCCAGCCCGCGAAGAATCCAGC	<i>ApaI</i>
DadX.R	ATGCGAGCTCATGCCAACACACCGCCCTGCAACC	<i>SacI</i>

La cepa *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 pMC*dadX* seguía acumulando alanina, y como era de esperar, la mezcla racémica tenía las mismas proporciones de D-alanina y de L-alanina que las que se habían determinado en los caldos del mutante afectado en el gen *dadA* (**Figura 57, Tabla 31**). De esta manera, se confirmó que el transposón Tn5 no afectaba la expresión del gen *dadX* en el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5.

5.2.2. Regulación del *cluster dad*.

5.2.2.1. Gen *dadR*.

Otro mutante tenía el transposón Tn5 alojado en el gen *dadR*. La localización exacta se muestra en la **Tabla 35**. Este gen, como se muestra en la **Figura 50**, se encuentra corriente arriba del gen *dadA* y se transcribe en sentido contrario. El mutante afectado en este gen se ha denominado *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5.

Tabla 35. Localización del punto de inserción del transposón Tn5 en el mutante afectado en el gen *dadR* (*P. putida* U Δ *dadR*::Tn5).

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>dadR</i>	
Mutante 54	<p>226 AAGAC Tn5 CGCGCGGCGGAAC TCTCGAAGGTGTCGCCGACTTGTAGTCCAGGCTGATTTCCACGAAC TTCTG GCGCGCCGCTTGAGGAGCTTCCACAGCGGGCTGAACATCAGGTCCGACTAAAGGTGCTTG -3 L V A R R F E E F T D G S K Y D L S I E V F</p>

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 50**.

El abordaje experimental que se realizó a continuación, consistió en determinar si la incapacidad del mutante *P. putida* U *dadR*::Tn5 para catabolizar la histamina se debía a una alteración de la secuencia de este gen *dadR* tras la inserción del Tn5, o si por el contrario esta se debía a un efecto polar causado por el Tn5. Para ello, se procedió a la clonación del gen en *trans*, amplificándolo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos que figuran en la **Tabla 36**. A continuación, se clonó el gen *dadR* en el plásmido replicativo pMC utilizando las enzimas de restricción *KpnI/SacI*.

Tabla 36. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *dadR* en el mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5.

Nombre del Primer	Secuencia	Modificaciones
DadR.F	CGGGGTACCCCGGGCGGTTCCGATTACACCGCTACC	<i>KpnI</i>
DadR.R	ATGCGAGCTCGTACCACGCATGGCCTGCCCGCGTGGC	<i>SacI</i>

La construcción así obtenida, pMC*dadR*, se transfirió mediante conjugación triparental al mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5. Esta nueva cepa recombinante (*P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 pMC*dadR*) en la que el gen *dadR* ahora se expresaba bajo el control del promotor de plásmido recuperaba su capacidad de crecer en MMh, mientras que la misma cepa control transformada solamente con el plásmido vacío seguía siendo incapaz de catabolizar dicha amina biogénica (**Figura 59**). Este resultado ponía de manifiesto que la construcción pMC*dadR* era funcional y que el crecimiento observado en la cepa mutante no se debía a la existencia de información presente en el plásmido previa a la clonación del gen *dadR*.

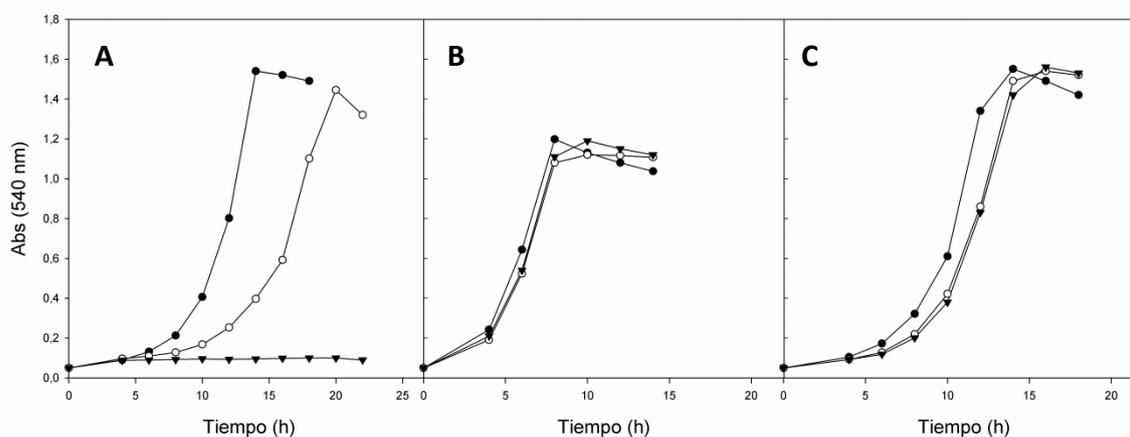


Figura 59. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de *P. putida* U control (●), de *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 pMC (▼) y de *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 pMC*dadR* (○) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM.

El gen *dadR* presenta una alta similitud con el gen que codifica el regulador de respuesta a leucina (DadR). La secuencia, la composición, el número de aminoácidos, el peso molecular y el punto isoelectrónico de esta proteína se muestran a continuación.

DadR	
MRTQHQSRELDKIDRNILRILQNDGRISFTE LGEKVGLSTTPCTERVRLEREGIIMGYNARL NPQHLKGSLLVFVEISLDYKSGDTFEEFRAV LKLPHVLECHLVSGDFDYLVKARISEMASYRK LLGDILLKLPHVRESKSYIVMEEVKESLCLPI PD	162 aminoácidos
	Mw: 18753,80 pI: 8,43
	Composición: A 4 R 15 N 4 D 9 C 3 Q 4 E 15 G 9 H 5 I 11 L 23 K 11 M 4 F 5 P 6 S 12 T 6 W 0 Y 5 V 11

Las proteínas reguladoras junto con los promotores regulados son los elementos llave que permiten a los operones catabólicos transcribirse cuando es requerido o cuando los niveles de sustrato son lo suficientemente altos para que sea utilizado como fuente de nutrientes. En este caso, el gen que codifica el regulador (Lrp) de este *cluster* es *dadR*. Este gen se transcribe en sentido contrario a los otros dos que se encuentran dentro del *cluster dad*, de los cuales ya se ha hablado.

Lrp, regulador de respuesta a leucina, es un activador transcripcional que aparece en bacterias y arqueas como un importante agente de control en los procesos metabólicos en los que intervienen aminoácidos y productos relacionados (de los Rios and Perona, 2007).

Los miembros de la familia Lrp son proteínas pequeñas de unión a DNA con una masa molecular alrededor de 15 kDa. El estado multimérico de los Lrp homólogos de distintos organismos, tales como *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *P. aeruginosa* y *Pirococcus furiosus*, incluye dímeros, tetrámeros, octámeros y hexadecámeros (Brinkman *et al.*, 2003). La estructura tridimensional predicha para el regulador Lrp de *P. putida* U (DadR), es similar a la de *E. coli* (de los Rios and Perona, 2007), presentando una organización octomérica (**Figura 60**). Esta estructura es la favorecida en presencia de leucina, que produce la disociación de la forma hexadecamérica (Chen *et al.*, 2001a).

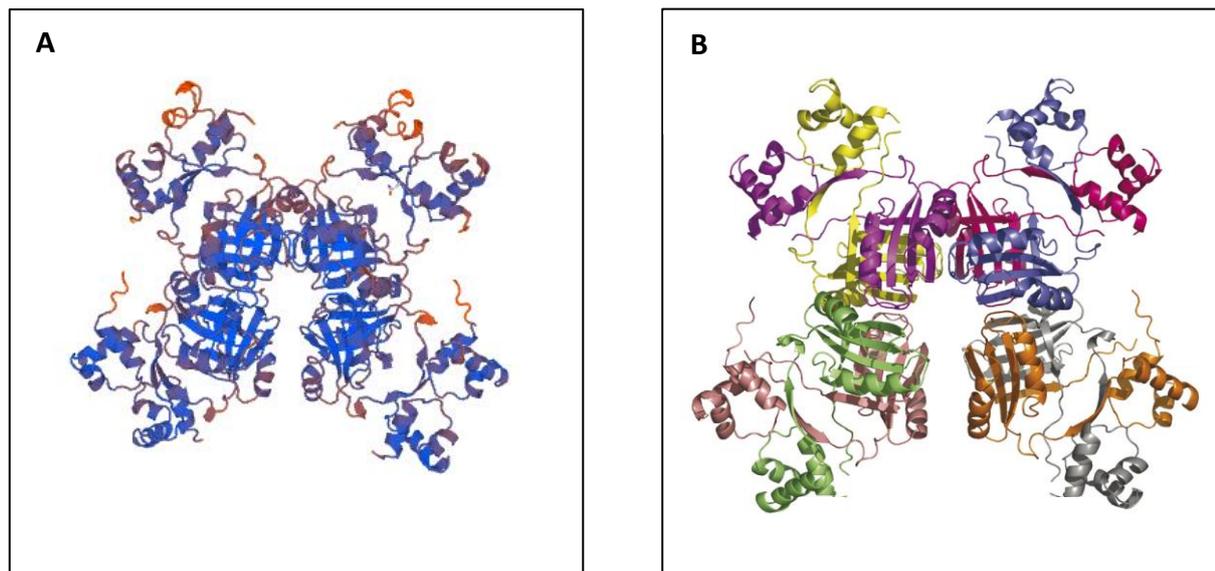


Figura 60. Estructura tridimensional de (A) DadR de *P. putida* U y (B) Lrp de *E. coli*.

Además, el regulador Lrp contiene 3 dominios funcionales de igual tamaño (Chen and Calvo, 2002; Hart and Blumenthal, 2011):

1. Dominio N-terminal que contiene un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a DNA, como se muestra en la **Figura 62**.
2. Dominio responsable de la activación de la transcripción de DNA.
3. Dominio C-terminal que es requerido para la respuesta a leucina, y es el que media la formación de multímeros (dímeros, octámeros y hexadecámeros).

Como se expondrá más adelante, existen varios reguladores Lrp en el genoma de cada microorganismo, pero solo hay uno responsable de la regulación del *cluster dad*. Este regulador se ha estudiado en distintas especies de *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* PAO1, *P. stutzeri* y *P. entomophila* (He *et al.*, 2011), y en bacterias entéricas, tales como *E. coli* (Mathew *et al.*, 1996), *K. aerogenes* (Janes and Bender, 1999) y *S. typhimorium* (Wasserman *et al.*, 1983). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos presentes en las enzimas de estos microorganismos se muestra en la **Figura 61**.

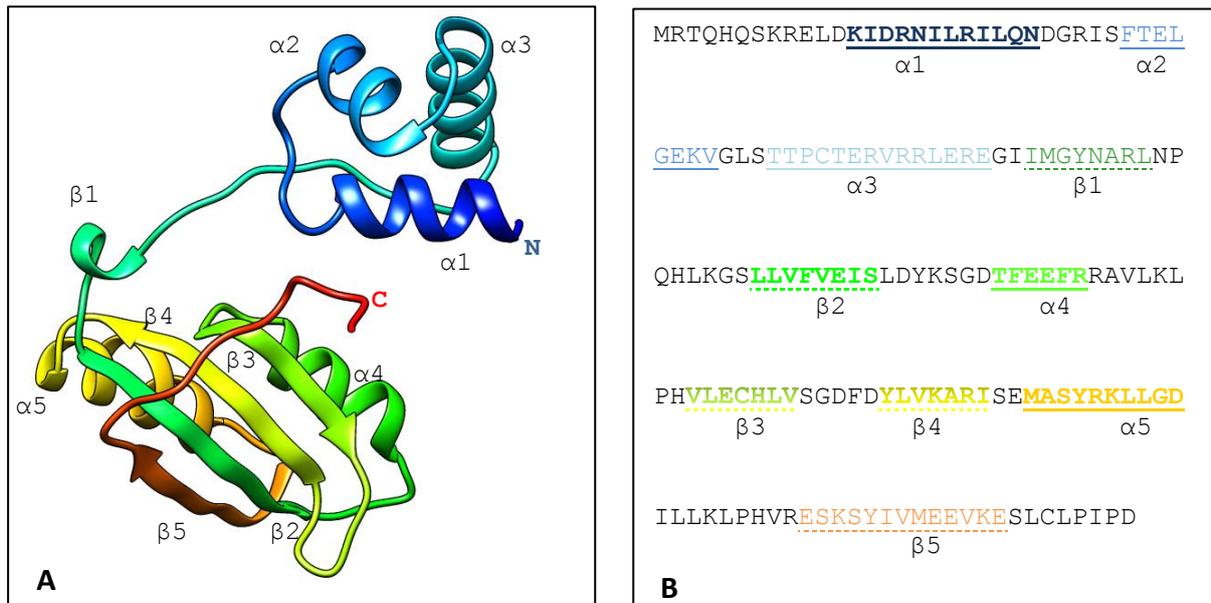


Figura 62. A) Estructura tridimensional del regulador Lrp de *P. putida* U (DadR). B) Secuencia proteica del regulador Lrp de *P. putida* U (DadR) donde se refleja las hélices α (subrayado con línea) y las laminas β (subrayado con puntos). Este abordaje se ha realizado con los programas *phyre2* y *swiss-model*.

Los reguladores globales son factores de transcripción que juegan un papel importante en las bacterias, siendo los que ayudan a coordinar las respuestas celulares de cientos de genes para hacer frente a los cambios complejos cambios medioambientales. En *E. coli*, Lrp junto con otros reguladores globales, tales como ArcA, Fis, Fnr, Ihf, Lrp y Narl, controlan la expresión de más de la mitad de los genes. En enterobacterias, como es el caso de *S. enterica*, de *K. pneumoniae* y de *Proteus mirabilis*, se ha comprobado que estos reguladores juegan un papel global. Sin embargo, también se ha observado que, a veces, Lrp actúa como un regulador local (caso de *Haemophilus influenzae*) (Unoarumhi *et al.*, 2016).

Lrp puede actuar como represor o como activador. Por lo general, Lrp regula positivamente genes que están involucrados en el anabolismo, y negativamente genes que participan en el catabolismo (Janes and Bender, 1999; Chen and Calvo, 2002). En el caso concreto del *cluster dad*, el regulador Lrp posee este doble papel. Por ejemplo, en *E. coli* actúa como represor y activador (Mathew *et al.*, 1996; Zhi *et al.*, 1999), mientras que en *P. aeruginosa* PAO1 actúa como activador (He *et al.*, 2011). Una de las teorías para explicar esta doble funcionalidad es la presencia o ausencia de alanina. Así, cuando no hay alanina, el regulador Lrp funciona como represor, pero en presencia de alanina, ésta se une al regulador

Lrp provocándole un cambio conformacional que permite que se una al DNA activando la transcripción de los genes *dad* (Brinkman *et al.*, 2003).

En el caso del mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5, el transposon Tn5 afecta la expresión del gen que codifica el regulador DadR e impide el crecimiento en histamina, por lo que hemos de asumir que activa uno o varios genes necesarios para el catabolismo de esta amina biogénica. *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5, al igual que el mutante afectado en el gen que codifica la deshidrogenasa (*dadA*), no es capaz de crecer en alanina, y la acumula (**Figura 63**). Este resultado indica que DadR regula la expresión de algunos de los genes adyacentes, que, como hemos visto, tiene que ver con el catabolismo de alanina.

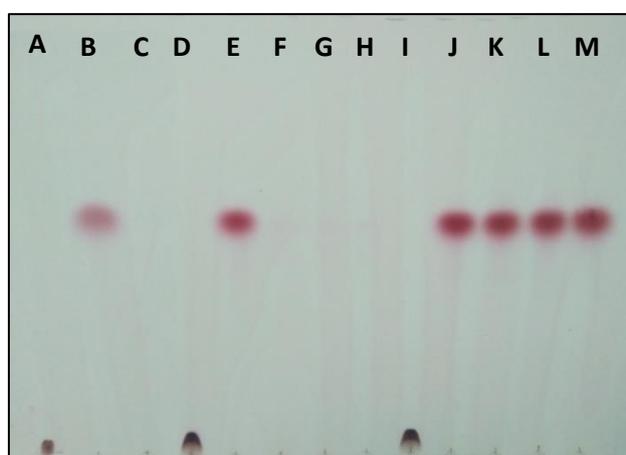


Figura 63. Placa de TLC. (A) histamina; (B) alanina y (C) 4-OHAFA. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 10 mM. Muestras del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 cultivado en MM suplementado con 4-OHAFA 10 mM + histamina 10 mM recogidas a distintos tiempos: 0 h (D); 12 h (E); 24 h (F); 36 h (G) y 48 h (H). Muestras del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 cultivado en MM suplementado con 4-OHAFA 10 mM + histamina 10 mM recogidas a distintos tiempos: 0 h (I); 12 h (J); 24 h (K); 36 h (L) y 48 h (M).

En la **Figura 63**, se observa que el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 acumula alanina y no es capaz de catabolizarla aunque pase el tiempo, a diferencia de lo que ocurre en el mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5, en cuyos cultivos a partir de las 20 h no se detectaba alanina (**Figura 64**). Este fenómeno pudiera ser explicado por la existencia de enzimas constitutivas implicadas en la degradación de alanina. Al no activarse la transcripción (no existe DadR), los niveles de expresión de los genes *DadA* y *DadX* serán basales y el catabolismo de histamina generará demasiada alanina para ser catabolizada. Luego, cuando la histamina se ha acabado, ya no se sintetiza más L-alanina y la acumulada en el medio es degradada por las enzimas *DadA* y *DadX*, que aunque a concentraciones bajas, seguirían actuando sobre ese aminoácido.



Figura 64. Placa de TLC. (A) histamina y (B) alanina. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 10 mM. Muestras del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 cultivado en MM suplementado con 4-OHAFA 10 mM + histamina 10 mM recogidas a distintos tiempos: 0 h (C); 4 h (D); 8 h (E); 12 h (F); 16 h (G); 20 h (H) y 24 h (I).

El siguiente experimento consistió en expresar en *trans* el gen *dadA* (deshidrogenasa) y *dadX* (alanina racemasa) en el mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5. Para ello, fue necesario clonar ambos genes utilizando dos plásmidos de expresión pMC con distintas resistencias (de la Torre *et al.*, 2017). Primero, se expresó el gen *dadX* en el plásmido pBBR1MCS-5 (pMC5) con resistencia a Gtm por medio de los cortes enzimáticos *ApaI/SacI*, y después, esta construcción se transfirió junto con pMC*dadA* al mutante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5. La cepa recombinante obtenida, *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 pMC*dadA* pMC5*dadX*, no fue capaz de utilizar la histamina como única fuente de carbono cuando se le había añadido al medio. Se obtuvo el mismo resultado con la cepa recombinante *P. putida* U Δ *dadR*::Tn5 pMC*dadAX*, en la que los genes *dadA* y *dadX* se clonaron juntos en el plásmido pMC (pMC*dadAX*). Este hecho sugiere que DadR regula más genes, además de los responsables del catabolismo de alanina (*dadA* y *dadX*), por ser un regulador global como se ha comentado, y probablemente tenga que ver también con aquellos otros responsables de la degradación de ImAA. El gen *dadR* se encuentra dentro de una organización génica muy conservada en *Pseudomonas*, donde están presentes, además de *dadA* y *dadR*, unos genes que codifican un regulador transcripcional (PuuR) y un citocromo C5 sobre los que podría ejercer alguna actividad reguladora (Ju *et al.*, 2005; Deudom *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2013).

Se han estudiado las secuencias presentes en la región intergénica entre el gen *dadA* y el gen *dadR* a las que se une el regulador Lrp para activar los genes. De esta manera, se ha establecido que la secuencia consenso en esta zona intergénica en *P. aeruginosa* PAO1 es

KCGGWWTTTTWCCWG (donde K es C/G; y W es A/T) (He *et al.*, 2011). Mientras que en *E. coli*, corresponde a YAHAWATTWTDCTR (donde Y es C/T; H es diferente de G; W es A/T; D es diferente de C; y R es A/G) (Zhi *et al.*, 1999). Como hemos comentado, el regulador Lrp de *E. coli* puede ser un activador o un represor en función de la zona a la que se una, y por esta razón, nosotros hemos seleccionado aquella región que corresponde en *E. coli*, a la requerida para Lrp actúe como activador. Esta zona (**Figura 65**), también ha sido identificada en *P. putida* U y en *P. aeruginosa* PAO1.

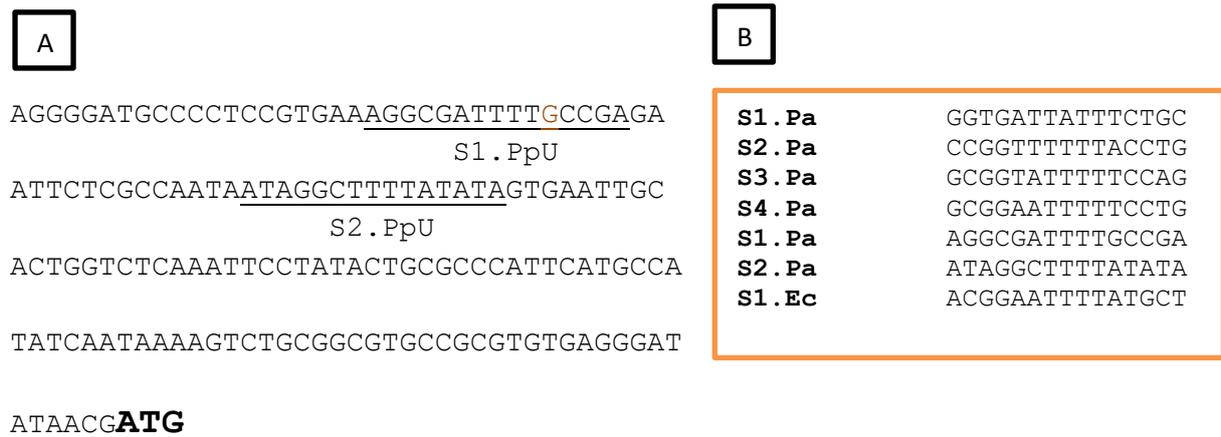


Figura 65. (A) Secuencia intergénica de la zona reguladora del *cluster dad* en *P. putida* U comprendida entre el gen *dadR* y el gen *dadA*. Los posibles sitios de unión del regulador DadR en *P. putida* U aparecen subrayados. El ATG marcado en negrita corresponde con el triplete de inicio del gen *dadA*. (B) Sitios de unión de DadR en la zona reguladora del *cluster dad* en *P. aeruginosa* (PAO1) y en *E. coli* (Ec), comparadas con los posibles zonas sobre las que se uniría DadR en el *cluster dad* en *P. putida* U.

Observando la región intergénica de *P. putida* U existente entre el gen *dadA* y el gen *dadR*, y teniendo en cuenta las zonas de unión del regulador Lrp descritas en *P. aeruginosa* y en *E. coli*, habría dos posibles zonas a las que pudiera unirse DadR para llevar a cabo su actividad reguladora sobre los genes del *cluster dadRAX* (**Figura 65**).

En el genoma de las bacterias, hay varios genes que codifican reguladores Lrp, por ejemplo, en *P. putida* U se expresan otros diez reguladores Lrp, además de DadR. El grado de identidad entre ellos oscila entre el 20% y el 40%. Los residuos presentes en la zona N-terminal que son necesarios para interactuar con el DNA se encuentran conservados en la mayoría de los reguladores (**Figura 66**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DadR	MRTQHQS KRELDKIDRNI LRLQNDGRISFTELGEKV GLSTTPCTER VRRLEREG IIMGY	60
Lrp1	KNFSTR LARDMDSFDQHI LTLQDASISLKD LAEAVNLS TPCW KRVKRLEEE GYILGK	61
Lrp2	-----MHSEL DAYDRRI LELLQEDASL SSAQAERV GLSQ SPCWRRI QRLKEEGVIRGQ	54
Lrp3	-----MPSS LDRDRALLAALQ DNARLTV AELADQVAL TSPCW RRVKLLED NGYITGY	54
Lrp4	-----MRK LDRDIGI LN SLQENARIT NAEL ARSVNLS PTPC FNRVRAMEE LGVIRQ	53
Lrp5	-----MREL DAKDREI LEVLSK DARIALKAL AGRI GLSR SAT TTERVAN LE RS GIIRGY	53
Lrp6	-----MD TIDRELI ALLR DNARTPV LTLAK KLKVARAT VQNR ITRLEE QGVII GY	50
Lrp7	--MSDS RSITLDEI DRQ LIALLO INARES VATLARQ LGIART TVNSR LERLE KNKVIS GY	58
lrp8	-----MDRT DRKILAE LQK DGRLSV T ELAERV GLSL SPCHRRL KALEES GAILGY	50
Lrp9	-----MSK LDRYDLS ITL AELQ RDARIS NQELAER I GLSP SPC SRRVKQ LEDD GYIS RQ	53
Lrp10	-----MT DAIDQL LINAL MEDSR RS LKAQA QV SGLS AP SVSER LR RLEER GV L RGY	51
	* * : : * : . : . : * : : :	

Figura 66. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la zona N-terminal de las proteínas de la familia Lrp presentes en *P. putida* U. Los residuos que interactúan con el DNA se muestran sombreados en gris.

5.2.3. Análisis comparativo del *cluster dad* en otros microorganismos.

Como se ha explicado, en este *cluster* se encuentran los genes que codifican proteínas que están implicadas en la regeneración del piruvato gastado en la transaminación, así como en la transferencia de electrones y en el catabolismo de la alanina.

El *cluster dad* de *P. putida* U está formado por un *cassette* catabólico de 3,1 kb. Este *cluster* se ha estudiado principalmente en bacterias entéricas, siendo la más característica *E. coli* (Janes and Bender, 1999; Mathew *et al.*, 1996) y en distintas especies de *Pseudomonas* (He *et al.*, 2011). También se han encontrado *clusters* que podrían ser homólogos en otros microorganismos tales como *R. leguminosarum* y *S. pneumoniae* (**Figura 67**).

La organización de los genes *dad* dentro del género *Pseudomonas* tiene ligeras modificaciones con respecto a la de *P. putida* U. Se conserva la misma estructura en *P. putida* KT2440 y en *P. entomophila*. Sin embargo, en *P. aeruginosa* y en *P. syringae*, entre los genes *dadA* y *dadX* o *dadR* aparecen otros ORFs que no existen en *P. putida* U (**Figura 67**). La diferencia más significativa dentro de este género se observa en *P. stutzeri*, donde no están presentes los tres genes de este *cluster*, sino que solo se encuentran *dadA* y *dadR* (**Figura 67**).

En bacterias entéricas, tales como *E. coli* y *S. enterica*, la diferencia con respecto a la organización génica de *P. putida* U, es que el regulador no está adyacente a los genes *dadAX*, sino que se encuentra en otro punto del genoma bastante alejado (**Figura 67**).

En otros microorganismos, se repite alguna de las organizaciones comentadas. Así, en *S. pneumoniae* se conserva igual que en *P. stutzeri*, mientras que en *R. leguminosarum* se mantiene la misma organización génica que en *P. putida* U (**Figura 67**).

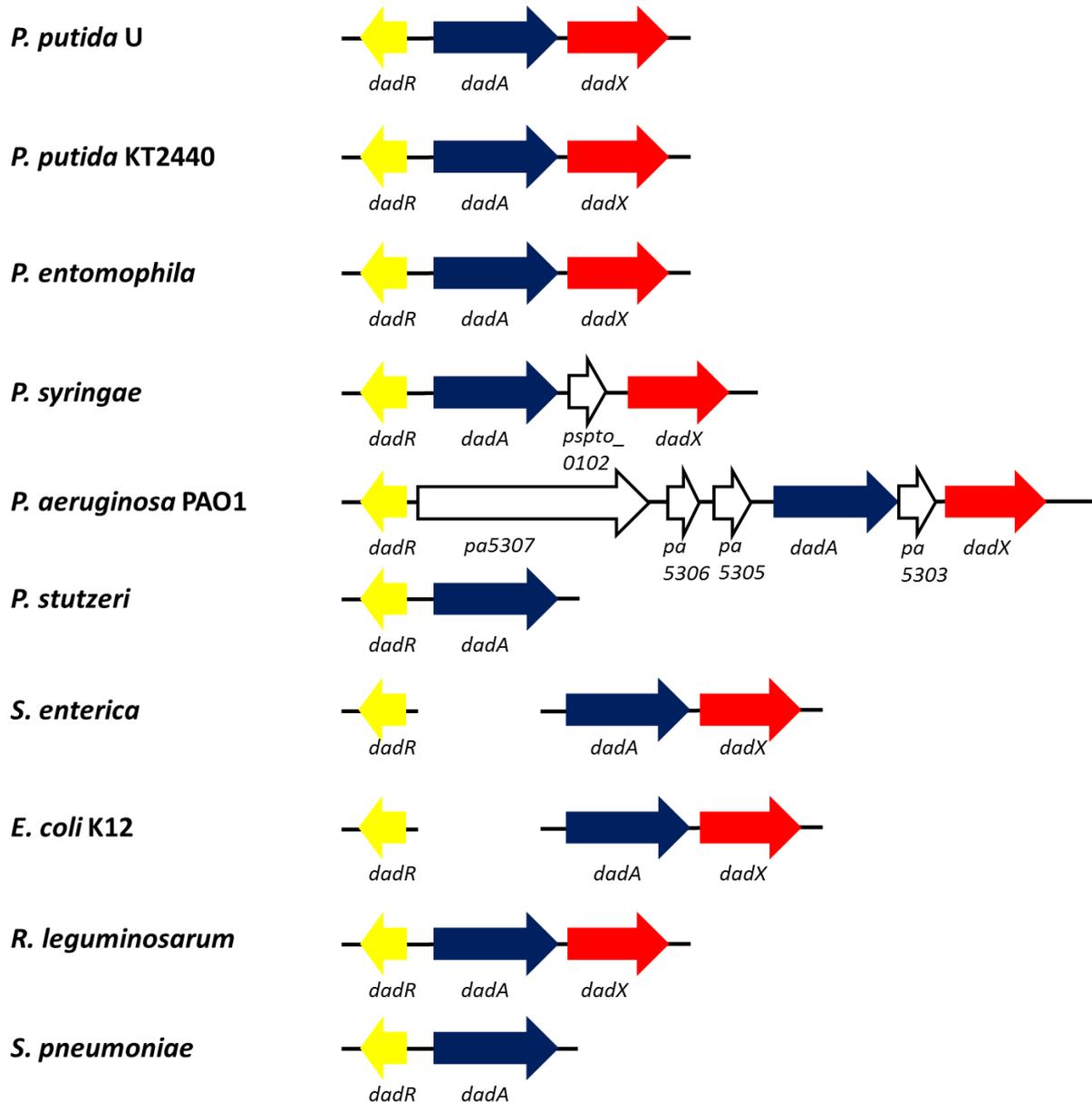


Figura 67. Comparación del *cluster dad* implicado en la regeneración del piruvato y en la transferencia de electrones durante la asimilación de histamina y de alanina en *P. putida* U, con otros probables *clusters dad* identificados por homología de secuencia en otros microorganismos. Los genes figuran en colores: amarillo (*dadR*), azul (*dadA*) y rojo (*dadX*). Otros genes son nombrados como están anotados en la base de datos NCBI. Las referencias de las secuencias son: *P. putida* KT2440 (NC_002947.4), *P. entomophila* (CT573326.1), *P. syringae* (NC_004578.1), *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516.2), *P. stutzeri* (CP007509.1). *S. enterica* (NC_003197.2), *E. coli* K12 (NC_000913.3), *R. leguminosarum* (NZ_AQUD01000002.1), *S. pneumoniae* (LJU01000002.1).

5.3. Organización genética del *cluster cox*.

Un nuevo mutante, incapaz también de degradar histamina, poseía el transposón Tn5 integrado en uno de los genes pertenecientes al *cluster cox*, que codifica la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃ de *P. putida* U y que está integrado por los genes *coxB*, *coxA*, *cox11* y *coxC*. A continuación se indica la secuencia de este fragmento, así como los marcos de lectura que corresponden a las proteínas que expresan cada uno de ellos (**Figura 68**).

```

1 CGTTGAACGTGATTGCGTTGATGAGGCCGACTGCTTTTGCAGGGGCTCGGTGTCGAAGCCAGGCAGTCTTGACC
  GCAACTTGCCTAAGCAACTACTCCGGGCTGACGAAAACGTCCCGGAGCCAGCAGCTTCGGTCCGTCAGAAGTGG

+3                                                                                   CoxB      M M R H
76 GCCGTTCCCTCTTGCCGCGAGGCCACGCCTCCGGGACAACAAGAATTAGAAGGGGAACCCGCAATGATGCGACATC
  CGCAAGGGAGAACGGCGTCCGGTGCGGAGGCCCTGTTGTTCTTAATCTTCCCCTTGGGCGTTACTACGCTGTAG

+3 P H V W M G L L L W S V F G Q A N A A W T V N M H
151 CACATGTCTGGATGGGCTCCTGTTGTGGTTCGGTTCGACCTGACGCAACGCGCCCTGGACCGTGAACATGCACC
  GTGTACAGACCTACCCGGAGGACAACACCAGCCAAAACCAGTCCGGTTGCGGCGGACCTGGCACTGTACGCTGG

+3 P G A T E V S N A V F D L H M T I F W I C V I I G
226 CGGGGGCGACGGAGGTTTCCAACGCGCTCTCGACCTGCACATGACCATCTTCTGGATCTGCGTGATCATCGGCG
  GCCCCGCTGCCTCCAAGGTTGCGGCAGAAGCTGGACGTGTACTGGTAGAAGACCTAGACGCACCTAGTAGCCCG

+3 V V V F G A M F W S M V V H R R S T G Q Q A A H F
301 TAGTTGTATTCGGCGCGATGTTCTGGTCCATGGTTCGTCACCGCGCTCCACTGGCCAGCAGGCGCGCATTTCC
  ATCAACATAAGCCGCGCTACAAGACCAGGTACCAGCAGGTGGCGGCGAGGTGACCGGTGCTCCGGCGCGTAAAGG

+3 H E H T W V E I M W T V V P F L I L V V M A I P A
376 ACGAGCATACTGGGTGGAAATCATGTGGACCGTGGTGCCTTCCTGATTCTGGTGGTGTGGCCATTCCGGCCA
  TGCTCGTATGGACCACCTTTAGTACACCTGGCACCACGGGAAGGACTAAGACCACCCTACCGGTAAGCCGCGT

+3 T K T L I D I Y D A S E S D I D I Q V T G Y Q W K
451 CCAAGACCTGATCGACATCTACGACGCCAGCGAGTCGGACATCGACATCCAGGTACCCGCTACCAAGTGGAAAGT
  GGTCTGGGACTAGCTGTAGATGCTGCGGTGCGCTCAGCCTGTAGCTGTAGTCCAGTGGCCGATGGTACCTTCA

+3 W H Y K Y L G Q D V E F F S N L A T P A D Q I H N
526 GGCACTACAAATACCTGGGCCAGGATGTGGAGTTCTTCAGCAACCTGGCCACCCCGCGGATCAGATTCACAACA
  CCGTGATGTTTATGGACCCGGTCTACACCTCAAGAAGTCGTTGGACCGGTGGGGCGGCTAGTCTAAGTGTGT

+3 K A P K D E H Y L L E V D Q P L V L P V G A K V R
601 AGGCCCCAAGGACGAGCATTACCTGCTCGAAGTCGACCAGCCGCTGGTGTGCGGTTGGGCGCAAGGTGCGCT
  TCCGGGGTTCCTGCTCGTAATGGACGAGCTTCAGTGGTGGCGACCACGACGGCCACCCGCGGTCCACGCGA

+3 F L V T A A D V I H S W W V P A F A V K R D A I P
676 TCCTGGTACTGCGCCGCGTCACTCCACTCCTGGTGGGTGCGGCGCTTCGCGGTCAAGGCGGACGCCATCCCCG
  AGGACCACTGACGGCGGCTGCAGTAGGTGAGGACCACCCAGGCGGGAAGCGCCAGTTCGCGCTGCGGTAGGGG

+3 G F V N E A W T R I E K P G I Y R G Q C T E L C G
751 GCTTGTCAACGAAGCCTGGACCGTATCGAAAAGCCCGCATCTACCGCGCCAGTGCACCGAGCTGTGCGGCA
  CGAAACAGTTGCTTCGGACCTGGGCATAGCTTTTCGGGCGGTAGATGGCGCGGTACGTTGGCTCGACACGCGT

+3 K D H G F M P V V V E V K S K A D Y D T W L G E R
826 AGGACCACGGCTTCATGCCGGTAGTGGTGGAGGTCAAGTCCAAGGCCACTACGACACCTGGCTGGGCGAGCGCA
  TCCTGGTGGCAAGTACGGCCATCACCACCTCCAGTTCAGTTCGGGCTGATGCTGTGGACCGACCCGCTCGCGT

+3 K A E A A K L K E L T S K E W T L E E L V E R G D
901 AGGTGAAGCCGCCAAGCTCAAGGAAGTACCAGCAAGGAGTGGACCCTGGAAGAGCTGGTGGAACTGGCGACA
  TCCGACTTCGGCGGTTTCGAGTTCCTTGACTGGTTCCTCACCTGGGACCTTCTCGACACCTTGACCCGCTGT

+3 K V Y H T T C V A C H Q A E G Q G L P P M F P A L
976 AGGTCTACACACCACCTGCGTGGCTGTCAACAGGCCAAGGCCAGGGCTGCGGCCGATGTTCCCGGCGCTCA
  TCCAGATGGTGTGGTGGACGCACCGGACAGTGGTCCGGCTCCGGTCCCGGACGGCGGCTACAAGGGCCGCGAGT

+3 K G S K I A T G P K E G H L S I V F H G K P G T A
1051 AGGGCTCGAAGATCGCCACCGGGCGAAGGAAGGCCACCTGAGCATTTGCTTCCACGGCAAGCCCGGTACCGCCA
  TCCCGAGCTTCTAGCGGTGGCCCGGCTTCCTTCCGGTGGACTCGTAACAGAAGGTGCCGTTCCGGCCATGGCGGT
  
```

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

+3 M A A F G K Q L S E V D I A A V V T Y E R N A W G
1126 TGGCGGCGTTCGGCAAGCAGCTCTCGGAAGTCGACATTCGCCCGCTTGTACCTACGAACGCAACCGCTGGGGCA
ACCGCCGCAAGCCGTTTCGTCGAGAGCCTTCAGCTGTAACGGCGGCAACAGTGGATGCTTGCCTTGGGACCCCGT

+3 N N K G D M V T P K D V L A L K Q A E A K ■
1201 ACAACAAGGGCGACATGGTCACGCCGAAGGACGTGCTGGCGCTGAAGCAGGCAGAGCCAAAGTGAACCGGTTAC
TGTTGTTCCCGCTGTACCAGTGGCGCTTCTGCACGACCCGACTTCGTCCGTCTTCGGTTCACCTGGCCCAATG

+1
1276 **CoxA** M S T V I D D H A H G H E H
TCGCGGCAATCAATGGGTTGCAGGAGACAGGACATGAGCACAGTGTACGACGACACGCCCACGGCCATGAGCAC
AGCGCCGTTAGTTACCCAACGTCCTCTGTCTGTACTCGTGTACTAGCTGCTGGTGGGGTGCCGGTACTCGTG

+1 A H G P A K G L M R W V L T T N H K D I G T M Y L
1351 GCCCAGCGCCCGGCAAGGCTTGATGCGCTGGGTACTGACCACCAACCATAAAGACATCGGCACGATGTACCTG
CGGGTGCCGGGCGGTTCCCGAATACGCGACCCATGACTGGTGGTGGTATTTCTGTAGCCGTGTACATGGAC

+1 W F S F I M F L L G G S F A M V I R A E L F Q P G
1426 TGGTTCAGTTCATCATGTTCTGCTTGGCGGCTGTTGCCATGGTATCCGCGCCGAGCTGTTCCAGCTGGC
ACCAAGTCGAAGTAGTACAAGGACGAACCGCCGAGCAAGCGGTACCCTAGGCGCGGCTCGACAAGGTCGGACCC

+1 L Q I V E P A F F N Q M T T M H G L I M V F G A V
1501 CTGCAGATCGTGGAGCCAGCCTTCTCAACCAGATGACCACCATGCACGCGCTGATCATGGTGGTGGCGGGTG
GACGCTTAGCACCTCGGTGGAAGAAGTTGGTCTACTGGTGGTACGTGCCGACTAGTACCACAACCGCGCCAC

+1 M P A F V G L A N W M I P L M I G A P D M A L P R
1576 ATGCCGGCCTTCGTGCGCCTGGCCAACTGGATGATCCCGTTGATGATCGGCGCGCTGACATGGCCCTGCCGCGC
TACGGCCGGAAGCAGCCGACCGGTTGACCTACTAGGGCAACTACTAGCCGCGCGGACTGTACCGGGACGGCGCG

+1 M N N F S F W L L P A A F L L L V S T L F S P G G
1651 ATGAACAACCTCAGTTCGGCTGCTGCCGCGAGCCTTCTGCTGTTGGTCTCGACCCTGTTCCAGCCGGTGGC
TACTTGTGAAGTCGAAGACCGACGACCGCGCTCGGAAGGACGACAACCAGAGCTGGGACAAGTCGGGCCACCC

+1 G P N F G W T F Y A P L S T T Y A P A S V T F F I
1726 GGGCGAATTCGGCTGGACCTTCTACGCCCCGCTGTCGACTACCTACGCCCCCGCAGCGTCACCTTCTTCATC
CCCGGCTTGAAGCCGACCTGGAAGATGCGGGGCGACAGCTGATGGATGCGGGGGCGGTCCGAGTGAAGAAGTAG

+1 F A I H L M G I S S I M G A I N V I A T I L N L R
1801 TTGCCATCCACCTGATGGGTATCAGCTCGATCATGGGCGGATCAACGTGATGGCCACCTCCTCAACCTGCGT
AAGCGGTAGGTGGACTACCATAGTCGAGTAGTACCCGCGCTAGTTGCACTAACGGTGGTAGGAGTTGGACGCA

+1 A P G M T L M K M P L F V W T W L I T A F L L I A
1876 GCGCCTGGCATGACCCTGATGAAGATGCCGCTGTTTGTCTGGACCTGGCTGATCAGGCCCTTCTGCTGATGGC
CGCGGACCTACTGGGACTACTTCTACGGCGACAACAGACCTGGACCGACTAGTCCGGAAAGACGACTAACCG

+1 V M P V L A G V V T M M L M D I H F G T S F F S A
1951 GTGATGCCGCTGCTGGCCGGTGTGGTACCATGATGCTGATGGACATTCACCTTCGGCACCAAGTTTCTTCAGCGC
CACTACGGCCACGACCGGCCACACCACTGGTACTACGACTACCTGTAAGTGAAGCCGTGGTCAAAGAAGTCCGCG

+1 A G G G D P V L F Q H V F W F F G H P E V Y I M I
2026 GCGGGGGCGGTGACCCAGTGTGTTCCAGCACGTGTTCTGGTTCCTCGGCCACCCGAGGTGTACATCATGATC
CGGCCCCGCCACTGGGTCAGACAAGGTCGTGCACAAGACCAAGAAGCCGGTGGGGCTCCACATGTAGTACTAG

+1 L P A F G A V S S I I P A F S R K P L F G Y T S M
2101 CTGCCGCCCTTGGTGGGTCAGCTCGATCATTCGGCGTTCCTCGCGCAAGCCGCTGTTCCGGCTACACCTCGATG
GACGGCCGGAACCCAGCCAGTCGAGCTAGTAAGCCGCAAGAGCGCGTTCGGCGACAAGCCGATGTGGAGCTAC

+1 V Y A T G A I A F L S F I V W A H H M F V V G I P
2176 GTGTACGCCACCGCGCAATTGCATTCCTGTCTGTTTCATGCTGTTGGGCCACACATGTTCTGTTGGTCCGCATCCCC
CACATGCGGTGGCCGCTTAACGTAAGGACAGCAAGTAGCAGACCCGGTGGTGTACAAGCACCAGCCGTAGGGC

+1 V V G E L F F M Y A T M L I A V P T G V K V F N W
2251 GTAGTCGGTGAGCTGTTCTTCATGTACGCCACCATGCTGATTGCCGTGCCACCCGGGCGTGAAGGTGTTCAATTGG
CATCAGCCACTCGACAAGAAGTACATGCGGTGGTACGACTAACGGCACGGGTGGCCGCACTCCACAAGTAAAC

+1 V S T M W E G S L T F E T P M L F A I A F V I L F
2326 GTCAGCACCATGTGGGAAGGCTCACTCACCTTCGAAACCGCGATGTTGTTCCGCATCGCCTTCGTATCCTGTTT
CAGTCGTGTACACCCCTTCGAGTGAGTGAAGCTTTGCGGCTACAACAAGCGGTAGCGGAAGCAGTAGGACAAA

+1 T I G G F S G L M L A I A P A D F Q Y H D T Y F V
2401 ACCATCGGCGGCTTCTCCGGGCTGATGCTGGCCATCGCCCCGGCGACTTCCAGTATCACGACACCTACTTCGTG
TGGTAGCCCGGCAAGAGGCCGACTACGACCGGTAGCGGGCCGCTGAAGGTCATAGTGTGTGGATGAAGCAC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

+1 V A H F H Y V L V P G A I F G I F A S A Y Y W L P
2476 GTGGCGCACTTCCACTACGTGCTGGTGCCTGGGGCAATCTTCGGCATCTTCGCCTCGGCGTACTACTGGCTGCCG
CACCGCGTGAAGGTGATGCACGACCACGGGCCCGTTAGAAAGCCGTAGAAGCGGAGCCGCATGATGACCCGACGGC

+1 K W T G H M Y D E T L G K L H F W L S F I G M N M
2551 AAATGGACCGGCCACATGTACGACGAAACCCCTTGGAAGCTGCATTTCTGGCTGTCTTCATCGGCATGAACATG
TTTACCTGGCCGGTGTACATGCTGCTTTGGGAACCGTTTCGACGTAAGACCGACAGCAAGTAGCCGTACTTGTATC

+1 A F F P M H F V G L A G M P R R I P D Y N L Q F A
2626 GCCTTCTTCCCATGCACTTCGTAGGGCTGGCCGGCATGCCGCGGCATCCCGGACTACAACCTGCAGTTCGCC
CGGAAGAAGGGGTACGTGAAGCATCCCGACCGCCGTACGGCGCCGCTAGGGCCTGATGTTGGACGTCAAGCGG

+1 D F N M V S S I G A F M F G A T Q I F F L F I V I
2701 GACTTCAACATGGTGTCTCCATCGGCGCGTTCATGTTCCGGCGCCACGCAGATCTTCTTCTGTTCATCGTCATC
CTGAAGTTGTACCACAGCAGGTAGCCGCGCAAGTACAAGCCGCGGTGCGTCTAGAAGAAGGACAAGTAGCAGTAG

+1 K C I R G G A P A P A K P W D G A E G L E W S I P
2776 AAGTGCATCCGCGCGGGCGCCGGCACCGGCCAAGCCCTGGGATGGCGCCGAGGGCCTGGAGTGGTGCATCCCC
TTCACGTAGGCGCCGCCCGCGCGGTGGCCGGTTCGGGACCCTACCGCGGCTCCCGGACCTCACCAGCTAGGGG

+2 **Cox11** M N G L S L
+1 S P A P Y H T F Q T P P E V K ■
2851 TCACCTGGCCCTACCACACCTTCCAGACACCCCGGAAGTGAATAGGAAACCCGCCATGAACCGCCTGTGCT
AGTGGACGCGGGATGGTGTGAAGGTCTGTGGGGCCTTCACTTTATCCTTTGGCGGTACTTGGCCGACAGCGA

+2 K R L V T R L L M L T V V M F A F G F A L V P I Y
2926 GAAACGCTGGTAAACGCGCTGCTGATGCTGACGGTGGTGTGTTGCGCTTCGGCTTCGCCCTGGTGCATCTA
CTTTGGCGGACCATGCGCGGACGACTACGACTGCCACCCTACAAGCGGAAGCCGAAGCGGGACCCAGGCTAGAT

+2 D V M C K A F G I N G K T G G Q Y E G S Q V S D P
3001 CGACGTGATGTGAAGCCCTTCGGCATCAACGGCAAGACCGGAGGCAATACGAGGGCAGCCAGGTGAGTACCC
GCTGCACACTACAGTTCGGGAAGCCGTAGTTGCCGTTCTGGCCTCCCGTTATGCTCCCGTCCAGTCACTGGG

+2 S R S V R V Q F M S T N A S D M V W D F Y S T A D
3076 GTCCGCTTCGGTGGGGTGCAGTTCATGTGACCAATGCCAGCGACATGGTCTGGGACTTCTACTCCAGCGTGA
CAGCGCAAGCCACGCCACGTCAAGTACAGCTGGTTACGGTCGCTGTACCAGACCCCTGAAGATGAGGTGCCGACT

+2 Q L E V N P G A V N Q M I F V A H N P T D R P M S
3151 CCAACTGGAGGTCAACCCGGGGGGTGAACCAGATGATCTTCGTGCGCACAAACCCGACCGACCCATGAG
GGTTGACCTCCAGTTGGGCCCCCGCCACTTGGTCTACTAGAAGCAGCGGTGTTGGGCTGGCTGGTGGTACTC

+2 A Q A I P S I T P A E A A A Y F H K T E C F C F T
3226 CGCGAGGGGATACCAGCATCACCCCGCCGAGGCGCAGCGTACTTCCACAAGACCGAGTGCCTTCTGCTTTAC
GCGCTCCGCTATGGGTGCTAGTGGGGCCGGCTCCGGCGTGCATGAAGGTGTTCTGGCTCACGAAGACGAAATG

+2 Q Q V L Q P G E R I E M P V R F I V D R D L P A S
3301 CCAGCAGGTGCTGCAGCCGCGCAACGCATCGAGATGCCCGTGCCTTCATCGTCGACCGCGACCTGCCGGCCG
GGTCTCCACGACGTCCGGCCGCTTGGCTAGCTTACGGGCACGCGAAGTAGCAGCTGGCGCTGGACGGCCGCTC

+2 V K H L T L A Y T L F D I T A R H P P V A H V A A
3376 CGTGAAGCACCTGACACTGGCCTACACCTTGTTCGACATCACCGCTCGCCACCCCGCGTCCGCATGTCCGGC
GCATCTCGTGGACTGTGACCGGATGTGGAACAAGCTGTAGTGGCGAGCGGTGGGGCGCCAGCGCTACAGCGCCG

+3 **CoxC** M A S H Q H Y Y V P A
+2 Q D V Q G A R ■
3451 CCAGGACGTCCAGGGCGCCCGTTAAGGGAAGGAGAACAGCAATGGCAAGTCATCAACACTACTACGTACCGGGC
GGTCTGCAGGTCCCGGGCAATTCCTTCTCTTGTGCTTACCCTTCAGTAGTGTGATGATGCATGGCCGGC

+3 Q S K W P I I A T I G M F I T V F G L G T W F N D
3526 AGAGCAAGTGGCCGATCATTGCCACCATCGGCATGTTTCATCACGGTGTTCGGCCTGGGACCTGGTTCAACGACA
TCTCGTTCACCGGTAGTAACGGTGGTAGCCGTACAAGTAGTGCACAAGCCGGACCCGTGGACCAAGTTGCTGT

+3 M K A G H P E S H G P L I F F V G A L F L A Y M L
3601 TGAAGCGCGGCCACCCGGAATCGCACGGGCGCTGATCTTCTTCGTGGGTGCGTGTGTTTCTGGCTACATGCTGT
ACTTCCGGCCGGTGGCCCTTAGCGTGCCTGGCGACTAGAAGAAGCACCCACGCAACAAGACCGGATGTACGACA

+3 F G W F G A V V K E S R A G L Y S P Q L D R S F R
3676 TCGGCTGGTTTGGCGCAGTGGTCAAGGAGAGCCGGGCGGGTGTACAGCCCGCAACTGGACCGCTCGTTCCGCT
AGCCGACCAAAACCGCTCACCAGTTCCTCTCGGCCCGCCCAACATGTCCGGCGTGTGACCTGGCGAGCAAGGGCA

+3 W G M S W F I F S E V M F F L A F F G A L F Y V R
3751 GGGCATAGAGCTGGTTCATCTTTTCTGAAGTCATGTTCTTCTTCCTGGCCTTCTTCGGTGCCTGTTCACGTGCGG
CCCCGTACTCGACCAAGTAGAAAAGACTTCACTACAAGAAGACCGGAAGAAGCCACCGGACAAGATGCACCGCC

+3 V L A G P W L G G D G A K G V A H M L W P T F E F
3826 TCCTGGCAGGGCCGTGGCTGGGTGGCGACGGGGCAAGGTGTTGCACACATGCTGTGGCCACGTTTCGAATTC
AGGACCGTCCCGGCACCGACCCACCGCTGCCCGGTTCCCAACAACGTGTGTACGACACCGGGTGAAGCTTAAGT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

```
+3 T W P L L H T P D P K L F P P P K E V I D P W H L
3901 CCTGGCCGCTGCTGCACACGCCCGACCCGAAGCTGTCCCGCCGCCAAGGAAGTGATCGACCCGTGGCACCTGC
GGACCGGCGACGACGTGTGCGGGCTGGGCTTCGACAAGGGCGGGGTTCTTCACTAGCTGGGCACCGTGGACG

+3 P L I N T I L L V S S S V T I T I A H H A L R R D
3976 CGCTGATCAACACCATCTTGTCTGCTCAGTTCAGTGTGACCATCACCATTGCCACCACGCCCTGCGCCGTGATC
GCGACTAGTTGTGGTAGAACGACCAAGTCAAGGTCACTGGTAGTGGTAACGGGTGGTGGGGACGCGGCACTAG

+3 H R G P L K F W M A L T I L L G L S F I A L Q A F
4051 ACCGGGGCGCTGAAATTCTGGATGGCCCTGACCATCCTGCTGGGGCTCAGCTTCATTGCATTGCAAGCCTTCG
TGGCGCCCGGCGACTTTAAGACCTACCGGGACTGGTAGGACGACCCCGAGTCGAAGTAACGTAACGTTCCGGAAGC

+3 E Y H E A Y T K L G L T L G S G I Y G A T F F M L
4126 AGTATCACGAAGCCTATACCAAGCTGGGGCTGACGTTGGGGTCGGGGATCTATGGCGCGACGTTCTTCATGCTCA
TCATAGTGTCTCGGATATGGTTCGACCCCGACTGCAACCCAGCCCTAGATACCGCGCTGCAAGAAGTACGAGT

+3 T G F H G A H V T L G T I I L I V M F V R I L R G
4201 CCGGGTTCACGGTGCCCGACGTGACCTTGGGCACGATCATCCTGATCGTGATGTTTCGTGCGCATCTGCGGGGC
GGCCCAAGGTGCCACGGGTGCACTGGAACCCGTGCTAGTAGGACTAGCACTACAAGCACGCGTAGAACGCGCCCGC

+3 H F N P E K H F G F E A A S W Y W H F V D V V W V
4276 ATTTCAACCCCGAGAAACACTTCCGGTTCGAGGCAGCCAGCTGGTATTGGCACTTCGTGCGACGTGGTGTGGGTG
TAAAGTTGGGGCTCTTTGTGAAGCCCAAGCTCCGTCGGTCGACCATAACCGTGAAGCAGCTGCACCACACCCACC

+3 G L F I F V Y V L ■
4351 GGTGTTCATCTTTGTGTATGTGCTGTAGGGCCAATCGCCGGCAAACAGTGCAGTTTCAGAAGGGCGCGTGTG
CCAACAAGTAGAAACACATACACGACATCCCGGTTAGCGGCCGTTTGTCTACGTCAAAGTCTTCCCGCGCACAC
```

Figura 68. Secuencia de nucleótidos del *cluster cox* compuesto por los genes *coxB*, *coxA*, *cox11* y *coxC*, así como la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican cada uno de esos genes.

5.3.1. Generación de la energía requerida para la incorporación de histamina.

La respiración aeróbica, fundamental para los animales y las plantas, es un proceso que implica la transferencia de electrones desde distintos donadores (por ejemplo, NADH, FADH₂, etc) hasta el oxígeno molecular. En este proceso participan diferentes cofactores redox unidos a complejos proteicos asociados a membrana o que forman parte integral de la misma, generándose la energía requerida para múltiples actividades metabólicas. En la respiración bacteriana, la energía se obtiene a través de la fosforilación oxidativa, de tal modo que se transfieren electrones desde sustratos reducidos hasta aceptores finales de electrones. La diferencia con respecto al sistema respiratorio mitocondrial, estriba en que en las especies bacterianas hay más flexibilidad respiratoria al haber múltiples oxidasas terminales que permiten a las células adaptarse tanto a las condiciones ambientales cambiantes, como a la disponibilidad de aceptores finales. Así, dependiendo de las condiciones de crecimiento, una de las diferentes oxidasas terminales será la predominante (Richardson, 2000; Morales *et al.*, 2006).

En las últimas etapas del proceso respiratorio se produce el transporte de electrones hasta dos tipos de oxidasas terminales: citocromo c oxidasas y quinol oxidasas, que son las

encargadas de reducir el oxígeno (**Figura 69**). Las primeras, son más eficaces desde el punto de vista energético por generar mayor proporción H^+/e^- que las quinol oxidasas (Carmona Gallardo, 2016). La mayoría son miembros de la superfamilia oxidasa de hemo-cobre (HCO), y forman parte de las cadenas respiratorias tanto en eucariotas como en procariotas (Pitcher and Watmough, 2004; Carmona Gallardo, 2016). La diferencia entre las distintas oxidasas que se van a describir a continuación, es que cada una tiene una afinidad específica por el oxígeno, una eficiencia de traslocación variable y un potencial redox distinto (Kawakami *et al.*, 2010; Arai *et al.*, 2014).

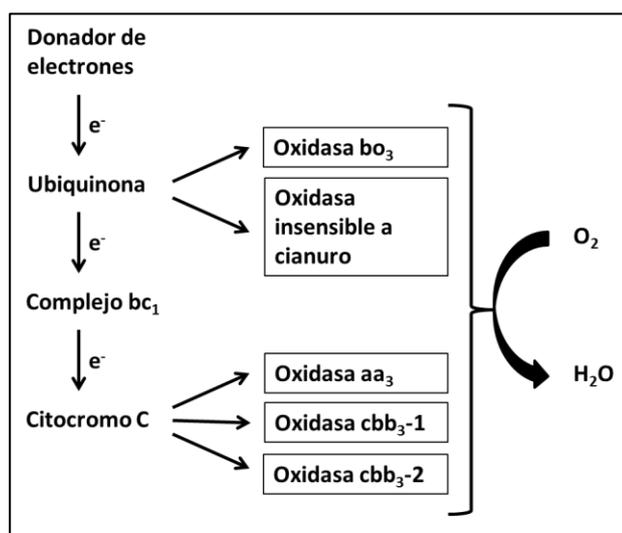


Figura 69. Cadena respiratoria de *P. aeruginosa* PAO1 en condiciones aeróbicas. El oxígeno se reduce a agua por alguna de las cinco oxidasas terminales: dos quinol oxidasas (bo_3 e insensible a cianuro) y tres citocromo c oxidasas (aa_3 , cbb_3-1 y cbb_3-2) (modificado de Arai, 2011).

- **Citocromo bo_3 oxidasa (*cyo*).**

Este tipo de oxidasa forma parte de la superfamilia HCO. Es homólogo al complejo citocromo c oxidasa de tipo aa_3 , pero contiene un grupo hemo *b* y un grupo hemo *o*. No posee el sitio de unión de Cu_A (el cual participa en la interacción con el citocromo C) y recibe electrones del ubiquinol (Arai, 2011). Este tipo de oxidasas son muy importantes y, tal como se demostrado en *P. putida*, juegan un doble papel, actuando como una oxidasa terminal y como un componente de una red de regulación global (Ugidos *et al.*, 2008). La cepa *P. putida* U al igual que *P. putida* KT2440 posee los genes que codifican este tipo de oxidasas (*cyoABCDE*) que son homólogos de los correspondientes genes de *E. coli* (Morales *et al.*, 2006). Los genes *cyoA*, *cyoB*, *cyoC* y *cyoD* codifican las subunidades II, I, III y IV,

respectivamente. El gen *cyoE* codifica una farnesil transferasa requerida para la producción del grupo hemo *o*, desde hemo *b* (Arai, 2011).

Otra *Pseudomonas* donde está presente este tipo de oxidasa es *P. aeruginosa* PAO1, pero en este caso, la enzima tiene baja afinidad por el oxígeno, y a diferencia de lo que ocurre en *P. putida* KT2440, juega un papel menos importante ya que cuando se cultiva en LB el nivel de expresión de los genes *cyo* es muy bajo. En esta bacteria, los genes *cyo* están regulados positivamente por óxido nítrico, generando S-nitrosoglutatión (GSNO); o por la falta de hierro, lo que demuestra que estos genes se expresan bajo condiciones de estrés (Arai *et al.*, 2014).

A pesar de que este complejo parece ser muy importante en *Pseudomonas*, algunas especies (*P. pseudoalcaligenes*) no poseen este *cluster* al completo, aunque suelen mantener en el genoma un fragmento del primer gen, *cyoA* (Carmona Gallardo, 2016).

- **Oxidasa terminal insensible a cianuro (CIO).**

Este tipo de oxidasa terminal es una quinol oxidasa que no posee cobre y que pertenece a la familia *bd*, sin embargo, es funcional y filogenéticamente distinta de las *bd* oxidasas tipo. Las *bd* oxidasas muestran una alta afinidad por el oxígeno y contienen un hemo b558 de bajo spin, un hemo b595 de alto spin y un hemo *d*, mientras que las CIOs de *P. aeruginosa* carecen de las características espectrales típicas del hemo b595 y del hemo *d*. Se considera que estos grupos hemo han sido reemplazados por centros redox. La enzima CIO consiste en dos subunidades codificadas por los genes *cioAB* que son homólogos a los genes *cydAB* (expresan los citocromos quinol oxidasas de tipo *bd*) (Arai, 2011; Arai *et al.*, 2014).

Este tipo de oxidasas se ha estudiado en algunas especies de *Pseudomonas*, tales como *P. pseudoalcaligenes* (Carmona Gallardo, 2016), *P. aeruginosa* (Kawakami *et al.*, 2010) y *P. putida* KT2440 (Morales *et al.*, 2006; Ugidos *et al.*, 2008). Sin embargo, mientras que en *P. pseudoalcaligenes* existen tres *clusters cio*, en *P. aeruginosa*, en *P. putida* KT2440 y en *P. putida* U solo aparece uno por genoma. Además, en *P. aeruginosa* se ha visto que este tipo de oxidasas actúa como una enzima complementaria cuando las HCO no funcionan o están inhibidas (Arai *et al.*, 2014). Lo mismo ocurre en *P. putida* KT2440 (Morales *et al.*, 2006).

- **Citocromo oxidasas cbb₃.**

Este tipo es el más distante filogenéticamente de la superfamilia HCO y se ha encontrado exclusivamente en bacterias (Pereira *et al.*, 2001; Pitcher and Watmough, 2004). Se inducen bajo condiciones de poco oxígeno en algunas bacterias, tales como *P. denitrificans*, *R. sphaeroides* y *R. capsulatus* (Arai, 2011). En *B. japonicum*, bacteria fijadora de nitrógeno, la oxidasa cbb₃ lleva a cabo su función en condiciones de concentración de oxígeno extremadamente bajas (Preisig *et al.*, 1993). Esta oxidasa está codificada por los genes incluidos en un *cluster* tetracistrónico denominado *ccoNOQP*. El producto del gen *ccoN* es la subunidad I catalítica que contiene el centro binuclear y consta del hemo b₃ de alto spin y Cu_B. Los genes *ccoO* y *ccoP* codifican las subunidades II y III, y el gen *ccoQ* codifica una proteína que estabiliza el complejo Cbb₃ (Arai, 2011).

P. putida, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. stutzeri* (Arai *et al.*, 2014) poseen dos *clusters* que codifican la citocromo oxidasa Cbb₃ (Cbb₃-1 y Cbb₃-2). Concretamente, en *P. aeruginosa* PAO1, Cbb₃-1 y Cbb₃-2 son codificados por los genes *ccoN1O1Q1P1* (PA1552-PA1554) y los genes *ccoN2O2Q2P2* (PA1555-PA1557) (Arai *et al.*, 2014). Cbb₃-1 tiene importancia en el crecimiento aeróbico, mientras que Cbb₃-2 juega un papel compensatorio o suplementario cuando tiene lugar una disminución de oxígeno (Kawakami *et al.*, 2010). En *P. putida* KT2440, el comportamiento de Cbb₃-1 es similar al de Cbb₃-2 de *P. aeruginosa*, mientras que Cbb₃-2 de *P. putida* KT2440 actúa de forma similar a Cbb₃-1 de *P. aeruginosa*. En *P. aeruginosa*, los genes que codifican Cbb₃-2 están localizados corriente arriba de los genes de Cbb₃-1, sin embargo, en *P. putida* KT2440 al igual que en *P. putida* U, la orientación es opuesta (Ugidos *et al.*, 2008).

- **Citocromo oxidasas de tipo aa₃.**

Este tipo de enzimas pertenecen a la superfamilia HCO, se encuentran en gran cantidad de bacterias y están relacionadas filogenéticamente con las oxidasas terminales mitocondriales. La cadena de transporte de electrones con la oxidasa terminal de este tipo genera un mayor gradiente de protones que con el resto de oxidasas terminales, indicando que la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃ es la más eficiente, obteniendo ATP desde diferentes nutrientes, y además, es la más importante para conservar energía en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Pitcher and Watmough, 2004; Arai *et al.*, 2014).

Este tipo de oxidasas tienen baja afinidad por oxígeno y juegan un papel predominante cuando algunas bacterias se cultivan bajo condiciones en las que la concentración de oxígeno es elevada (*P. denitrificans*, *B. japonicum*, *R. sphaeroides* y *B. Subtilis*) (Richardson, 2000; Arai, 2011).

Cada uno de los genes que codifican las diferentes oxidasas terminales están controlados, principalmente, por dos reguladores transcripcionales: ANR y RoxSR. El regulador ANR es un sensor de oxígeno mientras que RoxSR es un regulador transcripcional de dos componentes. Uno de estos componentes, RoxS, es una quinasa sensora de unión a membrana, mientras que el otro, RoxR, es el regulador de respuesta (Arai, 2011). Se ha visto que en fase estacionaria el promotor *cox* es dependiente del factor sigma RpoS y es reprimido por RoxSR, debido a que, en estas condiciones, RpoS se expresa en grandes cantidades (Kawakami *et al.*, 2010; Arai, 2011).

A continuación, se va a detallar cada uno de los genes que están presentes en el *cluster cox* y que codifican las diferentes subunidades de la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃. Este *cluster* se puede encontrar nombrado de diversas maneras, tanto *cox* (poniendo las subunidades en números romanos, como con letras), como *cta*. Así por ejemplo, el gen que codifica la subunidad II puede ser nombrado como *coxII*, *coxB* o *ctaC* (Alge and Peschek, 1993).

5.3.1.1. Gen *coxB*.

El mutante 29, denominado *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 está afectado en un nuevo gen que no pertenece a ninguno de los dos *loci* mencionados con anterioridad (*hin* y *dad*). Solo se ha obtenido un mutante que afecte genes *cox*, y la localización del punto de inserción se refleja en la **Tabla 37**.

Tabla 37. Localización del punto de inserción del transposón Tn5 en el mutante afectado en el gen *coxB* (*P. putida* U Δ *coxB*::Tn5).

Punto de inserción del transposón Tn5 en el gen <i>coxB</i>	
Mutante 29	+3 K V Y H T T C V A C H Q A E G Q G L P P M F 976 AGGTCTACCCACCCACCTGGGTGGCCTGTCACCAGGCCGA Tn5 AGGCCAGGGCCTGCCGCCGATGTTCC TCCAGATGGTGTGGTGGACGCACCCGGACAGTGGTCCGGCT TCCGGTCCCGGACGGCGGCTACAAGG

El número de nucleótidos de la secuencia de esta tabla hace referencia al número de nucleótidos de la secuencia de la **Figura 68**.

Con el fin de determinar si el mutante afectado en el gen *coxB* recuperaba su función original, se procedió a la clonación del gen en *trans* siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio de los genes anteriores. Para ello, el gen *coxB* de *P. putida* U se amplificó mediante PCR (**Tabla 38**), y se clonó utilizando los cortes de restricción *ApaI/SacI* en el plásmido replicativo pMC. A continuación, la construcción pMC*coxB* se transfirió al mutante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 mediante conjugación triparental, obteniéndose el recombinante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 pMC*coxB*.

Tabla 38. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *coxB* en el mutante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5.

Nombre del Primer	Secuencia
CoxB.F	CATTATTGCGCCACACCCTATCAAGC
CoxB.R	CGATGTCTTTATGGTTGGTGGTCAGTACC

A pesar de que el gen clonado se expresaba en *trans*, la cepa recombinante no era capaz de crecer en MMh (**Figura 70**), lo que indica que la expresión de esta construcción en este mutante no revierte la función metabólica perdida. Este hecho podría deberse a que como el gen *coxB* pertenece a una unidad transcripcional formada por diferentes genes situados corriente abajo, éstos no se expresasen debido al efecto polar causado por la inserción del transposón Tn5.

Por esta razón, el mutante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 se transformó con una construcción genética en la que se encontraban los cuatro genes que codifican la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃ (*coxB*, *coxA*, *cox11* y *coxC*). Para ello se amplificó un fragmento del gen adyacente al gen *coxC* mediante PCR (**Tabla 39**), y se clonó en el plásmido pJQ por medio de los cortes de restricción *XhoI/BamHI*. Después, se llevó a cabo la recombinación de la construcción obtenida en el genoma de *P. putida* U, y se digirió el DNA totalmente con la enzima *XhoI*. Posteriormente, se realizó la religación de los fragmentos obtenidos, lográndose clonar los cuatro genes en el plásmido pJQ (pJQ*coxBA-C*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 39. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación de un fragmento interno del gen adyacente a *coxC* en el plásmido pJQ.

Nombre del Primer	Secuencia	Modificaciones
C.cox.F	CCGCTCGAGCGGTTTCAGCAGACGCGTTCGAGTTTTTCGTCGTCC	<i>XhoI</i>
C.cox.R	CGCGGATCCGCGAGTGCCATGGCGTGTGCAGGGGTATCG	<i>BamHI</i>

El siguiente paso consistió en transformar *E. coli* DH10B con la construcción PJQ*coxBA-C* y, seguidamente, transferirla al mutante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 mediante una conjugación triparental. Una vez obtenida la cepa recombinante de este mutante (*P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 pJQ*coxBA-C*) se procedió a cultivarla en MMh, además de en MM con otras fuentes de carbono tales como histidina 10 mM e ImAA 10 mM (**Figura 70**). Los resultados obtenidos en la gráficas de la **Figura 70** demuestran que al clonar el *cluster* pJQ*coxBA-C* en el mutante *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5, esta cepa recuperaba la capacidad para degradar la histamina.

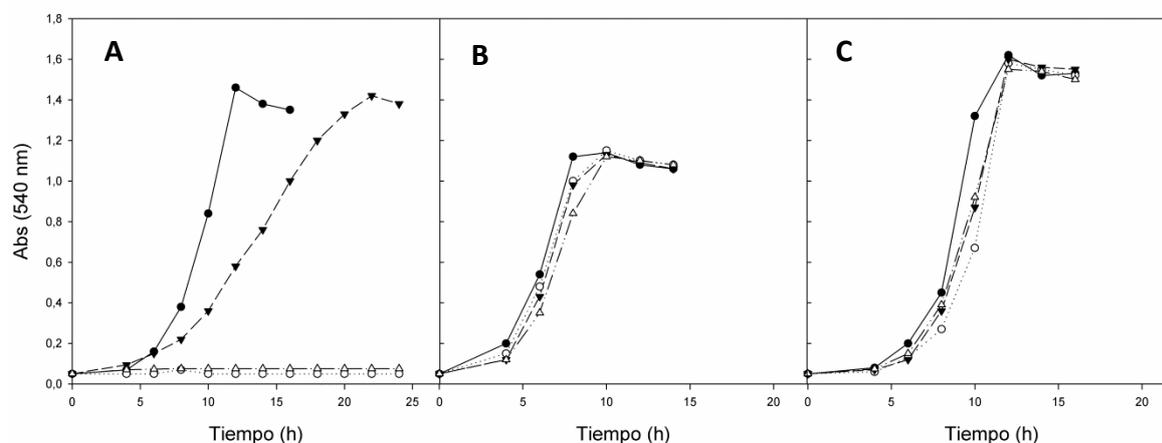


Figura 70. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●), de *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 pMCoxB (○), de *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 pJQ (Δ) y de *P. putida* U Δ *coxB*::Tn5 pJQ*coxBA-C* (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM; (B) ImAA 10 mM y (C) histidina 10 mM.

Otra estrategia que se diseñó para que este mutante fuese capaz de crecer en histamina, consistió en clonar el gen *coxB* en el plásmido pJQ (por medio de los mismos oligos que aparecen en la **Tabla 38**) y utilizando los cortes de restricción *BamHI/SacI*, de tal manera, que cuando la recombinación ocurriese en cualquier punto posterior a la inserción de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

transposón Tn5, la función del mutante se revertiría. Tal y como se esperaba, el recombinante *P. putida* U Δ coxB::Tn5 pJQcoxB fue capaz de degradar la histamina de una manera similar a como lo hacía *P. putida* U Δ coxB::Tn5 pJQcoxBA-C. Queda claro, pues, que el gen *coxB* forma parte del *cluster cox* que participa en una cadena de transporte de electrones y que, por tanto, es responsable de la génesis de la energía requerida para la incorporación de histamina desde el caldo de cultivo.

La proteína CoxB tiene homología con la subunidad II de la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃. Su peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia, composición y número de aminoácidos se muestran a continuación:

CoxB	
MGLLLWSVFGQANA AWTVMNHPGATEVSNVAVF DLHMTIFWICV IIGVVVFGAMFWSMVVHRRST GQQA AHFHEHTWVEIMWTVVPFLILVVM AIPA TKTLIDIYDASESDIDIQVTGYQWKWHYKYL G QDVEFFSNLATPADQIHNKAPKDEHYLLEVDQ PLVLPVGA KVRFLVTAADVIHSWWVPAFAVKR DAIPGFVNEAWTRIEKPGIYRGQCTELCGKDH GFMPVVVEVSKADYDTWLGERKAEAAKLKEL TSKEWTLEELVERGDKVYHTTCVACHQAEQGQ LPPMFPA LKGSKIATGPKEGHLSIVFHGKPGT AMAAFGKQLSEVDIAAVVTYERNAWGNKGM VTPKDV LALKQAEAK	367 aminoácidos <hr/> Mw: 40958,25 pI: 6,10 <hr/> Composición: A 38 R 9 N 9 D 18 C 5 Q 13 E 23 G 26 H 15 I 19 L 26 K 25 M 11 F 16 P 17 S 13 T 22 W 14 Y 9 V 39

Esta subunidad se encuentra bastante conservada en muchas bacterias. El alineamiento de la enzima CoxB de diferentes microorganismos mostrado en la **Figura 71**, ha permitido ver que los porcentajes de identidad de CoxB de *P. putida* U frente a CoxB de *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa*, *P. denitrificans*, *B. subtilis* y *R. palustris*, son del 99%, 81%, 31%, 25% y 34%, respectivamente.

CoxB. PpU	-----MGLLLWSVFGQANA AWTVMNHPGATEVSNVAV	31
CoxB. KT	MMR-----HPHVVMGLLLWSVFGQANA AWTVMNHPGATEVSNVAV	39
CoxB. Pa	MLR-----HPRVVMGFLLLSAISQANA AWTVMNHPGATEVSRV	39
CoxB. Pd	MMAIATKRRGVA AVMSLG VATMTAVPALAQDVLGDLPVIGKPVNGGMNFQPASSPLAHDQ	60
coxB. Bs	-----MVKHWRLI LLLA-----LVPLLLSGCGKPF LSTL-KPAGEVADKQ	39
CoxB. Rp	-MKVSKERLG---RWSLGLAIACCAA AVGG---TAF AEMGQPAPWEVTLQQPASPVMQNI	53
	. . .	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CoxB. PpU	FDLHMTIFWICVVIIGVVVFGAMFWSMVVHRRS---TGQQA AHFHEHTWVEIMWTVVPFLI	88
CoxB. KT	FDLHMTIFWICVVIIGVVVFGAMFWSMVIHRRS---TGQQA AHFHEHTWVEILWTVVPFLI	96
CoxB. Pa	FDLHMTIFWICVVIIGVLFVFGAMFWSMIVHRRS---TGQQA AHFHEHTTVEILWTVVPFVI	96
CoxB. Pd	QWLDHFVLYIITAVTIFVCLLLICIVRFNRR---ANPVPARFTHNTPIEVIWTVLPVLI	117
coxB. Bs	YDLTVLSTLIMVVVAVVSVIFFYVIVRFRRSRVGENTIPKQVEGNKFL EITWTVIPILL	99
CoxB. Rp	VWFHSFLLWLTITLITLFLVLLLVIVVVKFNAK---ANPVP SKTTHNTLIEVAWTIVPVL I	110
	: . : . * : . : . . . : . : * : * : * : . :	
CoxB. PpU	LVVMAIPATKTLIDIYDAS-----ESDIDIQVTGYQWKWHYKYL GQDVEFFSNLAT	139
CoxB. KT	LVVMAIPATKTLIDIYDAS-----ESDIDVQVTGYQWKWHYKYL GQDVEFFSNLAT	147
CoxB. Pa	LVVMAVPATRTLHIYDTS-----EPELDVQVTGYQWKWQYKYL GQDVEYFNLAT	147
CoxB. Pd	LVAIGAFSLPILFRSQEMP-----NDPDLVKAIGHQWYWSY EYPNDGVAFDALMLE	169
coxB. Bs	LIILVIPVVLTYLELADTSPMDKKRKAEDALVVNVRANLYWWE FEYPDYGI I-----	152
CoxB. Rp	LVAVAVPSFRLFLFLELDIP-----KPDLTVKATGNQWNW TYTYPDDKIEFTSIMLT	161
	* : : : : : . : : . . : * : * . : :	
C		
CoxB. PpU	PADQIHNKAPKDEHYLLEVDQPLVLPVGAKVRFVLTAA DVIHSSWWVPAFAVKRDAIPGFV	199
CoxB. KT	PTDQIHNKAPKDEHYLLEVDQPLVLPVGAKVRFVLTAA DVIHSSWWVPAFAVKRDAIPGFV	207
CoxB. Pa	PQDQIHNKAPKDEHYLLEVDQPLVLPVGAKVRFVLTSS DVIHSSWWVPAFAVKRDAIPGFV	207
CoxB. Pd	-KEALADAGYSEDEYLLATDNPVVVVPGKVLVQVTATD VIHAWTI PAFAVKQDAVPGRI	228
coxB. Bs	-----TSQELIVPTDQRVYFNLKASDVKHSFWI PSVGGKLDTNTDNE	194
CoxB. Rp	-DEERAKMNP-VPPRLLGVDNEMVVPVDKVVRIQTAA DVIHSSWAI PSFGVKIDAI PGRL	219
	. . : : * . . * . . : : * * * : : * : . . * * : .	
C		
CoxB. PpU	NEAWTRI-----EKPGIYRQQT ELCGKDHGFMPVVVEV KSKADYDTWLGERKAEAAKL	253
CoxB. KT	NEAWTRI-----EKPGIYRQQT ELCGKDHGFMPVVVEV KSKADYDTWLGERKAEAAKL	261
CoxB. Pa	NEAWTKV-----DEPGIYRQQAELCGKDHGFMP I VVDV KPAEFDQWLAKRKEEAAKV	261
CoxB. Pd	AQLWFSV-----DQEGVYFGQCS ELCGINHAYMPI VVKAVSQEKYEAWLAGAKEEFAAD	282
coxB. Bs	NKFFLTFDSKR SKEAGDMFFGKCAELCGPSHALMDFK VKTMSAKEFQGWTKEMKNYKSTA	254
CoxB. Rp	NEAWFKA-----VKEGRYYGQCSEL CGRDHAFMPI VVVRV VNEQEYEA WKKKQQVASRMR	273
	: : . : * : * : * * * . * . * . . . : : * :	
CoxB. PpU	KELTSKEWTLEELVERGDKVY-HTTCVACHQAEGQGLP-----PMFPAL KGSKIATGP	305
CoxB. KT	KELTSKEWTLEELVERGDKVY-HTTCVACHQAEGQGLP-----PMFPAL KGSKIATGP	313
CoxB. Pa	KELTSKEWTLEELVARGDKVY-HTICAACHQAEGQGM P-----PMFPAL KGSKIATGP	313
CoxB. Pd	ASD-----YLPASPVKLASA-----E-----	298
coxB. Bs	ES-----DLAKQGEELFKEKNCL SCHAVEPNDKRAEAARTAPNLATFGERTKVAGV	305
CoxB. Rp	DDS-----YASAASATR-----	285
	. .	
CoxB. PpU	KEGHLSI-----VFHGKPGTAMAAF GKQLSEVDIAAVVTY ERNAWGNNGDMVTPKDV	358
CoxB. KT	KEGHLSI-----VFHGKPGTAMAAF GKQLSEVDIAAVVTY ERNAWGNNGDMVTPKDV	366
CoxB. Pa	KEHHLEV-----VFNGVPGTAMAAF GKQLNEVDLAAVITY ERNAWGNDDGDMVTPKDV	366
CoxB. Pd	-----	298
coxB. Bs	KEANKENVKAWLKDPDS IKPGNKMTGTYPKLS DSETNALYEY LKGLKAESK-----	356
CoxB. Rp	-----	285
CoxB. PpU	LALKQAEAK 367	
CoxB. KT	LALKQAEAK 375	
CoxB. Pa	VAYKQKQQ- 374	
CoxB. Pd	----- 298	
coxB. Bs	----- 356	
CoxB. Rp	----- 285	

Figura 71. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína CoxB de *P. putida* U y las proteínas CoxB de *P. putida* KT2440 (KT), de *P. aeruginosa* PAO1 (Pa), de *P. denitrificans* (Pd), de *B. subtilis* (Bs) y de *R. palustris* (Rp). Los residuos del centro binuclear de Cu_A se muestran sombreados en gris. Los residuos que participan en la interacción con el citocromo C se indican con la letra C.

Esta subunidad II alberga el centro binuclear de Cu_A donde se produce la transferencia de electrones con el citocromo C. Los residuos conservados de este centro binuclear son H181, C216, E218, C220, H224 y M227, mientras que los aminoácidos D178 y E218 participan en la interacción con el citocromo C (**Figura 71**) (Witt *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2001).

5.3.1.2. Gen *coxA*.

La secuenciación masiva del genoma de la cepa silvestre, permitió observar que corriente abajo del gen *coxB* (mutado por inserción del transposón Tn5), se encontraba un ORF que se transcribía en el mismo sentido que *coxB* y que presentaba homología con la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa. Su secuencia, número de aminoácidos, composición, peso molecular y punto isoeléctrico se muestran a continuación.

CoxA	
MSTVIDDHAHGHEHAHGPAKGLMRWVLTTHK DIGTMYLWFSFIMFLLGGSFAMVIRAEFLQPG LQIVEPAFFNQMTTMHGLIMVFGAVMPAFVGL ANWMIPLMIGAPDMALPRMNNFSFWLLPAAFL LLVSTLFSPPGGPNFGWTFYAPLSTTYAPASV TFFIFAIHLMGISSIMGAINVIATILNLRAPG MTLMKMPLFVWTLWLTAFLLIAVMPVLAGVVT MMLMDIHFGTSFFSAAGGDPVLFQHVFWFFG HPEVYIMILPAFGAVSSIIIPAFSRKPLFGYTS MVYATGAI AFLSFIVWAHMFVVGIPVVGELF FMYATMLIAVPTGVKVFNVVSTMWEGSLTFET PMLFAIAFVILFTIGGFSGLMLAIAPADFQYH DTYFVVAHFHYVLVPGAIFGIFASAYYWLPKW TGHMYDETLGKLFWLSFIGMNAFFPMHFVG LAGMPRRIPDYNLQFADFNMVSSIGAFMFGAT QIFFLFIVIKCIRGGAPAPAKPWDGAEGLEWS IPSPAPYHTFQTPPEVK	529 aminoácidos
	Mw: 58720,73
	pI: 6,45
	Composición:
	A 53 R 8 N 12 D 12 C 1
	Q 8 E 11 G 47 H 20 I 40
	L 48 K 10 M 37 F 59 P 37
	S 26 T 31 W 16 Y 15 V 38

La comparación de CoxA presente en diferentes microorganismos, tales como *P. putida* U, *P. putida* KT2440 (Ugidos *et al.*, 2008), *P. aeruginosa* (Kawakami *et al.*, 2010), *P. denitrificans* (García-Horsman *et al.*, 1991), *B. subtilis* y *R. palustris* (Matsutani *et al.*, 2014) mostrada en **Figura 72**, permite deducir los porcentajes de identidad de CoxA de *P. putida* U frente a los microorganismos nombrados, siendo del 99%, 94%, 52%, 51%, 44% y 57%, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	D	
CoxA.PpU	---MSTVIDD-HAHGHEHAHGPAKGLMRWVLTNHNKDIGTMYLWFSFIMFLLGGSFAMVI	56
CoxA.KT	---MSAVIDD-HAHGHDHAHGPAKGLMRWVLTNHNKDIGTMYLWFSFIMFLLGGSFAMVI	56
CoxA.Pa	---MSAVIDTDPDHHAGDHHGPAKGLMRWVLTNHNKDIGTLYLWFSFMMFLLGGSAMVI	57
CoxA1.Pd	--MA----DAAVHGH-GDHHDRGFFTRWFMSNHNKDIGILYLFRTAGIVGLISVCFVYM	53
CoxA2.Pd	-----MSAQIS-DSIEEKRGFFTRWFMSNHNKDIGVLYLFRTAGLAGLISVTLTVYM	50
CoxA.Bs	--MLNA-----LTEKRTRGSMLWDYLTVDHKKIAILYLAVAGGFFFLVGGIEAMFI	49
CoxA.Rp	MAMEAARVAHSEHAHDDHAHAHPTGWRRYLYSTNHNKDIGTMYLVFAVMAGVIGAAMSAI	60
	. . . : * * . : * * . : . . . : . . .	
	↓	
	D	
CoxA.PpU	RAELFQPGQLQIV-----EPAFFNQMTTMMHGLIMVFGAVMPAF-VGLAN	98
CoxA.KT	RAELFQPGQLQIV-----EPAFFNQMTTMMHGLIMVFGAVMPAF-VGLAN	98
CoxA.Pa	RAELFQPGQLQIV-----EPAFFNQMTTMMHGLIMVFGAVMPAF-VGLAN	99
CoxA1.Pd	RMELQHPGVQYMCLEGARLIADASAECTPNGHLWNVMITYHGVLMFFVVI PALFGGFGN	113
CoxA2.Pd	RMELQHPGVQYMCLEGMRLVADAAAECTPNGHLWNVVVYTHGILMMFFVVI PALFGGFGN	110
CoxA.Bs	RIQLAKPENAF-----SAQAYNEVMTMHGTMI FLAAMPLLF-ALMN	91
CoxA.Rp	RVELMFPGIQIF-----HNHTYNVFVTSHGLIMIFFMVMPAMIGGFGN	104
	* : * * . . . : * . * * * * : * * . : * : . : *	
	D D	
CoxA.PpU	WMIPLMIGAPDMALPRMNNFSFWLLPAAFLLLVSTLFSPPGGG----PNFGWTFYAPLSTT	154
CoxA.KT	WMIPLMIGAPDMALPRMNNFSFWLLPAAFLLLVSTLFSPPGGG----PNFGWTFYAPLSTT	154
CoxA.Pa	WMIPLMIGAPDMALPRMNNFSFWLLPAAFLLLVSTLFSPPGGG----PNFGWTFYAPLSTT	155
CoxA1.Pd	YFMPLHIGAPDMAFPRLNNSYWMYVCGVALGVASLLAPGGNDQMGSGVGVWVLYPPLSTT	173
CoxA2.Pd	YFMPLHIGAPDMAFPRLNNSYWLIVCGVSLAIASLLSPGGSDQPGAGVGVWVLYPPLSTT	170
CoxA.Bs	AVVPLQIGARDVSFPFLNALGFWLFVFFGGIFLNLVSWFLGGA----PDAGWTSYASLSLH	146
CoxA.Rp	WVPLMIGAPDMAFPRLNNSYWMYVCGVALGVASLLAPGGNDQMGSGVGVWVLYPPLSTT	164
	. : * * * * * : : : * . : : * . * * * * * . : : : . : *	
	D	
CoxA.PpU	-YAPASVTFEFAIHLMGISSIMGAINVIATILNLRAPGMTLMKMPFLVWVTLITAFLLI	213
CoxA.KT	-YAPASVTFEFAIHLMGISSIMGAINVIATILNLRAPGMTLMKMPFLVWVTLITAFLLI	213
CoxA.Pa	-FAPHSVTFEFAIHLGAGISSIMGAINVIATILNLRAPGMTLMKMPFLVWVTLITAFLLI	214
CoxA1.Pd	-EAGYSMDLAIFAVHVS GASSILGAINIITTFNLNRAPGMTLKFVPLFAVSVFITAWLIL	232
CoxA2.Pd	-EAGYAMDLAIFAVHVS GASSILGAINIITTFNLNRAPGMTLKFVPLFAVAVFITAWMIL	229
CoxA.Bs	-SKGHGIDFFVLGLQISGLGTLIAGINFLATIINMRAPGMTYMRPLPLFTWTTVFASALIL	205
CoxA.Rp	GHPGPAVDFAILALHLAGASSILGAINFITITFNLNRAPGMTLHKMPFLVWVTLITAFLLI	224
	. : . : : : : * . : : : . * * . : : * : : * * * * * : : * * * . * : : : . : *	
	DD ↓ D K K	
CoxA.PpU	AVMPVLAGVVTMMLMDIHFGTSFFSAAGGGDPVLFQHVFWFFGHPEVYIMILPAFGAVSS	273
CoxA.KT	AVMPVLAGVVTMMLMDIHFGTSFFSAAGGGDPVLFQHVFWFFGHPEVYIMILPAFGAVSS	273
CoxA.Pa	AVMPVLAGVVTMMLMDIHFGTSFFSAAGGGDPVLFQHVFWFFGHPEVYIMILPAFGAVSA	274
CoxA1.Pd	LSPVLAGAITMLLMDRNFQTFDFPAGGGDPVLYQHILWFFGHPEVYIIILPGFGIISH	292
CoxA2.Pd	LSPVLAGGITMLLMDRNFQTFDFPAGGGDPVLYQHILWFFGHPEVYMLILPGFGIISH	289
CoxA.Bs	FAFPPLTVGLALMMLDRLFGTNFNPELGGNTVIWEHLFWIFGHPEVYILILPAFGIFSE	265
CoxA.Rp	LSPVLAGAITMLLMDRNFQTFDFPAGGGDPVLYQHILWFFGHPEVYILILPGFGMISQ	284
	: * * : : : : * * * * * . * * : : : : * * * * * : : * * * * * . *	
	↓↓	
	K	
CoxA.PpU	IIPAFSRKPLFGYTSMVYATGAI AFLSFIWVAHHMFVVGIPVVGELFFMYATMLIAVPTG	333
CoxA.KT	IIPAFSRKPLFGYTSMVYATGAI AFLSFIWVAHHMFVVGIPVVGELFFMYATMLIAVPTG	333
CoxA.Pa	IIPAFSRKPLFGYTSMVYATGAI AFLSFIWVAHHMFVVGIPVVGELFFMYATMLIAVPTG	334
CoxA1.Pd	VISTFARKPIFGYLPVLAAMAIAIGILGFVVAHHMYTAGMSLTQQAYFMLATMTIAVPTG	352
CoxA2.Pd	VISTFARKPIFGYLPVLAAMAIAIGILGFVVAHHMYTAGMSLTQQAYFQMATMTIAVPTG	349
CoxA.Bs	VIPVFARKRFLGYSSMVFAIVLIGFLGMVVAHHMFTTGLGPIANAI FAVATMAIAIPTG	325
CoxA.Rp	IVSTFARKPIFGYLPVLAAMAIAIGILGFVVAHHMYTAGMSLTQQAYFVAATMTIAVPTG	344
	: : . : : * : * * * * . * * * * . : : : : * * * * * : : * * * * * : * * * * * . *	

hemo a₃ (H392) y el Cu_B (H257, H306 y H307) (Pereira *et al.*, 2001; Bossis *et al.*, 2014). La zona en la que se encuentra H257, GHEPEVY (que abarca desde el aminoácido 256 al 262), también participa en la unión al centro binuclear de Cu_B (Ishikawa *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2001). En la enzima citocromo c oxidasa, existe un centro activo de magnesio (o manganeso) localizado en la zona de contacto entre la subunidad I y la subunidad II. Se ha observado que al menos dos residuos de cada una de estas subunidades participan en este proceso. En el caso de la subunidad I, los residuos H384 y D385 son los responsables de esta unión, conservándose la zona adyacente TYFVVAHFHYV (que comprende desde el aminoácido 386 al 396) (**Figura 72**) (Hosler *et al.*, 1995; Hiser *et al.*, 2000; Nomura *et al.*, 2006). Por el contrario, en la subunidad II, los aminoácidos D178 y E218 son los encargados de este mecanismo (**Figura 71**) (Ostermeier *et al.*, 1997; Zhen *et al.*, 1999).

Esta enzima cataliza la reducción de O₂ a H₂O, y en este proceso participan cuatro electrones:



Los sitios de reacción están dentro de la proteína, y los canales de protones (D y K) que así permiten este mecanismo, están presentes en esta subunidad. Los residuos de CoxA que pertenecen al canal D, son Y38, N98, D109, N116, S173, F255, G256 y E259. El canal K está compuesto por los residuos Y261, S272, T332 y K335 (**Figura 72**). Este canal se une directamente al centro binuclear Cu_B por medio de un enlace covalente que se establece entre la tirosina Y261 y la histidina H257, interviniendo en el ciclo catalítico y formando un radical tirosil transitorio que permite la rotura del enlace del oxígeno molecular (Proshlyakov *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2001).

5.3.1.3. Gen *cox11*.

Continuando con nuestro estudio acerca de los ORFs que hay corriente abajo de *coxB* y con ayuda de la secuenciación masiva, se observó un ORF que presentaba homología con un gen que codifica la proteína de ensamblaje (Cox11 o Cox-). A continuación se muestra su secuencia, número de aminoácidos, composición, punto isoeléctrico y peso molecular.

	■ ■	
Cox11.PpU	---VKHLTLAYTLFDITARHPPVAHVAAQD-VQGAR	188
Cox11.KT	---VKHLTLAYTLFDITARHPPVAHVAAQD-VQGAR	188
Cox11.Pa	---VRHVTLAYTLFDITARKPPVPVAGR-----	184
cox11.Pd	AGRIRDITLSYTFHRTDPPAPKQAALDAKTEPTVN-	195
Cox11.Rp	NDTVKTITLSYTYYPVRDPAPKPVASSEPPAPRKGNL	214
Cox11.Rs	GRYVRQITLSYTFHETALTEE-QAALAAESATDVN-	191
	:: :*:** .	

Figura 73. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína de ensamblaje (Cox11) de *P. putida* U y de otros microorganismos, tales como *P. putida* KT2440 (KT), *P. aeruginosa* (Pa), *P. denitrificans* (Pd), *R. palustris* (Rd) y *R. sphaeroides* (Rs). El motivo conservado de unión a metal está sombreado en gris. Las flechas indican las cisteínas que se unen al cobre. Los residuos conservados que intervienen en la interacción de esta enzima con la subunidad I del complejo citocromo c oxidasa se señalan con ■.

El porcentaje de identidad de Cox11 de *P. putida* U es más alto con respecto a la proteínas del género de *Pseudomonas*, tales como *P. putida* KT2440 (97%) y *P. aeruginosa* (71%), que con respecto a especies de otros géneros, *P. denitrificans* (35%), *R. sphaeroides* (34%) y *R. palustris* (28%) (**Figura 73**). La función de esta enzima Cox11 es la transferencia de cobre hasta los sitios de unión de Cu_B en la subunidad I (residuos H306 y H307 señalados en la **Figura 72**). Para llevar a cabo dicho mecanismo, el cobre se une a la enzima Cox11 por medio de las cisteínas del motivo conservado CFCF (que extiende desde el aminoácido 127 al 130) y una tercera cisteína (C35) (Morales *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2010; Arai, 2011). Además, hay otros residuos que participan en la interacción de esta proteína con la subunidad I, los cuales son de distinto tipo: cargados (E139, D150, K124), polares (T131, A163, T165) y apolares (W73, F75, A109, P115, F122, M143, P144, V145) (**Figura 73**) (Greiner *et al.*, 2008).

5.3.1.4. Gen *coxC*.

Este ORF presenta homología con los genes que codifican la subunidad III de la citocromo c oxidasa de tipo aa₃, siendo éste el último gen que contenía la construcción pJQ*coxBA-C*, la cual se utilizó para revertir la función metabólica perdida en *P. putida* U Δ*coxB*::Tn5. A continuación figuran la secuencia, la composición, el número de aminoácidos, el peso molecular y el punto isoeléctrico de esta proteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CoxC.PpU	FMLTGFHGAHVTLGTIILIVMFVRIILRGHFNPEKHFGEAASWYWHFVDVVWVGLFIFVY	293
CoxC.KT	FMLTGFHGAHVTLGTIILIVMFVRIILRGHFNPEKHFGEAASWYWHFVDVVWVGLFIFVY	293
CoxC.Pa	FMLTGFHGAHVTLGALILGIMLIRIILRGHFDAEHHFGFEAASWYWHFVDVVWVGLFIFVY	293
CoxC.Pd	YMATGFHGAHVIGTIFLFLVCLIRLLKQMTQKQHVGFEEAAWYWHFVDVVWVGLFIFVY	270
CoxC.Rp	FMATGFHGFHVLVGTIFLLVCLIRAYAGHFTPKQHLGFEEAAYWHFVDVVWVGLFIFVY	271
CoxC.Rs	FMATGFHGFHVIVGTIFLLVCLIRVQRGHFTPEKHVGFEEAIWYWHFVDVVWVGLFIFVY	262
	:* ***** ** :*:::* : ::* *:: :*:*** * *****: ** :*	
CoxC.PpU	VL-----	295
CoxC.KT	VL-----	295
CoxC.Pa	VI-----	295
CoxC.Pd	IWGR-----	274
CoxC.Rp	VWGHGASTMAHGG	284
CoxC.Rs	IWQG-----	266
	:	

Figura 74. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas CoxC de *P. putida* U y de otros microorganismos tales como *P. putida* KT2440 (KT), *P. aeruginosa* (Pa), *P. denitrificans* (Pd), *R. palustris* (Rp) y *R. sphaeroides* (Rs). Los residuos que intervienen en la interacción de esta subunidad con CoxA se muestran sombreados en gris.

En *R. sphaeroides* se ha descrito que la función de esta subunidad es la estabilización del complejo citocromo c oxidasa por medio de la interacción con la subunidad I (Varanasi *et al.*, 2006). Los residuos encargados de esta función (W64, P92 y R257) están presentes en todas las secuencias comparadas (**Figura 74**). Esta interacción es importante para la estabilización del sitio activo de la enzima citocromo c oxidasa durante el cambio conformacional catalítico y para prevenir su inactivación (Varanasi *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2008).

En algunos genomas de *Pseudomonas* (*P. putida* S12, *P. fluorescens* F113, *P. capeferrum*, etc.) y de bacterias pertenecientes a otros géneros (*Hahella chejuensis*, *Endozoicomonas arenosclerae*, *Stenotrophomonas rhizophila*, etc.), se han anotado genes homólogos de *coxC*. Tal es el caso del gen que codifica un transportador de tipo MFS. Estas proteínas, que se encuentran en todos los reinos y que representan una gran familia de transportadores secundarios, participan en la incorporación de una gran cantidad de sustratos, entre los que se incluyen iones, carbohidratos, lípidos, aminoácidos y péptidos, nucleósidos y otras moléculas (Yan, 2013).

La mayoría de los miembros que pertenecen a esta familia de transportadores poseen doce hélices de transmembrana, a diferencia de lo que ocurre en CoxC de *P. putida* U, que posee solo siete (**Figura 75**). Además, se ha observado que en la mayoría de las proteínas que pertenecen a este grupo de transportadores, están presentes unos dominios conservados, DRXXRR, por duplicado, a pesar de que existe una muy baja identidad de secuencia entre los

diferentes miembros (Yan, 2013). En la proteína CoxC de *P. putida* U no se encuentra este dominio, por lo que no debería incluirse en esta familia de transportadores MFS.

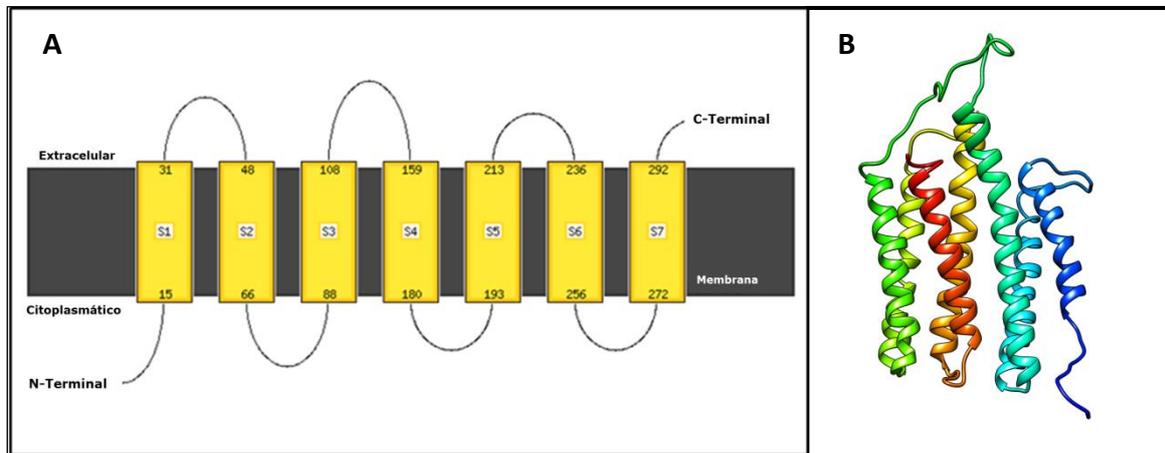


Figura 75. (A) Predicción de la estructura secundaria de CoxC de *P. putida* U y (B) estructura terciaria de CoxC.

5.3.2. ORFs adyacentes al *cluster cox*.

Una vez caracterizado el cluster *cox*, pasamos a analizar los ORFs que existían corriente abajo, y vimos que había unos genes que codifican proteínas que participan en la biosíntesis de este tipo de citocromos, como *surfl*, *cox15*, *ctaB* y *senC*. Estos genes también están presentes en otras cepas de *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* PAO1 y *P. putida* KT2440 y aparecen de manera semejante (**Figura 76**).

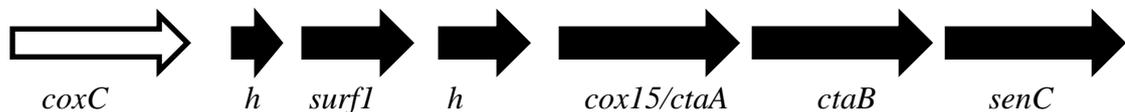


Figura 76. Organización de los genes que se encuentran corriente abajo del *cluster cox* en diferentes cepas de *Pseudomonas* (*P. putida* U, *P. putida* KT2440 y *P. aeruginosa* PAO1). h, gen que codifica una proteína con función desconocida.

Como se verá en otros microorganismos, tales como *P. denitrificans*, *B. subtilis* y *R. palustris*, la mayoría de estos genes se encuentran intercalados entre los genes *coxB*, *coxA* y *coxC* (**Figura 77**). Así, *ctaA*, *ctaB* y *surfI* codifican factores de biosíntesis del grupo hemo a; mientras que *senC*, al igual que *coxII*, codifica chaperonas de cobre (Sanders *et al.*, 2008; Hannappel *et al.*, 2012; Dash *et al.*, 2015).

5.3.3. Transferencia de electrones a la enzima citocromo c oxidasa.

Los citocromos C son los encargados de transportar los electrones liberados en la primera oxidación de ciertas aminas y de algunos alcoholes hasta una citocromo c oxidasa existente en la membrana plasmática (García-Horsman and Escamilla, 1989). Concretamente, se ha observado que el principal donador de electrones bajo condiciones normales de crecimiento de las oxidasas de tipo *cbb₃-1* y *cbb₃-2* es el citocromo C4 (Arai *et al.*, 2014).

En la degradación de feniletilamina por *P. putida* U, se han obtenido mutantes en algunos de los genes que codifican proteínas que intervienen en la biosíntesis del citocromo C. Uno de los mutantes estaba afectado en el gen *ccmE*, que codifica una chaperona que permite la liberación del grupo hemo al espacio periplásmico; el otro mutante estaba afectado en el gen *ccmI*, la proteína codificada por este gen presenta el apocitocromo a la proteína CcmF que participa junto con otra proteína (CcmH) en la ligación de este apocitocromo C al hemo, obteniéndose el holocitocromo C (Arias *et al.*, 2008). Pensamos que este citocromo C podría intervenir también en la ruta catabólica de histamina transfiriendo el electrón desde el complejo bc1 hasta la enzima citocromo c oxidasa de tipo aa₃. Si esto fuese así, los mutantes en este citocromo C no podrían crecer en MM suplementado con histamina. Los dos mutantes crecieron perfectamente, lo que nos permite concluir que este citocromo C no es el encargado de transferir electrones a la oxidasa terminal que participa en la degradación de histamina. De igual modo, es evidente que la oxidasa terminal que participa en la asimilación de histamina, no participa en la ruta catábólica de feniletilamina, ya que el mutante afectado en el gen *coxB* (*P. putida* U Δ *coxB*::Tn5) crece en MM suplementado con feniletilamina 5 mM como única fuente de carbono (**Tabla 41**).

5.3.4. Análisis comparativo del *cluster cox* en otros microorganismos.

Como ya hemos visto, el *cluster cox* de *P. putida* U está constituido por un *cassette* catabólico de 4,3 kb. Otros *clusters* homólogos han sido encontrados en otras *Pseudomonas* (*P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* PAO1 y *P. fluorescens*), así como en *D. radiodurans*, *B. subtilis*, *R. palustris* y *P. denitrificans* (**Figura 77**).

La organización génica en *P. putida* KT2440 (Ugidos *et al.*, 2008), en *P. aeruginosa* PAO1 (Arai *et al.*, 2014) y en *P. fluorescens* es idéntica a la que está presente en *P. putida* U (**Figura 77**).

En otros géneros se observan diferencias notables. Por ejemplo, en *D. radiodurans* solamente se encuentran *coxA* y *coxB*, orientados de la misma manera que en *Pseudomonas*, aunque algunos de los genes (*ctaA* y *ctaB*) que codifican enzimas para la biogénesis de la enzima citocromo c oxidasa, están situados corriente arriba de los genes del *cluster*. *B. subtilis* también tiene los genes *ctaA* y *ctaB* corriente arriba del *cluster*, pero el gen *coxII* se encuentra situado después del gen *coxC*, a diferencia de lo que ocurre en otros microorganismos. Además, en el *cluster cox* de *B. subtilis* existe un gen, *ctaF*, que codifica una cuarta subunidad que no está presente en el *cluster cox* de los otros microorganismos (**Figura 77**).

En otros microorganismos, tales como *P. denitrificans* y *R. palustris*, los genes *ctaA* y *ctaB* están situados entre los genes del *cluster cox*. El caso de *P. denitrificans* es curioso porque es un microorganismo que no posee juntos los dos genes que codifican la subunidades I y II (*coxA* y *coxB*). Además, este microorganismo posee dos genes parálogos de *coxA* (**Figura 77**).

Como se ha indicado, tras analizar la comparación del *cluster cox* en diferentes microorganismos, podemos concluir que la organización genética está muy conservada dentro del género *Pseudomonas*, pero varía enormemente en otros géneros de bacterias. Algunos de los genes, tales como *coxII* y *coxC*, así como el orden de estos, varía en función de la especie que se estudie. Los genes que siempre están presentes, y que se organizan en la mayor parte de los microorganismos de la misma forma, son los genes *coxB* y *coxA* (en este orden), que codifican las subunidades donde se encuentran los centros binucleares Cu_A y a₃-Cu_B, respectivamente.

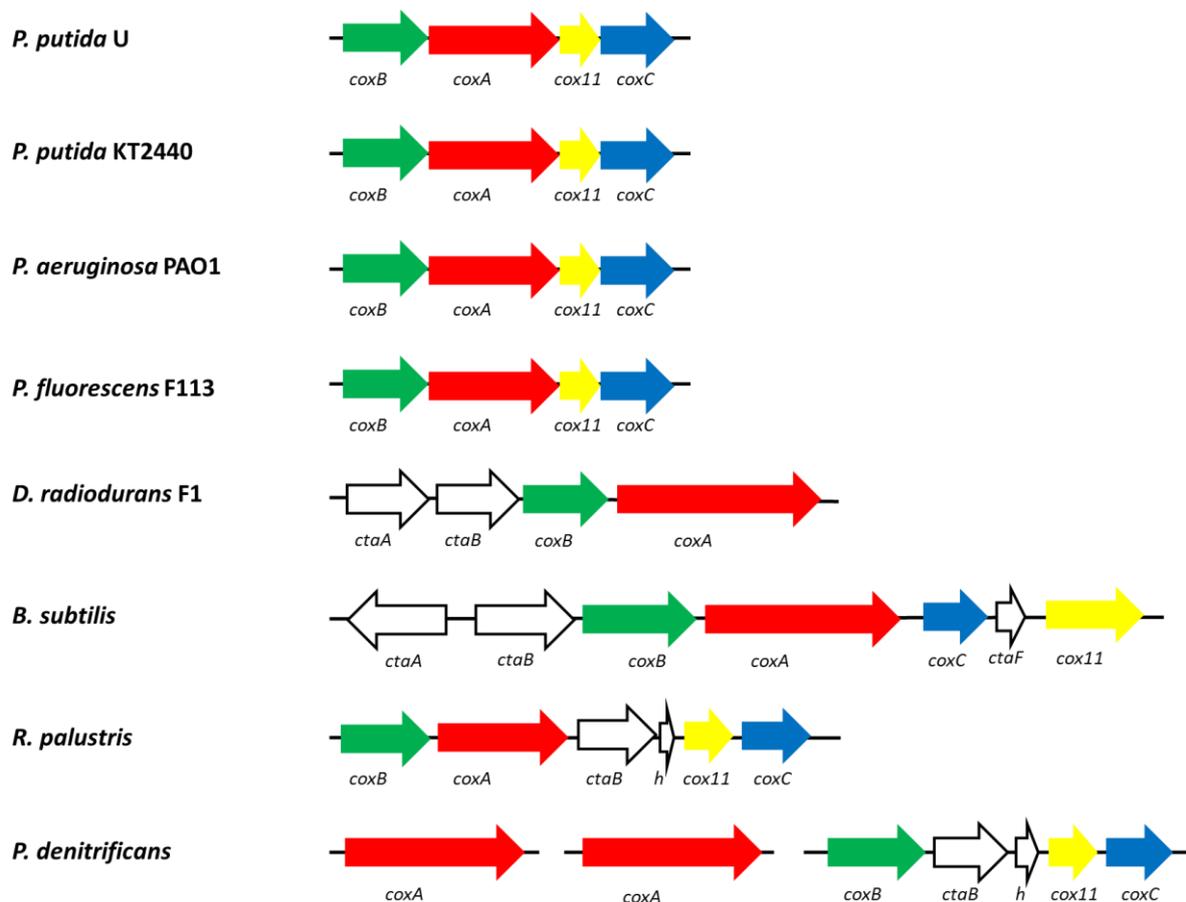


Figura 77. Comparación del *cluster cox* implicado en la generación de la energía requerida para la incorporación de histamina en *P. putida U* con otros probables *clusters cox* identificados por homología de secuencia en otros microorganismos. Los genes figuran en colores: verde (*coxB*), rojo (*coxA*), amarillo (*cox11*), azul (*coxC*) y blanco (otros genes). Las referencias de las secuencias son: *P. putida* KT2440 (NC_002947.4), *P. aeruginosa* (NC_002516.2), *P. fluorescens* F113 (NC_016830.1), *D. radiodurans* (NC_001263.1), *B. subtilis* (NC_000964.3), *R. palustris* (NC_014834.1) y *P. denitrificans* (NC_008686.1, NC_008687.1). *h*, gen que codifica una proteína con función desconocida.

Además, se comprobó por medio de HPLC que el imidazoletanol que se había sintetizado no se correspondía con el ImAA ni con el imidazolmetanol, ya que cada uno de estos posee un Rt (min) diferente (imidazolmetanol, 5,4; ImAA, 5,8 e imidazoletanol, 7,1) (**Figura 79**).

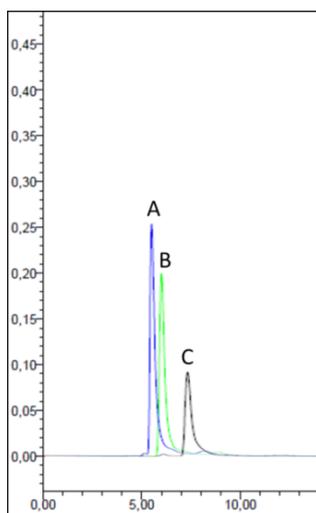


Figura 79. Comparación de los perfiles de elución mediante HPLC del (A) imidazolmetanol, (B) ImAA y (C) imidazoletanol. El eje Y representa la intensidad de absorbancia (unidades arbitrarias) y el eje X representa el Rt (min).

Ni en *P. putida* U ni en ninguno de los mutantes que se estudiaron se pudo detectar imidazoletanol. Además, *P. putida* U no era capaz de crecer en MM suplementado con imidazoletanol como única fuente de carbono, por lo que se descartó que el catabolismo de histamina en esta cepa tuviera este compuesto como intermediario a pesar de que sea así en otros microorganismos (micobacterias).

7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA DEGRADACIÓN DE HISTAMINA EN *P. putida* U EN OTROS MICROORGANISMOS.

E. coli es el microorganismo mejor estudiado tanto a nivel bioquímico como genético y ha sido ampliamente utilizado para la expresión de genes sencillos o *clusters*. La cepa *E. coli* W (Davis and Mingioli, 1950) es incapaz de crecer utilizando histamina como única fuente de carbono, lo que facilita su utilización como modelo de expresión heteróloga de genes encargados de codificar las proteínas necesarias para la degradación de histamina.

Por lo tanto, mediante expresión en *E. coli* W del *cluster hin1* de *P. putida* U y de uno de los genes pertenecientes a este *cluster*, *hinC*, se pretendió determinar si con este gen que codifica la enzima responsable de la desaminación de histamina (HinC) era suficiente o si se precisaba la expresión de todo el *cluster hin1*, para poder convertir esta amina biogénica en ImAA. Esa construcción podría ser utilizada para transformar otros microorganismos con mayor interés industrial y en los que la expresión de estos genes representase un importante avance biotecnológico.

El mismo abordaje, se llevó a cabo con una cepa filogenéticamente cercana a *P. putida* U, como es el caso de *P. putida* DOC21, una cepa silvestre aislada en nuestro laboratorio, y que es incapaz de degradar histamina y que puede asimilar diferentes esteroides (Merino *et al.*, 2013; Barrientos *et al.*, 2015).

A continuación se exponen las diferentes cepas recombinantes de *E. coli* W y de *P. putida* DOC21 obtenidas en esta Tesis Doctoral mediante transferencia de diferentes construcciones genéticas y los distintos efectos observados en cada uno de los casos.

- ***E. coli* W pMChinC.**

La primera construcción genética que se transfirió a *E. coli* W, es la que se comentó en el apartado 5.1.2.1 de Resultados y Discusión. Esa construcción denominada pMChinC contenía el gen que codifica la aminotransferasa dependiente de piruvato y que cataliza la desaminación de la histamina. Al ser transferida pMChinC a *E. coli* W, debería conferir a esta

cepa la capacidad para desaminar la histamina, y si actuaran alhído deshidrogenasas inespecíficas que reconociesen el ImAdh, debería ser capaz de transformar la histamina en ImAA. Comprobamos que el recombinante *E. coli* W pMChinC era capaz de convertir la histamina en ImAA (**Figura 80**).

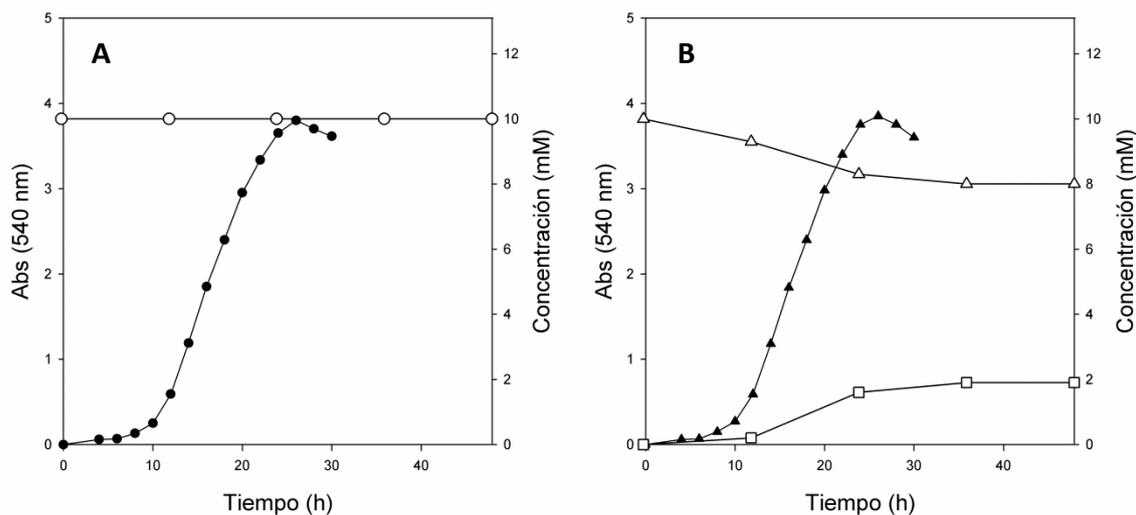


Figura 80. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de (A) la cepa *E. coli* W pMC (●) y (B) la cepa *E. coli* W pMChinC (▲) cuando se cultivaban en MM con 4-OHAFa 20 mM más histamina 10 mM. Estudio del consumo de histamina y aparición de ImAA mediante el análisis de los caldos de cultivo por HPLC: (A) concentración residual de histamina (○) en la cepa *E. coli* W pMC y (B) concentración residual de histamina (Δ) y de ImAA (□) en la cepa *E. coli* W pMChinC.

En resumen, se demostraba que en la célula había enzimas alhído deshidrogenasas que eran capaces de oxidar el ImAdh, sin presencia de la alhído deshidrogenasa codificada por el gen *hinD*. Estos resultados corroboran en cierta medida el retraso apreciado en la degradación de histamina cuando el mutante *P. putida* U $\Delta hinD::pK18mob$ se cultivaba en MMh.

Comprobamos además, que la cepa *E. coli* W transformada con el plásmido pMC, cuando se cultivaba en las mismas condiciones que la cepa *E. coli* W pMChinC era incapaz de

transaminar la histamina (**Figura 80**), demostrándose que el gen *hinC* era el responsable de la desaminación de histamina en la cepa recombinante *E. coli* W pMChinC.

Sin embargo, como puede apreciarse en la **Figura 80**, el proceso de obtención de ImAA no era muy eficiente, ya que la conversión solo se producía en las primeras 40 h (**Figura 80**), y luego no se incrementaba. De hecho solo se transformaba una parte de la histamina añadida, lo que sugiere que se precisan más genes, además del que codifica la primera enzima de la ruta catabólica.

- ***E. coli* W pK18::mobhin1.**

El segundo abordaje consistió en introducir el *cluster hin1*, que además del gen *hinC*, contiene los genes *hinA*, *hinB*, *hinD* y *hinE*, en la cepa *E. coli* W, para comprobar si la conversión de histamina en ImAA era más eficiente que con la cepa anterior, y por tanto, ser capaz de transformar toda la histamina en ImAA. La obtención de la construcción pK18::mobhin1 se explicó en el apartado 5.1.4.1 de Resultados y Discusión. Esta construcción debería conferir a la cepa *E. coli* W (el plásmido pK18::mob es replicativo en *E. coli*) mayor capacidad de degradar la histamina que en el caso anterior, ya que están presentes todos los genes que integran el *cluster hin1* (*hinEABCD*).

Se transfirió dicha construcción a la cepa *E. coli* W siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior. Cuando esta cepa recombinante *E. coli* W pK18::mobhin1 se cultivaba en MM líquido suplementado con 4-OHAFA 20 mM más histamina 10 mM, toda la histamina se transformó en ImAA en 42 h (**Figura 81**). Sin embargo, la cepa *E. coli* W pK18::mob cultivada en las mismas condiciones no modificó la histamina presente en el medio (**Figura 81**).

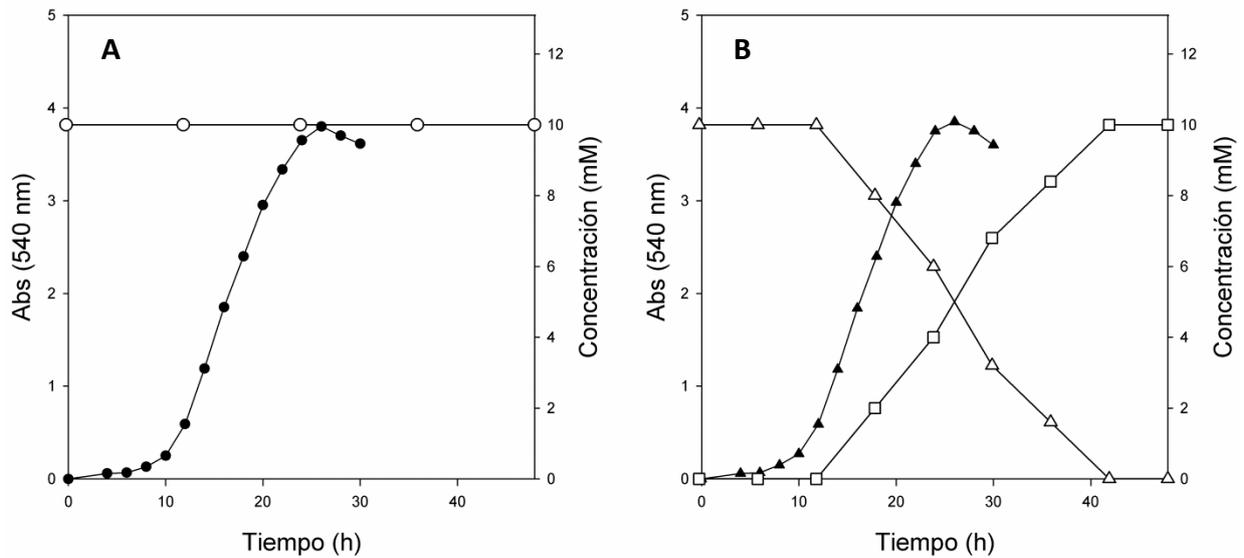


Figura 81. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de (A) la cepa *E. coli* W pK18::mob (●) y (B) la cepa *E. coli* W pK18::mobhin1 (▲) cuando se cultivaban en MM con 4-OHAFa 20 mM mas histamina 10 mM. Estudio del consumo de histamina y aparición de ImAA mediante el análisis de los caldos de cultivo por HPLC: (A) concentración residual de histamina (○) en la cepa *E. coli* W pK18::mob y (B) concentración residual de histamina (Δ) y de ImAA (□) en la cepa *E. coli* W pK18::mobhin1.

- *P. putida* DOC21 pMChinC.

El mismo desarrollo experimental que se realizó con la cepa *E. coli* W, se llevó a cabo con esta cepa filogenéticamente próxima a *P. putida* U, *P. putida* DOC21. La primera construcción génica que se introdujo en esta cepa fue pMChinC, debiéndole conferir cierta capacidad de degradación de histamina como ocurría en la cepa *E. coli* W.

Cuando se transfirió mediante mating triparental la construcción pMChinC a la cepa *P. putida* DOC21, y se cultivó en MM suplementado con 4-OHAFa (20 mM) + histamina (10 mM), la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pMChinC era capaz de convertir cierta parte de histamina en ImAA en la misma proporción que lo hacía la cepa *E. coli* W pMChinC (**Figura 82**). Como en los casos anteriores, para comprobar que esta acción se debía únicamente a la expresión del gen *hinC*, se procedió a transformar la cepa *P. putida* DOC21 con el plásmido pMC, y esta cepa transformada (*P. putida* DOC21 pMC) se cultivó en las mismas condiciones que *P. putida* DOC21 pMChinC. El resultado fue que la cepa transformada con el plásmido

pMC vacío era incapaz de desaminar la histamina, no habiendo por lo tanto, transformación de ésta en ImAA (**Figura 82**).

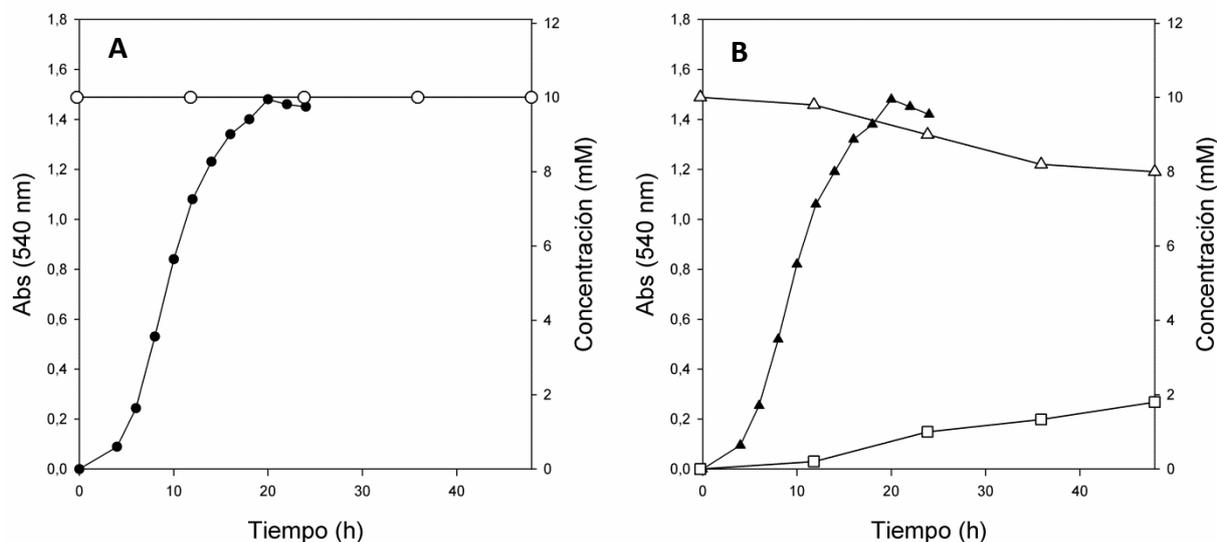


Figura 82. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de (A) la cepa *P. putida* DOC21 pMC (●) y (B) la cepa *P. putida* DOC21 pMChinC (▲) cuando se cultivaban en MM con 4-OHFAFA 20 mM mas histamina 10 mM. Estudio del consumo de histamina y aparición de ImAA mediante el análisis de los caldos de cultivo por HPLC: (A) concentracion residual de histamina (○) en la cepa *P. putida* DOC21 pMC y (B) concentración residual de histamina (Δ) y de ImAA (□) en la cepa *P. putida* DOC21 pMChinC.

- *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1*.

Para comprobar que es lo sucedía cuando se clonaba la construcción pK18::*mobhin1* en *P. putida* DOC21, se transformó esta bacteria mediante mating triparental, esperando que esta construcción confiriese a esta cepa, al igual que a *E. coli* W pK18::*mob::hin1*, la capacidad para convertir toda la histamina en ImAA, e incluso, de una forma más rápida de lo que lo hacía en aquella cepa.

Como se esperaba, la cepa recombinante *P. putida* DOC21 pK18::*mobhin1* era capaz de convertir toda la histamina en ImAA al cultivarse en MM al que se le añadía 20 mM de 4-OHFAFA y 10 mM de histamina (**Figura 83**). Además, esta transformación transcurría en menos tiempo, como era de esperar, ya que *P. putida* U y *P. putida* DOC21 son cepas de la misma especie (**Figura 83**).

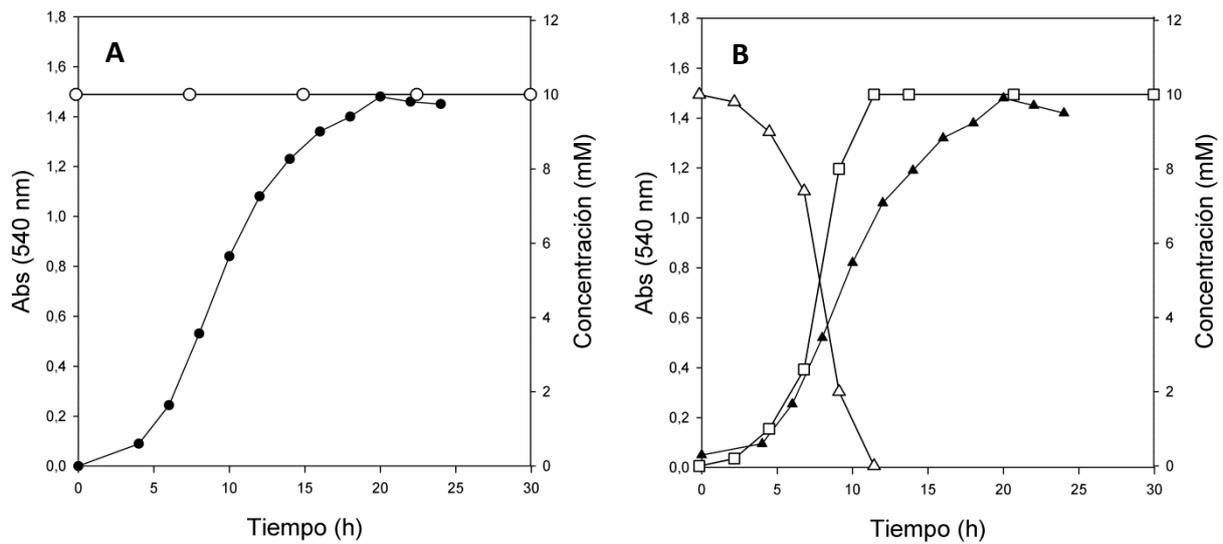


Figura 83. Curvas de crecimiento (medidas como Abs_{540nm}) de (A) la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mob (●) y (B) la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 (▲) cuando se cultivaban en MM con 4-OHFAFA 20 mM mas histamina 10 mM. Estudio del consumo de histamina y aparición de ImAA mediante el análisis de los caldos de cultivo por HPLC: (A) concentración residual de histamina (○) en la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mob y (B) concentración residual de histamina (Δ) y de ImAA (□) en la cepa *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1.

En resumen, *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 adquiría la capacidad para degradar la histamina gracias a la expresión heteróloga de los genes presentes en la construcción pK18::mob, ya que la cepa control de *P. putida* DOC21 transformada solo con el plásmido pK18::mob, no era capaz de degradar esta amina (**Figura 83**).

Los resultados obtenidos con *E. coli* W pK18::mobhin1 y *P. putida* DOC21 pK18::mobhin1 indican que esa construcción (pK18::mobhin1) puede ser utilizada como una herramienta biotecnológica muy útil para conferir a otros microbios la capacidad de degradar histamina.

8. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LOS MUTANTES DE HISTAMINA PARA CATABOLIZAR OTRAS AMINAS Y AMINOÁCIDOS.

Con el propósito de determinar la especificidad de sustrato de las enzimas codificadas en los *clusters hin1*, *dadRAX* y *coxBA-C*, se procedió al crecimiento de los diferentes mutantes en placas de MM suplementado con otras aminos o aminoácidos precursores de las mismas (Tablas 40 y 41).

Tabla 40. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes del *cluster hin1* cultivados en MM que contenía otras aminos y aminoácidos precursores de aminos.

	CONTROL	<i>Cluster hinEABCD (hin1)</i>			
	<i>P. putida</i> U	<i>PpUΔhinA::Tn5</i>	<i>PpUΔhinB::Tn5</i>	<i>PpUΔhinC::Tn5</i>	<i>PpUΔhinD::pK18::mob</i>
Histamina	+	-	-	-	-
Cadaverina	+	+	+	+	+
Tiramina	+	+	+	+	+
Dopamina	+	+	+	+	+
Espermidina	+	+	+	+	+
2-feniletilamina	+	+	+	+	+
Putrescina	+	+	+	+	+
Glutamina	+	+	+	+	+
Asparragina	+	+	+	+	+
GABA	+	+	+	+	+
Histidina	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+
Triptófano	+	+	+	+	+

La concentración final de las aminos y aminoácidos en las placas de MM es 5 mM.

Tabla 41. Crecimiento de *P. putida* U y de los mutantes del *cluster dad* y del *cluster cox* cultivados en MM que contenían otras aminas y aminoácidos precursores de aminas.

	CONTROL	<i>Cluster dadRAX</i>		<i>Cluster coxBA-C</i>
	<i>P. putida</i> U	<i>PpUΔdadA::Tn5</i>	<i>PpUΔdadR::Tn5</i>	<i>PpUΔcoxB::Tn5</i>
Histamina	+	-	-	-
Cadaverina	+	-	-	+
Tiramina	+	+	+	+
Dopamina	+	+	+	+
Espermidina	+	+	+	+
2-feniletilamina	+	+	+	+
Putrescina	+	+	+	+
Glutamina	+	+	+	+
Asparragina	+	+	+	+
GABA	+	+	+	+
Histidina	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+
Triptófano	+	+	+	+

La concentración final de las aminas y aminoácidos en las placas de MM es 5 mM.

- **Tiramina.**

Cuando se cultivaron los mutantes de histamina en placas sólidas de MM suplementado con tiramina 5 mM (**Tablas 40 y 41**), se observó que crecían como la cepa silvestre, por tanto cada una de las aminas biogénicas tiene su sistema de asimilación (Arcos *et al.*, 2010).

- **2-feniletilamina.**

Esta amina aromática tiene su propia ruta de degradación en *P. putida* U (Arias *et al.*, 2008). A pesar de ello, se procedió a la comprobación de si alguna de las enzimas que intervienen en la degradación de histamina también participaban en la asimilación de feniletilamina. Los mutantes de histamina se cultivaron en MM suplementado con 2-feniletilamina, y se observó que todos ellos utilizaban dicha amina como fuente de carbono al igual que la cepa silvestre (**Tablas 40 y 41**). Además, todos los mutantes incapaces de degradar 2-feniletilamina crecían bien en los medios con histamina, lo que sugiere que ambas rutas catabólicas no comparten ninguna etapa enzimática.

• **Putrescina.**

Como ya hemos descrito, algunos de los genes catábolicos de histamina (*hinA* y *hinD*) están anotados como ORFs involucrados en la degradación de putrescina. Sin embargo, los mutantes afectados en estos genes y en los demás que participan en la asimilación de histamina, crecen bien en MM suplementado con putrescina. Por esta razón, asumimos que los genes estudiados son específicos de histamina (**Tablas 40 y 41**), o que aunque pudiesen estar implicados en la degradación de putrescina, su función puede ser suplida por otras enzimas presentes en *P. putida* U.

La primera etapa de la degradación de putrescina en *P. aeruginosa* PAO1, ocurre de la misma forma que la asimilación de histamina, es decir, a través de la transaminación catalizada por una aminotransferasa dependiente de piruvato (Chou *et al.*, 2008). La aminotransferasa de *P. aeruginosa* PAO1 tiene homología con dos secuencias proteicas codificadas por genes que se encuentran alejados en el genoma de *P. putida* U. Las secuencias de estas dos proteínas, SpuCI y SpuCII, tienen una identidad del 86% entre sí, y sus porcentajes de identidad con respecto a la proteína SpuC de *P. aeruginosa* PAO1 son del 74% y 76%, respectivamente (**Figura 84**).

Se procedió a comparar las secuencias proteicas de las aminotransferasas de *P. putida* U involucradas en ambas rutas degradativas, de histamina (comprobado experimentalmente) y de putrescina (por homología de secuencias anotadas en la Base de Datos NCBI), y de la proteína SpuC de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 84**).

HinC	MNAPFAPQRQTRDYQAADAAHHIHAFLDQKALNAEGPRVIVGGERLHLWDSEGKRYLDGM	60
SpuCI.PpU	---MSEKSSQTLAWQSMSRDHHLAPFSDVKQLAEKGPRIITSAKGVYLDWSEGNKILDGM	57
SpuCII.PpU	---MSTNNPQTREWQNLSGEHHLAPFSDYKQLKEKGPRIITKAQGVHLDWSEGHKILDGM	57
SpuC.Pa	MN-SQITNAKTREWQALSIRDHLLPFFTDYKQLNEKGARIITKAEGVYIWDSEGNKILDAM	59
	. : * : * . ** : * * * * : * * : . : : : * * * * : : * * *	
HinC	SGLWCTQLGYGRRDLTVAATQMDQLAYYNNMFHTTHPAVIELSELLFSLPHGYSHAIY	120
SpuCI.PpU	AGLWCVAVGYGRDELAEVASQQMKQLPYYNLFFQTAHPPALELAKAIADVAPQGMNHVFF	117
SpuCII.PpU	AGLWCVAVGYGREELVQAAEKQRELPPYYNLFFQTAHPPALELAKAITDVAPEGMTHVFF	117
SpuC.Pa	AGLWCVNVGYGREELVQAATQRMRELPPYYNLFFQTAHPPVVELAKAIADVAPQGMNHVFF	119
	: * * * . : * * * : * . * * * : * : * * : * * : * * * : * * : : : : * . * : :	
HinC	TNSGSEANEVLIRTVRRYWQVVGQPNKKVMIGRWNGYHGSTLAATALGGMKFMHEMGG-	179
SpuCI.PpU	TGSGSEGNDTVLRMVRHYWALKGKKNKNVIIGRINGYHGSTVAGAALGGMSGMHQQGGV-	176
SpuCII.PpU	TGSGSEGNDTVLRMVRHYWALKGKPKHQTIIGRINGYHGSTFAGACLGGMSGMHEQGGLP	177
SpuC.Pa	TGSGSEANDTVLRMVRHYWATKQPQKVVIGRWNGYHGSTVAGVSLGGMKALHEQGGDFP	179
	* . * * * . * : : : * * * : * * : * : : : * * * * * * * * . * . . * * * . : * : * . .	
HinC	IPDVAHIDEPYWYAEGGELTPAEFGRRCALQLEEKILELGAENVAGFIAEPFQAGGMIF	239
SpuCI.PpU	IPDIVHIPQPYWFGEGGDMTEADFGVWAAEQLEKKILEVGVNDVAAFIAEPIQGAGGVII	236
SpuCII.PpU	IPGIVHIPQPYWFGEGGDMTPDAFGIWAAEQLEKKILEVGEDNVAAFIAEPIQGAGGVII	237
SpuC.Pa	IPGIVHIAQPYWYEGGDMSPDEFVWAAEQLEKKILEVGEENVAAFIAEPIQGAGGVIV	239
	** . : . * : * * * : * * * : : : * * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HinC	PPESYWPEIQRICRQYDVLLCADEVIGGFGRGTGEWFAHEYFGFEPDTLSIAKGLTSGYVP	299
SpuCI.PpU	PPQTYWPKVKEILARYDILFVADEVICGFGRTGEWFGTDYYDLKPDLMTIAGLTSYIP	296
SpuCII.PpU	PPETYWPKVKEILAKYDILFVADEVICGFGRTGEWFGSDYYDLKPDLMTIAGLTSYIP	297
SpuC.Pa	PPDTYWPKIREILAKYDILFIADDEVICGFGRTGEWFGSQYYGNAPDLMPIAKGLTSYIP	299
	:::::.* :**:* :***** *****. :*:. ** :*****:*	
HinC	MGGLVLSKRIAERALVERGGVFAHGLTYSGHPVAAAIAIANLKALRDEGIVTQVKDDTGPY	359
SpuCI.PpU	MGGVIVRDEVAKV-ISEGGDFNHGFTYSGHPVAAAVGLENLRILRDEQIIQQVHDKTAPY	355
SpuCII.PpU	MGGVIVRDKVAKV-ISEGGDFNHGFTYSGHPVAAAVGLENLRILRDEQIVEKARTEAAPY	356
SpuC.Pa	MGGVVVRDEIVEV-LNQGGEFYHGFTYSGHPVAAAVALENIRILREEKIIIEKVKAETAPY	358
	::: :. . ** * **::**. : * : ** * * : . : . . **	
HinC	LQRILREVAFADHPLIGVQVQAGLVAALQFAEHKPTRKRKFANENDLAWQCRTFGFEEGVII	419
SpuCI.PpU	LQQRLRE-LADHPLVGEVRGLGMLGAIELVKDKATRARYEGK-GVGMICRQHCFDNGLIM	413
SpuCII.PpU	LQKRLRE-LQDHPLVGEVRGLGMLGAIELVKDKATRSRYEGK-GVGMICRTFCFENGLIM	414
SpuC.Pa	LQKRWQE-LADHPLVGEARGVMVAALELVKNKKTRETFDK-GVGMLCREHCFRNLIM	416
	** : * : *****:*. * *::*::*::* * * * : . : . . ** . * :**:	
HinC	RSTLGRMIMAPALIANHSELDELVEKTRIAVDRTARLVGKL	460
SpuCI.PpU	RAVGDTMI IAPPLVISIEEIDELVEKARKCLDLTYEAVR--	452
SpuCII.PpU	RAVGDTMI IAPPLVISHAEIDELVEKARKCLDLTLEAIR--	453
SpuC.Pa	RAVGDTMI ISPLVIDPSQIDELITLARKCLDQTAAAVLA-	456
	*: . . **::* * : . :****: * * .:* * :	

Figura 84. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína HinC de *P. putida* U y de las proteínas SpuC de *P. aeruginosa* PAO1 (Pa) y de *P. putida* U (SpuCI y SpuCII).

Aunque comparando las secuencias (**Figura 84**), haya un 53% de identidad entre la aminotransferasa que interviene en la ruta degradativa de histamina y la que participa en el catabolismo de putrescina, experimentalmente se ha comprobado que son distintas, ya que como se ha descrito en la **Tabla 40**, el mutante afectado en el gen que codifica la aminotransferasa dependiente de piruvato (*P. putida* U Δ hinC::Tn5) es capaz de asimilar la putrescina.

Las proteínas SpuC de *P. putida* U tienen un 51% de identidad con respecto a HinC.

- **Cadaverina.**

Se ha comprobado experimentalmente que la aminotransferasa SpuC (citada en el apartado anterior), también participa en el catabolismo de cadaverina en *P. aeruginosa* PAO1, una vez ha sufrido un proceso de glutamilación (Chou *et al.*, 2013).

Así, cuando cultivamos los mutantes afectados en el *cluster dadRAX* (*P. putida* U Δ dadA::Tn5 y *P. putida* U Δ dadR::Tn5) en MM que contenía cadaverina, comprobamos que a diferencia del control (*P. putida* U), estas cepas no crecían, lo que sugiere que los genes *dad*

además de participar en la ruta de degradación de histamina, lo hacen también en la asimilación de cadaverina (**Tabla 40, Figura 85**).

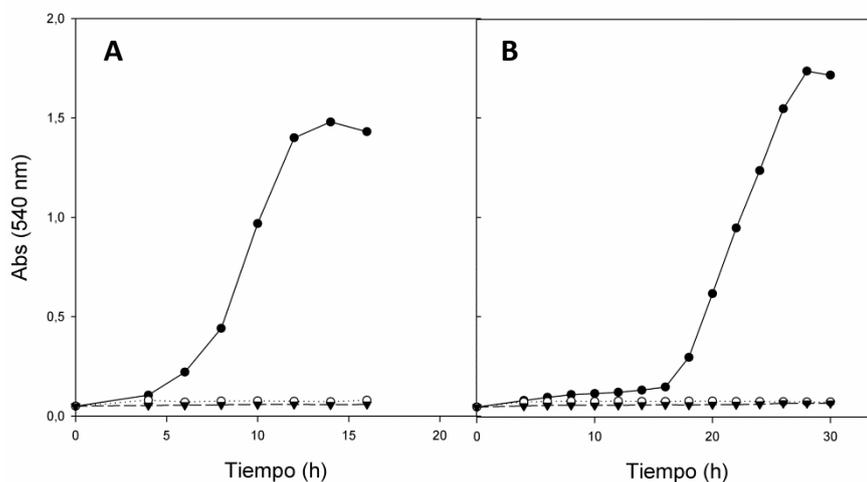


Figura 85. Curvas de crecimiento (medidas como Ab_{540nm}) de la cepa *P. putida* U control (●), del mutante *P. putida* U $\Delta dadA::Tn5$ (○) y del mutante *P. putida* U $\Delta dadR::Tn5$ (▼) cuando se cultivaban en MM suplementado con: (A) histamina 10 mM y (B) cadaverina 10 mM.

Es decir, la aminotransferasa que participa en la degradación de cadaverina es dependiente de piruvato, y probablemente, en *P. putida* U es una de las proteínas SpuC (SpuCI o SpuCII). La otra será la encargada de transaminar la putrescina sin requerir piruvato.

Además, los mutantes *P. putida* U $\Delta dadA::Tn5$ y *P. putida* U $\Delta dadR::Tn5$ son capaces de transformar la histamina en alanina, siendo la cepa afectada en la actividad D-aminoácido deshidrogenasa la que acumula mas alanina. Por esta razón, era de esperar que cuando el mutante *P. putida* U $\Delta dadA::Tn5$ se cultivase en MM suplementado con 4-OHFAFA 10 mM (como fuente de piruvato) mas cadaverina 10 mM (como fuente de intermediarios metabólicos), ocurriese lo mismo que cuando se suplementaba histamina en lugar de cadaverina. Efectivamente, comprobamos que el mutante *P. putida* U $\Delta dadA::Tn5$ acumulaba alanina, pero la cantidad del aminoácido generado fue mucho menor que cuando se utilizaba histamina. Este hecho es debido a que el catabolismo de cadaverina es mucho más lento que el de histamina (**Figura 86**).

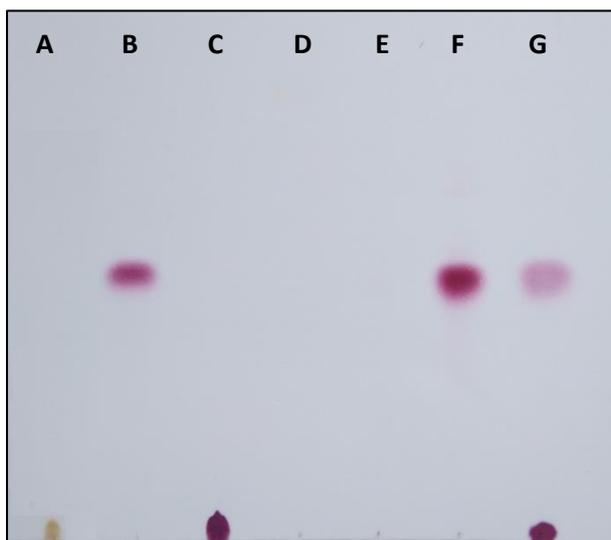


Figura 86. Análisis mediante TLC del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 cultivado en MM 4-OHAFa 10 mM suplementado con histamina 10 mM o cadaverina 10 mM. (A) histamina, (B) alanina, (C) cadaverina y (D) 4-OHAFa. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 10 mM. Las muestras (recogidas a las 48 h) se han obtenido de los caldos de cultivo a los que se les había suplementado (E) 4-OHAFa 10 mM, (F) 4-OHAFa 10 mM + 10 mM histamina y (G) 4-OHAFa 10 mM + cadaverina 10 mM.

Aunque el mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 se incubase más tiempo en MM suplementado con 4-OHAFa 10 mM mas cadaverina 10 mM, no se terminaba de transformar esta amina, como se muestra en la **Figura 87**, incluso, después de haber transcurrido 6 días. Esto demuestra, que la conversión de cadaverina en alanina es menos eficiente que la transformación de histamina en alanina.



Figura 87. Análisis mediante TLC del caldo del mutante *P. putida* U Δ *dadA*::Tn5 cultivado en MM 4-OHAFa 10 mM suplementado con histamina 10 mM o cadaverina 10 mM. (A) histamina, (B) cadaverina y (C) Alanina. Todos los patrones se prepararon a una concentración de 10 mM. Las muestras (recogidas a los 6 días) se han obtenido de los caldos de cultivo a los que se había suplementado (D) 4-OHAFa 10 mM + histamina 10 mM y (E) 4-OHAFa 10 mM + cadaverina 10 mM.

- **Triptófano.**

Hay trabajos científicos que proponen la participación del complejo *dadRAX* en la vía catabólica de triptófano en *P. aeruginosa* PAO1, sugiriendo su acoplamiento con la enzima kinureninasa (Kurnasov *et al.*, 2003; He *et al.*, 2011), la cual no existe en *P. putida* U. Sin embargo, como se puede ver en las **tablas 40** y **41**, la degradación de triptófano no se encuentra afectada en ninguno de los mutantes analizados.

- **Histidina.**

Como ya se comentó al principio de los Resultados y Discusión, una primera hipótesis a la hora de abordar el estudio de la degradación de histamina, asumía la existencia de enzimas que interviniesen tanto en la asimilación de histamina como en la ruta catabólica de histidina. El hecho de que ambos compuestos fuesen estructuralmente muy semejantes, (diferenciándose exclusivamente en un grupo carboxilo) (ver IR, **Figura 88**), hacía pensar que este planteamiento no fuese descabellado.

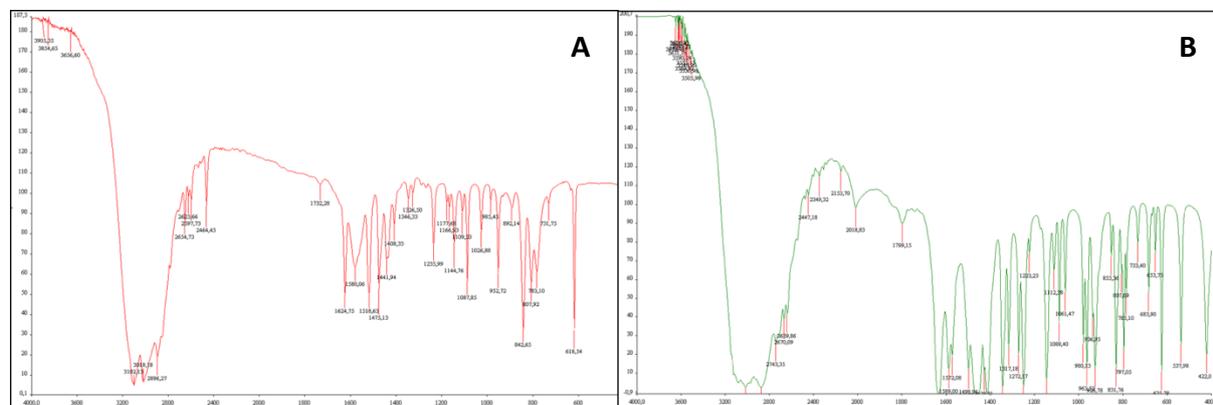


Figura 88. Espectros IR de (A) histamina y (B) histidina.

Sin embargo, comprobamos que todos los mutantes incapaces de crecer en histamina, eran capaces de asimilar la histidina como el control (**Tablas 40** y **41**), lo que nos ha permitido concluir que ambos procesos transcurren por vías diferentes. Además esta conclusión se confirma con lo expuesto anteriormente (apartado 2 de Resultados y Discusión), ya que los mutantes de histidina (*P. putida* U Δ *his*::Tn5) pueden degradar eficazmente la histamina.

9. INGENIERÍA METABÓLICA: DEGRADACIÓN DE HISTIDINA VÍA HISTAMINA.

Existen diferentes procesos que dan lugar a la evolución de rutas catabólicas en microorganismos. Éstos pueden estar mediados por presión selectiva o por la transferencia de genes, y ambas se pueden observar en la naturaleza y en el laboratorio. Dentro de estos últimos, uno de los más desarrollados es la evolución *in vitro* de rutas catabólicas en microorganismos. Este tipo de evolución dirigida se basa en la introducción de genes en un organismo hospedador con el fin de crear una nueva ruta metabólica que dote a este microorganismo hospedador de capacidades degradativas que antes no tenía.

Como se explicó anteriormente (ver apartado 4.4 de la Introducción), hay microorganismos que tienen la histidin descarboxilasa, pero no es el caso de la cepa *P. putida* U, ya que en la búsqueda de mutantes de histamina, se han encontrado 41 mutantes incapaces de degradar la histidina pero si la histamina (*P. putida* U $\Delta his::Tn5$). Estos resultados nos permiten concluir que en *P. putida* U no existe la enzima histidin descarboxilasa capaz de catalizar la formación de histamina, a pesar de que nuestra cepa posee el gen que codifica la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) y que potencialmente podría utilizar la histidina como substrato (Bowsher and Henry, 1986). La información obtenida de la base de datos KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) indica que *P. putida* KT2440 posee el gen que codifica esta enzima (en *P. putida* U se encuentra un gen homólogo). Recientemente, se ha comprobado que esa enzima en *P. putida* KT2440 tiene una alta especificidad por L-DOPA (Koyanagi *et al.*, 2012), pero en ningún caso por la histidina, lo que justifica el hecho de que los mutantes de histidina degradasen histamina y viceversa.

Con el fin de derivar la ruta de degradación de histidina hacia la de histamina, se identificó el gen que codifica la histidin descarboxilasa en diferentes bases de datos. La proteína Hdc cataliza la reacción indicada en la **Figura 89** (Recsei and Snell, 1972).

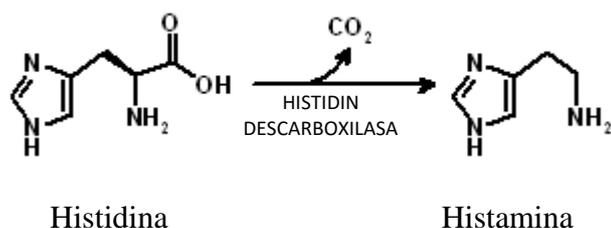


Figura 89. Reacción de descarboxilación de histidina catalizada por la histidin descarboxilasa generándose histamina.

Entre todos ellos, seleccionamos el gen *hdc* de *Enterobacter aerogenes* (CECT 684). Este gen se amplificó mediante PCR utilizando DNA de *E. aerogenes* como DNA molde (**Figura 90**) y los oligonucleótidos modificados con dianas para los cortes de restricción *XhoI* y *XbaI* como se muestran en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en *trans* del gen *hdc* de *Enterobacter aerogenes*.

Nombre del Primer	Secuencia	Modificaciones
Hdc.Ea.F	GAGCTCGAGCGATTCCATTTTCTGGGGCACA	<i>XhoI</i>
Hdc.Ea.R	GGATCTAGATTGTCCAGCGCGAGCAGTTGA	<i>XbaI</i>

```

1 CGATTCCATTTTCTGGGGCACAATTATGATGATGGTAACCATTCCTCTGTTTTCTTTTGTGCGGGCCGGACGTAA
  GCTAAGGTAAAAGACCCCGTGTAAATACTACTACCATTGGTAAGGAGACAAAAGAAAACAGCGCCGGCCTGCATT

+1 M
76 TAAAAAAGCCAGGATATTCTTTACCTTCAAAAATAATATTTTATTCACCAACATAAATATGGAGATTCATATGT
  ATTTTTCCGGTCTATAAGAAATGGAAGTTTTTATATAAAAATAAGTGGTGTATTTATACCTTAAGTATACA

+1 S L S I A D Q N K L D A F W S Y C V K N R Y F N I
151 CTTTATCTATTGCGGATCAAATAAACTCGATGCATTTTGGTCATACTGTGTAATAAATCGCTACTTTAATATTG
  GAAATAGATAACGGCTAGTTTTATTTGAGCTACGTAAAACAGTATGACACATTTTTTAGCGATGAAATTATAAC

+1 G Y P E S A D F D Y T M L E R F L R F S I N N C G
226 GCTACCCTGAATCTGCTGATTTTGATTACACCATGCTGGAGCGTTTTCTGCGTTTCTCAATTAATAACTGTGGTG
  CGATGGGACTTAGACGACTAAAACATAATGTGGTACGACCTCGCAAAGAGCAGCAAAGAGTTAATTATTGACACCAC

+1 D W G E Y C N Y L L N S F D F E K E V M E Y F S G
301 ACTGGGGGAGTACTGTAACTATTTACTCAACTCTTTCGACTTTGAAAAAGAAGTCATGGAGTATTTCTCCGGCA
  TGACCCCCCTCATGACATTGATAAATGAGTTGAGAAAGCTGAAACTTTTTCTTTCAGTACCTCATAAAGAGGCCGT

+1 I F K I P F A E S W G Y V T N G G T E S N M F G C
376 TATTCAAATCCCTTTTGGGAAAGCTGGGGCTATGTCACCAACGGTGGCACAGAAAGTAATATGTTTGGTTGCT
  ATAAGTTTTAGGGGAAACGCCTTTCGACCCCGATACAGTGGTTGCCACCGTGTCTTTCATTATACAACCAACGCA
    
```

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

```
+1 Y L G R E L F P E G T L Y Y S K D T H Y S V A K I
451 ATCTGGGAAGAGAACTGTTCCCGGAAGGCACGCTCTACTATTCAAAGATACTCACTATTCCGTCGCCAAAATCG
TAGACCCCTTCTCTTGACAAGGGCCTTCCGTGCGGATGATAAGTTTTCTATGAGTGATAAGGCAGCGGTTTAGC

+1 V K L L R I K S Q L V E S Q P D G E M D Y D D L I
526 TCAAACCTGCTGCGTATCAAATCGCAACTGGTGGAAATCTCAGCCAGACGGAGAAATGGATTATGACGATTTGATCA
AGTTTGACGACGCATAGTTTAGCCTTGACCACCTTAGAGTCGGTCTGCCTCTTTACCTAATACTGCTAAACTAGT

+1 N K I R T S G E R H P I I F A N I G T T V R G A V
601 ATAAAATCAGGACCTCAGGCGAACGCCATCCCATCATTTTCGCCAATATTGGCACAACGGTACGCGGGCGCTGTTG
TATTTTAGTCTCGAGTCCGCTTTCGGTAGGGTAGTAAAAGCGGTTATAACCGTGTGCCATGCGCCGCGACAAC

+1 D N I A E I Q K R I A A L G I P R E D Y Y L H A D
676 ATAATATCGCTGAGATACAGAAACGTATCGCTGCGCTGGGGATCCCACGTGAAGATTATTATCTACACGCGGGATG
TATTATAGCGACTCTATGTCTTTGCATAGCGACGCGACCCCTAGGGTGCCTTCTAATAATAGATGTGCGCCTAC

+1 A A L S G M I L P F V E D P Q P F T F A D G I D S
751 CCGCGCTAAGCGGCATGATCTTGCCCTTTCGTGGAGGATCCACAACCGTTTACCTTCGCGGATGGTATCGATTCCA
GGCGGATTCGCCCTACTAGAACGAAAGCACCTCTAGGTGTTGGCAAATGGAAGCGCCTACCATAGCTAAGCT

+1 I G V S G H K M I G S P I P C G I V V A K K A N V
826 TTGGCGTTTCCGGACACAAAATGATCGGCTCCCCGATTCCATGCGGCATTTGGTAGCCAAAGAAAGCCAACGTCG
AACCGCAAAGGCCTGTGTTTACTAGCCGAGGGGTAAGGTACGCCGTAACACCATCGGTTCTTTTCGGTTGCGAGC

+1 D R I S V E I D Y I S A H D K T I S G S R N G H T
901 ACCGTATCAGCGTAGAGATCGACTACATCTCCGCCACGATAAAAACGATTTTCAGGGTCACGCAACGGTCATACCC
TGGCATAGTCGCATCTCTAGCTGATGTAGAGGCGGGTGTATTTTGTCTAAAGTCCCAGTGCGTTGCCAGTATGGG

+1 P L M M W A A V R S H T D A E W H R R I G H S L N
976 CTTTGATGATGTGGGCCGCGGTTTCGCAGCCATACCGATGCCGAATGGCATCGCCGCGATTGGTCCACAGCCTCAACA
GAAACTACTACACCCGGCGCAAGCGTCGGTATGGCTACGGCTTACCCTAGCGCGTAACCAAGTGTGCGAGTTGT

+1 M A K Y A V D R F K A A G I D A L C H K N S I T V
1051 TGGCGAAAATACGCCGTGGATCGCTTTAAAGCAGCAGGATTTGACGCGCTGTGCCAAAAAACTCCATCACGGTGG
ACCGCTTTATGCGGCACCTAGCGAAATTTTCGTGCTCCATAACTGCGCGACACGGTGTTTTGTAGGTAGTGCCACC

+1 V F P K P S E W V W K K H C L A T S G N V A H L I
1126 TCTTCCGAAGCCTTCTGAATGGGTATGGAAGAAACACTGCCTGGCAACGTCCGGCAACGTAGCCCATCTGATCA
AGAAAGCCTTCGGAAGACTTACCCATACCTTCTTTGTGACGGACCGTTGCAGGCCGTTGCATCGGGTAGACTAGT

+1 T T A H H L D S S R I D A L I D D V I A D L A Q R
1201 CCACCGCTCACCACCTGGACAGTTCCCGGATTGATGCGCTGATCGATGACGTGATTGCCGACCTGGCGCAACGGG
GGTGGCGAGTGGTGGACCTGTCAAGGGCCTAACTACGCGACTAGCTACTGCTAACCGCTGGACCGCGTTGCC

+1 A A ■
1276 CGGCATAAGAGTGAGCAGCGGCAAACTGCTCGCGCTGGACAATCTGTGGGTT
GCCCTATTCTCACTCGTCGCCGTTTGACGAGCGCGACCTGTTAGACACCCAA
```

Figura 90. Secuencia de nucleótidos de la región del genoma de *E. aerogenes* donde se localiza el gen *hdc*. También se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína Hdc responsable de descarboxilar la histidina.

Una vez amplificado el gen *hdc*, se clonó en el plásmido pTZ, y de ahí se transfirió al pMC utilizando los cortes enzimáticos *XhoI/XbaI*, de forma que el gen *hdc* quedase correctamente orientado para ser expresado desde el promotor del plásmido. La construcción pMChdc se transfirió a algunos de los mutantes de *P. putida* U incapaces de utilizar la histidina como fuente de carbono.

Si nuestro planteamiento experimental era correcto, cuando se expresase la construcción pMChdc en estos mutantes, deberían recuperar la capacidad para crecer en MM suplementado con histidina como única fuente de carbono. En ellos no funcionaría la ruta clásica de degradación de histidina sino a través de otra nueva vía que implicaría la

descarboxilación de este aminoácido y su posterior degradación a través de la ruta catabólica de histamina.

Cuando se cultivó una de las cepas recombinantes (denominadas genéricamente *P. putida* U $\Delta his::Tn5$ pMChdc) en MM suplementado con histidina (5 mM en placa y 10 mM en líquido) se obtuvo el resultado que se puede apreciar en la **Figura 91**. La cepa recombinante *P. putida* U $\Delta his::Tn5$ pMChdc a la que se le había introducido el gen *hdc*, era capaz de crecer en MM suplementando en histidina (tanto en sólido como en líquido), mientras que sus respectivos controles transformados sólo con el plásmido pMC sin inserto, continuaban sin poder hacerlo.

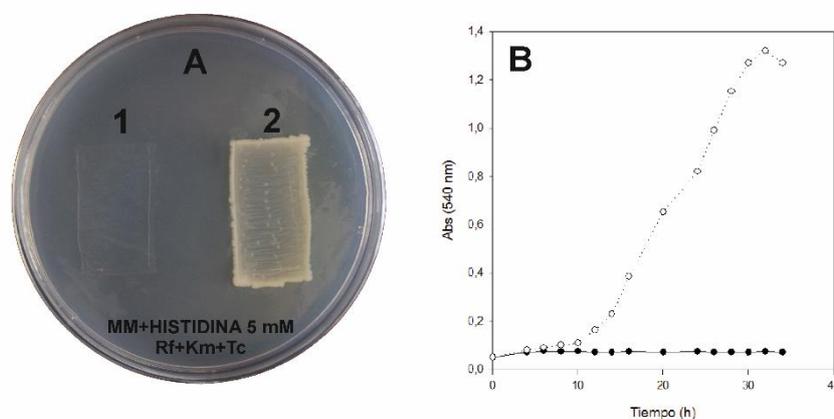


Figura 91. Crecimiento de *P. putida* U $\Delta his::Tn5$ pMC (1, ●) y de un mutante *P. putida* U $\Delta his::Tn5$ pMChdc (2,○) cuando se cultivaban en: A) placa de MM suplementado con histidina 5 mM y B) MM líquido suplementado con histidina 10 mM (medidas como Abs_{540nm}).

Estos resultados son muy interesantes ya que demuestran que aunque una cepa sea capaz de producir histamina por descarboxilación de histidina, ésta no se acumula en el medio (o en los alimentos si se tratase de procesos fermentativos) siempre que exista una vía catabólica que permita la eliminación de histamina. Una vez más, ponemos de manifiesto que los genes implicados en la degradación de histamina pueden ser utilizados como una potente herramienta biotecnológica que podría ser muy útil para eliminar esta amina biogénica de diferentes medios e incluso desde alimentos o desde precursores de los mismos.

10. RUTA PROPUESTA DE LA ELIMINACIÓN MICROBIANA DE HISTAMINA EN *P. putida* U.

Todos los abordajes experimentales descritos nos han permitido concluir que la ruta catabólica de histamina en *P. putida* U es la que se indica en la **figura 92**.

Las enzimas codificadas en los genes pertenecientes al *cluster hin1* (*hinA*, *hinB*, *hinC*, *hinD*) son responsables de la transformación de histamina en ImAA (**Figura 92**). La proteína HinA es un transportador perteneciente a la familia de transportadores denominada APC que esta implicada en la toma de histamina desde el medio de cultivo al interior de la bacteria. HinC es una histamina desaminasa o histamina-piruvato aminotransferasa que utiliza como substratos la histamina y el ácido pirúvico, generando ImAdh y L-alanina. HinD es una aldehído deshidrogenasa que cataliza la oxidación del ImAdh a ImAA y que utiliza como coenzima el NAD⁺. Finalmente, HinB, la otra proteína perteneciente a este *cluster*, es un regulador perteneciente a la familia LuxR, que actúa modulando la transcripción de los otros genes.

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 que la etapa final la cataliza un complejo citocromo c oxidasa de tipo aa₃ (CoxBA-C) (**Figura 92**), y que es el responsable de la génesis de la energía requerida para transportar la histamina.

La proteína DadX, una racemasa, cataliza la transformación de la L-alanina generada por la histamina-piruvato aminotransferasa (HinC) en el isómero D-alanina (**Figura 92**). Posteriormente, este aminoácido es desaminado por acción de una D-aminoácido deshidrogenasa (DadA) dependiente de FAD, generando el piruvato requerido para desaminar una nueva molécula de histamina. Durante este proceso de desaminación oxidativa, el FAD ligado a DadA se reduce a FADH₂ y, éste, se acopla a la cadena de transporte electrónico antes citada y en la que participa un complejo citocromo c oxidasa de tipo aa₃ (CoxBA-C) integrada por tres subunidades CoxA, CoxB y CoxC y por una proteína de ensamblaje (Cox-/Cox11) (**Figura 92**). De esta manera, a través de esta cadena se genera la energía necesaria para transportar la histamina cuando esta amina se está utilizando como única fuente de carbono.

Tanto la ruta catabólica en sí, como las enzimas que llevan a cabo las reacciones que forman parte de la misma y, en particular, las catalizadas por las proteínas HinA, HinB, HinC y HinD, son nuevas y 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 *in vivo* en *Pseudomonas putida* U y en otras bacterias se desconocía hasta la fecha. Además, en otros casos en los que algunas de las enzimas habían sido descritas, su participación no había sido relacionada con esta ruta (casos de DadRAX, CoxBA-C).

El descubrimiento de esta ruta demuestra, además, que la degradación de histamina en *P. putida* U no se realiza mediante las enzimas descritas en otros seres vivos.

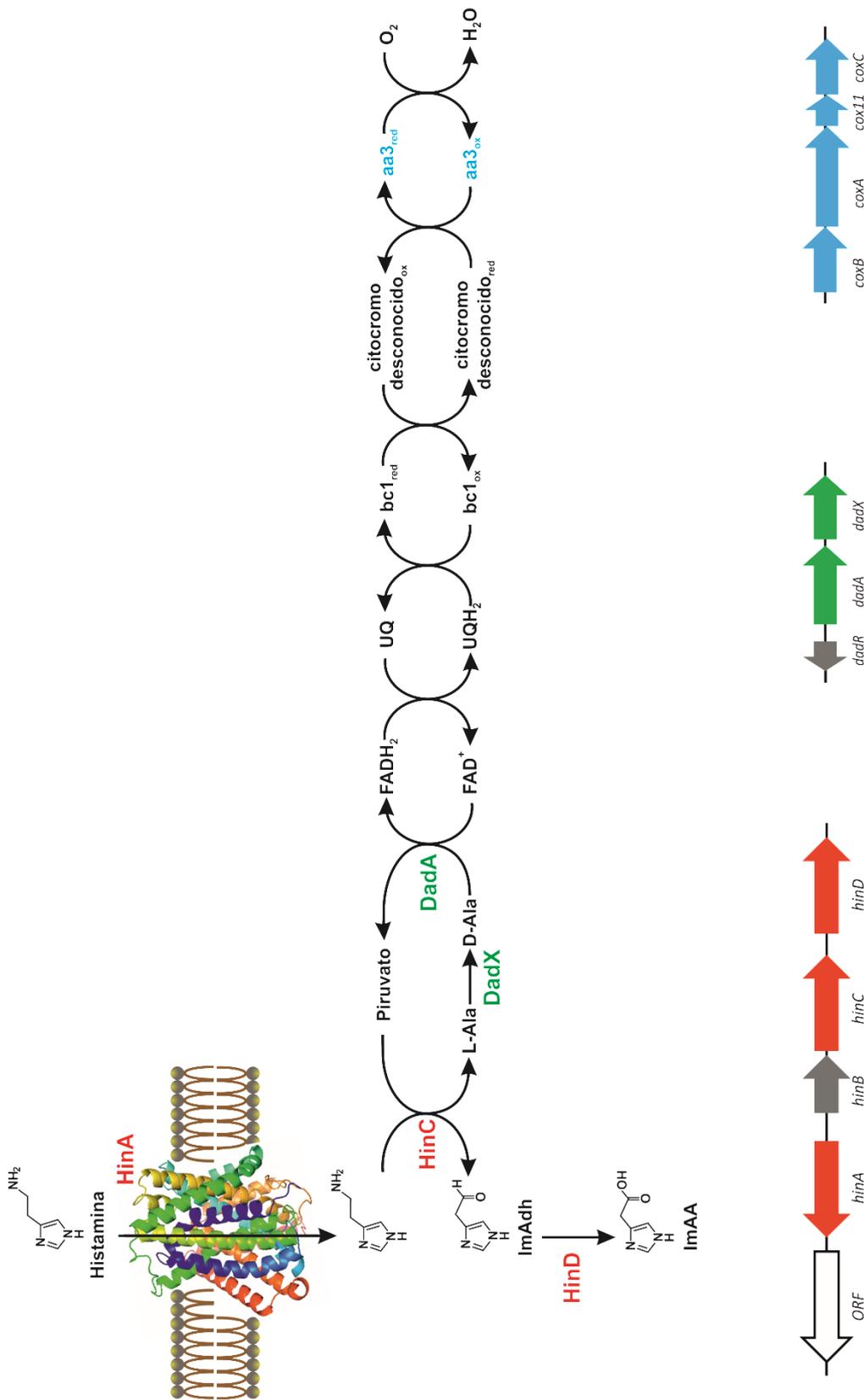


Figura 92. Representación esquemática de los pasos metabólicos responsables de la conversión de histamina en ImAA en *P. putida* U y de las enzimas que catalizan cada uno de ellos. Los distintos metabolitos son: histamina, ImAdh (imidazolacetaldéhid), ImAA (ácido imidazolacético), L-alanina (L-ala) y D-alanina (D-ala). Las enzimas están explicadas en el texto. En este esquema también se muestra la organización de los genes implicados en esta ruta catabólica en *P. putida* U. UQ, ubiquinona; UQH₂, ubiquinol; bc1, complejo citocromo bc1; aa₃, citocromo c oxidasa de tipo aa₃.

11. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

En el apartado de Introducción de esta Tesis Doctoral ya se habló de la presencia de aminas biogénicas en los alimentos, carnes, pescados, vegetales y diferentes bebidas, y los efectos nocivos de éstas para la salud humana. Una de las aminas biogénicas más importantes, tanto por su acumulación en los alimentos como por la variedad de efectos nocivos que provoca en el organismo, es la histamina (Stratton *et al.*, 1991).

En algunos alimentos, tales como la carne y el pescado, la histamina se acumula a lo largo del tiempo de almacenaje debido a la acción de bacterias indeseables capaces de descarboxilar la histidina libre a histamina. Esta acumulación es tan eficiente que no puede evitarse ni con el envasado al vacío de los alimentos (Wei *et al.*, 1990).

Pero es en alimentos tan populares como quesos, vinos o embutidos, donde la acumulación de histamina adquiere una mayor repercusión. Esto se debe a que en la elaboración de estos alimentos se requieren procesos de fermentación en los que participan microorganismos, que modifican las propiedades de la materia prima original. Por lo tanto, su eliminación de los mismos resolvería el problema del acúmulo de aminas biogénicas pero desvirtuaría la calidad, las propiedades organolépticas y las características de dichos productos alimentarios. Muchas de las bacterias utilizadas con estos fines en la industria alimentaria son histidín descarboxilasa positivas y, por lo tanto, van a dar lugar a la acumulación de histamina en los productos finales (Askar and Treptow, 1986).

El consumo de alimentos con un elevado contenido en histamina puede provocar un gran número de efectos farmacológicos. Los más comunes son dolores de cabeza, sudoración, secreción nasal, erupciones, edemas, dificultad al tragar, dificultad respiratoria, broncoespasmo, taquicardias y desórdenes de tensión arterial (Ladero *et al.*, 2010).

Por lo tanto, no existe duda respecto al aspecto negativo que supone para la salud el consumo de alimentos con un elevado contenido en histamina. Por ello, la obtención de una construcción genética que permitiese a los organismos portadores de la misma degradar este compuesto, podría ser utilizada para transformar aquellos microbios que participan en la fermentación de modo que se evitaría la acumulación de esta amina biogénica en los alimentos.

Estas cepas recombinantes con capacidad para degradar la histamina se podrían utilizar incluso como *starters* (cultivos iniciadores), dotándolos de una mayor eficiencia, ya que estos *starters*, aunque suelen estar constituidos por cepas no productoras de aminas biogénicas, no pueden evitar la acumulación de las aminas producidas por la flora microbiana presente en las materias primas originales. En cambio, si contaran con la presencia de bacterias capaces de degradar la histamina, evitarían la acumulación de este compuesto en los alimentos con independencia de las materias primas utilizadas en la elaboración de los mismos.

Además, analizado desde un punto de vista estrictamente económico, la posibilidad de dotar a cepas bacterianas con interés para la industria alimentaria de la capacidad requerida para degradar la histamina puede ser esencial para la elaboración de nuevos productos y la apertura de nuevos mercados ya que muchos países (Canadá, Holanda o Suiza entre otros) están estableciendo límites para la concentración de aminas biogénicas en los alimentos y en las bebidas importadas, especialmente en el vino. La presencia de aminas en el vino entraña más riesgo que en otro tipo de alimentos y bebidas, ya que al contener alcohol, se van a ver afectados los mecanismos de detoxificación del organismo, incrementándose las posibilidades de intoxicación por ingesta de aminas.

Teniendo en cuenta que hemos conseguido una construcción genética mediante la que se puede transferir la capacidad para degradar la histamina a distintas cepas bacterianas (*E. coli* W y *P. putida* DOC21) es evidente que podemos hacer lo mismo con otros organismos de interés para la industria alimentaria.

Mediante transferencia de este *cassette* genético (*cluster hin1*) podríamos dotar a cualquier bacteria, tanto G+ como G-, con la capacidad degradativa de histamina, evitando de este modo, la acumulación de este compuesto en aquellos alimentos en cuyo proceso de elaboración intervenga dicha bacteria. Sin embargo, la legislación actual no permite la utilización de microorganismos manipulados genéticamente para la elaboración de alimentos, pero estamos seguros que en poco tiempo, cuando se controlen todos los riesgos que pudieran correrse al utilizar estas cepas recombinantes, las administraciones públicas adoptarán estas nuevas aplicaciones biotecnológicas. Con este fin, actualmente se está llevando a cabo en nuestro laboratorio la transferencia del *cluster hin1* a cepas de *Lactococcus*. Se pretende evitar la acumulación de la histamina (generada mediante descarboxilación de la histidina por la

proteína histidin descarboxilasa presente en este organismo) en aquellos quesos y derivados lácteos en cuyo proceso de elaboración intervenga esta bacteria.

Adicionalmente, el hecho de que la histamina sea un importante neurotransmisor y poseamos una construcción genética transferible capaz de degradarlo, podría tener aplicaciones en terapia génica en el futuro, de modo que algunos de estos genes podrían ser utilizados para el tratamiento de determinadas patologías relacionadas con una excesiva acumulación de histamina en el organismo.

Por último, mediante Ingeniería Metabólica, hemos logrado establecer una nueva ruta útil para la degradación del aminoácido L-histidina mediante la participación del gen que codifica la histidin descarboxilasa (*hdc*) de *Enterobacter aerogenes*. Una aplicación interesante sería la confluencia en un mismo microorganismo de los genes del *cluster hinI* (*hinEABCD*), de los genes necesarios para degradar el ácido imidazolacético y el gen *hdc*, que permitiría catabolizar toda la L-histidina a través del intermediario histamina, y así, elaborar alimentos con bajo contenido en este aminoácido y en sus derivados.

CONCLUSIONES

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.”

Robert Oppenheimer.

CONCLUSIONES.

1. El metabolismo aeróbico de la histamina en *P. putida* U tiene lugar mediante una ruta específica e independiente de la descrita para la degradación del aminoácido L-histidina.
2. La histamina es degradada en *P. putida* U mediante una serie de pasos metabólicos que conducen a su transformación en imidazolacetaldehído, y, posteriormente, en ácido imidazolacético.
3. Se han identificado y caracterizado todos los genes que codifican las funciones necesarias para la degradación de histamina en *P. putida* U. Estos 11 genes están agrupados en tres *clusters* catabólicos diferentes (*hin*, *dad* y *cox*) que se localizan en diferentes regiones del genoma de esta bacteria.
4. El *cluster hin* es el responsable del transporte de histamina, de su desaminación y de su posterior oxidación. Está constituido por 5 genes que se extienden a lo largo de un fragmento de DNA de 7,3 kb. Entre las proteínas codificadas por esta agrupación genética se encuentran: un transportador de histamina (HinA); un transaminasa dependiente de piruvato (HinC); una aldehído deshidrogenasa (HinD) que participa en el proceso de oxidación del aldehído generado tras las desaminación de la histamina, y una proteína reguladora (HinB) que actúa como activador de la expresión de las proteínas mencionadas. Además, en este *cluster hin* se ha identificado otro ORF que pudiera estar implicado en la degradación de histamina pero cuya participación no parece ser imprescindible para que se lleve a cabo dicho proceso. Este ORF codifica una semialdehído deshidrogenasa cuya función no es indispensable para la degradación de histamina y que podría suplir, cuando se requiriese, a HinD.

5. El *cluster dad* está constituido por 3 genes que se hallan en un fragmento de DNA de 3,1 kb. Estos genes codifican las siguientes proteínas catabólicas: una alanina racemasa (DadX) que transforma la L-alanina formada por la aminotransferasa (HinC) en D-alanina, y una D-aminoácido deshidrogenasa (DadA) dependiente de FAD (se reduce a FADH₂ que se acopla a una cadena de transporte electrónico) responsable de la desaminación de esta D-alanina. En este *cluster* la regulación se lleva a cabo a través del gen *dadR*, que codifica una proteína que actúa como activador de, al menos, los genes *dadA* y *dadX*. El *cluster dad* es el responsable de dos funciones: 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 que el aceptor final es una citocromo c oxidasa.
6. El *cluster cox* está formado por 4 genes que se encuentran en un fragmento de 4,2 kb: *coxB*, *coxA*, *coxC* y *coxII*, que codifican las 3 subunidades y la proteína de unión del complejo citocromo c oxidasa de tipo aa₃. Esta proteína es la responsable de la transferencia de electrones al oxígeno, formando parte de la cadena de transporte que genera la energía requerida para la incorporación de histamina.
7. El *cluster dad*, responsable de la degradación de la L-alanina generada tras la desaminación de histamina, no solo interviene en la asimilación de histamina, sino que también participa en la degradación de cadaverina. La mutación en el gen *dadA*, que conduce a la ausencia de actividad D-aminoácido deshidrogenasa, permite la acumulación extracelular de D-alanina y L-alanina (44,8% y 55,2%) a partir de histamina y de cadaverina siempre que exista otra fuente de carbono que proporcione piruvato.
8. Se ha logrado clonar y expresar en un plásmido (pK18::*mob*), el *cluster hinI* (*hinEABCD*), dotando de este modo a las bacterias transformadas con esta construcción de la capacidad necesaria para convertir la histamina en ácido imidazolacético. Estos recombinantes son unas herramientas biotecnológicas muy importantes ya que pueden ser utilizadas para la eliminación de histamina de diferentes fuentes, evitando así su aparición en ciertos alimentos.

9. Se ha conseguido establecer, mediante Ingeniería metabólica (clonación en *P. putida* U del gen que codifica la histidin descarboxilasa de *Enterobacter aerogenes* CECT 648) una nueva ruta catabólica de L-histidina en la que participa la histamina como intermediario catabólico y que supone una alternativa a la ruta existente en este microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

*“El conocimiento es la mejor inversión
que se puede hacer.”*

Abraham Lincoln.

BIBLIOGRAFÍA.

ABEL, J.J., KUBOTA, S. (1919) On the presence of histamine (β -Iminazolylethylamine) in the hypophysis cerebri and other tissues of the body and its occurrence among the hydrolytic decomposition products of proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **13**: 243–300.

ADAMS, E., ROSSO, G. (1967) α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase of *pseudomonas* properties of the purified enzyme induced by hydroxyproline and of the glucarate-induced and constitutive enzymes. *J. Biol. Chem.* **242**: 1802–1814.

AGÚNDEZ, J.A., LUENGO, A., HERRÁEZ, O., MARTÍNEZ, C., ALONSO-NAVARRO, H., JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F.J., GARCÍA-MARTÍN, E. (2008) Nonsynonymous polymorphisms of histamine-metabolising enzymes in patients with Parkinson's disease. *Neuromol. Med.* **10**: 10–16.

AIRAKSINEN, M.S., REINIKAINEN, K., RIEKKINEN, P., PANULA, P. (1991) Neurofibrillary tangles and histamine-containing neurons in Alzheimer hypothalamus. *Agents Actions.* **33**: 104–107.

AISIEN, S.O., WALTER, R.D. (1993) Biogenic-amine acetylation: An additional function of the N-acetyltransferase from *Fasciola hepatica*. *Biochem. J.* **291**: 733–737.

AKDIS, C.A., BLASER, K. (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**: 15–22.

ALEXANDER, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science.* **211**: 132–138.

ALGE, D., PESCHEK, G.A. (1993) Identification and characterization of the *ctaC* (*coxB*) gene as part of an operon encoding subunits I, II, and III of the cytochrome *c* oxidase (cytochrome *aa₃*) in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**: 9–17.

ALRAKSINEN, M.S., PAETAU, A., PALJA, L., REINIKAINEN, K., RLEKKINEN, P., SUOMALAINEN, R., PANULA, P. (1991) Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. *Neuroscience.* **44**: 465–481.

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.

AMES, G.F.L., NIKAIDO, K., WANG, I.X., LIU, P.Q., LIU, C.E., HU, C. (2001) Purification and characterization of the membrane-bound complex of an ABC transporter, the histidine permease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 79–92.

ANSDELL, V. (2008) Food-borne illness. In Keystone, J.S., Kozarsky, P.E., Freedman, D.O., Nothdurft, H.D., Connor, B.A. (eds.). *Travel Med*, pp. 475–484. Mosby, Philadelphia.

AOI, R., NAKASHIMA, I., KITAMURA, Y., ASAI, H., NAKANO, K. (1989) Histamine synthesis by mouse T lymphocytes through induced histidine decarboxylase. *Immunology*. **66**: 219-223.

AQUINO-MIRANDA, G., MOLINA-HERNÁNDEZ, A., ARIAS-MONTAÑO, J.A. (2012) Regulación por receptores H₃ a histamina de la liberación de neurotransmisores en los ganglios basales: implicaciones para la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Gac. Médica México*. **148**: 467–475.

ARAI, H. (2011) Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2**: 103.

ARAI, H., KAWAKAMI, T., OSAMURA, T., HIRAI, T., SAKAI, Y., ISHII, M. (2014) Enzymatic characterization and *in vivo* function of five terminal oxidases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **196**: 4206–4215.

ARCE, L., RÍOS, A., VALCÁRCEL, M. (1998) Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. *J. Chromatogr. A*. **803**: 249–260.

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.

ARENA, M.E., MANCA DE NADRA, M.C. (2001) Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 158–162.

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.

ARNOULD, J.M. (1985) Biosynthesis of carcinine (beta-alanyl-histamine) *in vivo*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **93**: 351–361.

ARNOULD, J.M. (1987) La β -alanylation, une voie de neutralisation de l'histamine dans le système nerveux central de *Carcinus maenas*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 1898–1902.

ARRANG, J.M., GARBARG, M., SCHWARTZ, J.C. (1983) Autoinhibition 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., DE LA CRUZ-AGUILERA, D.L., MEDINA-RIVERO, E., HURTADO-ALVARADO, G., QUINTERO-FABIÁN, S., PAVÓN, L. (2016) Immunomodulatory effects mediated by dopamine. *J. Immunol. Res.* **3160486**: 1-31.

ASH, A.S.F., SCHILD, H.O. (1966) Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **27**: 427–439.

ASKAR, A., TREPTOW, H. (1986) Biogenic amine in lebensmitteln. Vorkommen, bedeutung und bestimmung. Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart.

AXELROD, J., SAAVEDRA, J.M. (1977) Octopamine. *Nature.* **265**: 501–504.

BABIZHAYEV, M.A., SEGUIN, M.C., GUEYNE, J., EVSTIGNEEVA, R.P., AGEYEVA, E.A., YZHELTUKHINA, G.A. (1994) L-Carnosine (β -alanyl-L-histidine) and carcinine (β -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem. J.* **304**: 509–516.

BACHERT, C. (1998) Histamine a major role in allergy?. *Clin. Exp. Allergy.* **28**: 15–19.

BAENZIGER, N.L., MACK, P., JONG, Y.J., DALEMAR, L.R., PEREZ, N., LINDBERG, C., WILHELM, B., HADDOCK, R.C. (1994) An environmentally regulated receptor for diamine oxidase modulates human endothelial cell/fibroblast histamine degradative uptake. *J. Biol. Chem.* **269**: 14892–14898.

BÄHRE, H., KAEVER, V. (2017) Analytical methods for the quantification of histamine and histamine metabolites. In Flockerzi, V., Frohman, M.A., Geppetti, P., Hofmann, F.B., Michel, M.C., Page, C.P., Rosenthal, W., Wang, K. (eds.). Handbook of experimental pharmacology, pp. 1-17. Springer International Publishing, Switzerland.

BAKKE, M., SATO, T., ICHIKAWA, K., NISHIMURA, I. (2005) Histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp.: gene cloning, expression in *Escherichia coli*, characterization and application to histamine determination. *J. Biotechnol.* **119**: 260–271.

BALASUBRAMANIAN, D., MURUGAPIRAN, S.K., SILVA-HERZOG, E., SCHNEGER, L., YANG, X., TATKE, G., NARASIMHAN, G., MATHEE, K. (2013) Transcriptional regulatory network in *Pseudomonas aeruginosa*. In Babu, M.M. (ed.). Bacterial gene regulation and transcriptional networks, pp. 199-222. Caister Academic Press, Poole, UK.

BANDOUNAS, L., BALLERSTEDT, H., DE WINDE, J.H., RUIJSSENAARS, H.J. (2011) Redundancy in putrescine catabolism in solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J. Biotechnol.* **154**: 1–10.

BARDÓCZ, S. (1995) Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* **6**: 341–346.

BARGER, G., DALE, H.H. (1910) Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J. Physiol.* **41**: 19–59.

BARRIENTOS, A., MERINO, E., CASABON, I., RODRÍGUEZ, J., CROWE, A.M., HOLERT, J., PHILIPP, B., ELTIS, L.D., OLIVERA, E.R., LUENGO, J.M. (2015) Functional analyses of three acyl-CoA synthetases involved in bile acid degradation in *Pseudomonas putida* DOC21. *Environ. Microbiol.* **17**: 47–63.

- BÄUMLISBERGER, M., MOELLECKEN, U., KÖNIG, H., CLAUS, H.** (2015) The potential of the yeast *Debaryomyces hansenii* H525 to degrade biogenic amines in food. *Microorganisms*. **3**: 839–850.
- BAYLEY, S.A., DUGGLEBY, C.J., WORSEY, M.J., WILLIAMS, P.A., HARDY, K.G., BRODA, P.** (1977) Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet. MGG*. **154**: 203–204.
- BELDA, E., VAN HECK, R.G., LOPEZ-SANCHEZ, M.J., CRUVEILLER, S., BARBE, V., FRASER, C., KLENK, H.-P., PETERSEN, J., MORGAT, A., NIKEL, P.I., VALLENET, D., ROUY, Z., SEKOWSKA, A., MARTINS DOS SANTOS, V.A., DE LORENZO, V., DANCHIN, A., MÉDIGUE, C.** (2016) The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ. Microbiol.* **18**: 3403-3424.
- BELLO-FERNÁNDEZ, C., PACKHAM, G., CLEVELAND, J.L.** (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7804–7808.
- 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.
- BERNARDO-GARCÍA, N., SÁNCHEZ-MURCIA, P., GAGO, F., CAVA, F., HERMOSO, J.A.** (2016) Structural bioinformatics in broad-spectrum racemases: a new path in antimicrobial research. *Curr. Org. Chem.* **20**: 1222–1231.
- BERRY, M.D.** (2004) Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J. Neurochem.* **90**: 257–271.
- BEST, C.H., DALE, H.H., DUDLEY, H.W., THORPE, W.V.** (1927) The nature of the vasodilator constituents of certain tissue extracts. *J. Physiol.* **62**: 397-417.
- BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., CASSARINO, T.G., BERTONI, M., BORDOLI, L., SCHWEDE, T.** (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**: W252–W258.
- BJELDANES, L.F., SCHUTZ, D.E., MORRIS, M.M.** (1978) On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food Cosmet. Toxicol.* **16**: 157–159.
- BJORNSDOTTIR-BUTLER, K., MCCARTHY, S.A., DUNLAP, P.V., BENNER, R.A.** (2016) *Photobacterium angustum* and *Photobacterium kishitanii*, psychrotrophic high-level histamine-producing bacteria indigenous to tuna. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 2167–2176.
- BLAKESLEY, M.L.** (1983) Scombroid poisoning: prompt resolution of symptoms with cimetidine. *Ann. Emerg. Med.* **12**: 104–106.
- BODMER, S., IMARK, C., KNEUBÜHL, M.** (1999) Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflamm. Res.* **48**: 296–300.

- BORDIGA, M., TRAVAGLIA, F., LOCATELLI, M., ARLORIO, M., COÏSSON, J.D.** (2010) Histaminol: identification and HPLC analysis of a novel compound in wine. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 10202–10208.
- BOROWSKY, B., ADHAM, N., JONES, K.A., RADDATZ, R., ARTYMYSHYN, R., OGOZALEK, K.L., DURKIN, M.M., LAKHLANI, P.P., BONINI, J.A., PATHIRANA, S., BOYLE, N., PU, X., KOURANOVA, E., LICHTBLAU, H., OCHOA, F.Y., BRANCHEK, T.A., GERALD, C.** (2001) Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 8966–8971.
- BORYCZ, J., VOHRA, M., TOKARCZYK, G., MEINERTZHAGEN, I.A.** (2000) The determination of histamine in the *Drosophila* head. *J. Neurosci. Methods.* **101**: 141–148.
- BORYCZ, J., BORYCZ, J.A., KUBOW, A., LLOYD, V., MEINERTZHAGEN, I.A.** (2008) *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *J. Exp. Biol.* **211**: 3454–3466.
- BOSSIS, F., DE GRASSI, A., PALESE, L.L., PIERRI, C.L.** (2014) Prediction of high- and low-affinity quinol-analogue-binding sites in the aa₃ and bo₃ terminal oxidases from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **461**: 305–314.
- BOULTON, A.A.** (1976) Identification, distribution, metabolism, and function of *meta* and *para* tyramine, phenylethylamine and tryptamine in brain. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **15**: 57-67.
- BOULTON A.A.** (1980) Trace amines and mental disorders. *J. Neurol. Sci.* **7**: 261-263.
- BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H.** (1999) Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53**: 33–41.
- 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.* **50**: 1089–1126.
- BOWSER, R.R., HENRY, D.P.** (1986) Aromatic L-amino acid decarboxylase: biochemistry and functional significance. In Boulton, A.A., Baker, G. B., and Yu, P. H., (eds.). *Neuromethods. Neurotransmitter enzymes*, Vol. 5, pp. 33–78. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- 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.
- BRINKMAN, A.B., ETTEMA, T.J.G., DE VOS, W.M., VAN DER OOST, J.** (2003) The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol. Microbiol.* **48**: 287–294.

- BROWN, D.D., TOMCHICK, R., AXELROD, J.** (1959) The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme. *J. Biol. Chem.* **234**: 2948–2950.
- BUCHHAUPT, M., GUDER, J., SPORLEDER, F., PAETZOLD, M., SCHRADER, J.** (2013). Oxidation of fatty aldehydes to fatty acids by *Escherichia coli* cells expressing the *Vibrio harveyi* fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 569–575.
- BUTLER, R.D.** (1961) The ultraviolet absorption spectra of histamine, histidine and imidazole. Effect of pH and certain foreign ions of the spectrum of histamine (Thesis). Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- CALLES-ENRÍQUEZ, M., ERIKSEN, B.H., ANDERSEN, P.S., RATTRAY, F.P., JOHANSEN, A.H., FERNÁNDEZ, M., LADERO, V., ÁLVAREZ, M.A.** (2010) Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6231–6238.
- CARELLI, D., CENTONZE, D., PALERMO, C., QUINTO, M., ROTUNNO, T.** (2007) An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. *Biosens. Bioelectron.* **23**: 640–647.
- CARMONA GALLARDO, M.I.** (2016) Estudio del papel de los genes *cio* en la resistencia al cianuro de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Tesis). Universidad de Extremadura.
- CASSIMJEE, K.E.** (2012) ω -Transaminase in biocatalysis: methods, reactions and engineering (Thesis). KTH Royal Institute of Technology. Stockholm.
- CASSIMJEE, K.E., MANTA, B., HIMO, F.** (2015) A quantum chemical study of the ω -transaminase reaction mechanism. *Org. Biomol. Chem.* **13**: 8453–8464.
- ČERNE, K., KRŽAN, M.** (2009) Involvement of the organic cation transporters in histamine uptake into human vascular endothelial cells. *Inflamm. Res.* **58**: 61–62.
- ČERNE, K., IRMAN-FLORJANC, T., KRŽAN, M.** (2008) Histamine uptake into human vascular endothelial cells and influence of three different antidepressant drugs. *Inflamm. Res.* **57**: 37–38.
- CHA, H.J., JEONG, J.H., ROJVIRIYA, C., KIM, Y.G.** (2014) Structure of putrescine aminotransferase from *Escherichia coli* provides insights into the substrate specificity among class III aminotransferases. *PLoS One.* **9**: e113212.
- 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.* **258**: 24–47.
- CHEN, J., XIE, J.** (2011) Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *J. Cell. Biochem.* **112**: 2694–2702.
- CHEN, S., CALVO, J.M.** (2002) Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. *J. Mol. Biol.* **318**: 1031–1042.

- CHEN, S., ROSNER, M.H., CALVO, J.M.** (2001a) Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **312**: 625–635.
- CHEN, Z., WU, J., BAKER, G.B., PARENT, M., DOVICH, N.J.** (2001b) Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples. *J. Chromatogr. A.* **914**: 293–298.
- CHEN, Z., SAKURAI, E., HU, W., JIN, C., KISO, Y., KATO, M., WATANABE, T., WEI, E., YANAI, K.** (2004) Pharmacological effects of carbinine on histaminergic neurons in the brain. *Br. J. Pharmacol.* **143**: 573–580.
- CHIN, K.D.H., KOEHLER, P.E.** (1983) Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. *J. Food Sci.* **48**: 1826–1828.
- CHING, T.L., VAN DER HEI, R.M., BHOELAN, N.M., BLAUW, J., MENGE, W., DE JONG, J., BAST, A.** (1995) Histamine as a marker for hydroxyl radicals. *Mediators Inflamm.* **4**: 339–343.
- 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.
- 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.
- CIANCHI, F., CORTESINI, C., SCHIAVONE, N., PERNA, F., MAGNELLI, L., FANTI, E., BANI, D., MESSERINI, L., FABBRONI, V., PERIGLI, G., CAPACCIOLI, S., MASINI, E.** (2005) The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 6807–6815.
- CLEMETSON, C.A.B.** (2004) Elevated blood histamine caused by vaccinations and vitamin C deficiency may mimic the shaken baby syndrome. *Med. Hypotheses.* **62**: 533–536.
- CODE, C.F.** (1937) The quantitative estimation of histamine in the blood. *J. Physiol.* **89**: 257–268.
- COELHO, M.H., SILVA, I.J., AZEVEDO, M.S., MANSO, C.F.** (1991) Decrease in blood histamine in drug-treated parkinsonian patients. *Mol. Chem. Neuropathol.* **14**: 77–85.
- COMBARROS-FUERTE, 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.

- CONNIL, N., LE BRETON, Y., DOUSSET, X., AUFRAY, Y., RINCÉ, A., PRÉVOST, H. (2002) Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3537–3544.
- CONTI, P., TAMBORINI, L., PINTO, A., BLONDEL, A., MINOPRIO, P., MOZZARELLI, A., DE MICHELI, C. (2011) Drug discovery targeting amino acid racemases. *Chem. Rev.* **111**: 6919–6946.
- COOPER, R.A. (1997) On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 85–89.
- DAGLEY, S. (1981) New perspectives in aromatic catabolism. In Leisinger, T., Cook, A.M., Hütter, R., Nüesch, J. (eds.). Degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, pp.181–186. 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 -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* **41**: 318–344.
- DAPKEVICIUS, M.L.E., NOUT, M.R., ROMBOUTS, F.M., HOUBEN, J.H., WYMENGA, W. (2000) Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **57**: 107–114.
- DASH, B.P., ALLES, M., BUNDSCHUH, F.A., RICHTER, O.M., LUDWIG, B. (2015) Protein chaperones mediating copper insertion into the Cu_A site of the aa₃-type cytochrome *c* oxidase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1847**: 202–211.
- DATTA, S., MORI, Y., TAKAGI, K., KAWAGUCHI, K., CHEN, Z.W., OKAJIMA, T., KURODA, S., IKEDA, T., KANO, K., TANIZAWA, K., MATHEWS, F. (2001) Structure of a quinoxinoprotein amine dehydrogenase with an uncommon redox cofactor and highly unusual crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 14268–14273.
- DAVENPORT, A.P. (2003) Peptide and trace amine orphan receptors: prospects for new therapeutic targets. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**: 127–134.
- DAVIDSON, V.L. (2004) Electron transfer in quinoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **428**: 32–40.
- DAVIDSON, V.L. (2005) Structure and mechanism of tryptophylquinone enzymes. *Bioorganic Chem.* **33**: 159–170.
- DAVIS, B.D., MINGIOLI, E.S. (1950) Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* **60**: 17–28.
- DE BRUIJN, I., RAAIJMAKERS, J.M. (2009) Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4753–4761.
- DE CERIO, O.G.D., BARRUTIA-BORQUE, A., GARDEAZABAL-GARCÍA, J. (2016) Scombroid poisoning: A practical approach. *Actas Dermosifiliogr.* **107**: 567–571.

- DE LA TORRE, M., HUMANES, M.C., OLIVERA, E.R., LUENGO, J.M.** (2017) Plasmids containing the same origin of replication are useful tools to perform biotechnological studies in *Pseudomonas putida* U and in *E. coli* DH10B. *Can. J. Biotech.* **1**: 38-43.
- DE LAS RIVAS, B., RODRÍGUEZ, H., CARRASCOSA, A.V., MUÑOZ, R.** (2008) Molecular cloning and functional characterization of a histidine decarboxylase from *Staphylococcus capitis*. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 194–203.
- DE LOS RIOS, S., PERONA, J.J.** (2007) Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. *J. Mol. Biol.* **366**: 1589–1602.
- DEEUDOM, M., KOOMEY, M., MOIR, J.W.** (2008) Roles of *c*-type cytochromes in respiration in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* **154**: 2857–2864.
- 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.
- DENNO, M.E., PRIVMAN, E., BORMAN, R., WOLIN, D., VENTON, B.J.** (2016) Quantification of histamine and carcinine in *Drosophila melanogaster* tissues. *ACS Chem. Neurosci.* **7**: 407-414.
- D'ERME, A.M., GIANFALDONI, S., KATSAMBAS, A.D., LOTTI, T.M.** (2015) Antihistamines. In Katsambas, A.D., Lotti, T.M., Dessinioti, C., D'Erme, A.M. (eds.) European handbook of dermatological treatments, pp. 1373–1380. Springer Berlin Heidelberg, Germany.
- DEUTCH, A.Y., ROTH, R.H.** (1999) Neurotransmitters. In Zigmond, M. (Ed.). Fundamental neuroscience, pp. 208–212. Academic Press, San Diego.
- DIAZ, M., DEL RIO, B., LADERO, V., REDRUELLO, B., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, M.C., ALVAREZ, M.A.** (2015) Isolation and typification of histamine-producing *Lactobacillus vaginalis* strains from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **215**: 117–123.
- DICKINSON, G.** (1982) Scombroid fish poisoning syndrome. *Ann. Emerg. Med.* **11**: 487–489.
- DRAGSTEDT, C.A., MEAD, F.B.** (1936) The role of histamine in canine anaphylactic shock. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **57**: 419–426.
- DUA, M., SINGH, A., SETHUNATHAN, N., JOHRI, A.** (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 143–152.
- DUDLEY, H.W., ROSENHEIM, O., STARLING, W.W.** (1927) The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochem. J.* **21**: 97-103.
- ELIAS, M.S., EVANS, P.D.** (1983) Histamine in the insect nervous system: distribution, synthesis and metabolism. *J. Neurochem.* **41**: 562–568.

- 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. Denmark.
- ERIM, F.B.** (2013) Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends Anal. Chem.* **52**: 239–247.
- 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
- FENG, C., TEUBER, S., GERSHWIN, M.E.** (2016) Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **50**: 64–69.
- FERNÁNDEZ-CAÑÓN, J.M., REGLERO, A., MARTÍNEZ-BLANCO, H., FERRERO, M.A., LUENGO, J.M.** (1989) Phenylacetic acid transport system in *Penicillium chrysogenum* Wis 54-1255: molecular specificity of its induction. *J. Antibiot.* **42**: 1410–1415.
- FERNÁNDEZ-NOVOA, L., CACABELOS, R.** (2001) Histamine function in brain disorders. *Behav. Brain Res.* **124**: 213–233.
- FERRARIO, C., BORGIO, F., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R., RICCI, G., FORTINA, M.G.** (2014) Sequencing, characterization, and gene expression analysis of the histidine decarboxylase gene cluster of *Morganella morganii*. *Curr. Microbiol.* **68**: 404–411.
- FERREIRA, I.M., PINHO, O.** (2006) Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *J. Food Prot.* **69**: 2293–2303.
- FLANCBAUM, L., BROTMAN, D.N., FITZPATRICK, J.C., VAN ES, T., KASZIBA, E., FISHER, H.** (1990) Existence of carbinine, a histamine-related compound, in mammalian tissues. *Life Sci.* **47**: 1587–1593.
- FLOWERS, F.P., ARAUJO, O.E., NIEVES, C.H.** (1986) Antihistamines. *Int. J. Dermatol.* **25**: 224–231.
- FRIEDBERG, D., PLATKO, J.V., TYLER, B., CALVO, J.M.** (1995) The amino acid sequence of Lrp is highly conserved in four enteric microorganisms. *J. Bacteriol.* **177**: 1624–1626.
- FUJIEDA, N., SATOH, A., TSUSE, N., KANO, K., IKEDA, T.** (2004) 6-S-Cysteinylyl flavin mononucleotide-containing histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex*: molecular cloning, sequencing, overexpression, and characterization of redox centers of enzyme. *Biochemistry.* **43**: 10800–10808.
- GAO, X., LU, F., ZHOU, L., DANG, S., SUN, L., LI, X., WANG, J., SHI, Y.** (2009) Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science.* **324**: 1565–1568.

- GARCÍA-HORSMAN, J.A., ESCAMILLA, E.** (1989) Review article: structural and functional properties of cytochrome *aa₃* from bacteria. *Bol. Estud. Med. Biol.* **38**: 29–40.
- GARCÍA-HORSMAN, J.A., BARQUERA, B., ESCAMILLA, J.E.** (1991). Two different *aa₃*-type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur. J. Biochem.* **199**: 761–768.
- GARCÍA-MARTÍN, E., AYUSO, P., LUENGO, A., MARTÍNEZ, C., AGÚNDEZ, J.A.** (2008) Genetic variability of histamine receptors in patients with Parkinson's disease. *BMC Med. Genet.* **9**: 15.
- GARDINI, F., ÖZOGUL, Y., SUZZI, G., TABANELLI, G., ÖZOGUL, F.** (2016) Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Front. Microbiol.* **7**: 1218.
- GAVIN, B.A., ARRUDA, S.E., DOLPH, P.J.** (2007) The role of carcinine in signaling at the *Drosophila* photoreceptor synapse. *PLoS Genet.* **3**: e206.
- GENG, C., SPARKS, T.C., SKOMP, J.R., GAJEWSKI, R.P.** (1993) Biogenic amines in the brain of *Manduca sexta* during larval-pupal metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* **106**: 275–284.
- GIBSON, D.T.** (1988) Microbial metabolism of aromatic hydrocarbons and the carbon cycle. In Hagedorn, S.R., Hanson, R.S., Kunz, D.A. (eds.). *Microbial metabolism and carbon cycle*, pp. 33-58. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- GILBERT, R.J., HOBBS, G., MURRAY, C.K., CRUICKSHANK, J.G., YOUNG, S.E.J.** (1980) Scombrototoxic fish poisoning: features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976–9). *Br. Med. J.* **281**: 71–72.
- GITOMER, W.L., TIPTON, K.F.** (1983) The role of cytoplasmic aldehyde dehydrogenase in the metabolism of N-*tele*-methylhistamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**: 113–116.
- GLAZER, A.N., NIKAIDO, H.** (2007) Microbial Biotechnology: Scope, Techniques, Examples. In Glazer, A.N., Nikaido, H. (eds.). *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*, pp. 45-89. Cambridge University Press, New York.
- GLÓRIA, M.B.A.** (2005) Bioactive amines. In Hui, Y.H., Sherkat F. (eds.) *Handbook of Food science, technology and engineering*, Vol. 4, pp. 13.1-13.38. CRC Press, London.
- GOLDMAN, B.S., BECKMAN, D.L., BALI, A., MONIKA, E.M., GABBERT, K.K., KRANZ, R.G.** (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. *J. Mol. Biol.* **268**: 724–738.
- 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.* **87**: 4645–4649.

- GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DRDÁK, M.** (1997) Determination of biogenic amines in foods of animal origin by HPLC. *Potrav.Vědy*. **15**: 119-129.
- GREINER, P., HANNAPPEL, A., WERNER, C., LUDWIG, B.** (2008) Biogenesis of cytochrome *c* oxidase—*in vitro* approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. *Biochim. Biophys. Acta*. **1777**: 904–911.
- GROVE, R.A., HARRINGTON C.M., MAHLER A., BERESFORD I., MARUFF P., LOWY M.T., NICHOLLS A.P., BOARDLEY R.L, BERGES AC, NATHAN P.J., HARRIGAN J.P.** (2014) A randomized, double-blind, placebo-controlled, 16-week study of the H3 receptor antagonist, GSK239512 as a monotherapy in subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res*. **11**: 47–58.
- GUSTAFSSON, A., FORSHELL, G.P.** (1964) Studies on the enzymic methylation of histamine. *Acta Chem. Scand*. **18**: 2069–2076.
- HAAS, H., PANULA, P.** (2003) The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci*. **4**: 121–130.
- HACISALIHOGU, 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.
- HAMADA, Y., SHINOHARA, Y., YANO, M., YAMAMOTO, M., YOSHIO, M., SATAKE, K., TODA, A., HIRAI, M., USAMI, M.** (2013) Effect of the menstrual cycle on serum diamine oxidase levels in healthy women. *Clin. Biochem*. **46**: 99–102.
- HANAHAN, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. **166**: 557–580.
- HANAHAN, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D.M. (ed.). DNA cloning: a practical approach, Vol. 1, pp. 109–135. IRL Press, Oxford.
- HANDLEY, D.A., GRAFF, F.** (1998) A look ahead. Third-generation antihistamines. *Adv. Nurse Pract*. **6**: 53–72.
- HANNAPPEL, A., BUNDSCHUH, F.A., LUDWIG, B.** (2012) Role of Surf1 in heme recruitment for bacterial COX biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1817**: 928–937.
- HART, B.R., BLUMENTHAL, R.M.** (2011) Unexpected coregulator range for the global regulator Lrp of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol*. **193**: 1054–1064.
- HASALA, H.** (2006) Role of histamine in the regulation of human eosinophil apoptosis (Thesis). University of Tampere, Medical School. Finland.
- HE, W., LI, C., LU, C.D.** (2011) Regulation and characterization of the *dadRAX* locus for D-amino acid catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol*. **193**: 2107–2115.

- HEMPEL, J., KUO, I., PEROZICH, J., WANG, B.C., LINDAHL, R., NICHOLAS, H.** (2001) Aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **268**: 722–726.
- HERNÁNDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS, M.T., VIDAL-CAROU, M.C.** (1996) Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 3097–3101.
- 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.
- HESS, S.M., REDFIELD, B.G., UDENFRIEND, S.** (1959) The effect of monoamine oxidase inhibitors and tryptophan on the tryptamine content of animal tissues and urine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**: 178–181.
- HIDALGO, E., CHEN, Y.M., LIN, E.C., AGUILAR, J.** (1991) Molecular cloning and DNA sequencing of the *Escherichia coli* K-12 ald gene encoding aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**: 6118–6123.
- HIGGINS, C.F.** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 67–113.
- HIGGINS, C.F.** (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.* **152**: 205–210.
- HIGGINS, C.F., LINTON, K.J.** (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 918–926.
- HIROTA, S., IWAMOTO, T., KISHISHITA, OKAJIMA, T., YAMAUCHI, O., TANIZAWA, K.** (2001) Spectroscopic observation of intermediates formed during the oxidative half-reaction of copper/topa quinone-containing phenylethylamine oxidase. *Biochemistry.* **40**: 15789–15796.
- HISER, L., DI VALENTIN, M., HAMER, A.G., HOSLER, J.P.** (2000) Cox11p is required for stable formation of the Cu_B and magnesium centers of cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* **275**: 619–623.
- 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.
- HOLLAND, I.B., BLIGHT, M.A.** (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**: 381–399.
- HOLM-BENTZEN, M., SØNDERGAARD, I., HALD, T.** (1987) Urinary excretion of a metabolite of histamine (1, 4-methyl-imidazole-acetic-acid) in painful bladder disease. *Br. J. Urol.* **59**: 230–233.

- HOLT, J.G.K., SNEATH, N.R., STALEY, P.H., WILLIAMS, J.T., STANLEY, T.** (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.). pp. 1984-1989. Md. Williams & Wilkins, Baltimore.
- HORMAECHE, E., EDWARDS, P.R.** (1960) A proposed genus *Enterobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **10**: 71-74.
- HOSIE, A.H., POOLE, P.S.** (2001) Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.* **152**: 259-270.
- HOSIE, A.H., ALLAWAY, D., GALLOWAY, C.S., DUNSBY, H.A., POOLE, P.S.** (2002) *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusually broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J. Bacteriol.* **184**: 4071-4080.
- HOSLER, J.P., ESPE, M.P., ZHEN, Y., BABCOCK, G.T., FERGUSON-MILLER, S.** (1995) Analysis of site-directed mutants locates a non-redox-active metal near the active site of cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry.* **34**: 7586-7592.
- HOUGH, L.B., DOMINO, E.F.** (1979) Tele-methylhistamine oxidation by type B monoamine oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**: 422-428.
- 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, X., MADAN, A.** (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **9**: 868-877.
- HUFFMAN, J.L., BRENNAN, R.G.** (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 98-106.
- HUI, J.Y., TAYLOR, S.L.** (1985) Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyltransferase, and monoamine oxidase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **81**: 241-249.
- HUNGERFORD, J.M.** (2010) Scombroid poisoning: a review. *Toxicon.* **56**: 231-243.
- HYUN, Y.L., DAVIDSON, V.L.** (1995) Electron transfer reactions between aromatic amine dehydrogenase and azurin. *Biochemistry.* **34**: 12249-12254.
- IONESCU, G., KIEHL, R.** (1988) Monoamine and diamine oxidase activities in atopic eczema. *Allergy.* **43**: 318-319.
- ISHII, S., HAYASHI, H., OKAMOTO, A., KAGAMIYAMA, H.** (1998) Aromatic L-amino acid decarboxylase: Conformational change in the flexible region around Arg334 is required during the transaldimination process. *Protein Sci.* **7**: 1802-1810.
- ISHIKAWA, R., ISHIDO, Y., TACHIKAWA, A., KAWASAKI, H., MATSUZAWA, H., WAKAGI, T.** (2002) *Aempyrum pernix* K1, a strictly aerobic and hyperthermophilic

archaeon, has two terminal oxidases, cytochrome *ba*₃ and cytochrome *aa*₃. *Arch. Microbiol.* **179**: 42–49.

ISHIZAKA, T., DEBERNARDO, R., TOMIOKA, H., LICHTENSTEIN, L.M., ISHIZAKA, K. (1972) Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immunol.* **108**: 1000–1008.

IZQUIERDO-PULIDO, M., HERNÁNDEZ-JOVER, T., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.C. (1996) Biogenic amines in European beers. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 3159–3163.

IZZATI-ZADE, K.F. (2008) The role of serotonin in the pathogenesis and clinical presentations of migraine attacks. *Neurosci. Behav. Physiol.* **38**: 501–505.

JACK, D.L., PAULSEN, I.T., SAIER, M.H. (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology.* **146**: 1797–1814.

JANES, B.K., BENDER, R.A. (1998) Alanine catabolism in *Klebsiella aerogenes*: molecular characterization of the *dadAB* operon and its regulation by the nitrogen assimilation control protein. *J. Bacteriol.* **180**: 563–570.

JANES, B.K., BENDER, R.A. (1999) Two roles for the leucine-responsive regulatory protein in expression of the alanine catabolic operon (*dadAB*) in *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **181**: 1054–1058.

JARISCH, R., WANTKE, F., RAITHEL, M., HEMMER, W. (2015) Histamine and Biogenic Amines. In Jarisch, R. (ed.). Histamine Intolerance, histamine and seasickness, pp. 3–43. Springer Berlin Heidelberg, Germany.

JASTRZEBSKA, A., KOWALSKA, S., SZLYK, E. (2016) Studies of levels of biogenic amines in meat samples in relation to the content of additives. *Food Addit. Contam. Part A Chem.* **33**: 27–40.

JO, J.E., RAJ, S.M., RATHNASINGH, C., SELVAKUMAR, E., JUNG, W.C., PARK, S. (2008) Cloning, expression and characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 51–60.

JOUTEY, N.T., BAHAFID, W., SAYEL, H., EL GHACHTOULI, N. (2013) Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. In Chamy, R. (Ed.). Biodegradation-life of science, pp 289–320. Intech, Rijeka.

JU, J., YOKOIGAWA, K., MISONO, H., OHNISHI, K. (2005) Cloning of alanine racemase genes from *Pseudomonas fluorescens* strains and oligomerization states of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **100**: 409–417.

JU, J., XU, S., FURUKAWA, Y., ZHANG, Y., MISONO, H., MINAMINO, T., NAMBA, K., ZHAO, B., OHNISHI, K. (2011) Correlation between catalytic activity and monomer–dimer equilibrium of bacterial alanine racemases. *J. Biochem.* **149**: 83–89.

- JUNG, H., PIRCH, T., HILGER, D.** (2006) Secondary transport of amino acids in prokaryotes. *J. Membr. Biol.* **213**: 119–133.
- KANEHISA, M., GOTO, S.** (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 27–30.
- 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.
- KARIM, A., PATONG, A.R., ABD WAHID, W., RAYA, I.** (2015) Isolation and characterization of diamine oxidase enzyme from mung bean sprouts (*Vigna radiata* L). *Am. J. Biomed. Life Sci.* **3**: 7-11.
- KARMAS, E.** (1981) Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Food. Sci. Technol.* **5**: 108-109.
- KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVA, Z.** (2005) Biogenic amines in food. *Chem. Pap.* **59**: 70–79.
- KATO, Y., TSUDA, T., ASANO, Y.** (2007) Purification and partial characterization of N-hydroxy-L-phenylalanine decarboxylase/oxidase from *Bacillus* sp. strain OxB-1, an enzyme involved in aldoxime biosynthesis in the “aldoxime–nitrile pathway.” *Biochim. Biophys. Acta.* **1774**: 856–865.
- KAWAKAMI, T., KUROKI, M., ISHII, M., IGARASHI, Y., ARAI, H.** (2010) Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **12**: 1399–1412.
- 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**: 845–858.
- KESSLER, B., PALLERONI, N.J.** (2000) Taxonomic implications of synthesis of poly- β -hydroxybutyrate and other poly- β -hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 711–713.
- KHAN, H.A., ULLAH, Q., AHMAD, A., ALHOMIDA, A.S., AL ROKAYAN S.H.** (2016) Methods of trace amine analysis in mammalian brain. In Farooqui, T., Farooqui, A.A. (eds.). Trace amines and their relevance to neurological disorders: potential mechanisms and risk factors, Vol. 257, pp 11-26. Academic Press, London.
- KIKUCHI, Y., KOJIMA, H., TANAKA, T., TAKATSUKA, Y., KAMIO, Y.** (1997) Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 4486–4492.
- KIM, K.A., VON ZASTROW, M.** (2001) Old drugs learn new tricks: insights from mammalian trace amine receptors. *Mol. Pharmacol.* **60**: 1165–1167.

- KIM, R.B., FROMM, M.F., WANDEL, C., LEAKE, B., WOOD, A.J., RODEN, D.M., WILKINSON, G.R.** (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J. Clin. Invest.* **101**: 289-294.
- KIMURA, B., TAKAHASHI, H., HOKIMOTO, S., TANAKA, Y., FUJII, T.** (2009) Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 485-497.
- KITANAKA, J., KITANAKA, N., TSUJIMURA, T., TERADA, N., TAKEMURA, M.** (2002) Expression of diamine oxidase (histaminase) in guinea-pig tissues. *Eur. J. Pharmacol.* **437**: 179-185.
- KLINMAN, J.P., MU, D.** (1994) Quinoenzymes in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 299-344.
- KLYUEV, M.V., KHIDEKEL', M.L.** (1980) Catalytic amination of alcohols, aldehydes, and ketones. *Russ. Chem. Rev.* **49**: 14-27.
- KONINGS, W.N., POOLMAN, B., VAN VEEN, H.W.** (1994) Solute transport and energy transduction in bacteria. *J. Gen. Mol. Microbiol.* **65**: 369-380.
- KONISHI, H., KAKIMOTO, Y.** (1976) Formation of γ -glutamylhistamine from histamine in rat brain. *J. Neurochem.* **27**: 1461-1463.
- KOSZELEWSKI, D., TAUBER, K., FABER, K., KROUTIL, W.** (2010) ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. *Trends Biotechnol.* **28**: 324-332.
- 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-HANUSKOVA, E., BUDAY, T., GAVLIAKOVA, S., PLEVKOVA, J.** (2015) Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol. Immunopathol.* **43**: 498-506.
- KOWALCZYK, L., RATERA, M., PALADINO, A., BARTOCCIONI, P., ERRASTI-MURUGARREN, E., VALENCIA, E., PORTELLA, G., BIAL, S., ZORZANO, A., FITA, I., OROZCO M., CARPENA X., VÁZQUEZ-IBAR J.L., PALACÍN M.** (2011) Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 3935-3940.
- KOYANAGI, T., NAKAGAWA, A., SAKURAMA, H., YAMAMOTO, K., SAKURAI, N., TAKAGI, Y., MINAMI, H., KATAYAMA, T., KUMAGAI, H.** (2012) Eukaryotic-type aromatic amino acid decarboxylase from the root colonizer *Pseudomonas putida* is highly specific for 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine, an allelochemical in the rhizosphere. *Microbiology.* **158**: 2965-2974.
- KURIHARA, S., TSUBOI, Y., ODA, S., KIM, H.G., KUMAGAI, H., SUZUKI, H.** (2009) The putrescine importer PuuP of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **191**: 2776-2782.

- KURNASOV, O., JABLONSKI, L., POLANUYER, B., DORRESTEIN, P., BEGLEY, T., OSTERMAN, A.** (2003) Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**: 219–227.
- LADERO, V., CALLES-ENRÍQUEZ, M., FERNÁNDEZ, M., ÁLVAREZ, M.A.** (2010) Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**: 145–156.
- LANDETE, J.M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUNOZ, R.** (2008) Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**: 697–714.
- LARSON, H.N., WEINER, H., HURLEY, T.D.** (2005) Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase “Asian” variant. *J. Biol. Chem.* **280**: 30550–30556.
- LASSEN, L.H., HEINIG, J.H., OESTERGAARD, S., OLESEN, J.** (1996) Histamine inhalation is a specific but insensitive laboratory test for migraine. *Cephalalgia.* **16**: 550–553.
- LATORRE-MORATALLA, M.L., BOVER-CID, S., BOSCH-FUSTÉ, J., VIDAL-CAROU, M.C.** (2012) Influence of technological conditions of sausage fermentation on the aminogenic activity of *L. curvatus* CTC273. *Food Microbiol.* **29**: 43–48.
- LEISINGER, T.** (1983) Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia.* **39**: 1183–1220.
- LEUSCHNER, R.G., HEIDEL, M., HAMMES, W.P.** (1998) Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 1–10.
- LEWINSON, O., LIVNAT-LEVANON, N.** (2017) Mechanism of action of ABC importers: conservation, divergence, and physiological adaptations. *J. Mol. Biol.* **429**: 606–619.
- LIMBURG, J., MURE, M., KLINMAN, J.P.** (2005) Cloning and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex*. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**: 8–22.
- LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ÁLVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M.** (2011) Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**: 691–703.
- 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.
- LOBOCKA, M., HENNIG, J., WILD, J., KŁOPOTOWSKI, T.** (1994) Organization and expression of the *Escherichia coli* K-12 *dad* operon encoding the smaller subunit of D-amino acid dehydrogenase and the catabolic alanine racemase. *J. Bacteriol.* **176**: 1500–1510.
- LOCHER, K.P.** (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**: 487–493.
- LONVAUD-FUNEL, A.** (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 9–13.

- LÓPEZ-SABATER, E.I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J., ROIG-SAGUES, A.X., MORA-VENTURA, M.T.** (1993) Determination of histamine in fish using an enzymic method. *Food Addit. Contam.* **10**: 593–602.
- 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.
- LUCAS, P.M., WOLKEN, W.A., CLAISSE, O., LOLKEMA, J.S., LONVAUD-FUNEL, A.** (2005) Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1417–1424.
- LUENGO, J.M., GARCÍA, J.L., OLIVERA, E.R.** (2001) The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Mol. Microbiol.* **39**: 1434–1442.
- MAHDY, A.M., WEBSTER, N.R.** (2014) Histamine and antihistamines. *Anaesth. Intensive Care Med.* **15**: 250–255.
- MAINTZ, L., NOVAK, N.** (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**: 1185–1196.
- MALDONADO, M., MAEYAMA, K.** (2015) The metabolism of histamine in rat hypothalamus and cortex after reserpine treatment. *Neurochem. Int.* **85–86**: 31–39.
- MALIK, M.S., PARK, E.S., SHIN, J.S.** (2012) Features and technical applications of ω -transaminases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1163–1171.
- MALMSTROM, B.G., ANDRÉASSON, L.E., REINHAMMAR, B.** (1975) Copper-containing oxidases and superoxide dismutase. In Boyer P. (ed.). *The Enzymes*. Vol. 12, pp. 507–579. Academic Press, New York.
- MARCOBAL, A., DE LAS RIVAS, B., LANDETE, J.M., TABERA, L., MUÑOZ, R.** (2012) Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **52**: 448–467.
- MARTÍN, M.C., FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., ÁLVAREZ, M.A.** (2005) Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology.* **151**: 1219–1228.
- 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.
- MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M.A., GARDINI, F., SUZZI, G.** (2000) Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 228–232.
- MASLINSKI, C., FOGEL, W.A.** (2012) Catabolism of histamine. In Uvnäs, B. (ed.). *Histamine and histamine antagonists*, pp 165-190. Springer-Verlag, Berlin.

- MASSON, F., TALON, R., MONTEL, M.C. (1996) Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **32**: 199–207.
- MATHEW, E., ZHI, J., FREUNDLICH, M. (1996) Lrp is a direct repressor of the *dad* operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 7234–7240.
- MATSUNAMI, H., OKAJIMA, T., HIROTA, S., YAMAGUCHI, H., HORI, H., MURE, M., 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.
- MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., YAMADA, M., ADACHI, O. (2002) Quinoproteins: structure, function and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 13–22.
- MATSUTANI, M., FUKUSHIMA, K., KAYAMA, C., ARIMITSU, M., HIRAKAWA, H., TOYAMA, H., ADACHI, O., YAKUSHI, T., MATSUSHITA, K. (2014). Replacement of a terminal cytochrome *c* oxidase by ubiquinol oxidase during the evolution of acetic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**: 1810–1820.
- MAXWELL, G.D., MOORE, M.M., HILDEBRAND, J.G. (1980) Metabolism of tyramine in the central nervous system of the moth *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **10**: 657–665.
- McGRATH, A.P., CARADOC-DAVIES, T., COLLYER, C.A., GUSS, J.M. (2010) Correlation of active site metal content in human diamine oxidase with trihydroxyphenylalanine quinone cofactor biogenesis. *Biochemistry.* **49**: 8316–8324.
- McINTIRE, W.S., HARTMANN, C. (1993) Copper-containing amine oxidases. In Davidson, V. (ed.). Principles and applications of quinoproteins, pp. 97-172. Marecl Dekker, New York.
- 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.
- MERICKEL, A., EDWARDS, R.H. (1995) Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. *Neuropharmacology.* **34**: 1543–1547.
- 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, NY.
- MIÑAMBRES, B., REGLERO, A., LUENGO, J.M. (1992) Characterization of an inducible transport system for glycerol in *Streptomyces clavuligerus*. Repression by L-serine. *J. Antibiot.* **45**: 269–277.
- MITOMA, C., UNDEFRIEND, S. (1960) Bacterial tryptophan decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* **37**: 356–357.
- MOFFAT, E.D., LYTLE, R.I. (1959) Polychromatic technique for the identification of amino acids on paper chromatograms. *Anal. Chem.* **31**: 926–928.

- MONDOVÌ, B., AGRÒ, A.F.** (1982) Structure and function of amine oxidases. In Bossa, F., Chiancone, E., Agrò, A.F., Strom. (eds). Structure and function relationships in biochemical systems, advances in experimental medicine and Biology, Vol 148, pp. 141–153. Springer, Boston.
- MONTEL, M.C., MASSON, F., TALON, R.** (1999) Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sci. Aliments*. **19**: 247–254.
- MONTES, J., FLORES, J., ALFONSO, B.E.** (2005) Histamina, receptores y antagonistas. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.* **68**: 104–109.
- MORALES, G., UGIDOS, A., ROJO, F.** (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb₃-1* terminal oxidases. *Environ. Microbiol.* **8**: 1764–1774.
- 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.
- MORII, H., KASAMA, K.** (2004) Activity of two histidine decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at different temperatures, pHs and NaCl concentrations. *J. Food Prot.* **67**: 1736–1742.
- 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.
- NAGANUMA, F., YOSHIKAWA, T., NAKAMURA, T., IIDA, T., HARADA, R., MOHSEN, A.S., MIURA, Y., YANAI, K.** (2014) Predominant role of plasma membrane monoamine transporters in monoamine transport in 1321N1, a human astrocytoma-derived cell line. *J. Neurochem.* **129**: 591–601.
- 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.
- NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G.C., BREMER, P.J., MEERDINK, G., MORTON, R.H.** (2012) Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chem.* **135**: 2650–2660.
- NARANG, D., TOMLINSON, S., HOLT, A., MOUSSEAU, D.D., BAKER, G.B.** (2011) Trace amines and their relevance to psychiatry and neurology: a brief overview. *Bull. Clin. Psychopharmacol.* **21**: 73–79.
- NARANJO, L., LAMAS-MACEIRAS, M., ULLAN, R.V., CAMPOY, S., TEIJEIRA, F., CASQUEIRO, J., MARTÍN, J.F.** (2005) Characterization of the *oat1* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding an ω -aminotransferase: induction by L-lysine, L-ornithine and L-arginine and repression by ammonium. *Mol. Genet. Genomics.* **274**: 283–294.
- 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., DÜSTERHÖFT, 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.
- NOMURA, C.T., PERSSON, S., SHEN, G., INOUE-SAKAMOTO, K., BRYANT, D.A. (2006) Characterization of two cytochrome oxidase operons in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: inactivation of *ctaDI* affects the PS I: PS II ratio. *Photosynth. Res.* **87**: 215–228.
- NORRANDER, J., KEMPE, T., MESSING, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene.* **26**: 101–106.
- NOUT, M.J.R. (1994) Fermented foods and food safety. *Food Res. Int.* **27**: 291–298.
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2003) Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.* **68**: 750–756.
- OGASAWARA, M., YAMAUCHI, K., SATOH, Y., YAMAJI, R., INUI, K., JONKER, J.W., SCHINKEL, A.H., MAEYAMA, K. (2006) Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J. Pharmacol. Sci.* **101**: 24–30.
- OIKAWA, T. (2006) Alanine, aspartate and asparagine metabolism in microorganisms. In Wendisch V.F. (ed.). Amino acid biosynthesis - pathways, regulation and metabolic engineering, Vol. 5, pp. 273–288. Springer, Berlin.
- 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., MUÑIZ, 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.* **95**: 6419–6424.
- OLIVIER, B. (2015) Serotonin: a never-ending story. *Eur. J. Pharmacol.* **753**: 2–18.
- ÖNAL, A. (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* **103**: 1475–1486.
- ÖNAL, A., TEKKELI, S.E.K., ÖNAL, C. (2013) A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* **138**: 509–515.

- ONO, K., OKAJIMA, T., TANI, M., KURODA, SUN, D., DAVIDSON, V.L., TANIZAWA, K.** (2006) Involvement of a putative [Fe-S]-cluster-binding protein in the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **281**: 13672–13684.
- ORDÓÑEZ, J.L., TRONCOSO, A.M., GARCÍA-PARRILLA, M.D.C., CALLEJÓN, R.M.** (2016) Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review. *Anal. Chim. Acta.* **939**: 10-25.
- OSTERMEIER, C., HARRENGA, A., ERMLER, U., MICHEL, H.** (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 10547–10553.
- OUBRIE, A., ROZEBOOM, H.J., KALK, K.H., HUIZINGA, E.G., DIJKSTRA, B.W.** (2002) Crystal structure of quinohemoprotein 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. *Ant. Leew.* **64**: 231–251.
- 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.
- PANULA, P., RINNE, J., KUOKKANEN, K., ERIKSSON, K.S., SALLMEN, T., KALIMO, H., RELJA, M.** (1997) Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* **82**: 993–997.
- PARSONS, S.M.** (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J.* **14**: 2423–2434.
- 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.* **85**: 2444–2448.
- PEÑA-GALLEGO, A., HERNÁNDEZ-ORTE, P., CACHO, J., FERREIRA, V.** (2012) High-performance liquid chromatography analysis of amines in must and wine: a review. *Food Rev. Int.* **28**: 71–96.
- PERALTA, G.H., BERGAMINI, C.V., HYNES, E.R.** (2016) Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Braz. J. Microbiol.* **47**: 741-748.
- PEREIRA, M.M., SANTANA, M., TEIXEIRA, M.** (2001) A novel scenario for the evolution of haem–copper oxygen reductases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**: 185–208.
- PEROZICH, J., NICHOLAS, H., WANG, B.C., LINDAHL, R., HEMPEL, J.** (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**: 137–146.

- PEROZICH, J., KUO, I., WANG, B.C., BOESCH, J.S., LINDAHL, R., HEMPEL, J.** (2000) Shifting the NAD/NADP preference in class 3 aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6197–6203.
- PIERCE, K.J., SALIFU, S.P., TANGNEY, M.** (2008) Gene cloning and characterization of a second alanine racemase from *Bacillus subtilis* encoded by *yncD*. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**: 69–74.
- PITCHER, R.S., WATMOUGH, N.J.** (2004) The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1655**: 388–399.
- POPIELSKI, L.** (1920) β -imidazolyläthylamin und die Organextrakte. *Pflüg. Arch. Für Gesamte Physiol. Menschen. Tiere.* **178**: 237–259.
- PRADENAS, J., GALARCE-BUSTOS, O., HENRÍQUEZ-AEDO, K., MUNDACA-URIBE, R., ARANDA, M.** (2016) Occurrence of biogenic amines in beers from Chilean market. *Food Control.* **70**: 138–144.
- PREISIG, O., ANTHAMATTEN, D., HENNECKE, H.** (1993) Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3309–3313.
- PREMONT, R.T., GAINETDINOV, R.R., CARON, M.G.** (2001) Following the trace of elusive amines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 9474–9475.
- PREUSS, C.V., WOOD, T.C., SZUMLANSKI, C.L., RAFTOGIANIS, R.B., OTTERNESS, D.M., GIRARD, B., SCOTT, M.C., WEINSHILBOUM, R.M.** (1998) Human histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: common genetic polymorphisms that alter activity. *Mol. Pharmacol.* **53**: 708–717.
- PROSHLYAKOV, D.A., PRESSLER, M.A., BABCOCK, G.T.** (1998). Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 8020–8025.
- QUANDT, J., HYNES, M.F.** (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene.* **127**: 15–21.
- RADKOV, A.D., MOE, L.A.** (2013) Amino acid racemization in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* **195**: 5016–5024.
- RAITERI, M., DEL CARMINE, R., BERTOLLINI, A., LEVI, G.** (1977) Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* **41**: 133–143.
- RAJ, S.M., RATHNASINGH, C., JUNG, W.C., SELVAKUMAR, E., PARK, S.** (2010) A novel NAD⁺-dependent aldehyde dehydrogenase encoded by the *puuC* gene of *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 that utilizes 3-hydroxypropionaldehyde as a substrate. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **15**: 131–138.
- RAMOS-JIMÉNEZ, J., GARDUÑO-TORRES, B., ARIAS-MONTAÑO, J.A.** (2009) Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev. Biomed.* **20**: 100–126.

- RAUSCH, C., LERCHNER, A., SCHIEFNER, A., SKERRA, A.** (2013) Crystal structure of the ω -aminotransferase from *Paracoccus denitrificans* and its phylogenetic relationship with other class III amino-transferases that have biotechnological potential. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **81**: 774–787.
- RECSEI, P.A., SNELL, E.E.** (1972) Histidine decarboxylaseless mutants of *Lactobacillus* 30a: isolation and growth properties. *J. Bacteriol.* **112**: 624–626.
- REDRUELLO, B., LADERO, V., DEL RÍO, B., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M.C., ÁLVAREZ, M.A.** (2017) A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chem.* **217**: 117–124.
- REIG, N., DEL RÍO, C., CASAGRANDE, F., RATERA, M., GELPÍ, J.L., TORRENTS, D., HENDERSON, P.J., XIE, H., BALDWIN, S.A., ZORZANO, A., FOTIADIS, D., PALACIN, M.** (2007) Functional and Structural Characterization of the first prokaryotic member of the L-amino acid transporter (LAT) family: a model for APC transporters. *J. Biol. Chem.* **282**: 13270–13281.
- REZNIKOFF, W.S.** (1993) The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 945–964.
- RICHARDSON, D.J.** (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology.* **146**: 551–571.
- 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.
- RILEY, J.F., WEST, G.B.** (1953) The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.* **120**: 528–537.
- RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B., REGLERO, A., LUENGO, J.M.** (1987) Uptake of N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli* K-235. Biochemical characterization of the transport system. *Biochem. J.* **246**: 287–294.
- ROIG-SAGUES, A.X., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., LÓPEZ-SABATER, E.I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J., MORA-VENTURA, M.T.** (1996) Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened salchichón, a Spanish cured sausage. *J. Food Prot.* **59**: 516–520.
- ROSINI, E., TONIN, F., VASYLIEVA, N., MARINESCO, S., POLLEGIONI, L.** (2014) Evolution of histamine oxidase activity for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 739–748.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.** (1989) *In* Molecular cloning: a laboratory manual, (2nd Ed) Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANDERS, C., TURKARSLAN, S., ONDER, O., FRAWLEY, E.R., KRANZ, R.G., KOCH, H.G., DALDAL, F.** (2008) Biogenesis of c-type cytochromes and cytochrome complexes. *In* Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. (eds.). The purple phototrophic bacteria, Vol. 28, pp. 407–423. Springer, Dordrecht.

- 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.** (1998) Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 227–230.
- SARKADI, L.S.** (2009) Biogenic amines. In Stadler, R.H., Lineback, D.R (eds.) Process-Induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks, pp. 321–361. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- SATO, T., HORIUCHI, T., NISHIMURA, I.** (2005) Simple and rapid determination of histamine in food using a new histamine dehydrogenase from *Rhizobium* sp. *Anal. Biochem.* **346**: 320–326.
- SATOH, A., ADACHI, O., TANIZAWA, K., HIROTSU, K.** (2003) The active site structure of quinohemoprotein amine dehydrogenase inhibited by p-nitrophenylhydrazine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1647**: 272–277.
- SATOMURA, T., SAKURABA, H., SUYE, S., OHSHIMA, T.** (2015) Dye-linked D-amino acid dehydrogenases: biochemical characteristics and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 9337–9347.
- SAURA, J., NADAL, E., VAN DEN BERG, B., VILA, M., BOMBI, J.A., MAHY, N.** (1996) Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* **59**: 1341–1349.
- SCHACHTER, J., PÉREZ, M.M., QUESADA-ALLUÉ, L.A.** (2007) The role of N- β -alanyldopamine synthase in the innate immune response of two insects. *J. Insect Physiol.* **53**: 1188–1197.
- 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.
- SCHAYER, R.W.** (1959) Catabolism of physiological quantities of histamine *in vivo*. *Physiol. Rev.* **39**: 116–126.
- SCHIRONE, M., VISCIANO, P., TOFALO, R., SUZZI, G.** (2016) Histamine Food Poisoning. In Hattori Y., Seifert R. (eds.). Histamine and histamine receptors in health and disease. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 241, pp. 217-235. Springer, Cham.
- SCHLEISSNER, C., OLIVERA, E.R., FERNÁNDEZ-VALVERDE, M., LUENGO, J.M.** (1994) Aerobic catabolism of phenylacetic acid in *Pseudomonas putida* U: biochemical characterization of a specific phenylacetic acid transport system and formal demonstration that phenylacetyl-coenzyme A is a catabolic intermediate. *J. Bacteriol.* **176**: 7667–7676.
- SCHNEIDER, E., HUNKE, S.** (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 1–20.

- SCHWARTZ, J.H.** (2001) Neurotransmitters. *In* Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (eds.). Principles of neuronal science, pp. 280-297. McGraw-Hill, New York.
- SCHWELBERGER, H.G., AHRENS, F., FOGEL, W.A., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.** (2013) Histamine metabolism. *In* Stark, H. (ed). Histamine H₄ receptor: a novel drug target in immunoregulatory and inflammatory diseases, Vol. 3, pp. 63–90. Versita, London.
- SEKIGUCHI, Y., MAKITA, H., YAMAMURA, A., MATSUMOTO, K.** (2004) A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *J. Biosci. Bioeng.* **97**: 104–110.
- SELVARAJ, G., IYER, V.N.** (1983) Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* **156**: 1292–1300.
- SHADEL, G.S., YOUNG, R., BALDWIN, T.O.** (1990) Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* **172**: 3980–3987.
- 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. *In* Shahid, M., Khardori, N., Khan, R.A., Tripathi, T. (eds.). Biomedical aspects of histamine: current perspectives, pp. 3–13. Springer-Verlag, Netherlands.
- SHAKILA, R.J., VASUNDHARA, T.S., KUMUDAVALLY, K.V.** (2001) A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chem.* **75**: 255–259.
- SHALABY, A.R.** (1994) Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chem.* **49**: 305–310.
- SHALABY, A.R.** (1995) Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem.* **52**: 367–372.
- SHALABY, A.R.** (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **29**: 675–690.
- SHIN, J.S., YUN, H., JANG, J.W., PARK, I., KIM, B.G.** (2003) Purification, characterization and molecular cloning of a novel amine: pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 463–471.
- SHORT, J.M., FERNÁNDEZ, J.M., SORGE, J.A., HUSE, W.D.** (1988) λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7583–7600.
- 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. *In* 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.
- STAHL, S.M.** (2016) Parkinson's disease psychosis as a serotonin-dopamine imbalance syndrome. *CNS Spectr.* **21**: 355–359.
- STEIN, C., WEINREICH, D.** (1983) Metabolism of histamine in the CNS of *Aplysia californica*: Cellular distribution of γ -glutamylhistamine synthetase. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **74**: 79–83.
- STEINHOFF, M., GRIFFITHS, C., CHURCH, M., LUGAR, T.A.** (2004) Histamine. In Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., Griffiths, C. (eds.). *Rook's textbook of dermatology*, Vol. 9, pp. 50–52. Blackwell Science, Oxford.
- STEINMETZ, C.G., XIE, P., WEINER, H., HURLEY, T.D.** (1997) Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure.* **5**: 701–711.
- STITES, T.E., MITCHELL, A.E., RUCKER, R.B.** (2000) Physiological importance of quinoenzymes and the *O*-quinone family of cofactors. *J. Nutr.* **130**: 719–727.
- 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.
- STOVER, C.K., PHAM, X.Q., ERWIN, A.L., MIZOGUCHI, S.D., WARRENER, P., HICKEY, M.J., BRINKMAN, F.S.L., HUFNAGLE, W.O., KOWALIK, D.J., LAGROU, GARBER, M.R., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L.L., COULTER, S.N., FOLGER, K.R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G.K., WU, Z., PAULSEN, I.T.** (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**: 959–964.
- STRATTON, J.E., HUTKINS, R.W., TAYLOR, S.L.** (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J. Food Prot.* **54**: 460–470.
- STRYCH, U., BENEDIK, M.J.** (2002) Mutant analysis shows that alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* are dimeric. *J. Bacteriol.* **184**: 4321–4325.
- STRYCH, U., HUANG, H.C., KRAUSE, K.L., BENEDIK, M.J.** (2000) Characterization of the alanine racemases from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr. Microbiol.* **41**: 290–294.
- STRYCH, U., PENLAND, R.L., JIMÉNEZ, M., KRAUSE, K.L., BENEDIK, M.J.** (2001) Characterization of the alanine racemases from two mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 93–98.
- SUBRAMANIAN, N.** (1978) Histamine degradative potential of ascorbic acid: considerations and evaluations. *Agents Actions.* **8**: 484–487.

- SUGINO, H., SASAKI, M., AZAKAMI, H., YAMASHITA, M., MUROOKA, Y.** (1992) A monoamine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the monoamine oxidase structural gene (*maoA*) and the *maoC* gene. *J. Bacteriol.* **174**: 2485–2492.
- SUN, S., TONEY, M.D.** (1999) Evidence for a two-base mechanism involving tyrosine-265 from arginine-219 mutants of alanine racemase. *Biochemistry.* **38**: 4058–4065.
- SUN, D., ONO, K., OKAJIMA, T., TANIZAWA, K., UCHIDA, M., YAMAMOTO, Y., MATHEWS, F.S., DAVIDSON, V.L.** (2003a) Chemical and kinetic reaction mechanisms of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* **42**: 10896–10903.
- SUN, X., YANG, X., WANG, E.** (2003b) Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A.* **1005**: 189–195.
- SUZZI, G., GARDINI, F.** (2003) Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 41–54.
- TABANELLI, G., TORRIANI, S., ROSSI, F., RIZZOTTI, L., GARDINI, F.** (2012) Effect of chemico-physical parameters on the histidine decarboxylase (HdcA) enzymatic activity in *Streptococcus thermophilus* PRI60. *J. Food Sci.* **77**: M231–M237.
- TABOR, H.** (1954) Metabolic studies on histidine, histamine, and related imidazoles. *Pharmacol. Rev.* **6**: 299–343.
- TABOR, H., MOSETTIG, E.** (1949) Isolation of acetylhistamine from urine following oral administration of histamine. *J. Biol. Chem.* **180**: 703–706.
- TAKAGI, K., TORIMURA, M., KAWAGUCHI, K., KANO, K., IKEDA, T.** (1999) Biochemical and electrochemical characterization of quinohemoprotein amine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry.* **38**: 6935–6942.
- TAPINGKAE, W., PARKIN, K.L., TANASUPAWAT, S., KRUEENATE, J., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W.** (2010) Whole cell immobilisation of *Natrinema gari* BCC 24369 for histamine degradation. *Food Chem.* **120**: 842–849.
- TARNOK, Z., TARNOK, I.** (1986) Histamine (HIS) degradation in microorganisms: imidazole ring splitting and formation of imidazolyl ethanol (IMET) and imidazolyl acetic acid (IMAC) in mycobacteria. *Agents Actions.* **18**: 34–37.
- 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., SUMNER, S.S.** (1986) Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In Kramer, D.E., Liston, J. (eds.). *Seafood quality determination*, Vol. 30, pp 235–245. Elsevier, Amsterdam.
- TAYLOR, S.L.** (1983) Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. In *mograph on histamine poisoning*. Codex alimentarius comission FAO/WHO, Rome, 19th session of the codex committee on food hygiene, Wahsington, DC.

- TAYLOR, S.L., STRATTON, J.E., NORDLEE, J.A.** (1989) Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **27**: 225–240.
- 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.
- TER BEEK, J., GUSKOV, A., SLOTBOOM, D.J.** (2014) Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* **143**: 419–435.
- THOMPSON, A.K., SMITH, D., GRAY, J., CARR, H.S., LIU, A., WINGE, D.R., HOSLER, J.P.** (2010) Mutagenic analysis of Cox11 of *Rhodobacter sphaeroides*: insights into the assembly of Cu_B of cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry.* **49**: 5651–5661.
- 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.
- TILIGADA, E., ZAMPELI, E., SANDER, K., STARK, H.** (2009) Histamine H₃ and H₄ receptors as novel drug targets. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **18**: 1519–1531.
- 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.
- TRIP, H., MULDER, N.L., RATTRAY, F.P., LOLKEMA, J.S.** (2011) HdcB, a novel enzyme catalysing maturation of pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase. *Mol. Microbiol.* **79**: 861–871.
- 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.
- UGIDOS, A., MORALES, G., RIAL, E., WILLIAMS, H.D., ROJO, F.** (2008) The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ. Microbiol.* **10**: 1690–1702.
- UNOARUMHI, Y., BLUMENTHAL, R.M., MATSON, J.S.** (2016) Evolution of a global regulator: Lrp in four orders of γ -Proteobacteria. *BMC Evol. Biol.* **16**: 111.
- URBACH, K.F.** (1949) Nature and probable origin of conjugated histamine excreted after ingestion of histamine. *Exp. Biol. Med.* **70**: 146–152.
- USUI, T., NAKAZAWA, A., OKURA, T., DEGUCHI, Y., AKANUMA, S., KUBO, Y., HOSOYA, K.** (2016) Histamine elimination from the cerebrospinal fluid across the blood–cerebrospinal fluid barrier: involvement of plasma membrane monoamine transporter (PMAT/SLC29A4). *J. Neurochem.* **139**: 408–418.

- VALE, S., GLÓRIA, M.B.A.** (1998) Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chem.* **63**: 343–348.
- VAN DYKE, K., WOODFORK, K.A.** (1998) Histamine and histamine antagonists. In Craig, C.R., Stitzel, R.E. (eds.). *Modern pharmacology with clinical applications*, Vol. 5, pp. 449–457. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 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., HACISALIHOGU, 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.
- VARANASI, L., MILLS, D., MURPHREE, A., GRAY, J., PURSER, C., BAKER, R., HOSLER, J.** (2006) Altering conserved lipid binding sites in cytochrome *c* oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* perturbs the interaction between subunits I and III and promotes suicide inactivation of the enzyme. *Biochemistry.* **45**: 14896–14907.
- VASTERMARK, A., WOLLWAGE, S., HOULE, M.E., RIO, R., SAIER, M.H.** (2014) Expansion of the APC superfamily of secondary carriers. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**: 2797–2811.
- VINCENZINI, M., GUERRINI, S., MANGANI, S., GRANCHI, L.** (2009) Amino acid metabolisms and production of biogenic amines and ethyl carbamate. In Helmut, K., Gottfried, U., Fröhlich, J. (eds.). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, pp. 167–180. Springer, Berlin.
- VOHORA, D., BHOWMIK, M.** (2012) Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. *Front. Syst. Neurosci.* **6**: 72.
- WANG, J.** (2016) The plasma membrane monoamine transporter (PMAT): Structure, function, and role in organic cation disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.* **100**: 489–499.
- WARD, J., WOHLGEMUTH, R.** (2010) High-yield biocatalytic amination reactions in organic synthesis. *Curr. Org. Chem.* **14**: 1914–1927.
- WASSERMAN, S.A., WALSH, C.T., BOTSTEIN, D.** (1983) Two alanine racemase genes in *Salmonella typhimurium* that differ in structure and function. *J. Bacteriol.* **153**: 1439–1450.
- WATANABE, A., YOSHIMURA, T., MIKAMI, B., ESAKI, N.** (1999) Tyrosine 265 of alanine racemase serves as a base abstracting α -hydrogen from L-alanine: the counterpart residue to lysine 39 specific to D-alanine. *J. Biochem.* **126**: 781–786.
- WATANABE, S., YAMADA, M., OHTSU, I., MAKINO, K.** (2007) α -Ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase isozymes involved in metabolic pathways of D-glucarate, D-galactarate, and hydroxy-L-proline. Molecular and metabolic convergent evolution. *J. Biol. Chem.* **282**: 6685–6695.

- WEI, C.I., CHEN, C.M., KOBURGER, J.A., OTWELL, W.S., MARSHALL, M.R.** (1990). Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci.* **55**: 59–63.
- WEINREICH, D.** (1979) γ -Glutamylhistamine: a major product of histamine metabolism in ganglia of the marine mollusk, *Aplysia californica*. *J. Neurochem.* **32**: 363–369.
- WERETILNYK, E.A., HANSON, A.D.** (1990) Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 2745–2749.
- WHITE, C.E., GAVINA, J., MORTON, R., BRITZ-MCKIBBIN, P., FINAN, T.M.** (2012) Control of hydroxyproline catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **85**: 1133–1147.
- WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M., SLATER, H., SIMPSON, N.J., SALMOND, G.P.** (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365–404.
- WIERENGA, R.K., TERPSTRA, P., HOL, W.G.** (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.* **80**: 726–730.
- WINDAUS, A., VOGT, W.** (1907) Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **40**: 3691–3695.
- WINSOR, G.L., VAN ROSSUM, T., LO, R., KHAIRA, B., WHITESIDE, M.D., HANCOCK, R.E., BRINKMAN, F.S.** (2009) *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **37**: D483–D488.
- WINSOR, G.L., LAM, D.K., FLEMING, L., LO, R., WHITESIDE, M.D., NANCY, Y.Y., HANCOCK, R.E., BRINKMAN, F.S.** (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* **39**: D596–D600.
- WITT, H., ZICKERMANN, V., LUDWIG, B.** (1995) Site-directed mutagenesis of cytochrome *c* oxidase reveals two acidic residues involved in the binding of cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1230**: 74–76.
- 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.
- YAMADA, H., ADACHI, O., OGATA, K.** (1965) Amine oxidases of microorganisms. Part II. Purification and crystallization of amine oxidases of *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 649–654.

- YAMAUCHI, K., SEKIZAWA, K., SUZUKI, H., NAKAZAWA, H., OHKAWARA, Y., KATAYOSE, D., OHTSU, H., TAMURA, G., SHIBAHARA, S., TAKEMURA, M.** (1994) Structure and function of human histamine N-methyltransferase: critical enzyme in histamine metabolism in airway. *Am. J. Physiol.* **267**: L342–L349.
- YAN, N.** (2013) Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* **38**: 151–159.
- YANG, X., LIU, C., ZHANG, J., HAN, H., WANG, X., LIU, Z., XU, Y.** (2015) Association of histamine N-methyltransferase Thr105Ile polymorphism with Parkinson's disease and schizophrenia in Han Chinese: a case-control study. *PloS One.* **10**: e0119692.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 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.
- YEN, M.R., CHOI, J., SAIER JR, M.H.** (2009) Bioinformatic analyses of transmembrane transport: novel software for deducing protein phylogeny, topology, and evolution. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 163–176.
- YONAHA, K., NISHIE, M., AIBARA, S.** (1992) The primary structure of ω -amino acid: pyruvate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 12506–12510.
- YOSHIKAWA, T., YANAI, K.** (2016) Histamine clearance through polyspecific transporters in the brain. In Hattori, Y., Seifert, R. (eds.). Histamine and histamine receptors in health and disease. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 241, pp. 173-187. Springer, Cham.
- YOSHIKAWA, T., NAGANUMA, F., IIDA, T., NAKAMURA, T., HARADA, R., MOHSEN, A.S., KASAJIMA, A., SASANO, H., YANAI, K.** (2013) Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. *Glia.* **61**: 905–916.
- YUN, H., LIM, S., CHO, B.K., KIM, B.G.** (2004) ω -Amino acid: pyruvate transaminase from *Alcaligenes denitrificans* Y2k-2: a new catalyst for kinetic resolution of β -amino acids and amines. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2529–2534.
- ZAMAN, M.Z., BAKAR, F.A., SELAMAT, J., BAKAR, J.A.** (2010) Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech J. Food Sci.* **28**: 440–449.
- ZAMPELI, E., TILIGADA, E.** (2009) The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.* **157**: 24–33.
- ZELLEKE, T., MARX, D.** (2016) Free-energy landscape and proton transfer pathways in oxidative deamination by methylamine dehydrogenase. *Chem. Phys. Chem.* **18**: 208-222.

ZHEN, Y., HOGANSON, C.W., BABCOCK, G.T., FERGUSON-MILLER, S. (1999) Definition of the interaction domain for cytochrome *c* on cytochrome *c* oxidase I. Biochemical, spectral, and kinetic characterization of surface mutants in subunit II of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome aa₃. *J. Biol. Chem.* **274**: 38032–38041.

ZHI, J., MATHEW, E., FREUNDLICH, M. (1999) Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly. *Mol. Microbiol.* **32**: 29–40.

ZHU, M.Y., JUORIO, A.V. (1995) Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role. *Gen. Pharmacol.* **26**: 681–696.

