

Biotecnología y genética de bacterias termófilas extremas

José Berenguer

Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» CSIC-Universidad Autónoma de Madrid



Foto de grupo. Miembros del grupo de Biotecnología y Genética de Bacterias Termófilas. De pie desde la izquierda: Leticia Torres, Eloy Ferreras, Marcos Almendros, José Berenguer, Carlos Brício, Esther Sanchez, Laura Alvarez, Jorge Perez. Sentados: Aurelio Hidalgo, Maria Luisa del Pozo, Alba Blesa.

Los organismos termófilos se han convertido en los últimos 20 años en modelos biológicos muy relevantes en distintos ámbitos de las Biociencias. Uno de tales aspectos es el aprovechamiento que de la estabilidad intrínseca de sus componentes se ha hecho para desarrollar aplicaciones biotecnológicas de enorme repercusión, como el proceso de amplificación de ADN que ha significado un salto extraordinario en nuestra capacidad de detección de la información genética en pruebas diagnósticas, forenses, y en todos los ámbitos de la Biología. Además, dada la asociación entre estabilidad térmica y resistencia a solventes orgánicos y detergentes, existe en la industria un gran interés por la utilización de estas enzimas en procesos de biocatálisis. Un segundo aspecto relevante viene dado por la mayor facilidad para cristalizar que tienen las proteínas y los grandes complejos biológicos de los termófilos. Gracias a ello, las primeras estructuras de alta resolución que se obtuvieron de los ribosomas, las máquinas que fabrican proteínas, o del denominado complejo respiratorio I, pieza fundamental para la respiración, fueron obtenidos a partir de bacterias termófilas. Por tanto, los organismos termófilos constituyen también excelentes modelos en Biología Estructural. Finalmente, los organismos termófilos que crecen a mayor

temperatura, son los más parecidos a los primeros seres vivos que habitaron este planeta. Aunque este aspecto es aún controvertido, la mayor parte de las comparaciones genéticas entre organismos señalan a los organismos termófilos como los más antiguos en la evolución, constituyendo su análisis una forma de viajar en el tiempo para descubrir cómo fueron los primeros habitantes de la tierra.

A pesar de este interés biológico y aplicado, la utilización de organismos termófilos como modelo se ve restringida por la dificultad que su cultivo presenta para un laboratorio. Mucho esfuerzo ha sido empleado por diversos laboratorios en el mundo para «domesticar» algunos de estos organismos. A pesar de ello, sólo se ha tenido éxito razonable con las arqueas *Sulfolobus* spp y *Thermococcus* spp, y la bacteria *Thermus thermophilus* (Cava *et al.*, 2009).

Nuestro grupo de investigación ha sido uno de los que ha participado en la domesticación y adaptación al laboratorio de *Thermus thermophilus*, y hoy en día constituye nuestro modelo principal de trabajo (Cava *et al.*, 2009). A diferencia de otras bacterias termófilas extremas, muchos aislados de *T. thermophilus* crecen rápidamente en el laboratorio, duplicando su población a 70°C cada 45 min en medios líquidos,

y formando colonias en placa en 24 horas. Además, la disponibilidad de un aparato de competencia natural muy eficiente nos ha permitido desarrollar un juego de herramientas genéticas completo que da acceso a su análisis fisiológico y funcional, e incluso a su utilización como factoría celular para la producción de proteínas (Hidalgo y Berenguer 2013).

Empleando este modelo, en nuestro laboratorio seguimos dos líneas de investigación paralelas. Por un lado, estudiamos el proceso de la desnitrificación presente en algunas cepas de *Thermus* spp y su regulación (Cava *et al*, 2008a), y la forma en que esta capacidad se transfiere horizontalmente, y por otro, desarrollamos aplicaciones biotecnológicas derivadas del organismo o de sus enzimas (Hidalgo y Berenguer 2013).

Por desnitrificación se conoce a un proceso en el que en vez de oxígeno se emplean óxidos de nitrógeno para quemar los nutrientes y obtener energía, eliminando de paso el nitrato del medio. Nuestro grupo ha descrito y caracterizado un conjunto de reductasas necesarias para respirar nitrato (Nar), nitrito (Nir) (Álvarez *et al*, 2014) y óxido nítrico (Nor) a alta temperatura, y hemos descubierto que los genes que las codifican se hallan integrados en una región del genoma fácilmente transferible a otras cepas de la misma especie (Álvarez *et al*, 2011). Entre los aspectos bioquímicos y funcionales más interesantes que hemos descrito se encuentra el hecho de que la Nar de *T. thermophilus*, además de reducir el nitrato, es capaz de actuar como transportador de electrones hacia la Nir y la Nor, algo que en organismos no termófilos es llevado a cabo por el complejo respiratorio III, al que la Nar sustituye en este papel (Cava *et al*, 2008b). Otros aspectos importantes han sido descritos para la Nor, que contiene una subunidad adicional de función desconocida (Bricio *et al*, 2014) y dispone de varias vías de entrada de protones desde el citoplasma (Schurig-Briccio *et al*, 2007). A nivel más genético nos intriga el mecanismo de transferencia de ADN por contacto directo célula-célula, pues no se parece a ninguno de los hasta ahora descritos (César *et al*, 2011). Es interesante destacar que durante su estudio comparado con el sistema de transformación natural hemos descubierto la existencia de una proteína parecida al Argonauta humano que protege a las células mediante un sistema único de interferencia ADN-ADN, el primero de este tipo que ha sido descrito, de la posible acción nociva de genes de origen desconocido adquiridos del medio ambiente (Swarts *et al*, 2014).

En una línea más aplicada, nuestros esfuerzos se han concentrado principalmente en dos aspectos. Por un lado, hemos desarrollado un procedimiento que permite la selección de formas termoestables de enzimas y proteínas procedentes de organismos no termófilos mediante interferencia de plegamiento (Chautard *et al*, 2007). Esta técnica consiste en expresar en nuestra bacteria modelo a alta temperatura fusiones entre la proteína a estabilizar y una proteína que confiera una propiedad detectable, como es la resistencia a un antibiótico. Normalmente, la proteína no estable plegará mal en estas condiciones e interferirá con el plegamiento del testigo, dando lugar a bacterias sensibles. Por el contrario, las variantes termoestables plegarán bien, no interferirán, y generarán clones resistentes. De esta forma hemos estabilizado desde proteínas terapéuticas

(Chautard *et al*, 2007) a enzimas de utilidad en biocatálisis. En el futuro inmediato y a través de proyectos de la UE y del MINECO, desarrollaremos versiones de alta capacidad de cribado de este método, empleando para ello variantes termoestables de proteínas fluorescentes que hemos desarrollado. Por otro lado, hemos utilizado enzimas procedentes de distintas cepas para su utilización en procesos de biocatálisis (Almendros *et al*, 2012; Rocha-Martín *et al*, 2011; Rocha-Martín *et al*, 2012; Torres *et al*, 2012; Torres *et al*, 2013).

BIBLIOGRAFÍA

- Almendros M, Berenguer J, Sinisterra JV. (2012). *Thermus thermophilus* nucleoside phosphorylases active in the synthesis of nucleoside analogues. *Appl Environ Microbiol* 78:3128-3135.
- Álvarez L, Bricio C, Hidalgo A, Berenguer J. (2014). Parallel pathways for nitrite reduction during anaerobic growth in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 196:1350-1358.
- Álvarez L, Bricio C, Gómez MJ, Berenguer J. (2011). Lateral transfer of the denitrification pathway genes among *Thermus thermophilus* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:1352-1358.
- Bricio C, Alvarez L, San Martín M, Schurig-Briccio LA, Gennis RB, Berenguer J. (2014). A Third Subunit in Ancestral Cytochrome c-Dependent Nitric Oxide Reductases. *Appl Environ Microbiol* 80:4871-4878.
- Cava F, Zafra O, Da Costa MS, Berenguer J. (2008a). The role of the nitrate respiration element of *Thermus thermophilus* in the control and activity of the denitrification apparatus. *Environ Microbiol* 10:522-533.
- Cava F, Zafra O, Berenguer J. (2008b). A cytochrome c containing nitrate reductase plays a role in electron transport for denitrification in *Thermus thermophilus* without involvement of the bc respiratory complex. *Mol Microbiol* 70:507-518.
- Cava F, Hidalgo A, Berenguer J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13:213-231.
- Hidalgo A, Berenguer J. (2013). Biotechnological applications of *Thermus thermophilus* as host. *Current Biotech* 2:304-312.
- César CE, Álvarez L, Bricio C, Van Heerden E, Littauer D, Berenguer J. (2011). Unconventional lateral gene transfer in extreme thermophilic bacteria. *Int Microbiol* 14:187-199.
- Chautard H, Blas-Galindo E, Menguy T, Grand'moursel L, Cava F, Berenguer J, Delcourt M. (2007). An activity-independent selection system of thermostable protein variants. *Nat Methods* 4:919-921.
- Rocha-Martín J, Vega D, Bolívar JM, Godoy CA, Hidalgo A, Berenguer J, Guisan JM, Lopez-Gallego F. (2011). New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD⁺-recycling enzyme. *BMC Biotechnol* 11:101.
- Rocha-Martín J, Vega D, Bolívar JM, Hidalgo A, Berenguer J, Guisan JM, Lopez-Gallego F. (2012). Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds. *Bioresour Technol* 103:343-350.
- Schurig-Briccio LA, Venkatakrishnan P, Hemp J, Bricio C, Berenguer J, Gennis RB. (2013). Characterization of the nitric oxide reductase from *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12613-12618.
- Swarts DC, Jore MM, Westra ER, Zhu Y, Janssen JH, Sniijders AP, Wang Y, Patel DJ, Berenguer J, Brouns SJ, Van Der Oost J. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* 507:258-261.
- Torres LL, Cantero A, Del Valle M, Marina A, Lopez-Gallego F, Guisan JM, Berenguer J, Hidalgo A. (2013). Engineering the substrate specificity of a thermophilic penicillin acylase from *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 79:1555-1562.
- Torres LL, Ferreras ER, Cantero A, Hidalgo A, Berenguer J. (2012). Functional expression of a penicillin acylase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB27 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 11:105-117.