



UNIVERSITAT
POLITÀCNICA
DE VALÈNCIA



Metabolismo del fosfato en bacterias lácticas y su implicación en la funcionalidad

Tesis doctoral presentada por: Daniela Corrales Benedetti

Dirigida por:

Dr. Manuel Zúñiga Cabrera

Dr. Vicente Monedero García

Valencia, noviembre 2024

Programa de Doctorado en Biotecnología

Departamento de Biotecnología

Universidad Politécnica de Valencia



Los Dres. Manuel Zúñiga Cabrera y Vicente Monedero García, ambos Científicos Titulares del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos,

HACEN CONSTAR QUE:

La Graduada en Microbiología Industrial y Máster en Investigación en Biología Molecular Celular y Genética Dña Daniela Corrales Benedetti ha realizado el trabajo que tiene por título **“Metabolismo del fosfato en bacterias lácticas y su implicación en la funcionalidad”**, que reúne los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Paterna, noviembre de 2024

Fdo.: Manuel Zúñiga Cabrera

Fdo.: Vicente Monedero García

Agradecimientos

Hacer el doctorado ha significado mucho más que una formación académica y profesional para mí; ha sido un viaje lleno de altibajos, pero también han sido de los mejores años de mi vida. Este camino no solo me ha brindado conocimientos, sino que también me ha convertido en la persona que soy hoy. Sin lugar a duda, hay una Daniela antes y después del doctorado.

Por ello, quiero agradecerme a mí misma por haber confiado en mí, por haber creído en mis sueños, incluso en los días más difíciles, y por seguir trabajando en ellos. Así que, cuando la Daniela del futuro lea esto, quiero que sepa lo inmensamente orgullosa que siento de todo lo que hemos logrado, y que nunca deje de creer en sí misma.

Este camino, sin embargo, no habría sido el mismo sin todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años, no solo durante los años del doctorado, sino desde que decidí tomar un avión y recorrer 8.000 km para comenzar una nueva vida en Valencia.

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis directores de tesis Vicente y Manolo, por abrirme las puertas de su laboratorio, no una, sino tres veces, y por haber hecho posible la realización de este trabajo. Siempre he dicho y seguiré diciendo que tuve mucha suerte de tenerlos como directores de tesis. Gracias por su presencia constante, por su dedicación y por todo lo que me han enseñado.

A Cristina, por todo su apoyo y por su entrega diaria en el laboratorio, además de su respaldo emocional cuando las cosas no salían como esperábamos.

Lola que ha sido mi angelito durante estos años. Gracias por ser tan buena conmigo, por dejarme abrazarte, aunque no te gusten los abrazos. Este camino no hubiera sido lo mismo sin ti, y sé que, donde quiera que la vida nos lleve, estaremos presentes en la vida de la otra.

A Diego y Kesha, quienes se han convertido en mi pequeña familia en Valencia. Gracias por estar siempre, y por saber que puedo contar con ustedes, al igual que ustedes conmigo.

A mis demás compañeros del laboratorio de lácticas, tanto a los que han estado durante un tiempo y los que llegaron este último año, a los que, sin ser del laboratorio los adoptamos: Jaime, Alex y Sefora. Gracias por los almuerzos y comidas que nos sacaba de la rutina diaria, donde hablábamos de todo un poco, en las que teníamos debates, desahogos, risas, lágrimas y momentos en los que algunos ejercíamos de psicólogos.

Como dije antes esta tesis no solo resume mis años de doctorado, sino también todo mi trayecto desde que decidí emigrar. Así que este camino no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mis padres, quienes siempre me han dicho que la mejor herencia que me pueden dejar es mi educación. Gracias por todo el esfuerzo que han hecho para sacarnos adelante a Jose y a mí. Por apoyarme a seguir mis sueños, aunque eso implicara estar al otro lado del mundo y coger un avión de 10 horas para poder verme.

A mi hermano, por ser siempre mi mayor motivación para seguir adelante y por alegrarme la vida.

A mis tíos y primos que han venido a visitarme durante estos años, por traerme un pedacito de Colombia en cada visita y por permitirme mostrarles Valencia.

A mis mejores amigas Mari y Mare, porque a pesar de la distancia siempre las he sentido cerca. Y a Mari, en especial, por diseñar la portada de esta tesis, llevando así una parte de ella.

A Guilia, quien se ha convertido en la hermana que Valencia me regaló. Gracias por tus palabras siempre acertadas, por darme calma y recordarme que todo estará bien.

A Claudia, Paula, Sofia, Esther y Cristina por enseñarme que, aunque la vida a veces nos pone a prueba, siempre habrá buenas personas que nos la hagan más llevadera. Gracias por ser un apoyo emocional durante estos últimos meses.

Por último, pero no menos importante, a mi gatita Mía, por llegar en el momento que más la necesitaba.

A todas y cada una de las personas que han sido parte de este camino, les doy las gracias de corazón. Y donde sea que me lleve la vida, siempre guardaré un lugar especial en mi corazón al IATA y al grupo de bacterias lácticas y probióticos.

Resumen

El metabolismo del fosfato (Pi) es crucial para todos los organismos vivos, tanto en términos energéticos como de biosíntesis. En bacterias lácticas (BAL), como *Lactocaseibacillus paracasei*, este proceso podría estar vinculado a algunas de sus funciones probióticas, como la retención de metales/metaloideos tóxicos, como el mercurio y el arsénico (As), y la síntesis de polifosfato (poli-P), una molécula de relevancia en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En distintos lactobacilos se han identificado genes (*pstSCAB*) que codifican un transportador ABC específico de Pi que podría ser el responsable de la acumulación de arsenato [As(V)], un análogo estructural del Pi. Estos genes se encuentran habitualmente adyacentes a un sistema de dos componentes (TCS) *phoP-phoR*, el cual regula el metabolismo del Pi en otras bacterias. Por otro lado, se ha descrito que la enzima poli-P quinasa (Ppk) es la responsable de la síntesis de poli-P, mientras que su degradación es llevada a cabo por la enzima exopolifosfatasa (Ppx). En *Lc. paracasei* BL23, el gen que codifica Ppk está agrupado con dos genes que codifican exopolifosfatasas con diferente composición de dominios, con el orden génico *ppx1-ppk-ppx2*, pero la función de estos genes *ppx* aún no ha sido explorada. El objetivo principal de esta tesis fue estudiar cómo el metabolismo del Pi y su regulación en lactobacilos afectan a la captación del metaloide As(V) y la producción de poli-P.

Con este fin, se evaluó el papel del transportador PtsSCAB y el TCS PhoPR de lactobacilos en la incorporación de especies inorgánicas de As. Para evaluar la posible contribución de este sistema a la incorporación de As se utilizaron mutantes de los genes *pstC* del transportador PstSCAB, del gen regulador del transporte de Pi *phoU* y del gen *phoP* del TCS PhoPR en la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* Lpp+, y en la cepa *Lp. plantarum* WCFS1. Además, se construyeron mutantes en estos genes en nuestra bacteria modelo del laboratorio, *Lc. paracasei* BL23, incluyendo un mutante en el gen *phoR* del TCS PhoPR. Estas cepas mutantes fueron cultivadas en diferentes concentraciones de As(V) y arsenito [As(III)], y se estudió su capacidad de incorporación de As y de crecimiento. Nuestros resultados demostraron que es probable que el As(V) sea captado por el sistema de transporte PstSCAB en *Lp. plantarum*. También hemos demostrado que la cepa de *Lc. paracasei* que carece de *phoP* mostró una mayor resistencia a As(III) sin presentar una detoxificación (oxidación) aparente de As(III) a As(V).

La inesperada resistencia a As(III) en la cepa Δ *phoP* de *Lc. paracasei* BL23 nos llevó a caracterizar el regulador transcripcional PhoP, con el fin de intentar dar respuesta a este fenotipo. Para ello, realizamos un análisis transcriptómico comparativo entre la cepa *Lc. paracasei* BL23 y el mutante deficiente en *phoP*. Los resultados obtenidos mediante RNA-seq revelaron que la ausencia de PhoP en *Lc. paracasei* BL23 conduce a efectos pleiotrópicos significativos, evidenciados por los cambios sustanciales en el transcriptoma. La unión de PhoP a los promotores de los genes *pstS* y *phnD*

Resumen

(utilización de fosfonatos) pudo demostrarse mediante ensayos de retardo en gel. A su vez, uno de los hallazgos más destacados fue la disminución en la expresión del gen *ackA* (acetato quinasa), que no parecía debida a una interacción de PhoP con el promotor de *ackA*. Esta observación nos decidió a construir un mutante en este gen, el cual presentó el mismo fenotipo de resistencia a As(III) que la cepa Δ *phoP*. Esto evidenció que el déficit en la expresión de la acetato quinasa es el causante de la resistencia a As(III) en el mutante *phoP*.

Por otro lado, con el fin de explorar en detalle los mecanismos implicados en la síntesis y degradación de poli-P en lactobacilos, especialmente las funciones de los genes que codifican para las exopolifosfatasa Ppx1 y Ppx2 en *Lc. paracasei* BL23, se obtuvieron mutantes en sus respectivos genes y se estudió su impacto en la síntesis de poli-P. Los resultados obtenidos mostraron que, al igual que ocurre en otras bacterias, la síntesis de poli-P en los lactobacilos está estrechamente regulada. Observamos también un fenotipo inesperado para la falta de Ppx1 en *Lc. paracasei* BL23, que presentó una ausencia total de síntesis de poli-P. Así, Ppx1 es necesaria para la producción *in vivo* de poli-P, lo cual difiere de lo descrito para mutantes *ppx* de *E. coli* o mutantes de otras especies bacterianas en las que se eliminó *ppx1* y/o *ppx2*. Los ensayos de las actividades catalíticas de Ppk, Ppx1 y Ppx2 y el análisis de las secuencias proteicas sugieren que Ppx1 podría no actuar como una exopolifosfatasa. Tras este resultado decidimos estudiar cómo una mutación en el residuo conservado Glu-112 en Ppx1 afectaba a la acumulación de poli-P en *Lc. paracasei* BL23. Esta mutación resultó en un incremento significativo en la síntesis de poli-P, indicando una función reguladora o catalítica para este residuo de la proteína.

Hemos demostrado también que la transición a la fase estacionaria y la posible limitación de nutrientes desencadenan la acumulación de poli-P. Analizamos cómo la variación de los niveles de poli-P influye en la supervivencia bacteriana durante la fase estacionaria. Demostramos que la supresión de un segundo gen (*ppk2*), que codifica una Ppk adicional identificada en el genoma de *Lc. paracasei* BL23, afecta negativamente a la supervivencia durante esta fase, lo que sugiere su papel en el metabolismo del poli-P en los lactobacilos.

En conjunto, estos hallazgos profundizan en la comprensión del metabolismo del Pi y del poli-P en *Lc. paracasei* BL23, lo que podría tener importantes implicaciones en el desarrollo de aplicaciones probióticas, especialmente en el contexto de la resistencia a metales tóxicos y la homeostasis intestinal.

Abstract

The metabolism of phosphate (Pi) is crucial for all living organisms, both in terms of energy and biosynthesis. In lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactiaseibacillus paracasei*, this process could be linked to some of their probiotic functions, such as the retention of toxic metals/metalloids like mercury and arsenic (As), and the synthesis of polyphosphate (poly-P), a molecule relevant to the maintenance of intestinal homeostasis. In various lactobacilli, genes (*pstSCAB*) have been identified that encode a Pi-specific ABC transporter, which could be responsible for the accumulation of arsenate [As(V)], a structural analog of Pi. These genes are typically found adjacent to a two-component system (TCS) *phoP-phoR*, which regulates Pi metabolism in other bacteria. On the other hand, the enzyme poly-P kinase (Ppk) is responsible for poly-P synthesis, while its degradation is carried out by the exopolyphosphatase enzyme (Ppx). In *Lc. paracasei* BL23, the gene encoding Ppk is grouped with two genes that encode exopolyphosphatases with different domain compositions, in the gene order *ppx1-ppk-ppx2*, but the function of these *ppx* genes has not been explored yet. The main objective of this thesis was to study how Pi metabolism and its regulation in lactobacilli affect the uptake of the metalloid As(V) and the production of poly-P.

To this end, the role of the PstSCAB transporter and the PhoPR TCS from lactobacilli in the incorporation of inorganic As species was evaluated. To assess the possible contribution of this system to As incorporation, mutants of the *pstC* genes from the PstSCAB transporter, the Pi transport regulator gene *phoU*, and the *phoP* gene of the PhoPR TCS were obtained in the strain *Lactiplantibacillus plantarum* Lpp+ and the strain *Lp. plantarum* WCFS1. Additionally, mutants were constructed in these genes in our laboratory model bacteria, *Lc. paracasei* BL23, including a mutant in the *phoR* gene of the PhoPR TCS. These mutant strains were grown in different concentrations of As(V) and arsenite [As(III)], and their capacity to incorporate As and their growth were studied. Our results showed that As(V) is likely taken up by the PstSCAB transport system in *Lp. plantarum*. We also demonstrated that the *Lc. paracasei* strain lacking *phoP* showed greater resistance to As(III) without exhibiting an apparent detoxification (oxidation) of As(III) to As(V).

The unexpected As(III) resistance in the Δ *phoP* strain of *Lc. paracasei* BL23 led us to characterize the transcriptional regulator PhoP to try to explain this phenotype. For this, we performed a comparative transcriptomic analysis between the *Lc. paracasei* BL23 strain and the *phoP*-deficient mutant. RNA-seq results revealed that the absence of PhoP in *Lc. paracasei* BL23 leads to significant pleiotropic effects, as evidenced by substantial changes in the transcriptome. The binding of PhoP to the promoters of the *pstS* and *phnD* genes (utilization of phosphonates) was demonstrated through gel shift assays. One of the most notable findings was the decreased expression of the *ackA* gene (acetate kinase), which did not appear to be

Abstract

due to an interaction of PhoP with the *ackA* promoter. This observation prompted us to construct a mutant in this gene, which exhibited the same As(III) resistance phenotype as the Δ *phoP* strain. This indicated that the lack of acetate kinase expression is the cause of As(III) resistance in the *phoP* mutant.

Furthermore, to explore in detail the mechanisms involved in the synthesis and degradation of poly-P in lactobacilli, especially the functions of the genes encoding the exopolyphosphatases Ppx1 and Ppx2 in *Lc. paracasei* BL23, mutants in their respective genes were obtained, and their impact on poly-P synthesis was studied. The results showed that, as in other bacteria, poly-P synthesis in lactobacilli is tightly regulated. We also observed an unexpected phenotype for the lack of Ppx1 in *Lc. paracasei* BL23, which resulted in a complete absence of poly-P synthesis. Thus, Ppx1 is necessary for the *in vivo* production of poly-P, which differs from what has been described for *ppx* mutants of *E. coli* or mutants of other bacterial species in which *ppx1* and/or *ppx2* were deleted. The catalytic activities of Ppk, Ppx1, and Ppx2 and the analysis of the protein sequences suggest that Ppx1 may not act as an exopolyphosphatase. Following this result, we decided to study how a mutation in the conserved residue Glu-112 in Ppx1 affected the accumulation of poly-P in *Lc. paracasei* BL23. This mutation resulted in a significant increase in poly-P synthesis, indicating a regulatory or catalytic function for this protein residue.

We also demonstrated that the transition to the stationary phase and potential nutrient limitation trigger poly-P accumulation. We analyzed how variations in poly-P levels influence bacterial survival during the stationary phase. We showed that the suppression of a second gene (*ppk2*), which encodes an additional Ppk identified in the *Lc. paracasei* BL23 genome, negatively affects survival during this phase, suggesting its role in poly-P metabolism in lactobacilli.

In conclusion, these findings deepen our understanding of Pi and poly-P metabolism in *Lc. paracasei* BL23, which could have important implications for the development of probiotic applications, especially in the context of resistance to toxic metals and intestinal homeostasis.

Resum

El metabolisme del fosfat (Pi) és crucial per a tots els organismes vius, tant en termes energètics com de biosíntesi. En bacteris làctics (BAL), com *Lactocaseibacillus paracasei*, aquest procés podria estar vinculat a algunes de les seues funcions probiòtiques, com la retenció de metalls/metaloides tòxics com el mercuri i l'arsènic (As), i la síntesi de polifosfat (poli-P), una molècula rellevant en el manteniment de la homeòstasi intestinal. En diversos lactobacils, s'han identificat gens (*pstSCAB*) que codifiquen un transportador ABC específic de Pi, que podria ser responsable de l'acumulació d'arsenat [As(V)], un anàleg estructural del Pi. Aquests gens es troben habitualment adjacents a un sistema de dos components (TCS) *phoP-phoR*, que regula el metabolisme del Pi en altres bacteris. Per altra banda, l'enzim poli-P quinasa (Ppk) és responsable de la síntesi de poli-P, mentre que la seua degradació es porta a terme per l'enzim exopolifosfatasa (Ppx). En *Lc. paracasei* BL23, el gen que codifica Ppk està agrupat amb dos gens que codifiquen exopolifosfatases amb diferent composició de dominis, en l'ordre gènic *ppx1-ppk-ppx2*, però la funció d'aquests gens *ppx* encara no ha estat explorada. L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser estudiar com el metabolisme del Pi i la seua regulació en lactobacils afecten la captació del metaloide As(V) i la producció de poli-P.

Per a això, es va avaluar el paper del transportador PstSCAB i el TCS PhoPR en lactobacils en la incorporació d'espècies inorgàniques d'As. Per avaluar la possible contribució d'aquest sistema a la incorporació d'As, es van utilitzar mutants dels gens *pstC* del transportador PstSCAB, del gen regulador del transport de Pi *phoU*, i del gen *phoP* del TCS PhoPR en la soca *Lactiplantibacillus plantarum* Lpp+ i en la soca *Lp. plantarum* WCFS1. A més, es van construir mutants en aquests gens en la nostra soca model de laboratori, *Lc. paracasei* BL23, incloent un mutant en el gen *phoR* del TCS PhoPR. Aquestes soques mutants es van cultivar en diferents concentracions d'As(V) i d'arsenit [As(III)], i es va estudiar la seua capacitat d'incorporació d'As i de creixement. Els nostres resultats van demostrar que probablement l'As(V) és captat pel sistema de transport PstSCAB en *Lp. plantarum*. També hem demostrat que la soca de *Lc. paracasei* que manca de *phoP* va mostrar una major resistència a As(III) sense presentar una detoxificació (oxidació) aparent de As(III) a As(V).

L'inesperada resistència a As(III) en la soca Δ *phoP* de *Lc. paracasei* BL23 ens va portar a caracteritzar el regulador transcripcional PhoP, amb l'objectiu de donar resposta a aquest fenotip. Per a això, vam realitzar una anàlisi transcriptòmica comparativa entre la soca *Lc. paracasei* BL23 i el mutant deficient en *phoP*. Els resultats obtinguts mitjançant RNA-seq van revelar que l'absència de PhoP en *Lc. paracasei* BL23 provoca efectes pleiotròpics significatius, evidenciats pels canvis substancials en el transcriptoma. La unió de PhoP als promotors dels gens *pstS* i *phnD* (utilització de fosfonats) es va poder demostrar mitjançant assajos de retard en gel. Un dels descobriments més destacats va ser la disminució en l'expressió del gen *ackA* (acetat

Resum

quinasa), que no semblava deure's a una interacció de PhoP amb el promotor de *ackA*. Aquesta observació ens va portar a construir un mutant en aquest gen, el qual va presentar el mateix fenotip de resistència a As(III) que la soca Δ *phoP*. Això va evidenciar que el dèficit en l'expressió de l'acetat quinasa és el causant de la resistència a As(III) en el mutant *phoP*.

D'altra banda, per a explorar en detall els mecanismes implicats en la síntesi i degradació de poli-P en lactobacils, especialment les funcions dels gens que codifiquen les exopolifosfatases Ppx1 i Ppx2 en *Lc. paracasei* BL23, es van obtenir mutants en els seus respectius gens i es va estudiar el seu impacte en la síntesi de poli-P. Els resultats obtinguts van mostrar que, igual que en altres bacteris, la síntesi de poli-P en els lactobacils està estretament regulada. També vam observar un fenotip inesperat per la manca de Ppx1 en *Lc. paracasei* BL23, que va presentar una absència total en la síntesi de poli-P. Així, Ppx1 és necessària per a la producció *in vivo* de poli-P, la qual cosa difereix del que s'ha descrit per a mutants *ppx* d'*E. coli* o mutants d'altres espècies bacterianes en què es va eliminar *ppx1* i/o *ppx2*. Els assajos de les activitats catalítiques de Ppk, Ppx1 i Ppx2 i l'anàlisi de les seqüències proteiques suggereixen que Ppx1 podria no actuar com una exopolifosfatasa. Després d'aquest resultat, vam decidir estudiar com una mutació en el residu conservat Glu-112 en Ppx1 afectava l'acumulació de poli-P en *Lc. paracasei* BL23. Aquesta mutació va resultar en un increment significatiu en la síntesi de poli-P, indicant una funció reguladora o catalítica per a aquest residu de la proteïna.

També hem demostrat que la transició a la fase estacionària i la possible limitació de nutrients desencadenen l'acumulació de poli-P. Vam analitzar com la variació dels nivells de poli-P influeix en la supervivència bacteriana durant la fase estacionària. Vam demostrar que la supressió d'un segon gen (*ppk2*), que codifica una Ppk addicional identificada en el genoma de *Lc. paracasei* BL23, afecta negativament la supervivència durant aquesta fase, la qual cosa suggereix el seu paper en el metabolisme del poli-P en els lactobacils.

En conjunt, aquests descobriments profunditzen en la comprensió del metabolisme del Pi i del poli-P en *Lc. paracasei* BL23, cosa que podria tindre importants implicacions en el desenvolupament d'aplicacions probiòtiques, especialment en el context de la resistència a metalls tòxics i la homeòstasi intestinal.

Índice general

Índice de Tablas.....	XIX
Índice de Figuras	XXI
Abreviaturas.....	XXV
Introducción	1
1. Bacterias del ácido láctico.....	3
1.1 Definición y clasificación	3
1.2 Fisiología de las BAL: rutas de degradación de azúcares.....	5
1.3 Hábitat y aplicaciones de las BAL	7
1.3.1 Uso en alimentos	7
1.3.2. Hábitat natural	8
1.3.3 Seguridad	9
2. Probióticos	9
2.1 Polifosfato como molécula probiótica	12
2.2 Uso de los probióticos para captación de metales	13
3. Metabolismo del fosfato en bacterias.....	16
3.1 Importancia del fosfato en bacterias.....	16
3.2 Sistemas de regulación por fosfato: regulón Pho	17
3.2.1 El sistema de dos componentes PhoBR de <i>Escherichia coli</i>	18
3.2.2. El transportador PstSCAB y PhoU.....	21
4. Síntesis de polifosfato en bacterias.....	24
4.1 Definición y origen	24
4.2 Enzimas involucradas en la síntesis de polifosfato	26
4.2.1 Polifosfato quinasa (Ppk; EC 2.7.4.1).....	27
4.2.2 Exopolifosfatasa (Ppx; EC 3.6.1.11)	29
4.3 Papel del poli-P en diversos procesos celulares	33
4.3.1 Poli-P como componente estructural.....	33
4.3.2 Poli-P como sustituto de ATP, fuente de energía y reservorio de Pi.....	34
4.3.3 Quelación de metales y protección contra el estrés oxidativo.....	34
4.3.4 Polifosfato actúa como una chaperona protectora de proteínas.....	35
4.3.5 Polifosfato en la regulación de la respuesta al estrés.....	36
4.3.6 Papel en la virulencia de patógenos.....	37
Objetivos	39
Capítulo 1	43
Metodología.....	46
1.Condiciones de cultivo bacteriano	46
2. Construcción de cepas mutantes en los genes <i>pst</i> y <i>pho</i>	46
4. Ensayos de toxicidad, incorporación y especiación de As	50
5.Análisis estadísticos.....	51
Resultados.....	52
1.Obtención de las cepas mutantes de <i>Lactobacillus</i>	52

Índice general

2. La mutación de los genes <i>pst</i> que codifican para los transportadores ABC de fosfato afecta a la absorción y toxicidad del As(V)	53
3. Las mutaciones en el TCS PhoPR provocan una mayor resistencia al As(III) en <i>Lc. paracasei</i>	57
4. No se observan diferencias en la oxidación de As(III) en los mutantes <i>phoP</i> o <i>phoR</i> de <i>Lc. paracasei</i>	59
Discusión	62
Conclusiones	65
Capítulo 2	67
Metodología	70
1. Condiciones de cultivo bacteriano	70
2. Clonaje, expresión y purificación de PhoP	70
3. Experimentos de expresión génica	73
4. Identificación de sitios putativos de unión a PhoP	74
5. Inactivación de los genes <i>phnD</i> y <i>ackA</i>	75
6. Ensayos de crecimiento en diferentes concentraciones de fosfato y toxicidad frente al As(III)	76
7. Fosforilación de PhoP	76
8. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)	77
Resultados	78
1. Expresión de los genes <i>pstSCAB1B2-phoU</i> en <i>Lc. paracasei</i> en condiciones de alto y bajo fosfato	78
2. Análisis del transcriptoma de <i>Lc. paracasei</i> y su mutante derivado Δ <i>phoP</i>	79
4. Análisis de la unión de PhoP a regiones promotoras de genes expresados diferencialmente en una cepa Δ <i>phoP</i>	85
5. Caracterización de genes candidatos para explicar la resistencia a As(III)	90
5.1 Un transportador putativo de fosfonato en el genoma de <i>Lc. paracasei</i> BL23	90
5.2 El déficit de acetato quinasa es el responsable de la resistencia a As(III) en un mutante Δ <i>phoP</i> de <i>Lc. paracasei</i>	91
Discusión	93
Conclusiones	99
Capítulo 3	101
Metodología	104
1. Condiciones de cultivo bacteriano	104
2. Construcción de cepas deficientes en <i>ppx1</i> y <i>ppx2</i>	105
3. Complementación de Δ <i>ppx1</i>	106
4. Aislamiento y cuantificación de Poli-P	107
5. Electroforesis y tinción de Poli-P	107
6. Determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR	107
7. Análisis filogenético de las proteínas Ppx1	108
8. Expresión y purificación de proteínas con cola de histidinas	108
9. Actividades enzimáticas	109

Resultados.....	110
1.La síntesis y degradación de poli-P están ligadas a la disponibilidad de fosfato y a la fase de crecimiento en <i>Lc. paracasei</i> BL23	110
2. La inactivación del gen <i>ppx1</i> que codifica una exopolifosfatasa putativa resulta en la ausencia de acumulación de poli-P	112
3. Ppx1 es esencial para la síntesis de poli-P en <i>Lc. paracasei</i>	115
4. Actividades exopolifosfatasa y poli-P quinasa de las enzimas de <i>Lc. paracasei</i> BL23.....	120
Discusión.....	122
Conclusiones.....	125
Capítulo 4	127
Metodología.....	130
1.Condiciones de cultivo bacteriano	130
2. Construcción de un mutante en el residuo catalítico de Ppx1 (Glu-112) y una cepa deficiente en <i>ppk2</i> utilizando el sistema CRISPR-Cas9 endógeno de <i>Lc. paracasei</i> BL23.	130
3.Acumulación de poli-P en cepas mutantes y silvestre bajo diferentes condiciones del cultivo	135
5.Determinación de la viabilidad.....	135
6.Supervivencia bajo diferentes condiciones de estrés.....	136
7. Análisis estadísticos	136
Resultados.....	137
1. <i>Lc. paracasei</i> acumula poli-P durante la entrada en la fase estacionaria.	137
2.El poli-P se acumula como respuesta a la falta de nutrientes	138
3.Una mutación en Glu-112 en la exopolifosfatasa Ppx1 resulta en una mayor acumulación de poli-P.	139
4. Una poli-P quinasa de tipo Ppk2 de <i>Lc. paracasei</i>	141
5. Efectos de los niveles de poli-P en la supervivencia bacteriana en la fase estacionaria	141
Discusión.....	145
Conclusiones	148
Conclusiones generales	151
Referencias bibliográficas.....	157
Anexos.....	181

Índice de Tablas

Tabla 1. Miembros del regulón Pho de <i>E. coli</i> MG1655 identificados por RNA-seq.	18
Tabla 2. Cepas de <i>Lp. plantarum</i> , <i>Lc. paracasei</i> y sus mutantes utilizados en este capítulo.....	46
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este capítulo.....	49
Tabla 4. Cepas de <i>Lacticaseibacillus</i> y plásmidos usados en este capítulo.	70
Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este capítulo.....	72
Tabla 6. Secuencias utilizadas para rastrear sitios PHO en <i>Lc. paracasei</i> BL23 con GLAM2.....	75
Tabla 7. Resumen de las lecturas brutas por muestra.	80
Tabla 8. Secuencias identificadas con GLAM2Scan utilizando el motivo derivado de cajas PHO presentes en <i>Bacillus</i>	86
Tabla 9. Secuencias identificadas con GLAM2Scan usando el motivo derivado de las regiones intergénicas de <i>pstS</i> , <i>glnA</i> y <i>phnD</i> en <i>Lc. paracasei</i> BL23.	89
Tabla 10. Cepas de <i>Lacticaseibacillus</i> y plásmidos usados en este capítulo. ...	104
Tabla 11. Oligonucleótidos usados en este capítulo.....	106
Tabla 12. Cepas de <i>Lacticaseibacillus</i> y plásmidos usados en este capítulo. ...	130
Tabla 13. Oligonucleótidos usados en este capítulo.....	132

Índice Figuras

Figura 1. Árbol filogenético de 336 cepas de *Lactobacillaceae* con *Carnobacterium maltaromaticum* como grupo externo 4

Figura 2. Rutas metabólicas para la producción de ácido láctico. 6

Figura 3. Representación esquemática de las rutas alternativas de degradación del piruvato presentes en BAL..... 7

Figura 4. Mecanismos de acción de los probióticos.. 10

Figura 5. Estructura de la pared de BAL y posibles procesos involucrados en la interacción con contaminantes químicos 14

Figura 6. Estructura predicha de PhoR.. 20

Figura 7. Modelo de unión de PhoB al ADN en *E. coli* según el trabajo de Bachhawat *et al.* (2005)..... 21

Figura 8. Ciclo del transportador PstSCAB..... 22

Figura 9. Modelo de transducción de señales transmembrana mediado por la concentración de Pi. 24

Figura 10. Molécula de polifosfato. 25

Figura 11. Micrografías electrónicas de *Lactocaseibacillus paracasei*. 26

Figura 12. Estructura de EcPPK1..... 27

Figura 13. Estructura 3D de Ppk2 de *P. aeruginosa*. 28

Figura 14. Principales reacciones enzimáticas llevadas por las diferentes polifosfato quinasa..... 29

Figura 15. Actividad exopolifosfatasa. 30

Figura 16. Modelo propuesto para la regulación de los niveles de poli-P en *E. coli* 31

Figura 17. Estructura de dominios de las enzimas Ppx y Ppx/GppA de *Aquifex aeolicus* (Ppx/GppA), *E. coli* (Ppx), *E. coli* (GppA), y *Helicobacter pylori* (Ppx/GppA)..... 32

Figura 18. Estructura del dímero Ppx de *E. coli*.. 33

Figura 19. El poli-P actúa como una chaperona para prevenir la agregación de proteínas oxidadas.. 36

Figura 20. Contexto genómico de los genes *pstSCAB* en miembros de la familia *Lactobacillaceae* 52

Índice Figuras

Figura 21. Incorporación de As(V) en cepas de <i>Lp. plantarum</i> y sus mutantes derivados afectados en los genes <i>pst</i> y <i>pho</i>	53
Figura 22. Curvas de crecimiento de <i>Lp. plantarum</i> WCFS1 y diferentes mutantes derivados en los genes <i>pstC</i> , y <i>pho</i> en medio MEI con diferentes cantidades de As(V)	54
Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>Lp. plantarum</i> WCFS1 y diferentes mutantes derivados de <i>pst</i> y <i>pho</i> en medio MEI-LP con diferentes cantidades de As(V)..	55
Figura 24. Crecimiento de las cepas <i>Lp. plantarum</i> Lpp+ y <i>Lc. paracasei</i> BL23, y sus mutantes derivados <i>pstC</i> , en medios MEI y MEI-LP con diferentes concentraciones de As.....	56
Figura 25. Halos de inhibición de As(III) en placas MEI (alto Pi) y LP-MEI (bajo Pi)	57
Figura 26. Curvas de crecimiento de <i>Lc. paracasei</i> BL23, mutantes <i>phoP</i> o <i>phoR</i> y sus cepas complementadas en medio MEI con diferentes cantidades de As(III).	58
Figura 27. Curvas de crecimiento de <i>Lp. plantarum</i> WCFS1 y su mutante <i>phoP</i> en medio MEI con diferentes cantidades de As(III).	59
Figura 28. Especiación de As inorgánico en pellets de células bacterianas de diferentes cepas de <i>Lc. paracasei</i>	61
Figura 29. Regiones intergénicas en 5' de los genes seleccionados para los ensayos de EMSA.	77
Figura 30. Análisis de la expresión de genes <i>pst</i> en <i>Lc. paracasei</i> BL23 y en la cepa Δ <i>phoP</i>	79
Figura 31. Número de lecturas brutas mapeadas por muestra.	80
Figura 32. Distribución de la densidad de lecturas para cada muestra.	81
Figura 33. Representación de los primeros dos componentes del ACP.	81
Figura 34. Análisis transcripcional de <i>Lc. paracasei</i> Δ <i>phoP</i> frente a la cepa silvestre.	82
Figura 35. Heat map (Z-score) de los genes diferencialmente expresados en el mutante Δ <i>phoP</i> de <i>Lc. paracasei</i> BL23	83
Figura 36. Análisis de enriquecimiento GSEA (<i>Gene Set Enrichment score Analysis</i>)	84
Figura 37. Mejor motivo conservado identificado con GLAM2 a partir de las secuencias listadas en la Tabla 6.	85

Figura 38. PhoP fosforilada se une a las regiones promotoras de algunos genes regulados por PhoP	87
Figura 39. Motivo conservado identificado con GLAM2 a partir de las regiones intergénicas aguas arriba de los genes de <i>Lc. paracasei</i> BL23 genes <i>pstS</i> , <i>glnA</i> y <i>phnD</i>	88
Figura 40. Curvas de crecimiento de <i>Lc. paracasei</i> BL23, mutantes <i>phnD</i> y Δ <i>phoP</i> en medio alto (MEI) y bajo (MEI-LP) Pi	91
Figura 41. Curvas de crecimiento de <i>Lc. paracasei</i> BL23, mutantes en <i>phnD</i> , <i>ackA</i> y <i>phoP</i> , en medio MEI con diferentes cantidades de As(III).	92
Figura 42. Vías catabólicas del piruvato que conducen a acetil-P, presentes en <i>Lc. paracasei</i> BL23	94
Figura 43. Análisis transcripcional del gen <i>ackA</i>	95
Figura 44. Alineación parcial de la secuencia de los genes <i>ackA</i> de <i>Lc. paracasei</i> y especies estrechamente relacionadas.	95
Figura 45. Acumulación de poli-P en <i>Lc. paracasei</i>	111
Figura 46. Expresión de los genes <i>ppk</i> y <i>ppx</i> . Expresión relativa (<i>fold-change</i>) de <i>ppk</i> , <i>ppx1</i> y <i>ppx2</i> en células de <i>Lc. paracasei</i> BL23	111
Figura 47. Cepas mutadas en el operón <i>ppx1-ppk-ppx2</i>	113
Figura 48. Efecto de las mutaciones <i>ppx</i> en la síntesis de poli-P.	114
Figura 49. Contribución de Ppx1 a la biosíntesis de Poli-P en <i>Lc. paracasei</i>	116
Figura 50. Representación esquemática de Ppx1 y Ppx2.	117
Figura 51. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las proteínas Ppx1 de especies seleccionadas del filo Bacillota.	119
Figura 52. Geles PAGE que muestran Ppx1 (57.3 kDa), Ppx2 (35.3 kDa) y Ppk (82.7 KDa) purificados de <i>Lc. paracasei</i> BL23	120
Figura 53. Actividad poli-P quinasa de <i>Lc. paracasei</i> Ppk.	121
Figura 54. Fragmentos de DNA sintetizados para expresar los sgARN para la edición por CRISPR-Cas en <i>Lc. paracasei</i> BL23.	133
Figura 55. Mutación puntual en el residuo catalítico de Ppx1 (Glu-112) y delección del gen <i>ppk2</i> usando el sistema CRISPR-Cas9 endógeno de tipo II en <i>L. paracasei</i> ATCC 27092.	134
Figura 56. Síntesis de Poli-P en <i>Lc. paracasei</i>	137

Índice Figuras

Figura 57. Cantidad de Poli-P en <i>Lc. paracasei</i> en experimentos de transferencia.	139
Figura 58. Cantidades de poli-P en diferentes cepas de <i>Lc. paracasei</i>	140
Figura 59. Cantidad de Poli-P en la cepa <i>Lc. paracasei ppx1E112A</i> en experimentos de transferencia.....	141
Figura 60. Supervivencia de células de <i>Lc. paracasei</i> a estrés por pH y temperatura	143
Figura 61. Supervivencia de diferentes cepas de <i>Lc. paracasei</i> durante la fase estacionaria.	144

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre
ACP	Análisis de Componentes Principales
Amp	Ampicilina
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
ASKHA	Motivo acetato y azúcar quinasa/Hsp70/actina
ATSDR	Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CA	Dominio catalítico
Cipro	Ciprofloxacina
Clo	Cloranfenicol
CoA	Coenzima A
CR	Región cargada
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2- fenilindol
DE	Dominio receptor (DR) C-terminal
DHp	Dominio de dimerización
DO	Densidad óptica
DR	Dominio receptor (DR) N-terminal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Eri	Eritromicina
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GDP	Guanosín difosfato
GRAS	Generally Recognized As Safe
GSEA	Gene Set Enrichment Score Analysis
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1- iletanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

Lista de abreviaturas

LB	Medio Luria-Bertani
MEI	Medio con alto fosfato
MEI-LP	Medio con bajo fosfato
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe
Mup	Mupirocina
NES	Normalized Enrichment Score
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PAS	Dominio PAS (Per-ARNT-Sim)
PEG	Polietilenglicol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Poli-P	Polifosfato
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
Ppk	Polifosfato quinasa
pppGpp	Guanosina pentafofosfato
Ppx	Exopolifosfatasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QPS	Qualified Presumption of Safety
Rifam	Rifampicina
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TCS	Two Component System
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido

Introducción

Introducción

1. Bacterias del ácido láctico

1.1 Definición y clasificación

Las bacterias del ácido láctico (BAL) han constituido históricamente un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas unidas por ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Orla-Jensen definió por primera vez el grupo como bacterias Gram-positivas, no esporuladas y no móviles, pudiendo adoptar formas de cocos o bastones, y que tenían la capacidad de catabolizar azúcares principalmente a ácido láctico (Orla-Jensen, 1919). El desarrollo posterior de técnicas bioquímicas permitió una definición más precisa del grupo: bacterias Gram-positivas que producen mayoritariamente ácido láctico a partir de la degradación de azúcares, generalmente catalasa negativas y carentes de citocromos, anaeróbicas o aerotolerantes (Vinderola Gabriel *et al.*, 2019). Además, toleran ambientes ácidos y suelen tener múltiples requerimientos nutricionales (Stiles and Holzapfel, 1997). Dentro de este grupo se incluían entonces principalmente lactobacilos y bifidobacterias. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de análisis filogenético puso de manifiesto que estos dos grupos de bacterias están evolutivamente muy distanciadas (Stiles and Holzapfel, 1997; Papadimitriou *et al.*, 2016).

Según la taxonomía actual, las BAL pertenecen al filo Bacillota (Firmicutes), clase Bacilli, orden Lactobacillales. El análisis filogenético indica que Lactobacillales constituye un grupo monofilético (Makarova *et al.*, 2006). Actualmente el orden incluye las familias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*. En el año 2020, se llevó a cabo una importante reorganización taxonómica de las BAL según la filogenia basada en el grupo de genes compartidos (core genome), los valores de identidad promedio de sus aminoácidos por pares (average amino acid identity), los genes característicos específicos de cada clado, criterios fisiológicos y la ecología de los organismos (Zheng *et al.*, 2020).

Basándose en estos parámetros, se propuso modificar la familia *Lactobacillaceae* para incluir todos los géneros que anteriormente se incluían en las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* (Zheng *et al.*, 2020). Asimismo, se propuso una reclasificación del género *Lactobacillus* en 25 géneros, que incluyo el género *Lactobacillus* modificado, y los nuevos géneros, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfeliella*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* y *Secundilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

Introducción

Actualmente la familia *Lactobacillaceae* está conformada por 34 géneros que incluyen los géneros anteriormente citados y los géneros *Convivina*, *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Nicoliella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Periweissella*, *Philodulcिलactobacillus* y *Weissella*. Desde el 2019 se han añadido más de 40 genomas que confirman que los *Lactobacillaceae* son monofiléticas, siempre y cuando se incluyan las antiguas *Leuconostocaceae* (Qiao *et al.*, 2022) (Figura1).

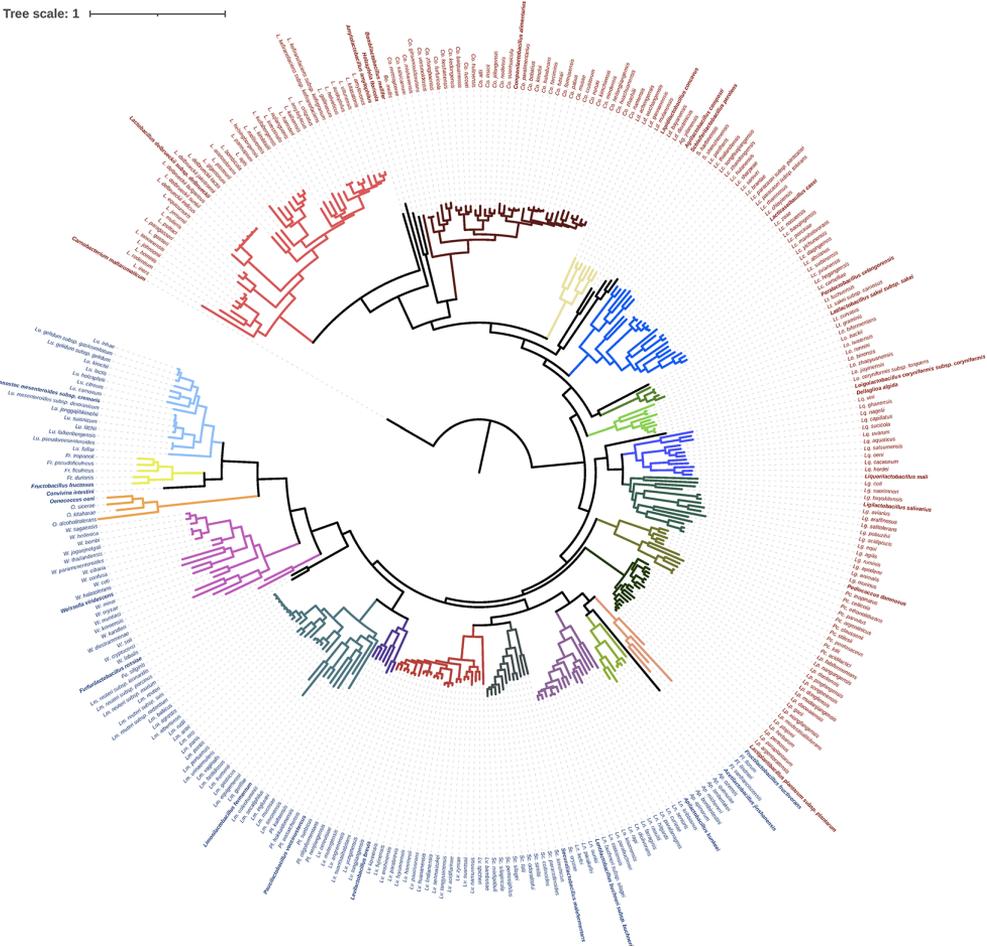


Figura 1. Árbol filogenético de 336 cepas de *Lactobacillaceae* con *Carnobacterium maltaromaticum* como grupo externo. Los colores de las ramas corresponden a los distintos géneros. Los nombres de las especies homofermentativas y heterofermentativas aparecen en rojo y azul, respectivamente. Imagen tomada de (Qiao *et al.*, 2022).

Las nuevas especies de *Lactobacillaceae* descritas con posterioridad siguiendo la clasificación propuesta por Zheng *et al.* (2020) coinciden con los rasgos ecológicos y metabólicos descritos para cada género. Por lo tanto, la propuesta de Zheng *et al.* (2020) ha facilitado la descripción de nuevos taxones dentro de la nueva familia de los *Lactobacillaceae*. Antes de 2020, era prácticamente imposible definir nuevos géneros dentro de la familia *Lactobacillaceae* porque implicaba la fragmentación del género *Lactobacillus* (Qiao *et al.*, 2022). Estos resultados han puesto de manifiesto una alta correlación entre los criterios taxonómicos establecidos y la adaptación a diferentes hospederos y las características metabólicas. Por ejemplo, el reexamen de la taxonomía de las especies del grupo *Lacticaseibacillus casei* (*Lc. casei*, *Lc. paracasei* y *Lc. rhamnosus*) mostró que las distintas especies podían ser distinguidas por la presencia de genes de tolerancia al estrés oxidativo específicos (Wuyts *et al.*, 2017). Este hecho subraya la importancia de considerar no solo las características morfológicas, sino también los aspectos genéticos y fisiológicos al definir la taxonomía de las BAL y, más ampliamente, de los microorganismos en general.

1.2 Fisiología de las BAL: rutas de degradación de azúcares

Como se ha señalado antes, las BAL se caracterizan por ser bacterias exclusivamente fermentadoras. Una de las pruebas clásicas para su clasificación se basaba en las vías metabólicas que usan para generar ácido láctico como producto final durante la fermentación de carbohidratos. Por lo tanto, las BAL se agrupaban en homofermentativas o heterofermentativas según sus productos finales durante la fermentación (Kandler, 1983). Esta prueba perdió sentido posteriormente debido a su falta de coherencia con los análisis filogenéticos. Sin embargo, la reorganización de las anteriores familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* y del género *Lactobacillus* ha puesto de manifiesto que las BAL heterofermentativas y homofermentativas de estas familias corresponden a grupos monofiléticos (Qiao *et al.*, 2022) (Figura 1).

Las BAL homofermentativas degradan las hexosas por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas convirtiendo una molécula de hexosa en dos moléculas de ácido láctico (Kandler, 1983) (Figura 2A). El enzima clave en esta ruta es la aldolasa que escinde la fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehído-3-P y dihidroxiacetona-P. Por su parte, las BAL heterofermentativas utilizan la vía de las pentosas fosfato, convirtiendo las hexosas en dióxido de carbono y xilulosa-5-P. Ésta es convertida en gliceraldehído-3-P y acetil-P por acción de la fosfocetolasa (Figura 2B). El acetil-P puede ser reducido a etanol para reoxidar el exceso de NADPH/NADH generado en las primeras etapas de la ruta, o directamente defosforilado a acetato, permitiendo así la síntesis de una molécula adicional de ATP (Gänzle, 2015) (Figura 2B).

Introducción

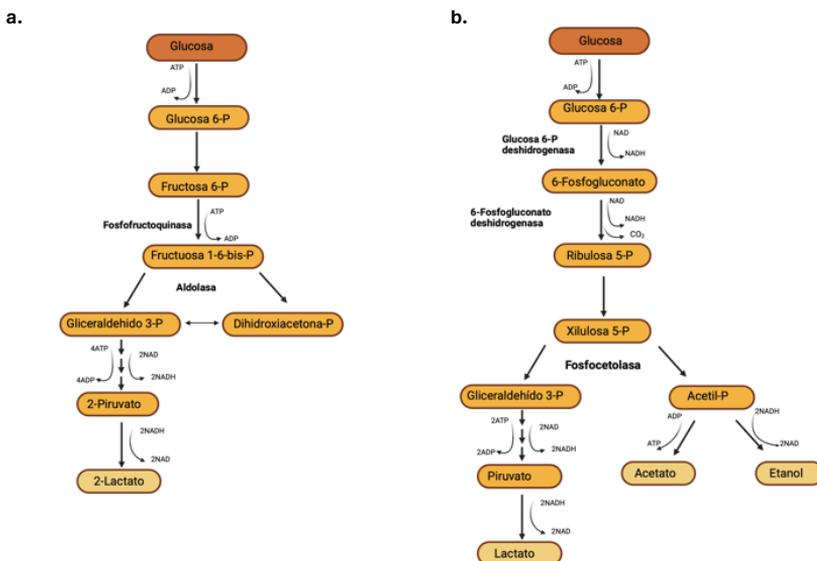


Figura 2. Rutas metabólicas para la producción de ácido láctico. **a.** Metabolismo homofermentativo por la vía de Embden -Meyerhoff; **b.** Metabolismo heterofermentativo por la vía de la fosfocetolasa.

Entre las BAL homofermentativas se puede distinguir dos grupos: homofermentativas estrictas y heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas estrictas carecen de la ruta de las pentosas fosfato, por lo que no pueden catabolizar pentosas, mientras que las heterofermentativas facultativas sí la poseen, pudiendo degradar las pentosas por esta ruta.

Además, de las reacciones descritas anteriormente, muchas BAL disponen de rutas alternativas de degradación del piruvato que se activan en condiciones ambientales específicas, tales como limitación de nutrientes, pH ácido extremo o alta disponibilidad de oxígeno [(Kandler, 1983); Figura 3]. Por ello, algunas BAL pueden alterar su perfil de productos de degradación de azúcares en función de las condiciones ambientales.

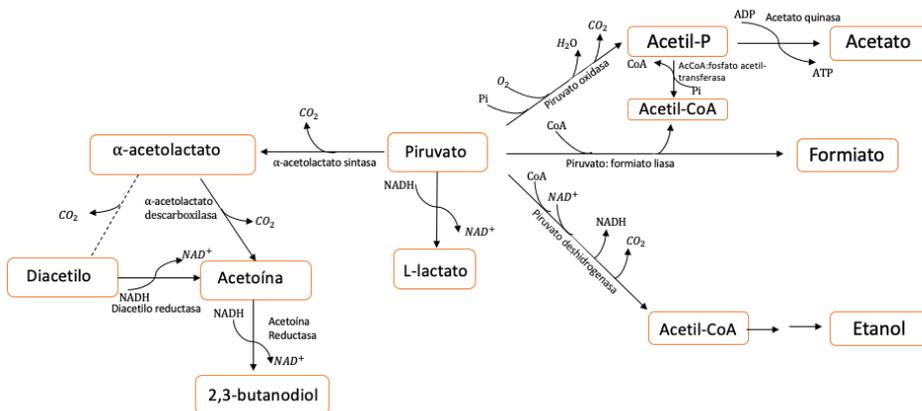


Figura 3. Representación esquemática de las rutas alternativas de degradación del piruvato presentes en BAL. La línea discontinua indica una reacción no enzimática.

1.3 Hábitat y aplicaciones de las BAL

1.3.1 Uso en alimentos

La característica más destacada de las BAL es su capacidad para generar ácido láctico como producto final durante la fermentación de carbohidratos. Esto crea un ambiente bacteriostático, y en algunos casos bactericida, para otras bacterias alterantes o patógenas. Además de la producción de ácido láctico, las BAL también generan metabolitos con actividad antimicrobiana, como las bacteriocinas, que juegan un papel crucial en este efecto. Estas actividades confieren a las BAL un importante papel en la preservación de alimentos y en la promoción de la salud mediante la inhibición del crecimiento de bacterias perjudiciales (Zapašnik, Sokołowska and Bryła, 2022).

Además, su actividad metabólica contribuye a la textura y aroma característicos de los productos fermentados. Gracias a esto, las BAL han sido tradicionalmente vinculadas con procesos de fermentación alimentaria. Desempeñan un papel esencial en la producción y conservación de una amplia gama de alimentos a nivel mundial, entre los cuales destacan los vegetales fermentados (como los pepinillos), las leches fermentadas (como el yogurt y los quesos), y las carnes fermentadas (como el salami) (National Research Council (U.S.). 1992).

Los humanos han utilizado la fermentación como método de transformar y prolongar la vida útil de muchos alimentos sin conocer la base microbiológica del proceso. Esto ha llevado a un proceso de selección inconsciente, hasta el desarrollo de la microbiología

Introducción

como ciencia, que ha sido de hecho un proceso de domesticación de muchas BAL asociadas a alimentos (Douglas and Klaenhammer, 2010).

La domesticación trajo consigo la pérdida de numerosos genes en el proceso de adaptación al ambiente rico en nutrientes proporcionado por los alimentos y la ganancia de funciones valiosas desde el punto de vista tecnológico. Este proceso ha conducido también a la evolución de especies de BAL adaptadas a nichos específicos, como por ejemplo *Oenococcus oeni*, esencialmente asociado al vino y la sidra (Lorentzen and Lucas, 2019).

1.3.2. Hábitat natural

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, generalmente, en hábitats ricos en nutrientes tales como alimentos, como se ha señalado antes, y materia vegetal en descomposición. Asimismo, son componentes habituales de la microbiota asociada a plantas (Yu, Leveau and Marco, 2020) y animales (Gatesoupe, 2007; Pessione, 2012; George *et al.*, 2018). En años recientes, se han aislado algunas especies de *Apilactobacillus* y *Bombilactobacillus* en insectos, como las abejas (Kang *et al.*, 2021; Saccà and Manici, 2021; Oliphant *et al.*, 2022).

En algunos casos, se ha demostrado una relación mutualista entre BAL y sus hospedadores. Por ejemplo, en mujeres con una microbiota vaginal saludable, las BAL constituyen entre el 70 y 90% de las bacterias presentes, siendo las especies de *Lactobacillus* (e.g. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*) las más dominantes. Estas contribuyen a crear un ambiente ácido en la vagina, que actúa como una barrera protectora contra patógenos e infecciones (Miller *et al.*, 2016). Otro aspecto importante es que las BAL, en particular especies de lactobacilos, colonizan a los bebés recién nacidos durante la lactancia con leche materna (Martín *et al.*, 2003; Pessione, 2012; Rodríguez, Fernández and Verhasselt, 2021).

De las más de 200 especies conocidas del antiguo género *Lactobacillus*, sólo unas pocas han sido asociadas de forma constante y repetida con el tracto gastrointestinal humano. Sin embargo, recientemente, este número ha aumentado, y se han detectado más de 50 especies de lactobacilos en las heces de voluntarios sanos, de manera repetida. Entre estas especies las más representadas son *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Ligilactobacillus murinus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Ligilactobacillus ruminis*. Algunas de estas especies como *Lc. rhamnosus* y *Li. murinus* rara vez se han aislado de entornos ajenos al intestino, por lo que son consideradas como microorganismos autóctonos del intestino (Rossi *et al.*, 2016).

1.3.3 Seguridad

Muchas de las BAL asociadas a fermentaciones de alimentos son consideradas microorganismos seguros GRAS (Generally Regarded as Safe), o QPS (Qualified presumption of Safety), según la legislación europea. Además, son reconocidas por ser beneficiosas, e incluso algunas cepas son conocidas como bacterias promotoras de la salud, es decir, probióticos, término del cual hablaremos más adelante. La mayoría de BAL consideradas seguras pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*, así como *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* (Koutsoumanis *et al.*, 2024).

Sin embargo, otras BAL pueden ser patógenas o alterantes de los alimentos. La mayoría de las BAL patógenas pertenecen a las familias *Aerococcaceae* (Rasmussen, 2016) *Enterococcaceae* (Krawczyk *et al.*, 2021) y *Streptococcaceae* (Brouwer *et al.*, 2023). Algunas BAL pueden alterar los alimentos como consecuencia de su metabolismo, produciendo compuestos que alteran el sabor y aromas característicos del producto, o compuestos que tienen un efecto nocivo para el consumidor. Por ejemplo, la proliferación de BAL en cervezas provoca turbidez, acidez y aromas extraños. Las bacterias más comunes implicadas en estas alteraciones son *Pediococcus damnosus* y *Levilactobacillus brevis* (Ciont *et al.*, 2022). La producción de aminas biogénicas por BAL es otro problema que afecta a muchos tipos de alimentos fermentados (del Rio *et al.*, 2024).

2. Probióticos

Como se indicó previamente, algunas BAL son reconocidas como microorganismos seguros. Además, se ha descrito que algunas de estas BAL ejercen un efecto beneficioso para la salud del consumidor, considerándose como probióticos. El término "probiótico" fue definido originalmente en 1965 por Lilly y Stillwell como "sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos" (Lilly and Stillwell, 1965). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) proporcionaron una definición más precisa del término, definiéndolo, como "Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas otorgan un beneficio en la salud del huésped" (FAO/WHO,2002). La International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics estableció más tarde un consenso por el cual se mantenía esta definición incidiendo en que a pesar de que cualquier cepa de una especie para la cual se hayan mostrado cualidades probióticas puede denominarse probiótico, cualquier alegación específica de salud debe de basarse en evidencia clínica (Hill *et al.*, 2014).

Estudios realizados en humanos y modelos animales, han demostrado distintos mecanismos celulares y moleculares de acción de los probióticos. Entre estos

Introducción

mecanismos se incluyen, el bloqueo de la actividad de patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas, la competencia por la unión a las células epiteliales y sobre todo, la regulación de las respuestas inmunitarias mediante la inhibición de las respuestas proinflamatorias y la mejora de la inmunidad antiinflamatoria (Yan and Polk, 2020). Además, los probióticos pueden contribuir al mantenimiento de la homeostasis intestinal al fortalecer la función de barrera, estimular la producción de moco, favorecer la supervivencia celular, activar respuestas citoprotectoras e inhibir citoquinas proinflamatorias. También se ha observado que los probióticos desempeñan un papel en la regulación del eje intestino-cerebro mediante la producción de neurotransmisores (Yan and Polk, 2020) (Figura 4).

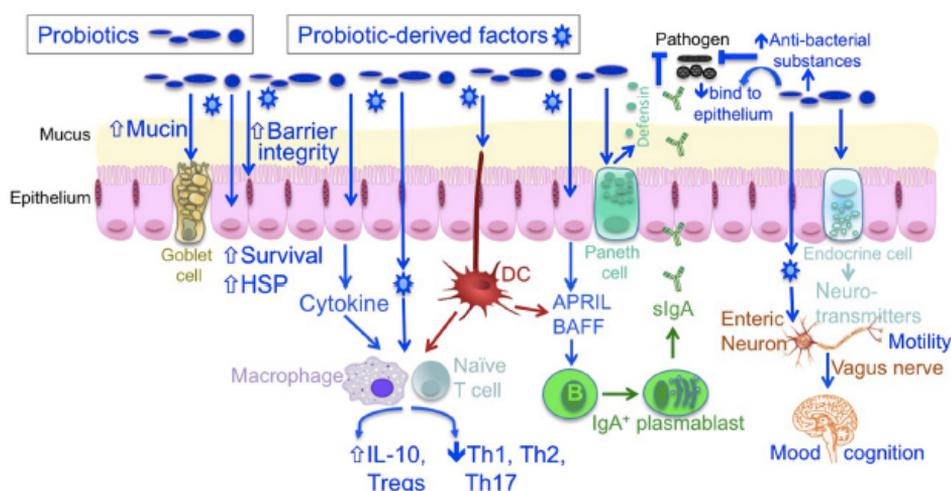


Figura 4. Mecanismos de acción de los probióticos. Los probióticos contribuyen al mantenimiento de la homeostasis, a la prevención y tratamiento de enfermedades en el huésped. Imagen tomada de (Yan and Polk, 2020).

Es por eso que los probióticos han ganado un gran interés en los últimos años, debido a su capacidad para promover la salud intestinal, tanto de humanos como de animales. Se sabe, que la microbiota desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas intestinales (Kim et al., 2019). Sin embargo, la microbiota intestinal puede ser alterada por diversos factores como el estilo de vida, la dieta y el uso de antibióticos. Por esta razón, los probióticos se utilizan actualmente para tratar y prevenir algunos trastornos intestinales, como la diarrea asociada a los antibióticos (Ouweland *et al.*, 2014), síndrome del intestino irritable (Principi *et al.*, 2018) u obesidad, entre otros (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016).

Adicional a esto, en los últimos años se ha propuesto su uso en el tratamiento y la prevención de un amplio rango de trastornos, no limitándose únicamente al ámbito intestinal. Se ha observado que los probióticos tienen la capacidad de modular el eje intestino-cerebro, lo que ha generado gran expectativa sobre su posible utilidad en el tratamiento de trastornos psiquiátricos como la depresión, el trastorno bipolar y la esquizofrenia. Sin embargo, las evidencias disponibles hasta el momento no son suficientes para determinar el papel exacto de los probióticos en el tratamiento de estos trastornos. A pesar de ello, varios estudios han señalado mejoras en el perfil inmune e inflamatorio como posibles mecanismos de acción terapéutica (Ribera *et al.*, 2024).

Igualmente se ha visto que son capaces también de modular el eje intestino-piel, mejorando síntomas de condiciones dermatológicas en las que se incluyen la rosácea, psoriasis, el acné, la dermatitis atópica y heridas cutáneas, entre otras (Sinha, Lin and Ferenczi, 2021). Como se mencionó anteriormente, las BAL constituyen un gran porcentaje de las bacterias presentes en la vagina, siendo las especies de la familia *Lactobacillaceae* las más abundantes. Debido a esto, los probióticos de este grupo han ganado un gran interés en el mantenimiento del microambiente vaginal. Se ha visto que estos se adhieren al epitelio vaginal y pueden competir con la colonización de patógenos. Además, los metabolitos producidos por estos microorganismos, como el ácido láctico y el peróxido de hidrógeno, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y mantener el pH vaginal bajo (Mei and Li, 2022).

Un interesante posible mecanismo de acción de los probióticos es que podrían ser capaces de activar el sistema inmunitario inhibiendo la proliferación de tumores malignos mediante la secreción de varios metabolitos potencialmente antitumorales como polisacáridos fosforilados, peptidoglicanos y exopolisacáridos (Pourmollaei *et al.*, 2020). Igualmente, se ha visto que mejoran el proceso inmunitario del organismo, promoviendo la producción de citoquinas e inhibiendo la proliferación de monocitos (Mei and Li, 2022), por lo cual se han postulado como alternativa de tratamiento para algunos cánceres, como el cáncer de cuello uterino. Estudios recientes llevado a cabo por Li *et al.* (2017) sugieren que los *Lactobacillus* tienen el potencial de inhibir la capacidad migratoria de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino, lo cual puede estar estrechamente relacionado con la regulación de la cadherina-E (Li *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios disponibles son pequeños y con diferentes enfoques metodológicos, por lo que se carece de pruebas de alta calidad que respalden su uso. Por lo tanto, la recomendación de probióticos, prebióticos u otros suplementos de venta libre para la prevención de los cánceres ginecológicos requiere estudios más amplios y bien diseñados (Mitra *et al.*, 2023).

Las bacterias probióticas concentradas utilizadas en la alimentación animal y consumidas por los seres humanos suelen presentarse en forma de biomasa desecada. Los preparados probióticos se presentan en cápsulas, suspensiones, polvos y combinados en alimentos probióticos (Kieps and Dembczyński, 2022). La dosis necesaria de probióticos varía según la cepa y el producto. Aunque muchos productos de venta

Introducción

libre suministran entre 10^9 - 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC)/dosis, se ha demostrado que algunos productos son eficaces a niveles inferiores, mientras que otros requieren una dosis considerablemente superior (World Gastroenterology Organisation, 2023).

Es importante que para ser eficaces, las cepas seleccionadas para estas formulaciones cumplan ciertas características; como la capacidad de sobrevivir y ser metabólicamente activas en el entorno intestinal, resistir el bajo pH del estómago, los ácidos orgánicos, ácidos biliares y enzimas presentes en los intestinos. También deben ejercer un efecto beneficioso para el huésped, no ser patógenas y ser estables en condiciones de almacenamiento (Fuller, 1989).

En resumen, los probióticos han captado un gran interés debido a su potencial capacidad de mejorar la salud intestinal al influir en la microbiota intestinal. Además, se han explorado sus efectos más allá del ámbito intestinal, como en el eje Intestino-cerebro y el eje intestino-piel. Asimismo, se han estudiado por su capacidad para modular el sistema inmunitario para el tratamiento de cánceres, como el cáncer de cuello uterino. Sin embargo, aún se requieren más evidencias para confirmar y establecer su eficacia en estas nuevas aplicaciones.

2.1 Polifosfato como molécula probiótica

La preservación de un equilibrio adecuado, conocido como homeostasis, de la población microbiana en el intestino es esencial para que la microbiota y el huésped puedan coexistir en una relación de beneficio mutuo (Kim *et al.*, 2019). Diversas moléculas secretadas tanto por el huésped como por la microbiota residente median este proceso (Mathur, Beresford and Cotter, 2020; Abdul Hakim, Xuan and Oslan, 2023). Dentro de estas moléculas se encuentra el polifosfato (poli-P), un polímero lineal de residuos de fosfato inorgánico (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía. Esta molécula está presente de manera ubicua en distintos organismos, incluyendo arqueas, bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos (Ault-Riché *et al.*, 1998). En el apartado 4 se revisará con mayor detalle su síntesis y papel fisiológico.

El poli-P fue inicialmente propuesto como el agente responsable de la actividad probiótica exhibida por *Lv. brevis* SBC8803 por Segawa *et al.* (2011). En dicho estudio, se concluyó que el poli-P es reconocido por la integrina intestinal $\beta 1$, activando la vía p38MAPK, induciendo factores citoprotectores como la proteína de choque térmico HSP27. Este mecanismo contribuye a mejorar la función barrera y a mitigar las lesiones intestinales en un modelo murino de colitis (Segawa *et al.*, 2011).

Igualmente, otros estudios han respaldado las afirmaciones anteriores. Entre ellos destacan los realizados por Saiki *et al.* (2016) con *Lc. paracasei* JCM 1163. En este estudio, se observó que el poli-P sintetizado por esta cepa inhibía la permeabilidad

intestinal inducida por oxidantes en el intestino de ratón (Saiki *et al.*, 2016). Además, Tanaka *et al.* (2015) demostraron que poli-P aislado de *Lv. brevis* era captado en la membrana plasmática a través de la integrina $\beta 1$ en células Caco2/bbe. Esto fue observado mediante la inhibición de la producción de la integrina $\beta 1$, que condujo a una reducción de la absorción del poli-P. Asimismo, la inhibición de la caveolina-1 suprimió la función del poli-P, incluida la actividad de la proteína de choque térmico HSP27 (Tanaka *et al.*, 2015).

2.2 Uso de los probióticos para captación de metales

En la actualidad, los metales pesados y metaloides son considerados como un factor importante de la contaminación ambiental, generando graves consecuencias en la salud humana. Esta problemática se atribuye en gran medida a la rápida industrialización y al aumento de la población mundial. El principal problema se deriva de su descarga en aguas y acumulación en ecosistemas acuáticos, convirtiendo al agua y los alimentos en las vías principales de contaminación por estas sustancias tóxicas en los seres humanos. Los animales acuáticos, especialmente los peces, son las principales fuentes de contaminación. Esta exposición se ha relacionado con varios mecanismos de toxicidad, como daño oxidativo, degradación del ADN, inmunidad aberrante y la formación de tumores (Balali-Mood *et al.*, 2021). Aunque algunos metales pesados como hierro (Fe), cobre (Cu) y zinc (Zn) son oligoelementos esenciales, otros como cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg) y el metaloide arsénico (As) son tóxicos incluso en trazas (Tchounwou *et al.*, 2012).

Algunas BAL tienen una notable capacidad de absorción de metales pesados. Se ha propuesto que estos tóxicos se unen principalmente a la superficie bacteriana por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, es decir, a través de bioadsorción. Esto es debido a que su superficie está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, ácidos teicoicos, proteínas y polisacáridos. Algunas cepas también secretan exopolisacáridos que forman una capa amorfa (cápsula) fuera del peptidoglicano de la pared celular (Lahtinen *et al.*, 2004). Estas estructuras contienen varios grupos cargados negativamente capaces de unir cationes (Figura 5) (Chiocchetti *et al.*, 2019). Por este motivo, en los últimos años se han estudiado determinadas cepas por su capacidad de captar tóxicos, como metales pesados y micotoxinas.

Halttunen *et al.* (2007) investigaron la capacidad de captar plomo y cadmio por parte de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en agua. Se evidenció una remoción significativa de estos metales, la cual fue específica de cepa y metal. Además, esta eliminación se vio influenciada por el pH, lo que sugiere la participación de mecanismos de intercambio iónico (Halttunen, Salminen and Tahvonen, 2007). Igualmente, en un estudio posterior por Halttunen *et al.* (2008) también se observó la capacidad de remoción de cadmio y plomo que tenían diferentes cepas de BAL, solas o combinadas. Se confirmó que la remoción es específica de cepa y metal. Sin embargo, al utilizarse cepas combinadas, la eficacia para eliminar estos metales se redujo en comparación de

Introducción

su uso individual. Esto sugiere que es preferible utilizar una sola cepa cuando se requiera eliminar un compuesto específico, y varias cepas cuando el objetivo sea eliminar varios compuestos (Halttunen *et al.*, 2008).

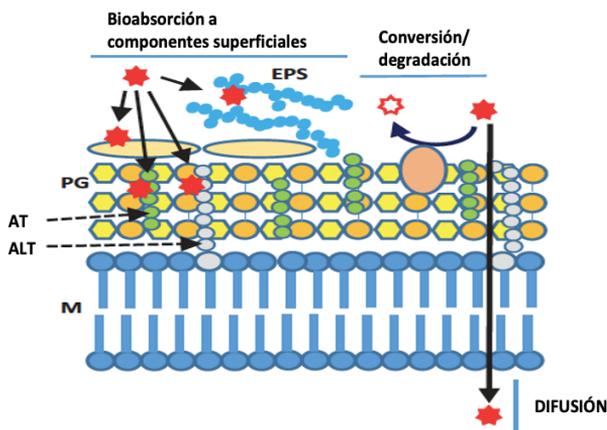


Figura 5. Estructura de la pared de BAL y posibles procesos involucrados en la interacción con contaminantes químicos. EPS: exopolisacáridos; PCS: proteínas de la capa S; PG: peptidoglicano; AT: ácidos teicoicos; ALT: ácidos lipoteicoicos; M: membrana citoplasmática. Imagen adaptada de (Chiocchetti *et al.*, 2019).

Se ha postulado también que algunas moléculas aniónicas de elevada carga (como el poli-P) producidas por bacterias podrían actuar como agentes quelantes de cationes metálicos como el Hg^{2+} , el Pb^{2+} o el Cd^{2+} , pudiendo participar en la retención del metal en las bacterias probióticas. Esta retención disminuiría la bioaccesibilidad del tóxico a nivel intestinal, que representa su principal vía de entrada al organismo, ya que son mayoritariamente vehiculados por agua y alimentos contaminados (Chiocchetti *et al.*, 2019). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la capacidad de retención de ciertos metales como el Hg en lactobacilos no depende del poli-P (Alcántara *et al.*, 2018).

El arsénico inorgánico está clasificado como carcinógeno humano del Grupo 1 por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 2012) y es la toxina ambiental más prevalente. Además, ocupa el primer lugar en la lista de prioridades de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Sustancias Peligrosas (ATSDR) de los Estados Unidos. La Agencia de Protección Ambiental de este país afirma que el arsénico representa una seria amenaza para el agua potable y el suministro de alimentos. Igualmente se ha visto que la exposición a largo plazo a este metal por medio de agua potable causa lesiones en la piel, así como cáncer de pulmón, vejiga y riñón (Yang and Rosen, 2016).

La exposición al arsénico no solo se vincula con las diversas formas de cáncer, sino que también causa una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II y retraso del desarrollo neuroconductual en poblaciones infantiles expuestas durante el periodo perinatal (EFSA, 2009). Además, la baja tasa de natalidad, la muerte fetal y el retraso en el desarrollo infantil están estrechamente relacionados con la exposición al arsénico durante el embarazo (Yang and Rosen, 2016).

En respuesta a la amenaza que representa la exposición al arsénico, la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido límites máximos de arsénico en productos como el arroz y derivados (Reglamento 1881/2006) y recomienda el control de metales en algas marinas y otros productos derivados (Recomendación (UE) 2018/464), al ser estos los que suponen un mayor aporte a la dieta en la Unión Europea (EFSA 2009). La OMS, ha establecido que las concentraciones de As en el agua destinada al consumo humano no deben superar los 10 $\mu\text{g/l}$ (OMS, 2022).

En las aguas subterráneas, el arsénico se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: arsenato +5 [As(V)] y arsenito +3 [As(III)] (Cullen and Reimer, 1989). La forma química del As puede ser alterada durante la preparación de alimentos (Devesa, Vélez and Montoro, 2008) o durante el tránsito por el tracto gastrointestinal (Clemente *et al.*, 2021; Fu *et al.*, 2021). Se ha comprobado que ciertas cepas de probióticos poseen la capacidad de unir As, aunque se trate de un tóxico aniónico, al contrario que los metales pesados (Halttunen, Finell and Salminen, 2007; Elsanhoty, Al-Turki and Ramadan, 2016).

Por otro lado, experimentos en modelos animales han mostrado que algunas cepas son capaces de revertir el daño intestinal provocado por el As vehiculado a través del agua de bebida (Domene *et al.*, 2024). Igualmente, la administración oral a largo plazo de yogurt suplementado con *Lc. rhamnosus*, tuvo un efecto protector contra el aumento de arsénico en mujeres embarazadas en riesgo por contaminación de éste, ya que los niveles en la sangre de este metal disminuyeron (Bisanz *et al.*, 2014). Se conoce que el As en forma de As(V) puede ser captado por las células a través de los sistemas de transporte de Pi (Yang and Rosen, 2016). Esto posiblemente es debido a que el As(V) es un análogo estructural del Pi. Por lo tanto, estos sistemas de transporte de Pi a la célula pueden ser la vía de entrada para el As(V).

3. Metabolismo del fosfato en bacterias

3.1 Importancia del fosfato en bacterias

El fósforo (P) desempeña un papel crucial en las células debido a su papel como intermediario metabólico y elemento estructural en prácticamente todos los procesos biológicos. El fósforo forma parte de ácidos nucleicos, fosfolípidos e intermediarios energéticos (Zheng *et al.*, 2016). Además, juega un importante papel en procesos de señalización celular, por ejemplo, regulando la actividad bioquímica de muchas proteínas mediante la fosforilación de aminoácidos específicos (Gardner and McCleary, 2019). La fuente de fósforo más comúnmente asimilada por bacterias es el Pi (Santos-Beneit, 2015). Además, en algunos organismos también se encuentra en su estado de oxidación +3 en forma de fosfonatos, los cuales contienen un enlace directo C-P (Gardner and McCleary, 2019).

La disponibilidad de fósforo es un factor limitante para el crecimiento de los organismos en muchos ambientes naturales, fundamentalmente debido a que forma compuestos insolubles con el calcio, aluminio o hierro, que son elementos comunes en la corteza terrestre (Hulett, F. M. 1993). Debido a esta limitación y las funciones indispensables que desempeña, las células deben mantener las reservas intracelulares de Pi óptimas. En bacterias como *E. coli* y *Salmonella*, se estima que este rango puede oscilar entre 1 a 10 mM (Gardner and McCleary, 2019). Para muchas bacterias, se ha identificado que el mecanismo por el cual el Pi es captado del ambiente depende de la concentración extracelular de este compuesto (Alvarez-Martin *et al.*, 2012). En las células, es asimilado mediante la síntesis de ATP y posteriormente transferido a otras moléculas claves (Gardner and McCleary, 2019). Todo esto refleja la importancia de mantener un equilibrio en la disponibilidad de Pi para asegurar las funciones celulares vitales y la homeostasis metabólica.

En consecuencia, las bacterias disponen de diferentes sistemas tanto para adquirir Pi cuando este se encuentra en bajas cantidades en el ambiente, como para evitar sus efectos adversos cuando se acumula en exceso dentro de la célula. Estos sistemas han sido objeto de estudio, especialmente en organismos modelo como *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Zheng *et al.*, 2016). Estas investigaciones han proporcionado información sobre los mecanismos de adaptación y supervivencia de las bacterias en entornos con variaciones en la disponibilidad de Pi. Sin embargo, existe una gran carencia de información sobre la regulación del metabolismo de Pi en otras bacterias, entre ellas las BAL.

En las bacterias estudiadas hasta ahora se han descrito dos estrategias generales para mantener un equilibrio adecuado de Pi: el control de la actividad de los sistemas de transporte de Pi y el secuestro del exceso de Pi en compuestos osmóticamente inertes (Kulakovskaya, Lichko and Ryazanova, 2014). Muchas bacterias lo almacenan como poli-

P; no obstante, bacterias como *B. subtilis*, que no sintetiza poli-P, utiliza en su lugar los ácidos teicoicos como forma de almacenamiento (Myers *et al.*, 2016).

3.2 Sistemas de regulación por fosfato: regulón Pho

En muchas bacterias la adaptación a la limitación de Pi es mediada por un sistema de transducción de señal de dos componentes (TCS del inglés “two component system”). En *E. coli*, este sistema es denominado PhoBR, el cual regula la expresión de los genes responsables del transportador de Pi PstSCAB. *B. subtilis* posee un sistema homólogo denominado PhoPR, que, a diferencia del sistema de *E. coli*, en respuesta a la limitación de Pi, reprime la transcripción de *tagAB* (implicados en la síntesis de ácidos teicoicos de pared) y activa la expresión de *tuaA-H*, que codifica los genes implicados en la síntesis de ácido teicurónico, reemplazando así los ácidos teicoicos por otro polímero aniónico que no contiene Pi (Devine, 2018). Aunque la información disponible es más limitada, la evidencia disponible en otras bacterias sugiere que los regulones Pho presentan considerable variabilidad, estando adaptados a las particularidades de la fisiología de cada bacteria (Devine, 2018).

La identificación del regulón Pho de *E. coli* partió de la identificación de dos regiones genéticas no vinculadas dentro del cromosoma circular de *E. coli*, denominadas R1 y R2, las cuales controlaban la expresión de la fosfatasa alcalina (PhoA) (Echols *et al.*, 1961; Garen and Echols, 1962). En trabajos posteriores se determinó que la región R1 contenía dos genes, *phoB* y *phoR* (Wanner and Latterell, 1980; Shixagawa, Makino and Nakata, 1983) y la región R2 contenía cinco genes, *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* y *phoU* (Willsky, Bennett and Malamy, 1973; Amemura *et al.*, 1985). Estos genes codifican las siete proteínas de señalización que están implicadas en la detección de Pi ambiental y el control de la expresión de los genes del regulón Pho. Con posterioridad se fueron identificando otros genes que compartían el mismo patrón de expresión [(Tabla 1) Gardner and McCleary, 2019]. Debido a que estos genes se localizaban en distintos puntos del cromosoma de *E. coli* y estaban todos coregulados con la fosfatasa alcalina, se les denominó regulón Pho (Gardner and McCleary, 2019).

Introducción

Tabla 1. Miembros del regulón Pho de *E. coli* MG1655 identificados por RNA-seq. Los cambios en transcripción corresponden a células cultivadas en presencia de 0.1 frente a 3.3 mM K₂HPO₄. Los residuos conservados de las cajas Pho (determinadas por footprinting o EMSA) se muestran en negrita. Tabla adaptada de (Gardner and McCleary, 2019).

Gen/operón	Función	Secuencia "caja Pho"	Log ₂ fold change
<i>pstSCAB-phoU</i>	Transportador ABC de Pi + regulador	CTGTCATAAACTGTCATATTCCTTAC ATATAACTGTCACCTGT	6.5
<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina	CTGTCATAAAGTTGTCACGGCC	7.5
<i>phoH</i>	Función desconocida-posible proteína de unión a ATP	CTGTCATCACTCTGTCATCTTT	5.1
<i>phnCDEFGHIJKLMNO P</i>	Transporte de fosfonatos + catabolismo	AATTAACCAAACTGTCACAATA	12
<i>phoE</i>	Porina de la membrana externa	CTGTAATAAAAGCGTAAACAACCTGT AAATATATCTTTAAACAATC	7.4
<i>phoBR</i>	Sistema de dos componentes (TCS)	TTTTCATAAATCTGTCATAAAT TTGTAACCTTTAGGTAAAAAAGTTA TACGCGGTGGAACATTG	5.4
<i>ytfK</i>	Tolerancia a H ₂ O ₂	TTTTCATAAATCTGTCATAAAT	2.4
<i>psiE</i>	Función desconocida	TTGTCATCTTTCTGACACCTTACTATC TTACAAATGTAACAAAAAGTTATTT TTCTGTAATTCGA	5.7
<i>ugpBAECQ</i>	Transportador glicerol 3-P + fosfodiesterasa	CTGTAATAAATAATATCTCACAGGCTT AATAGTCTCTTAATACAA	2.9
<i>waaH (yibD)</i>	LPS glicosiltransferasa	CTGTAATAAATAATATCTCACAGGCTT AATAGTCTCTTAATACAA	10

3.2.1 El sistema de dos componentes PhoBR de *E. coli*

Los sistemas de dos componentes o TCS son vías de transducción de señales que generalmente constan de una histidina quinasa, normalmente unida a la membrana, y un regulador de respuesta citoplasmático. Los TCS están presentes en la mayoría de las bacterias y controlan la expresión génica de muchos procesos claves en la fisiología celular, la comunicación célula-célula, el desarrollo bacteriano y en el caso de los patógenos, la virulencia bacteriana (Capra and Laub, 2012; Bekker *et al.*, 2006). La histidina quinasa tiene un dominio sensorial N-terminal que controla las señales ambientales y dos módulos involucrados en la reacción de fosforilación. Por su parte, el regulador de la respuesta presenta un dominio receptor conservado, donde se localiza el residuo fosforilable, y un dominio efector C-terminal. La histidina quinasa se autofosforila en respuesta a un estímulo específico y posteriormente transfiere el grupo Pi a su regulador de respuesta afín, modulando así su actividad, generalmente como regulador transcripcional (Monedero, Revilla-Guarinos and Zúñiga, 2017).

También se ha observado que diferentes TCS están interconectados y regulados entre sí, lo que significa que las señales recibidas por un sistema pueden influir en la actividad de

otro TCS, así como en otros reguladores globales. Esto permite una adaptación más efectiva de las bacterias a los cambios del entorno. Un ejemplo de esto es la activación de PhoB por otra histidina quinasa, CreC, en lugar de PhoR. Estas activaciones están reguladas por la fuente de carbono y el Pi ambiental, respectivamente, y sirven como un medio para coordinar el metabolismo del carbono, energía y metabolismo del Pi (Hsieh and Wanner, 2010).

En el sistema Pho de *E. coli*, PhoR es un sensor transmembranal con actividad autocatalítica histidina quinasa que se autofosforila en el residuo His-213 en respuesta a concentraciones externas bajas de Pi. Posteriormente, dona este grupo fosforilo al regulador de la respuesta PhoB. Además, cuando el Pi es abundante, actúa como fosfatasa eliminando el grupo fosforilo de PhoB-P (Carmany, Hollingsworth and McCleary, 2003; Gardner and McCleary, 2019). Por lo tanto, la función principal de PhoR es controlar el estado de fosforilación de PhoB en función de la disponibilidad de Pi. Otras especies bacterianas poseen sistemas homólogos aunque la nomenclatura varía. Por ejemplo, en *B. subtilis* este sistema se conoce como PhoP/PhoR (Hulett *et al.*, 1994), en *Corynebacterium glutamicum* PhoR/PhoS (Kočan *et al.*, 2006); y en *Campylobacter jejuni* PhoSS/PhoS (Wösten *et al.*, 2006).

La estructura tridimensional de PhoR no está determinada, aunque mediante el análisis de su secuencia y comparación con estructuras de otras histidinas quinasas se pueden deducir sus principales características. PhoR posiblemente forma un dímero anclado a la membrana celular. A diferencia de otras histidina quinasas, no posee un dominio periplásmico significativo. Cada monómero está constituido por una región transmembrana, una región cargada citoplasmática (CR), un dominio PAS (Per-ARNT-Sim), un dominio de dimerización y fosforilación de histidina (DHp) y un dominio catalítico de unión de ATP (CA) en su extremo C-terminal (Figura 6). Se ha postulado que el dominio PAS detecta una señal citoplasmática que refleja las concentraciones extracelulares de Pi, pero la naturaleza de la señal no se conoce completamente (Gardner and McCleary, 2019).

Introducción

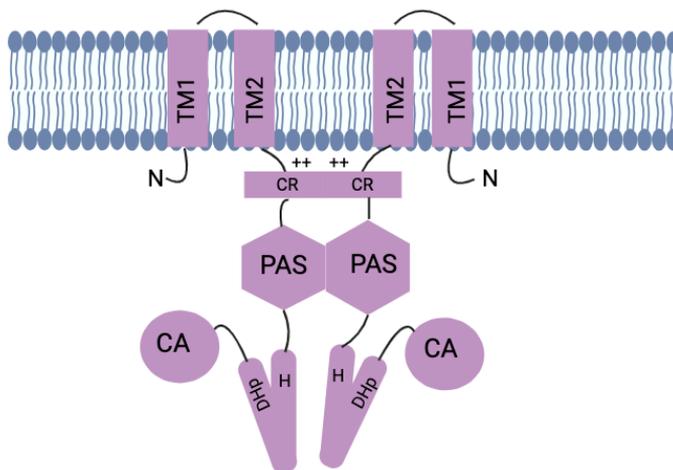


Figura 6. Estructura predicha de PhoR. TM, dominio transmembrana; CR, región cargada; dominio PAS; DHP, dominio de dimerización y fosforilación de histidina; CA, dominio catalítico de unión a ATP.

La estructura de PhoB consta de dos dominios funcionales conectados por un enlace flexible, los cuales funcionan en conjunto para que PhoB responda a la señal de fosforilación transmitida por PhoR. Uno es el dominio receptor (DR) N-terminal, que contiene el aspartato conservado (Asp53 en *E. coli*), al que se le transfiere el grupo fosforilo de la histidina de PhoR. El otro es el dominio efector (DE) C-terminal, con propiedades de unión al ADN y transactivación. La fosforilación de DR es necesaria para activar el DE (Santos-Beneit, 2015).

Además, diferentes análisis estructurales han determinado que el DR dimeriza mediante una rotación simétrica. Bachhawat y colaboradores (2005) propusieron un modelo que implica una rotación del enlace flexible que conecta a los dos dominios cuando están en su estado activo. La falta de rotación implicaría un estado inactivo, ya que posicionaría a DE en una dirección opuesta, incompatible con la unión al ADN. Mientras que con la rotación, éste forma un dímero simétrico que se une a las respectivas secuencias de la "caja Pho" (Figura 7) (Bachhawat *et al.*, 2005).

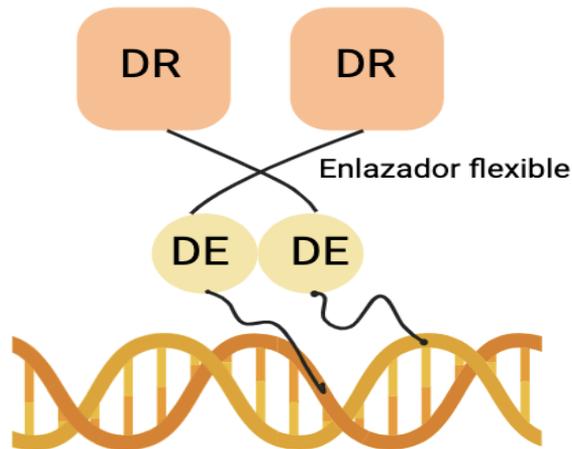


Figura 7. Modelo de unión de PhoB al ADN en *E. coli* según el trabajo de Bachhawat *et al.* (2005).

PhoB reconoce una secuencia específica de ADN que se encuentra en los promotores de los genes bajo su control, conocida como “caja Pho” (Tabla 1). Esta secuencia fue inicialmente identificada por Makinot *et al.* (1988) y se definió como una secuencia de 18 pares de bases mediante análisis de protección frente a DNasa I y metilación (Makinot *et al.*, 1988). La secuencia se describió como una repetición directa de la secuencia “CTGTCAT” con un espaciador de 4 bases. Sin embargo, en estudios posteriores, en los cuales se elucidó la estructura de PhoB, se descubrió que se une al ADN en forma de un dímero y que protege una secuencia de 22 pares de bases. Esta unión ocurre tanto en el surco mayor como en el surco menor del ADN. Por lo tanto, la secuencia se extendió a 22 pares de bases (Blanco *et al.*, 2002).

3.2.2. El transportador PstSCAB y PhoU

Como se ha señalado antes, el sistema de señalización de la disponibilidad de Pi en *E. coli* incluye el transportador de tipo ABC PstSCAB y el regulador PhoU. PstS es una proteína de unión de Pi periplásmica que se une al Pi extracelular y facilita su transporte (Webb, Rosenberg and Cox, 1992). Por su parte, PstA y PstC son las proteínas transmembranales que forman el canal de transporte a través de la membrana interna (Cox *et al.*, 1988; Cox, Webb and Rosenberg, 1989). Finalmente, PstB es una proteína periférica de la membrana que contiene los dominios de unión a nucleótidos de este transportador. Se encarga de unir el ATP, hidrolizarlo y liberar energía para el transporte (Chan and Torriani, 1996).

Introducción

En el proceso de transporte de Pi, inicialmente, la proteína PstS se encarga de unir y entregar Pi a los componentes transmembrana PstC y PstA. Cuando PstB une ATP, forma un complejo cerrado con PstC y PstA, que está orientado hacia el exterior de la célula. Cuando PstS está cargado con Pi, se induce la hidrólisis de ATP, desencadenando un cambio conformacional en PstB. Este cambio hace que PstC y PstA se orienten hacia el interior de la célula, liberando Pi en el citoplasma. La unión de ATP restablece el sistema a la conformación original, para que pueda recibir nuevamente el Pi de la proteína PstS (Figura 8) (Gardner and McCleary, 2019).

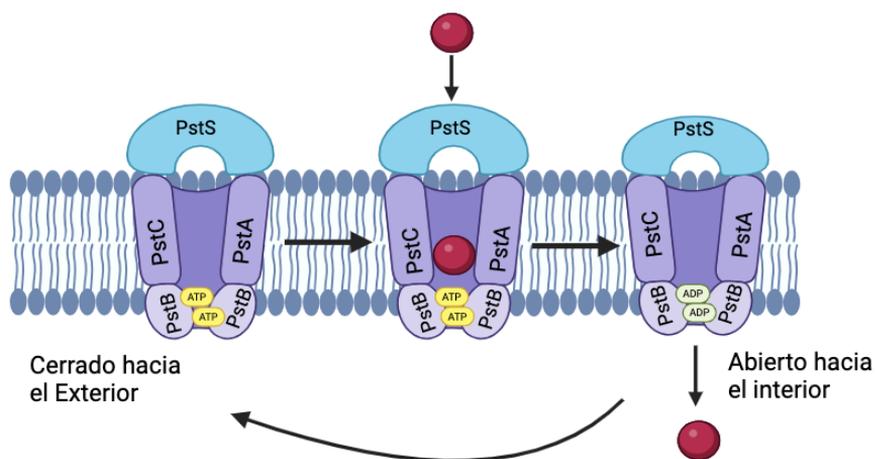


Figura 8. Ciclo del transportador PstSCAB.

Por su parte PhoU, codificada por el último gen del operón *pstSCABphoU* (Rice *et al.*, 2009), juega un papel fundamental en la señalización por Pi, pero no está directamente implicada en el transporte a través del complejo (Gardner and McCleary, 2019). PhoU es una proteína periférica de membrana que modula el transporte de Pi a través del complejo PstSCAB (Steedt and Wanner, 1993). Dado que PhoR carece de un dominio periplásmico responsable de detectar Pi, se ha postulado que PhoU actúa como un conector entre PhoB/PhoR y el transportador PstSCAB, formando un complejo de señalización entre el transportador PstSCAB y PhoR (Rice *et al.*, 2009). Sin embargo, la forma en la que actúa sobre ellos es poco conocida. La evidencia disponible sugiere que PhoU puede regular negativamente la actividad de PhoR, y por ende la regulación de la señal de Pi, ya que cuando *phoU* es mutado o eliminado, PhoR se encuentra constitutivamente activo y los genes del regulón Pho tienen altos niveles de expresión (Steedt and Wanner, 1993; Rice *et al.*, 2009). Por lo tanto, esta regulación negativa podría ser una forma en la cual la bacteria puede ajustarse a los niveles de Pi del entorno,

asegurando que la respuesta sea adecuada y proporcional a la señal recibida (Gardner and McCleary, 2019).

Estudios realizados por Gardner *et al.* (2015) han revelado que PhoU interacciona con PhoR a través de su dominio PAS. Además, PhoU también presenta interacciones con la proteína PstB del transportador (Gardner *et al.*, 2015). Los dominios PAS son conocidos por su papel en la señalización mediante la detección de estímulos físicos o químicos (Möglich, Ayers and Moffat, 2009). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que PhoU interacciona con ambos dominios de PhoR, tanto el dominio PAS como el dominio CA (Gardner *et al.*, 2015).

Estudios estructurales de las histidinas quinasa han demostrado que la disposición espacial correcta de los dominios DHP y CA es esencial para sus actividades quinasa y fosfatasa (Gao and Stock, 2009). Se ha observado que la transición de la actividad quinasa a la actividad fosfatasa de PhoR depende de la conformación entre los dominios CA y DHP. El dominio CA debe mantenerse flexible para una adecuada función quinasa. Igualmente, se ha demostrado que el dominio DHP es la parte de PhoR que tiene actividad fosfatasa (Carmany, Hollingsworth and McCleary, 2003). Por lo tanto, es posible que cuando PhoU interactúa con PhoR, esta interacción pueda limitar la flexibilidad del dominio CA, lo que inhibiría la actividad quinasa y expondría al dominio DHP, permitiendo así la actividad fosfatasa de PhoR (Figura 9) (Gardner *et al.*, 2015). Por lo tanto, se ha propuesto que PhoU modula la función de PhoR, alternando entre la actividad quinasa y fosfatasa, a través de cambios en la conformación de sus dominios estructurales.

En resumen, el complejo formado por el transportador PstSCAB, PhoR y PhoU desempeña un papel crucial en la señalización de Pi en *E. coli*. Cuando las concentraciones de Pi del ambiente son elevadas, la interacción entre el transportador PstSCAB y PhoR a través de PhoU activa su función fosfatasa e inhibe su actividad autoquinasa. Por otro lado, cuando las concentraciones de Pi son bajas, el cambio en la conformación del transportador PstSCAB altera la interacción de PhoU con PhoR favoreciendo la actividad autoquinasa de éste (figura 9). En este estado, PhoR se encuentra activo y transfiere Pi a PhoB. Dicho lo anterior, la activación de la señalización y transporte de Pi al interior de la célula ocurre en condiciones limitantes de Pi. Mientras que la desactivación ocurre bajo concentraciones altas de Pi, ya sea del ambiente externo o dentro de la célula. Esto implica una coordinación por parte de transportador PstSCAB y la regulación de la activación de PhoR mediada por la proteína PhoU, lo que permite a las bacterias adaptarse de manera efectiva a las fluctuaciones en la disponibilidad de Pi de su entorno.

Introducción

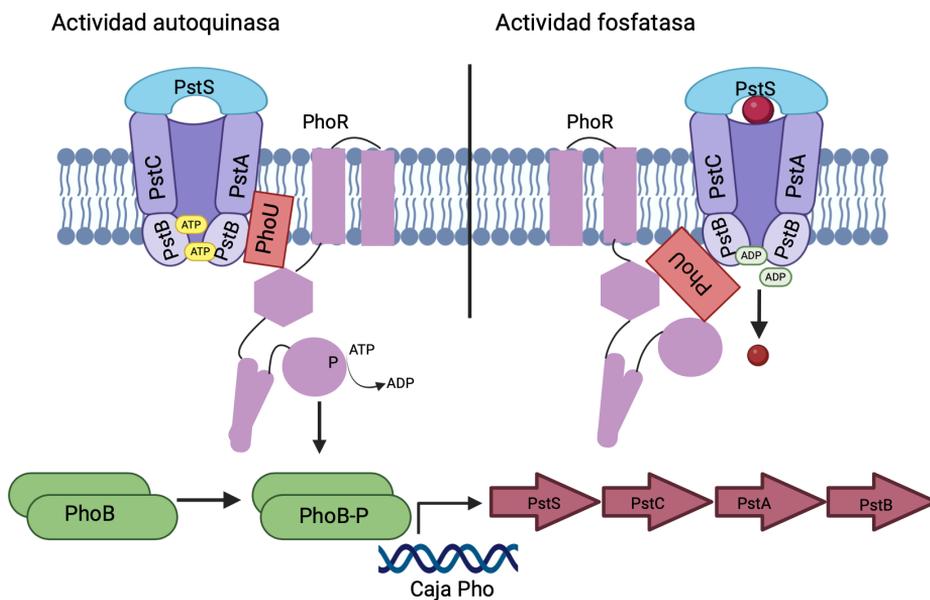


Figura 9. Modelo de transducción de señales transmembrana mediado por la concentración de Pi.

4. Síntesis de polifosfato en bacterias

4.1 Definición y origen

Una vez el Pi es internalizado en la célula, las bacterias lo pueden incorporar en diferentes moléculas como se ha señalado anteriormente. Una de ellas es el poli-P, una molécula que juega diversos papeles en la fisiología microbiana. Como se mencionó anteriormente (véase el apartado 2.1), el poli-P es un polímero lineal de residuos de Pi unidos por enlaces fosfoanhídrido ricos en energía (Ault-Riché *et al.*, 1998). El poli-P tiene así una estructura lineal y no ramificada (Figura 10). El grado de polimerización puede variar entre valores de 2 (denominado pirofosfato) a decenas o cientos, dando lugar a poli-P de elevado peso molecular (Kulaev, Vagabov and Kulakovskaya, 1975).

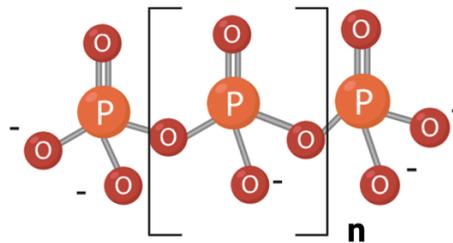


Figura 10. Molécula de polifosfato. El valor de n puede variar de decenas a cientos.

El poli-P puede ser producido de manera abiótica en entornos como volcanes (Yamagata, Y., Watanabe and H., Saitoh, 1991). Se ha propuesto que el poli-P estuvo presente en la tierra de manera prebiótica y que fuera probablemente uno de los muchos compuestos químicos disponibles en el medio ambiente que propiciaron la formación de condiciones adecuadas para el surgimiento de la vida. Se ha hipotetizado asimismo que fue incorporado por vesículas, convirtiéndose así en la fuente de Pi y de enlaces ricos en energía, en lo que podría considerarse un antecesor primitivo del ATP (Rao, Gómez-García and Kornberg, 2009).

Anteriormente, se consideraba que el poli-P era simplemente un "fósil molecular" o sólo una fuente de fósforo y energía que garantizaba la supervivencia de los microorganismos en condiciones extremas. Sin embargo, se han obtenido pruebas concluyentes que demuestran la presencia de este compuesto en representantes de todos los reinos de los seres vivos, pudiendo encontrarse en las células de procariontes y eucariotes, especialmente hongos, plantas y animales (Kulaev, Vagabov and Kulakovskaya, 1979).

Se comprobó que el poli-P podía ser acumulado en el interior de las células microbianas en forma de gránulos observables al microscopio, descritos por primera vez en *Spirillum volutans* y denominados gránulos de volutina (Wermel, E and Sassuchin, D, 1927). Posteriormente, Rosenberg determinó en *Tetrahymena pyriformis* que estos gránulos contenían pirofosfato, calcio y magnesio (Rosenberg, 1966). Estudios posteriores determinaron que estos gránulos de acumulación de poli-P son realmente estructuras presentes en las células y no son formados durante la fijación y tinción de las células con colorantes o como artefacto durante la preparación de muestras, ya que estos son fácilmente visibles sin tinción en células vivas de microorganismos mediante microscopía de contraste de fases (Kulaev, Vagabov and Kulakovskaya, 1975).

Se ha observado que el poli-P pueden ser acumulado a nivel intracelular en forma de gránulos por diversos microorganismos. Entre ellos se encuentran algunas cepas de la familia *Lactobacillaceae* tales como *Lv. brevis* (Segawa et al., 2011), *Lc. paracasei* (Saiki et al., 2016), *Lc rhamnosus* (Correa Deza et al., 2017), *Lp. plantarum* (Alcántara et al.,

Introducción

2018), y cepas probióticas de *Bifidobacterium* (Alcántara *et al.*, 2023). En estudios realizados por Alcántara *et al.* (2014), se observó la formación de gránulos en varias cepas de BAL, incluyendo varios miembros del antiguo género *Lactobacillus*, utilizando tinciones específicas y microscopía óptica o microscopía electrónica. En muchas ocasiones estos gránulos de poli-P, que suelen ser electrodensos al microscopio electrónico, aparecen en las preparaciones como huecos o agujeros redondeados u ovalados en el citoplasma, que son fruto de la eliminación de la estructura del poli-P durante los cortes al ultramicrotomo en el proceso de preparación de las muestras (Figura 11) (Alcántara *et al.*, 2014).

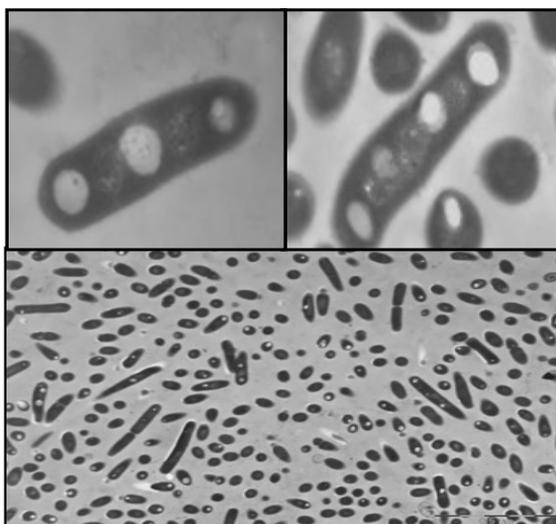


Figura 11. Micrografías electrónicas de *Lactocaseibacillus paracasei*. Se pueden observar los huecos dejados en las posiciones que eran ocupadas por los gránulos de poli. Imagen adaptado de (Alcántara *et al.*, 2014).

4.2 Enzimas involucradas en la síntesis de polifosfato

Las principales enzimas involucradas en la síntesis de poli-P son las poli-P quinasas (Ppk), las cuales, basándose en la similitud de sus secuencias y propiedades cinéticas, se han clasificado en dos familias: Ppk1 y Ppk2. Por otro lado, se encuentran las exopolifosfatasas (Ppx), encargadas de hidrolizar el poli-P, que jugarían un papel importante en el mantenimiento adecuado de los niveles de poli-P dentro de la célula.

4.2.1 Polifosfato quinasa (Ppk; EC 2.7.4.1)

La enzima Ppk1, es una de las enzimas más estudiadas y conservadas en el metabolismo del poli-P. Estas enzimas transfieren un grupo fosfato terminal a la cadena de poli-P haciendo uso de ATP, lo que lleva a la síntesis progresiva de una cadena elongada de poli-P (Rao, Gómez-García and Kornberg, 2009).

Para comprender cómo la Ppk1 realiza su proceso catalítico se llevó a cabo la cristalización de la Ppk1 de *E. coli* (EcPPK1) y la determinación de su estructura. Esta enzima forma un dímero entrelazado de monómeros de 80 kDa y contiene cuatro dominios estructurales. El sitio activo se localiza en un túnel estructural altamente conservado, que incluye un bolsillo único de unión a ATP, y probablemente facilita la translocación de poli-P recién sintetizado (Zhu *et al.*, 2005). El primer paso de la síntesis de poli-P implica la autofosforilación de la enzima. Investigaciones previas sugirieron que dos residuos de histidina, His435 e His454, eran los posibles sitios de autofosforilación (Kumble, Ahn and Kornberg, 1996). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que sólo el residuo His435 cumple esta función, actuando como nucleófilo al atacar el enlace fosfodiéster del grupo fosfato del ATP (Figura 12) (Zhu *et al.*, 2005).

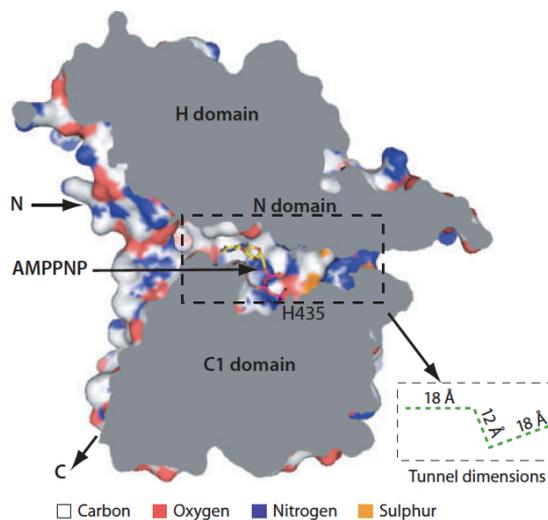


Figura 12. Estructura de EcPPK1. AMPPNP (adenilil imidodifosfato) es un análogo no hidrolizable del ATP utilizado en la cristalización para situar el centro activo. Imagen tomada de (Rao, Gómez-García and Kornberg, 2009).

Introducción

Inicialmente, en la mayoría de los estudios sobre la síntesis de poli-P bacteriano se utilizó siempre a *E. coli* como organismo modelo. Por lo tanto, solo se conocía la existencia de las enzimas Ppk1, ya que esta bacteria codifica para una sola polifosfato quinasa (Neville, Roberge and Jia, 2022). Sin embargo, en investigaciones posteriores en otras especies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que una cepa $\Delta ppk1$, deficiente en el enzima Ppk1, seguía produciendo poli-P. Esto sugirió que otra enzima podría estar ejerciendo una actividad polifosfato quinasa adicional (Rashid, Rao and Kornberg, 2000).

Posteriormente, se identificó Ppk2 como la enzima responsable en *P. aeruginosa* de sintetizar guanósín trifosfato (GTP) a partir de guanósín difosfato (GDP) y poli-P. Además, se identificó el gen que codifica para Ppk2, y se hallaron secuencias homologas a Ppk2 en otras bacterias, tanto en especies de Gram-positivos como de Gram-negativos (Zhang, Ishige and Kornberg, 2002). Ppk2 no comparte ninguna identidad de secuencia significativa con Ppk1 y las estructuras 3D determinadas para Ppk2 de varias especies muestran un pliegue estructural distinto en relación con el de Ppk1 (Nocek *et al.*, 2008). En consecuencia, se evidenció que Ppk1 y Ppk2 son entidades separadas con enzimología distinta. A pesar de la falta de homología entre ellas, ambas se encuentran muy conservadas en diversas especies.

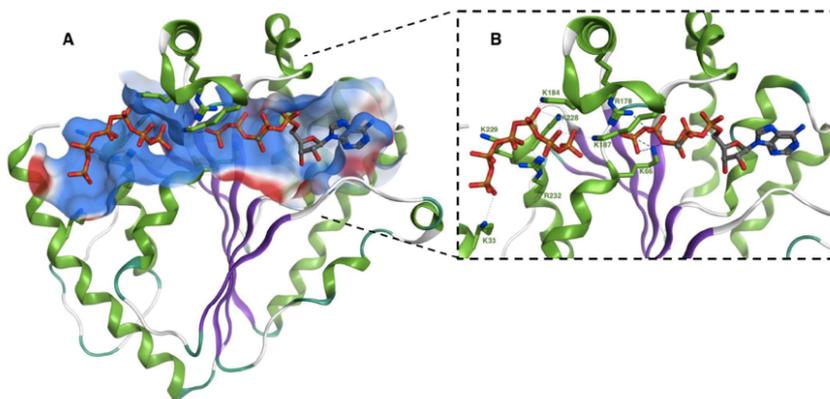


Figura 13. Estructura 3D de Ppk2 de *P. aeruginosa*. Se muestra la posición del poli-P y el ATP presentes en el co-cristal. La superficie electrostática de carga positiva que configura el canal de unión a poli-P está representada en azul. Imagen tomada de (Neville, Roberge and Jia, 2022).

En cuanto a su estructura, Ppk2 pertenece a la familia de las quinasas de bucle P que contienen dos motivos conservados (Walker A y Walker B) para coordinar el fosfato del nucleósido y el ion metálico Mg^{2+} (Figura 13) (Neville, Roberge and Jia, 2022). A su vez las Ppk2 pueden clasificarse en tres subfamilias basadas en la preferencia de sustrato de fosfato de nucleósido: la clase I fosforila difosfatos de nucleósido, la clase II fosforila monofosfatos de nucleósido y la clase III puede fosforilar ambos, mono- o difosfatos de nucleósido (Motomura *et al.*, 2014). Las enzimas Ppk2 son más eficientes en el proceso de síntesis de ATP debido a la preferencia de la fosforilación de nucleósidos en la reacción reversible. Por lo tanto, Ppk1 actúa preferentemente en la síntesis de poli-P dependiente de ATP, mientras que Ppk2 es más eficiente en la síntesis de ATP a partir de poli-P (Figura 14).

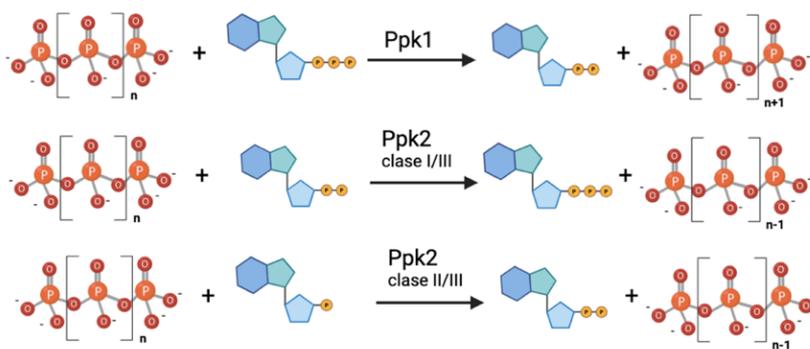


Figura 14. Principales reacciones enzimáticas llevadas por las diferentes polifosfato quinasas.

4.2.2 Exopolifosfatasa (Ppx; EC 3.6.1.11)

Las exopolifosfatasas (Ppx) tienen la capacidad de hidrolizar y liberar progresivamente el P_i terminal de la cadena lineal de poli-P que contiene tres o más enlaces fosfoanhídridos (Figura 15). En investigaciones iniciales realizadas en *E. coli*, se identificó un gen, *ppx*, adyacente al gen que codificaba Ppk1 (*ppk*), el cual codifica la enzima exopolifosfatasa. Estos dos genes constituyen un operón policistrónico, en el cual la transcripción del gen *ppx* está regulada por los promotores de *ppk*. El gen *ppx* codifica la Ppx de *E. coli*, una enzima de 513 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 58.1 kDa que requiere tanto Mg^{2+} como KCl para alcanzar su máxima actividad (Akiyama, Crooke and Kornberg, 1993).

Introducción

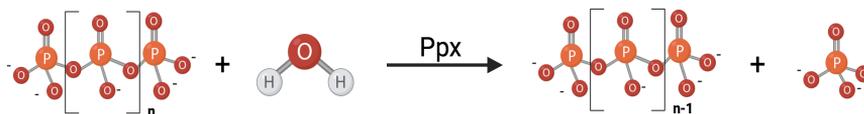


Figura 15. Actividad exopolifosfatasa. El producto (Pi) es liberado durante la reacción a partir de cadenas de poli-P.

Actualmente se conocen dos tipos de Ppx: las Ppx clásicas y las Ppx/GppA. Las Ppx clásicas son monofuncionales y su papel principal es la hidrólisis del poli-P (Rangarajan *et al.*, 2006) mientras que las Ppx/GppA tienen la capacidad de actuar tanto como exopolifosfatasa como de guanosina pentafofato (pppGpp) fosfohidrolasa para generar guanosina tetrafofato (ppGpp). Estos dos compuestos son unas moléculas denominadas alarmonas, que regulan la “respuesta estricta” o *stringent response* en bacterias. Esta respuesta es un mecanismo que se activa ante la falta de nutrientes esenciales, como los aminoácidos, y genera entre otros efectos la disminución de la transcripción de genes de proteínas ribosomales y rRNA, el aumento de la transcripción de genes de la biosíntesis de aminoácidos y la regulación de diferentes fases de la traducción (Bange *et al.*, 2021). En un principio, basándose en experimentos de actividad enzimática *in vitro* y en resultados con mutantes deficientes en la síntesis de (p)ppGpp, se propuso que, en condiciones de estrés nutricional, estas alarmonas inhibían la actividad de Ppx. Debido a la actividad constitutiva del enzima que sintetiza poli-P (Ppk), esto llevaría a la síntesis de niveles elevados de poli-P. Así, los niveles intracelulares de poli-P estarían gobernados por dos actividades enzimáticas antagónicas, Ppk y Ppx, siendo esta última la que estaba regulada.

Sin embargo, se ha demostrado que este modelo, propuesto inicialmente para *E. coli*, es incorrecto, ya que la acumulación de poli-P no depende de la síntesis de (p)ppGpp, tal y como han demostrado nuevos experimentos con cepas deficientes en los enzimas que sintetizan (p)ppGpp, RelA y SpoT (Downey, 2019). En cambio, se ha encontrado que la acumulación de poli-P, que en *E. coli* se produce tras una privación de nutrientes, depende del factor de transcripción DksA, asociado a la respuesta a estrés, y de los factores sigma RpoS, RpoE y RpoN, conocidos por su papel en la respuesta celular al estrés, y de PhoB, aunque ninguno de estos factores induce directamente la transcripción del gen *ppk* (Downey, 2019b; Gray, 2020). PhoU, el regulador negativo del transporte de Pi por el sistema PstSCAB, actúa también como regulador negativo de la síntesis de poli-P de manera no esclarecida (Figura 16) (Bowlin and Gray, 2021). Por tanto, la manera cómo la célula regula los niveles de poli-P todavía presenta multitud de incógnitas.

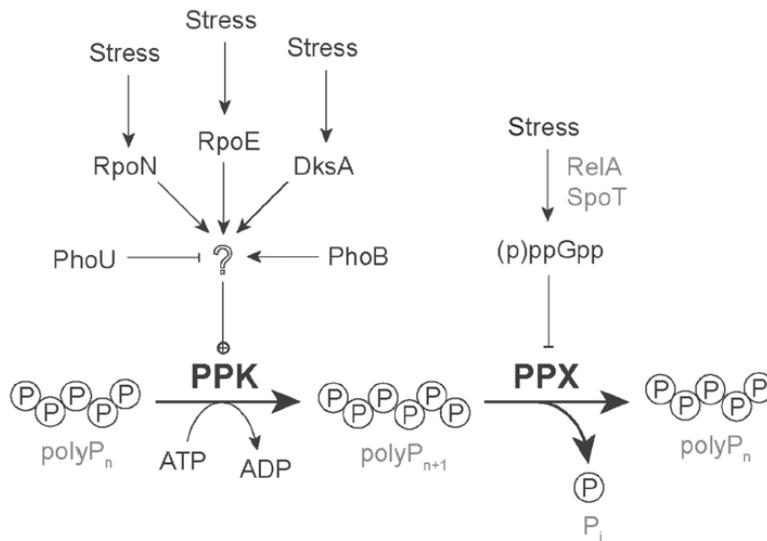


Figura 16. Modelo propuesto para la regulación de los niveles de poli-P en *E. coli*. El papel de (p)ppGpp en la regulación de la actividad Ppx está actualmente cuestionado. Imagen tomada de (Bowlin and Gray, 2021).

Tanto las enzimas Ppx como Ppx/GppA pertenecen a la superfamilia de fosfotransferasas con motivos acetato y azúcar quinasa/Hsp70/actina (ASKHA) y comparten homología extensamente (Reizer *et al.* 1993). Se ha observado que muchas especies solo poseen la enzima Ppx/GppA como es el caso de *Helicobacter pylori*, mientras que *E. coli* posee las dos enzimas homólogas (EcPpx y EcGppA). *Aquifex aeolicus* también contiene solo Ppx/GppA, sin embargo ésta solo dispone del dominio N-terminal (Figura 17), el cual en *E. coli* se ha comprobado que es el responsable de la actividad catalítica. Por lo tanto, carece de los dominios III y IV que se encuentran en la Ppx de *E. coli*, los cuales están presentes en el extremo C-terminal. Estos dominios son esenciales para la unión y reconocimiento del poli-P; así como para la procesividad de la enzima (Bolesch and Keasling, 2000; Rangarajan *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2020).

Introducción

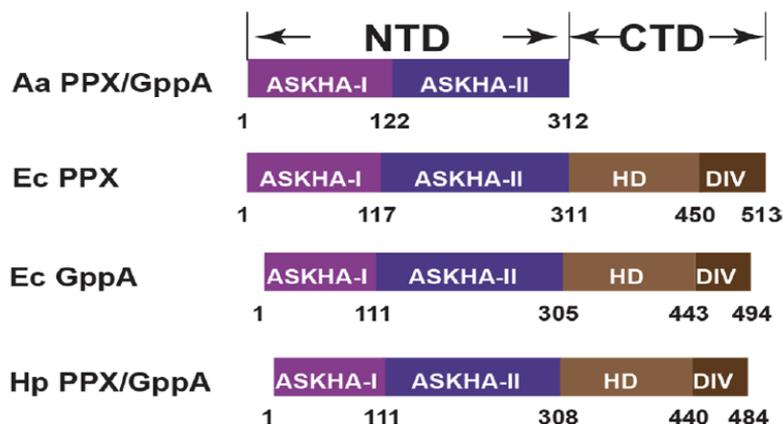


Figura 17. Estructura de dominios de las enzimas Ppx y Ppx/GppA de *Aquifex aeolicus* (Ppx/GppA), *E. coli* (Ppx), *E. coli* (GppA), y *Helicobacter pylori* (Ppx/GppA). Se representan los dominios ASKHA-I y ASKHA-II duplicados en el dominio N-terminal (NTD) y los dominios HD y DIV en el dominio C-terminal (CTD). Imagen tomada de (Song *et al.*, 2020).

La determinación de la estructura de la enzima Ppx de *E. coli* ha revelado que consiste en un dímero con un surco profundo y que cada monómero consta de cuatro dominios (Figura 18). Los dominios I y II (ASKHA) presentan similitud estructural entre sí y comparten un plegamiento similar a la ribonucleasa-H. El dominio III guarda similitud estructural con el dominio N-terminal HD de SpoT. El dominio IV, el más pequeño, tiene homólogos estructurales en las proteínas de unión al ARN asociadas al choque frío, pero su función en la Ppx es desconocida. Se ha observado que las secuencias de los dominios I y II son las que se encuentran más conservadas en comparación con los dominios III y IV (Rangarajan *et al.*, 2006).

Además, se ha propuesto que el sitio activo se encuentra entre los dominios I y II. Esta región del sitio activo contiene un bucle de unión a Pi rico en glicina (P-loop), que podría funcionar para anclar los grupos Pi del poli-P a través de interacciones de enlace de hidrógeno de la cadena principal, análogas a las implicadas en la unión de las partes fosforiladas de los trifosfatos de nucleósidos. Se cree que el poli-P se une al surco entre los dominios I y II, y entra en el sitio activo situado allí. Este sitio activo contiene un residuo de glutámico conservado (Glu121 en Ppx de *E. coli*), el cual activa una molécula de agua para actuar sobre en el enlace fosfodiéster del poli-P (Rangarajan *et al.*, 2006)

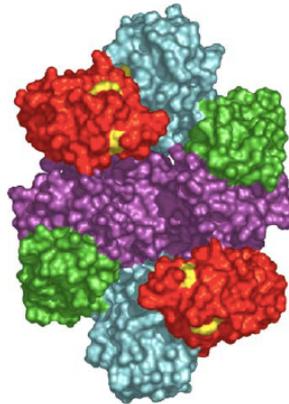


Figura 18. Estructura del dímero Ppx de *E. coli*. Se muestran los dominios I (rojo), II (turquesa), III (morado) y IV (verde). Los residuos altamente conservados se muestran en color amarillo. Imagen tomada de (Rangarajan *et al.*, 2006).

4.3 Papel del poli-P en diversos procesos celulares

Además del papel probiótico mencionado anteriormente para el poli-P sintetizado por las BAL (ver apartado 2.1), se sabe que el poli-P está involucrado en diversos procesos bacterianos, los cuales dependen de la cepa, de la localización celular y de las necesidades específicas de cada bacteria.

4.3.1 Poli-P como componente estructural

Una de las propiedades químicas más interesantes del poli-P es su capacidad para interactuar con una variedad de compuestos inorgánicos y orgánicos, lo que resulta en la formación de complejos ternarios. Por ejemplo, el poli-P puede formar complejos con poli- β -hidroxibutirato (PHB) de bajo peso molecular y con iones Ca^{2+} . En este complejo formado en la membrana celular, el PHB corresponde a la capa externa, que está directamente en contacto con la membrana lipídica; en el interior, los grupos éster del PHB están unidos al poli-P mediante interacciones iónicas y al Ca^{2+} mediante enlaces ión-dipolos (Natoli Reusch and Sadoff, 1988).

El complejo poli-P/ Ca^{2+} /PHB ha sido detectado en la membrana plasmática de bacterias naturalmente competentes (Natoli Reusch and Sadoff, 1988). Este complejo probablemente desempeña un papel fisiológico importante en la competencia para la entrada del ADN (Natoli Reusch and Sadoff, 1988). Asimismo, se dispone de evidencia de su papel como canal no proteico de Ca^{2+} en la ATPasa de calcio de las membranas de

Introducción

los eritrocitos humanos, el canal de potasio KcsA de *Streptomyces lividans* o la proteína de membrana externa nThiP5 de *Haemophilus influenzae* (Jendrossek and Pfeiffer, 2014).

4.3.2 Poli-P como sustituto de ATP, fuente de energía y reservorio de Pi

En el marco de la hipótesis del origen prebiótico del poli-P, éste se ha postulado como precursor del ATP y como donante primitivo de energía en el origen de la vida. Esto se debe a que, al igual que el ATP, el poli-P contiene moléculas de Pi unidas por enlaces de alta energía. Por ello, el poli-P puede jugar un papel importante en el metabolismo energético de las células (Kornberg, Rao and Ault-Riché, 1999). De hecho, el poli-P puede reemplazar al ATP en ciertos procesos celulares debido a su capacidad para donar grupos fosfato en reacciones enzimáticas. Por ejemplo, la enzima poli-P gluco(mano) quinasa (PPGK; EC 2.7.1.63), fosforila monosacáridos como la glucosa, manosa y en algunos casos fructuosa, utilizando poli-P o ATP. Por otro lado, la NAD quinasa (poli-P/ATP:NAD fosfotransferasa, EC 2.7.1.23) cataliza la fosforilación del NAD para producir NADP. En algunos procariontes, las NAD quinatas utilizan ATP o poli-P como donantes de grupos fosforilo. Aunque se ha visto que estas enzimas son capaces de usar ambos como donantes de fosforilo, se ha propuesto que se da una tendencia evolutiva a la disminución de la preferencia por usar poli-P (Albi and Serrano, 2015, 2016).

El poli-P constituye la principal reserva de Pi en muchos microorganismos ya que puede convertirse en moléculas de Pi mediante la acción de las exopolifosfatasas y no tiene efecto sobre la presión osmótica (Albi and Serrano, 2016). En muchos eucariotas, el poli-P es almacenado en orgánulos especializados denominados acidocalcisomas o en vacuolas con una estructura similar (Docampo R. 2024). La estructura de los mismos no ha sido completamente elucidada, aunque se ha propuesto que pueden estar rodeados por una membrana lipídica. En procariontes el poli-P también se almacena en gránulos cuyas características estructurales tampoco están completamente determinadas (Docampo R. 2024).

4.3.3 Quelación de metales y protección contra el estrés oxidativo

El poli-P, siendo un polianión, es un potente quelante de cationes metálicos (véanse referencias en Albi y Serrano, 2016). Se ha propuesto que esta capacidad incrementa la tolerancia de los microorganismos que producen poli-P a metales tóxicos. Diversos estudios han mostrado que no sólo la síntesis de poli-P, sino su degradación son necesarias para la actividad detoxificadora del poli-P. Keasling (1997) postuló un modelo en el que los metales son inicialmente quelados por el poli-P que es a continuación degradado por polifosfatasas y los complejos metal-fosfato resultantes son exportados a través de transportadores de Pi (Keasling, 1997).

El estrés oxidativo es una consecuencia natural de la vida aeróbica. Cuando el oxígeno molecular es reducido, se generan una serie de especies reactivas de oxígeno, como el

superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\cdot$). Estos tienen la capacidad de dañar proteínas, ADN, lípidos y otros componentes celulares, lo que puede ejercer un estrés considerable, y en ciertas circunstancias, potencialmente letal, sobre las células bacterianas (Zhao and Drlica, 2014).

Los mecanismos por los cuales el poli-P protege a las células contra el estrés oxidativo no están del todo claros. Sin embargo, en algunos casos se han propuesto mecanismos de acción de este polímero. Por ejemplo, su actividad contra el ión superóxido se puede explicar por su capacidad para coordinar cationes tales como el Fe^{3+} o el Mn^{2+} , que pueden promover la dismutación de O_2^- (Albi and Serrano, 2016). Inicialmente, el Mn^{2+} es quelado por el poli-P, formando un complejo Mn^{2+} -poli-P, que posteriormente es hidrolizado por exopolifosfatasas dando lugar a $MnHPO_4$, que detoxifica O_2^- . El poli-P también puede proteger contra la reacción de Fenton (generadora de radicales hidroxilo), al quelar los cationes como Fe^{2+} o el Cu^{2+} que intervienen en la reacción y estabilizar el ión intermedio Fe^{3+} (Albi and Serrano, 2016). Asimismo, su actividad chaperona y funciones reguladoras de las vías de respuesta al estrés pueden contribuir a atenuar el daño ocasionado por las especies reactivas del oxígeno.

4.3.4 Polifosfato actúa como una chaperona protectora de proteínas

En estudios realizados con cepas de *E. coli* deficientes en el gen *ppk*, y por tanto incapaces de sintetizar poli-P, se observó un aumento en la sensibilidad al tratamiento con ácido hipocloroso (HOCl) en comparación con la cepa silvestre. El HOCl causa un daño extremo a las proteínas al oxidar aminoácidos como la cisteína, la metionina y la histidina, lo que conduce al desplegamiento y la agregación de proteínas oxidadas. Estos resultados llevaron a preguntarse cómo intervenía el poli-P en la protección contra este daño. Se descubrió que el poli-P interactúa directamente con las proteínas que se despliegan, previniendo su agregación (Figura 19). Por lo tanto, se cree que el poli-P actúa como una chaperona protectora de proteínas (Gray *et al.*, 2014).

Esta protección fue comprobada tanto *in vivo* como *in vitro*, siendo las cadenas largas de poli-P las que ejercieron un efecto protector más fuerte que las cadenas cortas. También se observó que el poli-P es capaz de proteger de la agregación a un amplio espectro de proteínas. Además, este puede tener algunas ventajas en comparación con otras chaperonas, ya que no reacciona con oxidantes y no requiere hidrólisis de ATP para su actividad protectora (Gray *et al.*, 2014). Sin embargo, quedan muchas preguntas por responder sobre esta función de chaperona por parte del poli-P.

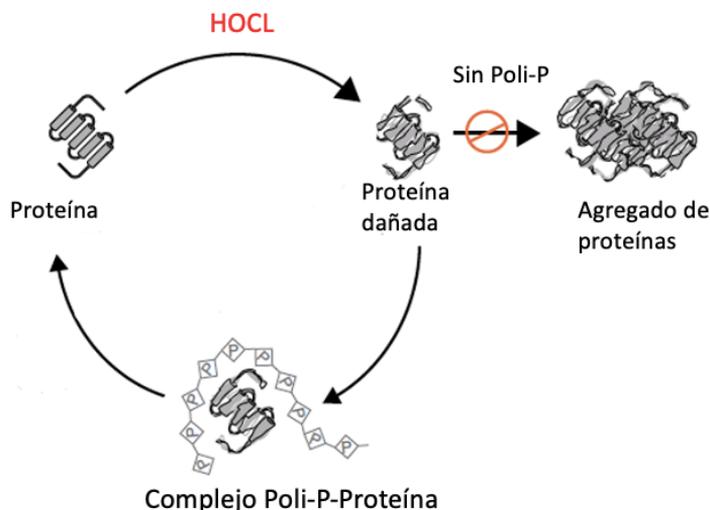


Figura 19. El poli-P actúa como una chaperona para prevenir la agregación de proteínas oxidadas. Imagen adaptada de (Gray and Jakob, 2015).

4.3.5 Polifosfato en la regulación de la respuesta al estrés

En *E. coli*, la respuesta al estrés es controlada por el factor σ^{38} codificado por el gen *rpoS*. Se ha demostrado que la enzima Ppk y el poli-P son necesarios para la transcripción de *rpoS*. Cuando hay condiciones de estrés osmótico o falta de nitrógeno, se ha observado que un mutante deficiente en σ^{38} no acumula poli-P (Shiba *et al.*, 1997; Ault-Riché *et al.*, 1998). Por lo tanto, debe de existir una relación entre la acumulación de poli-P y la activación de *rpoS* en *E. coli*.

Aunque no se conozcan los mecanismos exactos por los cuales el poli-P influye en la regulación de *rpoS*, se cree que podría actuar como una señal que lleva a la activación de σ^{38} en respuesta al estrés. Por lo tanto, el poli-P parece estar involucrado en la regulación en la transcripción de este gen, lo que a su vez permite una respuesta eficaz frente a condiciones de estrés (Gray and Jakob, 2015).

En algunas BAL, como *Lc. paracasei* (Alcántara *et al.*, 2014, 2018), *Lc. rhamnosus* (Correa Deza *et al.*, 2017) y *Limosilactobacillus reuteri* (Basu Thakur *et al.*, 2019), se ha comprobado que la síntesis de poli-P está involucrada en la resistencia a agentes oxidantes, pH ácido o temperaturas altas, aunque los mecanismos involucrados se desconocen por el momento.

4.3.6 Papel en la virulencia de patógenos

Como se ha mencionado anteriormente, la Ppk se encuentra muy conservada en muchas especies bacterianas, tanto en microorganismos Gram-positivos y como en Gram-negativos, incluyendo a la mayoría de las especies patógenas. En estudios donde se analizó el papel de la enzima Ppk en la fisiología de diferentes especies patógenas como *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se observó que al mutar el gen *ppk*, su movilidad se veía bastante afectada. Por lo tanto, esta disminución en la movilidad sugiere un papel crucial de la Ppk o el poli-P en la patogénesis bacteriana (Rashid, Rao and Kornberg, 2000).

Además, se ha observado que el poli-P es necesario también para otros factores asociados a la virulencia de ciertos patógenos, como son la formación de biofilms y la producción de esporas en *Bacillus cereus* (Shi, Rao and Kornberg, 2004). Otro ejemplo de una función recientemente descubierta para el poli-P en la patogénesis bacteriana es el reportado por Tang-Fichaux *et al.* (2020) en el que demuestra que la producción de la toxina colibactina por parte de diversas cepas de *E. coli*, que daña el ADN, depende de la presencia de Ppk (Tang-Fichaux *et al.*, 2020). Diversos estudios en modelos de infección en animales han demostrado que la virulencia de ciertos patógenos también se ve atenuada por la incapacidad de sintetizar poli-P (Peng *et al.*, 2012; Chuang, Belchis and Karakousis, 2013; Lv *et al.*, 2022; Rojas *et al.*, 2024).

Objetivos

El metabolismo del fosfato (P_i) es esencial para todos los seres vivos, tanto desde el punto de vista energético como de biosíntesis. Se ha postulado que en las BAL este metabolismo podría jugar un papel en algunas de sus características funcionales, como son la retención de metales tóxicos o la síntesis de moléculas con actividad probiótica sobre el huésped, como el polifosfato (poli-P). La incorporación de P_i en bacterias es un proceso que ha sido ampliamente estudiado en algunas especies modelo, pero se carece de información en miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Distintos lactobacilos poseen en su genoma genes (*pstSCAB*) que codificarían un transportador ABC específico de P_i que podría ser el responsable de la acumulación de arsenato [$As(V)$], un análogo estructural del P_i . Estos genes se encuentran habitualmente adyacentes a un sistema de dos componentes (TCS), *phoPR*, homólogo a sistemas que se ha demostrado en otras bacterias que intervienen en la regulación del metabolismo del P_i . Por otro lado, investigaciones recientes en lactobacilos han mostrado la implicación de genes que codifican poli-P quinasas (*ppk*) en la síntesis de poli-P. Estos genes se encuentran agrupados con diferentes genes (*ppx*) que codificarían exopolifosfatasas posiblemente involucradas en la degradación del poli-P.

Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue el estudio de cómo el metabolismo del P_i y su regulación en lactobacilos afectan a los dos aspectos funcionales anteriores: captación del metaloide $As(V)$ y producción de poli-P. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar si el transportador PtsSCAB o el TCS PhoPR de lactobacilos juegan algún papel en la incorporación de especies inorgánicas de As.
- Estudiar la posible función del regulador transcripcional PhoP en el control de los genes *pst* y descubrir otros genes controlados por él, usando como modelo la bacteria *Lactocaseibacillus paracasei*.
- Estudiar la actividad de las exopolifosfatasas Ppx1 y Ppx2 presentes en la familia *Lactobacillaceae* y su función en el mantenimiento de los niveles de poli-P en *Lc. paracasei*.
- Determinar de qué manera está regulada la acumulación de poli-P y qué factores la desencadenan en este modelo bacteriano.

Capítulo 1

Captación de fosfato y su relación con la toxicidad del arsénico en lactobacilos

La captación de contaminantes químicos por microorganismos está mediada, en algunos casos, por sistemas de transporte específicos (Chiocchetti *et al.*, 2019). En el caso de las especies inorgánicas de As [As(III) y As(V)], estudios previos revelaron que la capacidad de retención de diversas cepas de BAL era baja (Clemente *et al.*, 2020). Además, se demostró que la captación de As por los lactobacilos disminuye considerablemente cuando se usan células no viables (Clemente *et al.*, 2020) ,lo que sugiere que este proceso de captación está asociado a un proceso metabólico.

Puesto que se dispone de evidencia de que algunas cepas de BAL disminuyen el daño asociado a la exposición a As inorgánico (Bora *et al.*, 2022; Jain, Jain and Jain, 2023; Domene *et al.*, 2024), decidimos estudiar con mayor profundidad la interacción y toxicidad del As en BAL partiendo de la hipótesis de que la incorporación de As(V) en los lactobacilos podría tener lugar a través de transportadores de Pi específicos, debido a su analogía estructural con el Pi. El sistema de captación de Pi más estudiado en las bacterias es el transportador de Pi de alta afinidad de tipo PstSCAB (apartado 3.2.2), cuya transcripción está regulada por el TCS PhoPR en *E. coli* (apartado 3.2.1). Para evaluar la posible contribución de este sistema a la incorporación de As, decidimos construir mutantes en los genes *pstC* del transportador PstSCAB, en el gen regulador del transporte de Pi *phoU* y en el gen *phoP* del TCS PhoPR en la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* Lpp+, estudiada previamente en el laboratorio por su captación de As y en la cepa de referencia *Lp. plantarum* WCFS1. Además, se construyeron mutantes en estos genes en nuestra bacteria modelo del laboratorio, *Lacticaseibacillus paracasei* BL23, incluyendo adicionalmente un mutante en el gen *phoR* del TCS PhoPR. El TCS PhoPR de esta cepa ha sido ya objeto de estudio y se ha demostrado que la mutación del regulador de la respuesta PhoP ocasiona un crecimiento lento y sensibilidad al pH ácido en medio MRS (Alcántara, Revilla-Guarinos and Zúñiga, 2011). Este TCS está ubicado adyacente a los genes *pstSCAB_{1B2}-phoU*. Sin embargo, este operón no se ha estudiado en ningún miembro de la familia *Lactobacillaceae*.

Por lo tanto, nuestro objetivo en este capítulo fue dilucidar si los sistemas de transporte y regulación de los niveles intracelulares de Pi están implicados en la unión de As en lactobacilos. Mediante la construcción de estos mutantes, demostramos que es probable que el As(V) sea captado por el sistema de transporte PstSCAB en *Lp. plantarum*. Además, nuestros hallazgos informan sobre la existencia de un vínculo entre la actividad del regulador de respuesta PhoP y la sensibilidad al As(III) en *Lc. paracasei*.

Metodología

1. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas usadas en este estudio (Tabla 2) fueron cultivadas rutinariamente en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (BD Difco) a 30 o 37 °C, en condiciones estáticas. Para los ensayos de toxicidad de As se utilizó el medio MEI (Alcántara *et al.*, 2018) que contenía: 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de triptona, 0.4% K₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.005% MnSO₄, 0.05% cisteína, 0.05% glucosa y 1 ml de Tween 80 por litro. Cuando se usaron condiciones de bajo Pi, no se agregó K₂HPO₄ ni KH₂PO₄ al medio MEI (medio MEI-LP). *E. coli* DH10B [*F*⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rps ΔlacX74 Φ80 lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ*⁻] fue usada para la clonación y se cultivó en medio LB a 37 °C bajo condiciones de agitación (200 rpm). Para la selección de clones de *E. coli* se utilizó ampicilina a 100 μg/ml. Eritromicina a 5 μg/ml fue usada para la selección de los clones de lactobacilos. A los medios de cultivo sólidos se les añadió agar al 1.8% (p/v).

Tabla 2. Cepas de *Lp. plantarum*, *Lc. paracasei* y sus mutantes utilizados en este capítulo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Lp. plantarum</i> WCFS1	Cepa silvestre	(Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003)
<i>Lp. plantarum</i> DC421	WCFS1 <i>pstC</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lp. plantarum</i> DC423	WCFS1 <i>phoP</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lp. plantarum</i> DC425	WCFS1 <i>phoU</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lp. plantarum</i> Lpp+	Cepa silvestre	(Alcántara <i>et al.</i> , 2018)
<i>Lp. plantarum</i> DC424	Lpp+ <i>pstC</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> BL23	Cepa silvestre	(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lc. paracasei</i> DC399	BL23 <i>pstC</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> TC04	BL23 <i>phoP</i> ::pRV300;Eri ^r	(Alcántara, Revilla-Guarinos and Zuñiga, 2011)
<i>Lc. paracasei</i> DC398	BL23 <i>phoU</i> ::pRV300;Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC487	BL23 Δ <i>phoP</i>	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC488	BL23Δ <i>phoP</i> [pT1 <i>phoP</i>]; Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC489	BL23 Δ <i>phoR</i>	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC490	BL23Δ <i>phoR</i> [pT1 <i>phoR</i>]; Eri ^r	Este capítulo

Eri^r; Resistencia a eritromicina.

2. Construcción de cepas mutantes en los genes *pst* y *pho*

Los oligonucleótidos usados en este capítulo están listados en la Tabla 3. El ADN cromosómico de *Lp. plantarum* y *Lc. paracasei* fue aislado con el *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (Roche Applied Science). Fragmentos internos de 300 pb a 500 pb de

los genes *pstC*, *phoP* y *phoU*, fueron amplificados con sus respectivos pares de cebadores, mediante PCR a partir del ADN cromosómico usando NZYtaq II ADN polimerasa (NZYtech). Los fragmentos obtenidos fueron purificados con *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Cytiva), se digirieron con las enzimas de digestión *XhoI* y *PstI* y se clonaron en el plásmido integrativo pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) digerido con las mismas enzimas. Las ligaciones de los fragmentos se realizaron incubando toda la noche con ADN ligasa de T4 (1U en 20 μ l de reacción a 16 °C; Roche). Posteriormente, las mezclas de ligación se transformaron en la cepa *E. coli* DH10B mediante electroporación (25 μ F, 2500 V y 200 Ω , en un aparato GenePulser, Bio-Rad). Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas de agar LB con 40 mg/ml X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido), 0.1 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y ampicilina a 100 μ g/ml. Se aislaron las colonias de color blanco como posibles positivas para la integración de los fragmentos en el plásmido. Estos clones de *E. coli* se comprobaron por PCR con dos oligonucleótidos específicos de pRV300 (pRV300-For y pRV300-Rev; Tabla 3), que flanquean el *polylinker* de éste.

Una vez comprobados los clones en *E. coli* DH10B, se aislaron y purificaron los plásmidos con el *NucleoSpin Plasmid Kit* (Machery-Nagel) y fueron usados para transformar células electrocompetentes de *Lp. plantarum* WCFS1, *Lp. plantarum* Lpp+ y *Lc. paracasei* BL23 por medio de electroporación con cubetas de 0.2 cm a 25 μ F, 1500 V y 400 Ω , con 0.5-2 μ g de los plasmidos purificados. Las bacterias electrocompetentes de *Lp. plantarum* usadas fueron preparadas en polietilenglicol (PEG) 1500 siguiendo el protocolo descrito por Aukrust and Blom (1992) con algunas modificaciones. Las bacterias se cultivaron en 50 ml de MRS suplementado con 1% (p/v) de glicina hasta una DO_{595nm} de 0.4-0.6. Después se lavaron con 1 volumen de 1 mM $MgCl_2$ frío. Posteriormente, las células se lavaron con medio volumen de PEG 1500 al 30% frío y se resuspendieron en 500 μ l de PEG 1500 al 30%. Después de la electroporación las células fueron resuspendidas en 1 ml de MRS e incubadas por 1 h a 30 °C, para ser luego sembradas en placas de MRS con eritromicina 5 μ g/ml, que se incubaron a 30 °C durante 48 h. Para el caso de las competentes de *Lc. paracasei* se siguió el protocolo descrito previamente (Posno *et al.*, 1991). Las células transformadas fueron sembradas en MRS con eritromicina 5 μ g/ml e incubadas a 37 °C por 48 h. La integración del plásmido en el locus correcto en los transformantes resultantes se comprobó por PCR con un oligonucleótido que hibridaba en el gen diana, fuera del fragmento clonado, y otro que hibridaba en el plásmido pRV300.

Para obtener las cepas derivadas de *Lc. paracasei* BL23 con eliminaciones Δ *phoP* y Δ *phoR*, se sintetizaron fragmentos de 1kb *upstream* y *downstream* de la región que se desea eliminar por PCR, usando *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo scientific). Estos fragmentos se solapaban 20 pb y se fusionaron mediante una segunda PCR usándolos como molde. Los fragmentos obtenidos de 2 kb fue digeridos con las enzimas de restricción apropiadas y se clonaron en pRV300. Estos plásmidos integrativos fueron usados para transformar *Lc. paracasei* BL23 y se aislaron cepas con una primera

Capítulo 1. Metodología

integración del plásmido en el cromosoma en placas de MRS con eritromicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incubadas a 37 °C por 48 h. Se seleccionó un transformante de cada construcción y ambos clones fueron cultivados en medio MRS líquido por aproximadamente 200 generaciones en ausencia del antibiótico. Cepas que habían sufrido una segunda recombinación, que condujo a la pérdida del plásmido, fueron seleccionadas por ser sensibles a eritromicina mediante réplica en placas de MRS con y sin eritromicina. Entre los clones sensibles a la eritromicina obtenidos de cada construcción, se comprobó la presencia de la eliminación deseada mediante PCR y se confirmó mediante secuenciación.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este capítulo.

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
<i>Lp. plantarum</i>		
phoP-For	TTTTCTCGAGTGTGACGGCTAAAAATGATG	Disrupción de <i>phoP</i> en <i>Lp. plantarum</i>
phoP-Rev	TTTTCTGCAGAAATTCCTTTGGTGTCAAGC	
phoP-C	CCACAAATTCGTAGCCAAAG	Disrupción de <i>pstC</i> en <i>Lp. plantarum</i>
pstC- For	TTTTCTCGAGTTCTACTTTGTTGCATCACG	
pstC-Rev	TTTTCTGCAGAAAGGTCCCAGAAAGAATCC	Disrupción de <i>phoU</i> en <i>Lp. plantarum</i>
pstC-C	TTTATAAATTGTTTGCCAGCG	
phoU-For	TTTTCTCGAGACGGGAAGTTGAACTAGAAC	Disrupción de <i>phoU</i> en <i>Lp. plantarum</i>
phoU-Rev	TTTTCTGCAGATACATCTCCCCGACTTTTG	
phoU-C	ATTCAGGTAATCCGTGGAAC	
<i>Lc. paracasei</i>		
pstCLcas-For	TCAAAGCTTCGCACGGCAATCCCGAAGTTG	Disrupción <i>pstC</i> en <i>Lc. paracasei</i>
pstCLcas-Rev	TCAGAAATCCCGGAATCGCAGCACGTAGAACC	
pstCLcas-C	TCAGTTTAATTGTGATTGTGG	Disrupción <i>phoU</i> en <i>Lc. paracasei</i>
phoULcas-For	ACGAAGCTTCGAATTGATTGCACTGCAG	
phoULcas-Rev	ATGGAATTCATTGATCCCATGGTCTTC	Amplificación del segmento 5' de <i>phoP</i>
phoULcas-C	ATGAACGTGAAGTAGATTGG	
dphoP-F1	ATATCGAATTCCTGCAGCCAGGTGCGACCTTCATGAC	Amplificación del segmento 3' de <i>phoP</i>
dphoP-R1	TCGCGTAAATGGCTGACCTGCGCAGGTTGTCATCAA CAA	
dphoP-F2	TTGTTGATGACGAACCTGCGCAGGTCAGCCATTACG	Amplificación del segmento 3' de <i>phoP</i>
dphoP-R2	CTAGAACTAGTGGATCCCCGCAAAGGCAAGCGTTAG GAG	
dphoR-F1	ATATCGAATTCCTGCAGCCCCATAATCTAGATCGCATCC	Amplificación del segmento 5' de <i>phoR</i>
dphoR-R1	GTCG CACAGGCAAAGTGACCGTGACATCCCCGACAAAGTCC AG	
dphoR-F2	CTGGACTTTGTCGGAATGTCACGGTCACTTTGCCTGT	Amplificación del segmento 3' de <i>phoR</i>
dphoR-R2	G CTAGAACTAGTGGATCCCCCAGCTGTGCCATCGAGA C	
CphoP-F	atgttataatacaagtatcaTTTCCGGAGGAGACAGCATG	Clonación de <i>phoP</i> en pT1NX
CphoP-R	ttgttagcagccggatctaTTATTCATGGGGTGCCTCC	
CphoR-F	atgttataatacaagtatcaATACCAAATGGAGGCACCC	Clonación de <i>phoR</i> en pT1NX
CphoR-R	ttgttagcagccggatctaTTTTTCATCCTCTGTGCGG	
pRV300-For	AACAGCTATGACCATG	Comprobación de los clones obtenidos
pRV300-Rev	GTA AACGACGGCCAGT	

Los nucleótidos subrayados corresponden a los sitios de restricción introducidos para la clonación en pRV300. Los oligonucleótidos con el sufijo "-C" en sus nombres sirvieron para confirmar la integración del plásmido en el locus correcto. Los nucleótidos en minúsculas son extensiones 5' para crear homología con pT1NX para las reacciones de ensamblaje Gibson.

Capítulo 1. Metodología

3. Complementación de las cepas

Los genes *phoP* y *phoR* de *Lc. paracasei* BL23 fueron amplificados por PCR con *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) con los oligonucleotidos apropiados (Tabla 4). Los fragmentos de PCR purificados fueron ligados con el *GeneArt Gibson Assembly EX kit*, Invitrogen) en el plásmido pT1NX (Schotte *et al.*, 2000) previamente digerido con BglIII/SpeI, dando lugar a construcciones con los genes *phoP* y *phoR* bajo el control del promotor constitutivo P1 de *Lactococcus lactis*. Los productos de la reacción de Gibson se usaron para transformar células electrocompetentes de *Lc. lactis* MG1363 las cuales se prepararon siguiendo el protocolo de Holo and Nes (1989). Después de la electroporación, los clones transformantes fueron seleccionados en placas de agar M17 (Oxoid) que contenían 0.5 % (p/v) de glucosa (GM17) con eritromicina 5 µg/ml. Las colonias se comprobaron mediante PCR y los clones positivos se cultivaron en 5 ml de GM17 para aislar el plásmido usando el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) con algunas modificaciones. Las células se incubaron en tampón STE (20% de sacarosa, 10 mM de Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM de EDTA, 50 mM de NaCl) suplementado con lisozima (1 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C antes de la lisis celular. Los pasos siguientes se llevaron a cabo según las indicaciones del fabricante. Los plásmidos aislados y purificados que contenían los genes *phoP* y *phoR* fueron secuenciados y utilizados para transformar las cepas mutantes de *Lc. paracasei* $\Delta phoP$ y $\Delta phoR$ por electroporación para la expresión de estos genes.

4. Ensayos de toxicidad, incorporación y especiación de As

El As(V) (solución madre de 1000 mg/l, As₂O₅) se adquirió de Merck. La solución de arsenito [As(III) (1000mg/l)] se preparó disolviendo 1.32 g de As₂O₃ (Riedel-de Haën) en 25 ml de KOH 20% p/v. Tras la neutralización con H₂SO₄ al 20% v/v, esta solución se completó hasta un volumen final de 1 l con H₂SO₄ 1% v/v.

Las diferentes cepas de lactobacilos fueron sembradas en medio MEI o MEI-LP con diferentes concentraciones de As(III) o As(V) e incubadas en placas de 96 pocillos (200 µl por pocillo) a 30 °C (*Lp. plantarum*) o 37 °C (*Lc. paracasei*) en un lector de placas Spectrostar Nano (BMG-Labtech). Se monitorizó el crecimiento de las bacterias durante 24 horas con medidas espectrofotométricas cada 30 minutos a DO_{595 nm}. Por cada muestra, se hicieron tres réplicas de las curvas de crecimiento, para determinar las respectivas desviaciones estándar.

Los ensayos de inhibición de As(III) en placas de Petri se llevaron a cabo colocando discos de papel de filtro Whatman 3MM (5 mm de diámetro) impregnados con 3 µl de As(III) 1000 mg/l en placas de agar MRS de 90 mm con una superposición de 5 ml de MRS con 0.8 % de agar que contenían 10⁶ UFC de diferentes cepas de *Lc. paracasei*. Tras 24 h de incubación, se midió el diámetro de los halos de inhibición.

Para los ensayos de incorporación de As(V) a lo largo del tiempo, las cepas fueron cultivadas toda la noche en 50 ml de MRS, se centrifugaron ($5000 \times g$, 10 min) y se lavaron con 1 volumen de NaCl 0.9%. Luego se resuspendieron en NaCl 0.9% y se ajustó la DO_{595nm} a 10. Se prepararon alícuotas de las células suspendidas (1ml) que fueron incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos en un baño de agua antes de añadir el As(V) a una concentración final de 5 mg/l. Se tomaron muestras de 300 μl en diferentes intervalos de tiempo y se filtraron rápidamente al vacío utilizando filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm (Millipore). Los filtros se lavaron dos veces con 5 ml de NaCl 0.9% y se secaron al aire antes de la cuantificación.

La capacidad de retención de As(III) de las cepas de *Lc. paracasei* se estimó midiendo la cantidad de As(III) retenida por 1 ml de células a una DO_{595nm} de 10. Las suspensiones celulares se incubaron con 5 mg/l de As(III) en NaCl 0.9%, 1 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de centrifugar a $10000 \times g$ 5 min, el sedimento bacteriano se lavó dos veces con 1 ml de NaCl 0.9% y se determinó el As(III) en los sobrenadantes de los lavados y los sedimentos bacterianos.

Para la determinación del As total en las muestras (sobrenadantes de lavado bacteriano, sedimentos celulares y filtros), tras un paso de calcinación en seco, la cuantificación del As se llevó a cabo mediante espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros por Inyección de Flujo (FI-HG-AAS), siguiendo el procedimiento descrito previamente (Clemente, Devesa and Vélez, 2017).

Para determinar la oxidación de As(III) a As(V) por parte de *Lc. paracasei*. Se inocularon 50 ml de medio MEI con 5 mg/l As(III) con *Lc. paracasei* BL23 y las cepas ΔphoP y ΔphoR a una DO_{595nm} inicial de 0.01. Después de 16h de incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, las células fueron lavadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con un volumen de NaCl 0.9% ($4000 \times g$ 10 min) y los sedimentos bacterianos se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. El arsénico se extrajo de los sedimentos bacterianos con 5 ml de HNO_3 0.28 M a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1.5 h (Huang, Ilgen and Fecher, 2010) y los contenidos de As(III) y As(V) se determinaron por HPLC con columna de intercambio aniónico (Hamilton PRP X100, $150 \times 4,1\text{ mm}$, tamaño de partícula 5 μm) acoplada a una ICP-MS PerkinElmer Nex-Ion™300X según se describe en Du *et al.*, (2019).

5. Análisis estadísticos

Se realizaron ANOVAs de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey y la prueba t de Student con GraphPad Prism 5. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

Resultados

1. Obtención de las cepas mutantes de *Lactobacillus*

El transportador de Pi PstSCAB se encuentra ampliamente distribuido en bacterias. En muchos casos, los genes que codifican para este transportador se agrupan con los genes que codifican para el TCS PhoPR, el cual está implicado en la detección de la concentración de Pi extracelular y en controlar la expresión de los genes regulados por Pi. Al analizar las secuencias genómicas disponibles dentro de la familia *Lactobacillaceae*, se observó esta organización típica [Figura 20 (Botas *et al.*, 2022)], donde el gen *phoU* se encuentra también agrupado con *pstSCAB*. Generalmente, este operón contiene dos copias consecutivas del gen que codifica para las subunidades ATPasa PstB (*pstSCAB_{1B2}*) y los genes *phoPR* se encuentran ubicados aguas arriba.

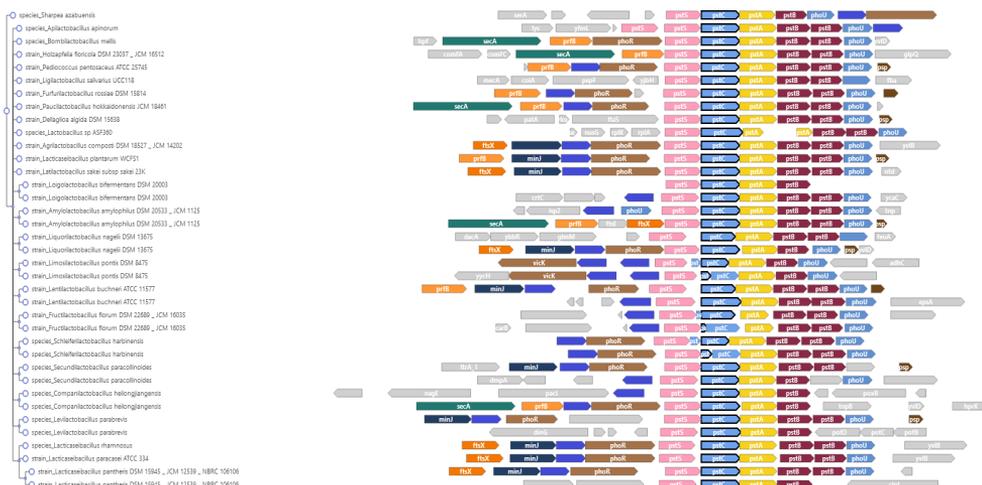


Figura 20. Contexto genómico de los genes *pstSCAB* en miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Los genes *phoP*, que en la mayoría de los casos preceden al gen que codifica el sensor quinasa PhoR, están representados en color azul oscuro. En algunas cepas existen dos operones *pstSCAB*, en los que uno de ellos está agrupado con genes *phoPR*. El gen que codifica una proteína transmembrana putativa con un dominio PDZ, situado aguas arriba de *phoP*, se anota en la mayoría de los genomas como *minJ*, debido a las homologías con *minJ* de *Bacillus subtilis*. Las comparaciones se realizaron con *The Genomic Context Visualizer* (GeCoViz; <https://gecoviz.cgmlab.org/>; Jorge Botas, Álvaro Rodríguez del Río, Joaquín Giner-Lamia, y Jaime Huerta-Cepas. (2022). GeCoViz: genomic context visualisation of prokaryotic genes from a functional and evolutionary perspective. *Nucleic Acids Research*, 50, W352-W357; doi.org/10.1093/nar/gkac367).

Para investigar la contribución de este sistema a la incorporación de As(V), decidimos construir mutantes en la subunidad permeasa transmembranal de Pi PstC en *Lp. plantarum* Lpp+. Esta cepa se había caracterizado por poseer una tasa de incorporación

de As(V) alta en comparación con otras cepas de lactobacilos (Clemente *et al.*, 2020) También se construyeron mutantes en la cepa de referencia de *Lp. plantarum*: WCFS1. Por último, también se empleó la cepa de laboratorio *Lc. paracasei* BL23 (Mazé *et al.*, 2010). Mientras que los mutantes en los genes *pstC*, *phoP* y *phoU* se obtuvieron con éxito para las cepas WCFS1 y BL23, por razones desconocidas y a pesar de varios intentos, en la cepa Lpp+ sólo se pudieron obtener disruptantes en *pstC*.

2. La mutación de los genes *pst* que codifican para los transportadores ABC de fosfato afecta a la absorción y toxicidad del As(V)

La determinación de la incorporación de As(V) a lo largo del tiempo en las cepas de *Lp. plantarum* con las mutaciones en los genes *pstC*, *phoP* y *phoU* (Figura 21) reveló que la ausencia de Pi facilitaba la captación de As(V) por las células, especialmente en el caso de la cepa WCFS1, que en estudios previos en el laboratorio había mostrado una baja captación en presencia de Pi. La mutación del componente PstC del transportador ABC de Pi en la cepa Lpp+ dio lugar a una menor captación de As(V), mientras que en la cepa WCFS1 *pstC* esta captación se vio fuertemente reducida. La capacidad de la cepa WCFS1 *phoU* para incorporar As(V) fue comparable a la de la cepa *pstC*, mientras que un mutante *phoP* tuvo un comportamiento intermedio. Por otro lado, la capacidad de incorporación de As(V) por *Lc. paracasei* BL23 en estas condiciones fue muy baja (< 20 ng As(V) por 300 µl de células bacterianas a una DO_{595nm} de 10, para todos los tiempos ensayados) y no mostró diferencias entre la cepa silvestre y la cepa con la mutación en *pstC*.

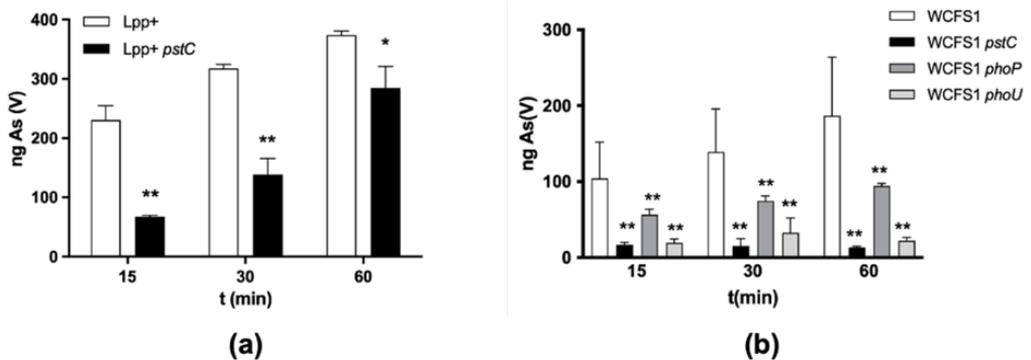


Figura 21. Incorporación de As(V) en cepas de *Lp. plantarum* y sus mutantes derivados afectados en los genes *pst* y *pho* (a) *Lp. plantarum* Lpp+; (b) *Lp. plantarum* WCFS1. Las columnas representan las cantidades medias de As retenidas por 300 µl de células bacterianas a una DO_{595nm} de 10 cuando se exponen a 5 mg/l de As(V) (n=3). Las barras de error representan desviaciones estándar. * (p<0.05); ** (p<0.01), diferencias estadísticas con respecto a la cepa silvestre para cada tiempo.

Capítulo 1. Resultados

A continuación, determinamos el grado de toxicidad del As(V) cultivando las diferentes cepas en medios con alta o baja concentración de Pi (medio MEI y MEI-LP, respectivamente), los cuales contenían diferentes concentraciones de As(V). La toxicidad y los efectos de las mutaciones variaron entre ambas cepas de *Lp. plantarum*, pero en la cepa WCFS1 se observó una menor toxicidad de As(V) en condiciones de alto contenido en Pi (Figura 22), en comparación con condiciones de bajo contenido en Pi (Figura 23). Además, la inactivación de *pstC* o *phoP* mejoró la resistencia a As(V) cuando se realizaron experimentos de crecimiento en condiciones de bajo Pi en la cepa WCFS1. La inactivación de *phoU* en la cepa WCFS1 también resultó en un ligero aumento de la resistencia frente al As(V) (Figura 23).

Los efectos de las mutaciones fueron mucho menos evidentes cuando las cepas se cultivaron en medio MEI, lo que sugiere que la presencia de Pi ejerció un efecto protector sobre la toxicidad del As(V), probablemente a través de la competencia con un sistema de incorporación común. Además, la cepa de *Lp. plantarum* Lpp+ con la mutación *pstC* no mostró una menor sensibilidad al As(V) en comparación con la silvestre, independientemente de la concentración de Pi en el medio (Figura 24). De manera similar a WCFS1, se observó un aumento de la resistencia a As(V) en la cepa BL23 portadora de la mutación en *pstC*, sólo en condiciones de baja concentración de Pi (Figura 24).

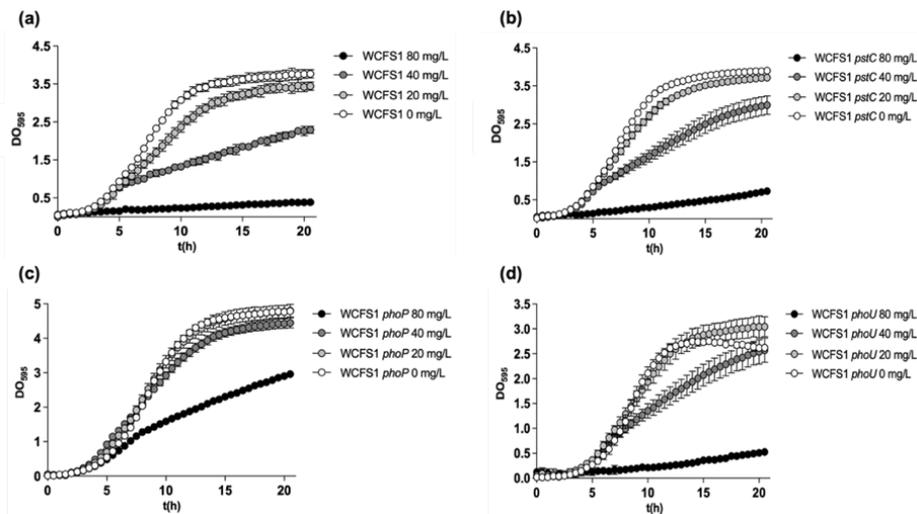


Figura 22. Curvas de crecimiento de *Lp. plantarum* WCFS1 y diferentes mutantes derivados en los genes *pstC*, y *pho* en medio MEI con diferentes cantidades de As(V) indicadas en mg/l. (a) cepa silvestre; (b) mutante *pstC*; (c) mutante *phoP*; (d) mutante *phoU*.

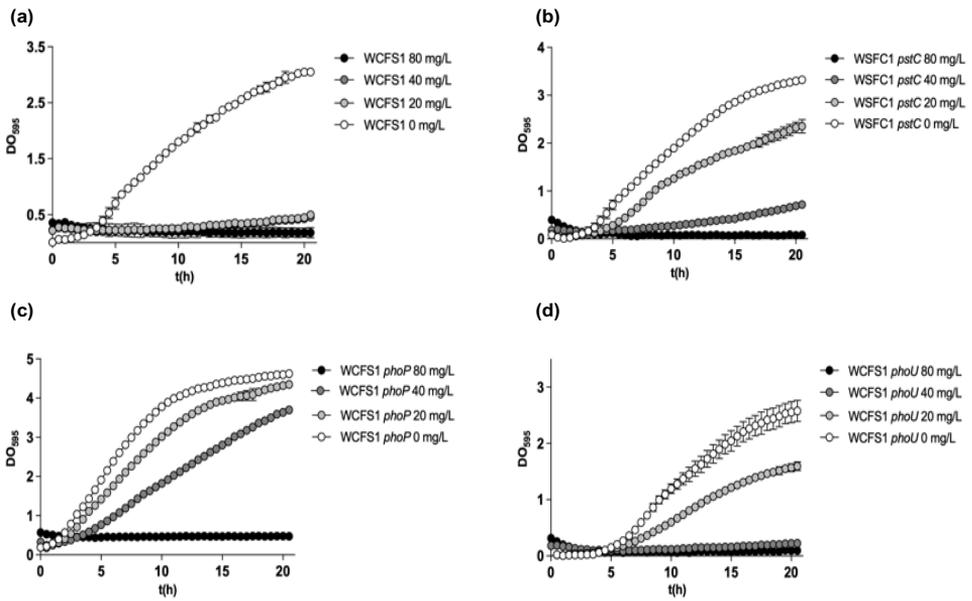


Figura 23. Curvas de crecimiento de *Lp. plantarum* WCFS1 y diferentes mutantes derivados de *pst* y *pho* en medio MEI-LP con diferentes cantidades de As(V) indicadas en mg/l. (a) cepa silvestre; (b) mutante *pstC*; (c) mutante *phoP*; (d) mutante *phoU*.

Capítulo 1. Resultados

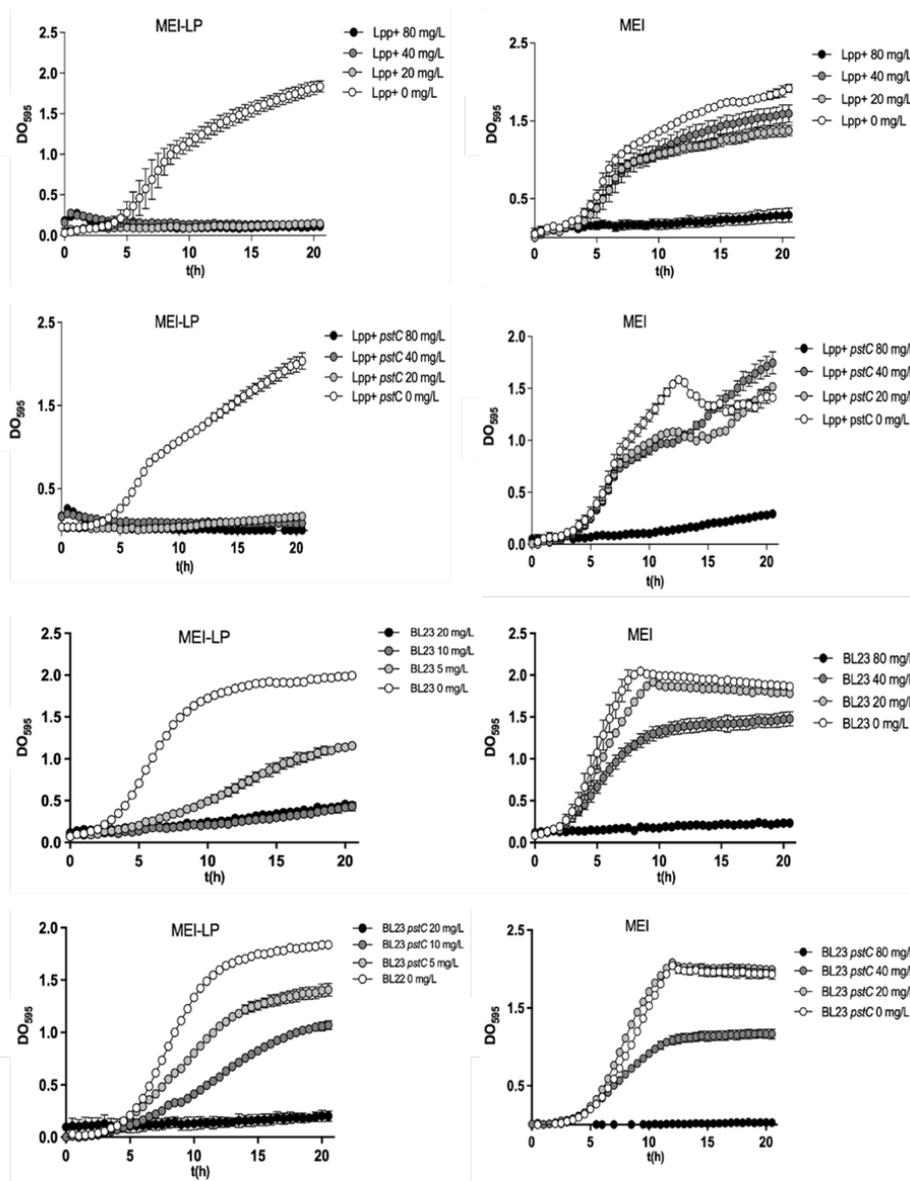


Figura 24. Crecimiento de las cepas *Lp. plantarum* Lpp+ y *Lc. paracasei* BL23, y sus mutantes derivados *pstC*, en medios MEI y MEI-LP con diferentes concentraciones de As(V).

3. Las mutaciones en el TCS PhoPR provocan una mayor resistencia al As(III) en *Lc. paracasei*

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio donde se evaluó la toxicidad del As en una cepa *Lc. paracasei* BL23 con una disrupción del gen *phoP* (*L. paracasei* TC04, Tabla 2) se realizó una observación inesperada: esta mutación en *phoP* provocó un aumento de la resistencia a arsenito [As(III)]. La disrupción se había obtenido mediante la integración de un plásmido en el gen, lo cual podría haber ocasionado efectos polares en la expresión de los genes *phoR* o *pst*. Para abordar esto, y corroborar este hallazgo, decidimos construir una nueva cepa de *Lc. paracasei* BL23 *phoP* en la que se eliminó en fase un fragmento interno dentro el marco de lectura de *phoP*. Dicha cepa expresa una proteína PhoP mutante desprovista de 189 aminoácidos [PhoP Δ (13-201)], que incluía el residuo fosforilable Asp-52.

En la Figura 25 se representan los diámetros de los halos de inhibición resultantes al colocar papeles de filtros impregnados con As(III) sobre un césped de bacterias en medios con contenidos alto o bajo de Pi. Mientras que en la cepa silvestre se observó una clara inhibición del crecimiento, en la cepa Δ *phoP* no se evidenciaron tales halos de inhibición en condiciones de bajo contenido de Pi, y estos se redujeron significativamente en condiciones de alto Pi. En comparación con la cepa silvestre, esta reducción en el diámetro de los halos causados por la toxicidad As(III) también pudo observarse en las cepas *pstC* y *phoU* sólo en condiciones de bajo nivel de Pi. Sin embargo, el efecto de estas mutaciones fue más débil en comparación con Δ *phoP*.

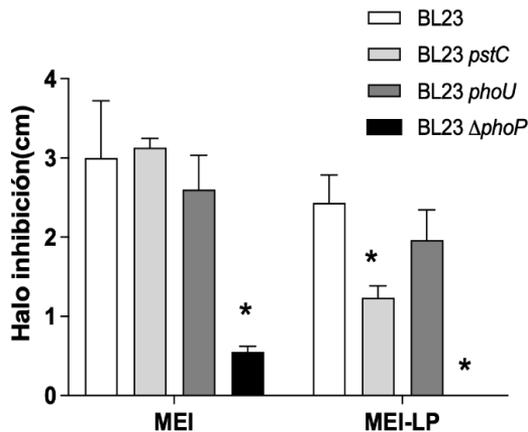


Figura 25. Halos de inhibición de As(III) en placas MEI (alto Pi) y LP-MEI (bajo Pi) sembradas con diferentes cepas de *Lc. paracasei* BL23, silvestre y mutantes en los genes *pst* y *pho*. Las columnas representan los diámetros promedios (n=3). Las barras de error representan desviaciones estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación con la cepa silvestre para cada condición de crecimiento ($p < 0.01$).

Capítulo 1. Resultados

Los ensayos de crecimiento confirmaron la reducción de la sensibilidad a As(III) de la cepa $\Delta phoP$ (Figura 26), que había sido detectada previamente en el mutante con la disrupción en *phoP*. Además, la complementación de la cepa $\Delta phoP$ mediante la expresión de PhoP nativa a partir de un plásmido restauró la sensibilidad a As(III). Esto excluyó la posibilidad de que los efectos polares en genes adyacentes debidos a la mutación (inserción o eliminación) fueran responsables del fenotipo observado en la cepa $\Delta phoP$. En la Figura 27 podemos ver que el fenotipo de resistencia a As(III) tras la mutación de *phoP* fue exclusivo de *Lc. paracasei*, ya que en las cepas mutantes equivalentes de *Lp. plantarum* no se observaron cambios aparentes en la sensibilidad a As(III).

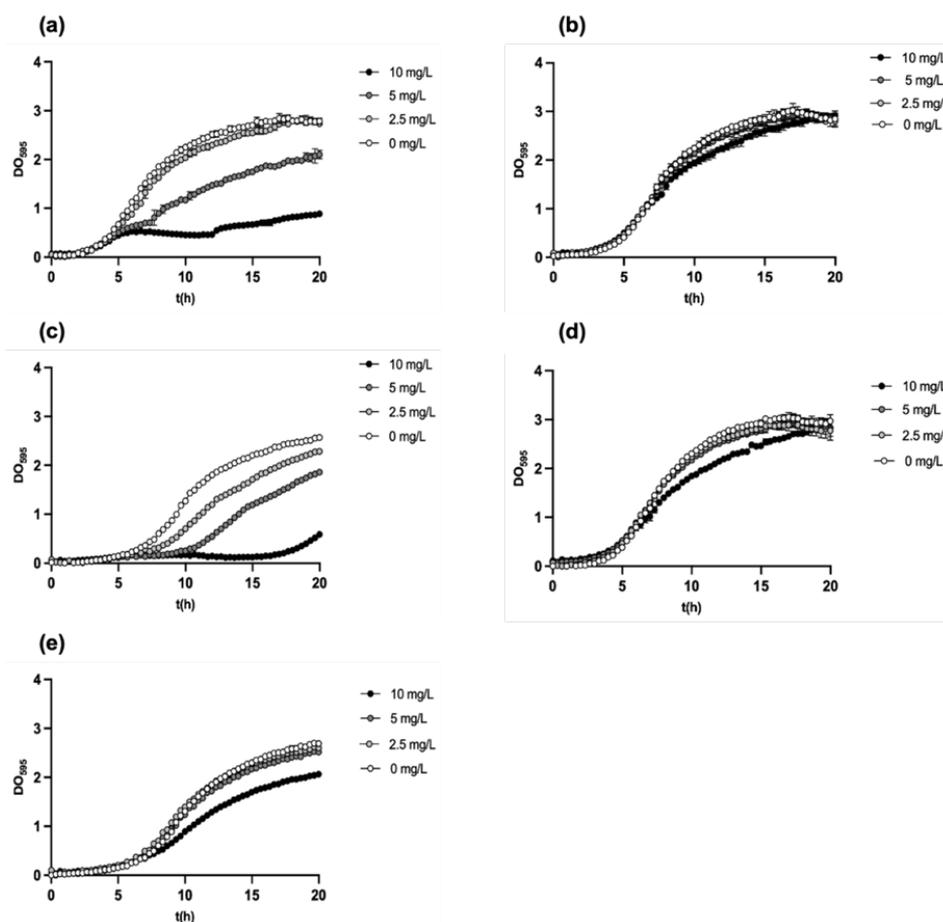


Figura 26. Curvas de crecimiento de *Lc. paracasei* BL23, mutantes *phoP* o *phoR* y sus cepas complementadas en medio MEI con diferentes cantidades de As(III). (a) BL23 (cepa silvestre); (b) $\Delta phoP$; (c) $\Delta phoP$ [pT1phoP], cepa complementada; (d) $\Delta phoR$; (e) $\Delta phoR$ [pT1phoR], cepa complementada.

La funcionalidad de los TCS suele requerir la acción conjunta de una histidina quinasa, que actúa como un sensor, y un regulador de la respuesta (Buschiazzo and Trajtenberg, 2019). Por lo tanto, investigamos si la eliminación de PhoR en la cepa BL23 producía un fenotipo de resistencia a As(III) similar al detectado en la cepa $\Delta phoP$. Para esto, se obtuvo una nueva cepa en la que *phoR* se eliminó por completo mediante doble recombinación. La toxicidad del As(III) se redujo en esta cepa en comparación con la cepa silvestre, alcanzando niveles similares a los de una cepa $\Delta phoP$. Aunque la transformación de esta cepa con un plásmido con *phoR* no complementó íntegramente la inactivación de *phoR* (Figura 26). Estos resultados sugirieron que la resistencia al As(III) estaba posiblemente ligada a genes bajo control de PhoPR.

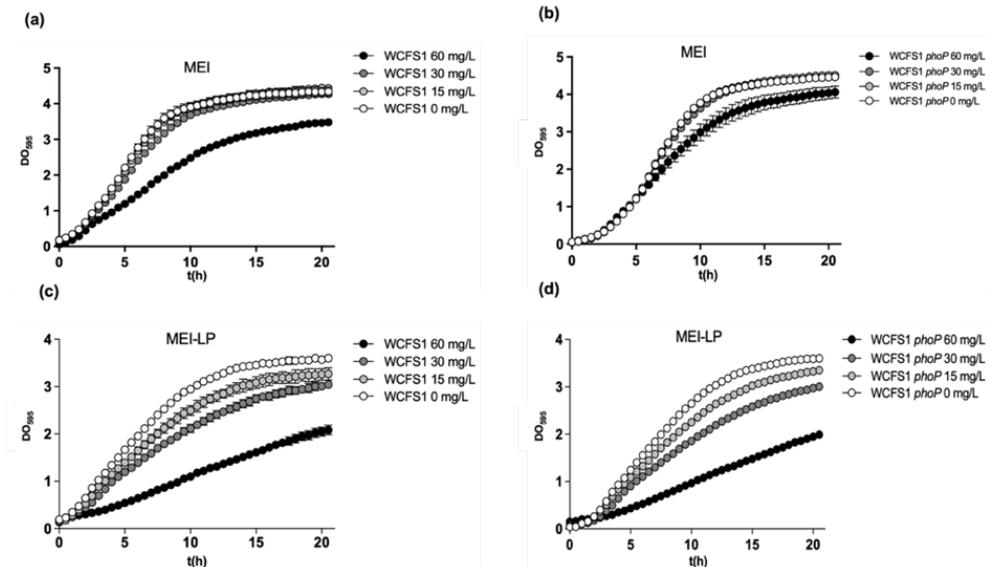


Figura 27. Curvas de crecimiento de *Lp. plantarum* WCFS1 y su mutante *phoP* en medio MEI con diferentes cantidades de As(III).

4. No se observan diferencias en la oxidación de As(III) en los mutantes *phoP* o *phoR* de *Lc. paracasei*

El hecho de que la eliminación de PhoP desencadenara la resistencia a As(III) en *Lc. paracasei* resultó desconcertante, dado que esta especie de As inorgánico no se asemeja al Pi y sus vínculos con el transporte y metabolismo del Pi no son evidentes. Por lo tanto, nuestra hipótesis para explicar este hecho fue que, al ser un regulador transcripcional pleiotrópico, la ausencia de PhoP podría provocar cambios en la capacidad y

Capítulo 1. Resultados

características de la superficie celular bacteriana para retener As(III), lo que conduciría a una menor toxicidad del metaloide. Cuando las cepas de *Lc. paracasei* se incubaron con 5 mg/l de As (III) a una DO_{595nm} de 10, mostraron una baja capacidad para retener As(III). En estos ensayos, la mayor parte del As(III) añadido a las suspensiones celulares se pudo recuperar en un primer paso de lavado, tanto en la cepa silvestre como en la cepa $\Delta phoP$ ($98.4 \pm 0.5 \%$ y $96.4 \pm 3.0 \%$, respectivamente).

También se pudo comprobar que el As(III) retenido por las bacterias tras dos pasos de lavado fue algo mayor en la cepa $\Delta phoP$ (56.3 ± 40.2 ng de As por ml de células a una DO_{595nm} de 10) en comparación con la silvestre (4.9 ± 2.3 ng de As por ml de células a una DO_{595nm} de 10). Esto excluía la posibilidad de que una menor interacción o unión en la superficie provocara una menor toxicidad en las cepas *phoP*. Una segunda posibilidad era que en las cepas $\Delta phoP$ o $\Delta phoR$ se produjera una posible oxidación de As(III) a la especie menos tóxica As(V), afectando así a la toxicidad del As añadido a los cultivos. Por consiguiente, estudiamos esta posibilidad realizando experimentos en los que se adicionó As(III) durante el crecimiento en medio MEI en la cepa BL23 y sus mutantes $\Delta phoP$ y $\Delta phoR$, y determinamos la especiación de las diferentes formas de arsénico presentes en las células.

Se pudo comprobar que la oxidación de As(III) a As(V) no tuvo lugar en estos ensayos, ya que la proporción de As(V) detectada fue siempre muy baja y similar para todas las cepas (entre 0.9 y 2% del total de As) (Figura 28). Esto indicaba que el aumento de la resistencia al As(III) tras la eliminación de *phoP* o *phoR* probablemente reside en mecanismos diferentes a la oxidación del As(III). En estos experimentos, la capacidad de las bacterias mutantes para retener As(III) también fue mayor en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en estos ensayos, debido a la toxicidad intrínseca del As(III), la cepa de tipo silvestre mostró un crecimiento inferior al de las cepas $\Delta phoP$ y $\Delta phoR$.

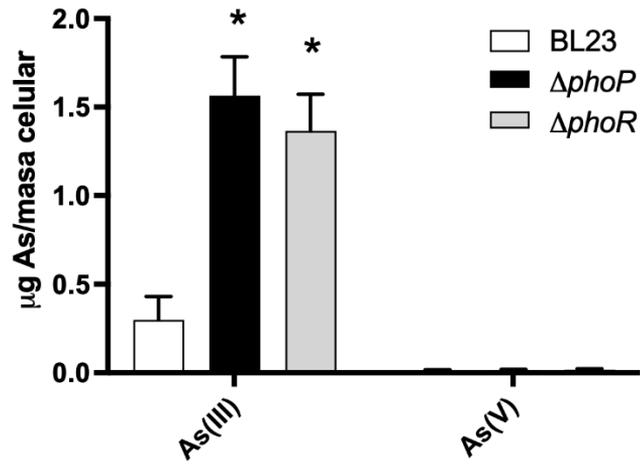


Figura 28. Especiación de As inorgánico en pellets de células bacterianas de diferentes cepas de *Lc. paracasei*. Las células fueron cultivadas en medio MEI que contenía 5 mg/L de As(III), los contenidos de As(III) y As(V) en las bacterias se cuantificaron y se refirieron a µg de As por gramo de masa húmeda (n=3). Las barras de error presentan desviaciones estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación con la cepa silvestre ($p < 0.01$).

Capítulo 1. Discusión

Discusión

Con los resultados obtenidos hemos demostrado que la capacidad de captación de As(V) de *Lp. plantarum* WCFS1 puede estar asociada al transportador de Pi PstSCAB. Como se muestra en la Figura 20, el operón *pstSCAB* se encuentra ampliamente distribuido en los lactobacilos, lo que sugiere que este transportador podría ser un importante sistema de captación de Pi en este grupo bacteriano, aunque no se han realizado estudios previos sobre él en estos microorganismos.

Aunque los transportadores Pst se han caracterizado ampliamente en otras bacterias y se han estudiado a fondo en organismos modelo como *E. coli*, también se han identificado otros transportadores de Pi, como las permeasas Pit (Atalla and Schumann, 2003; Hsieh and Wanner, 2010). La existencia de transportadores de Pi alternativos y adicionales podría explicar los distintos efectos de la inactivación de *pstC* en la incorporación de As(V) en las dos cepas de *Lp. plantarum* utilizadas. Por otro lado, para el caso de *Lc. paracasei* BL23, que no mostró ninguna capacidad de incorporación de As(V) destacable, la mutación de *pstC* también produjo un aumento de la resistencia al As(V) cuando las células se cultivaron en un medio con bajo contenido en Pi. Sin embargo, los efectos de las mutaciones *phoP* y *phoU* en las cepas WCFS1 y BL23 no tienen una interpretación directa y pueden indicar que, en ausencia de estos reguladores putativos, los posibles cambios en la expresión de PstSCAB pueden afectar a la incorporación de As(V).

En *E. coli*, las cepas que tienen una mutación de *phoU* presentan una desregulación del transporte de Pi, lo que permite la incorporación de mayores cantidades de Pi (Morohoshi *et al.*, 2002). En esta bacteria, PhoU cumple una función reguladora, vinculando la actividad de transporte a través de los componentes Pst a la autofosforilación de la quinasa PhoR. Este mecanismo proporciona un medio para detectar concentraciones externas de Pi y posteriormente regular la actividad de PhoP (Hsieh and Wanner, 2010; Gardner and McCleary, 2019). En la actualidad, se desconoce el papel exacto de PhoU en los lactobacilos. Mientras que PhoU está presente en algunas bacterias que poseen transportadores PstSCAB y ortólogos de PhoPR, está ausente en otras, incluidos algunos lactobacilos. También es destacable que en algunos miembros de las *Lactobacillaceae* (*Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Agrilactobacillus* o *Secundilactobacillus*), un gen que codifica una proteína putativa con ocho segmentos transmembrana y un dominio PDZ citoplasmático C-terminal (LCABL_10470 en *Lc. paracasei* BL23) se sitúa siempre aguas arriba de *phoP*, formando una probable estructura de operón con *phoPR* (Figura 20), por lo que la posible función de este gen en la red reguladora de Pho-Pst merece una investigación más profunda.

Respecto al fenotipo inesperado de resistencia al As(III) encontrado en las cepas $\Delta phoP$ y $\Delta phoR$ derivadas de BL23, los resultados obtenidos en este capítulo descartaron la posibilidad de que la cepa BL23 $\Delta phoP$ estuviera incorporando menos As(III) o promoviendo su oxidación a As(V). De hecho, los mutantes *phoP* y *phoR* de *Lc. paracasei* acumularon más As(III) que la cepa silvestre, aunque la absorción de As(III) en *Lc. paracasei* se produce siempre a niveles muy bajos. Por lo tanto, se desconocen las razones de este efecto. En *E. coli*, el regulón Pho está bien caracterizado. Este regulón comprende genes encargados de la captación de Pi en condiciones de suministro limitado de éste, así como genes que codifican fosfatasa y los genes *pst* (Gardner and McCleary, 2019). Sin embargo, debido a la relevancia metabólica del Pi, un defecto en PhoP, y por tanto en el suministro de Pi celular, puede tener importantes efectos pleiotrópicos. Aún se desconoce cómo un defecto en *phoP* en la cepa BL23 aumenta la resistencia al As(III). Un defecto en el gen sensor quinasa que codifica *phoR* en *Lc. paracasei* BL23 también dio lugar a un fenotipo de resistencia a As(III) similar al de *phoP*. Esto sugiere que la resistencia en un mutante *phoR* puede atribuirse a la ausencia de activación de PhoP a través de la fosforilación, debido a la falta de su quinasa afín. Sin embargo, no puede excluirse la posibilidad de que la eliminación de *phoR* provoque una expresión alterada de *phoP*, ya que no pudimos confirmar la complementación cuando transformamos una cepa $\Delta phoR$ con un plásmido que contenía *phoR*.

As(III) es transportado por la permeasa GlpF en *E. coli* (Garbinski, Rosen and Chen, 2019) aunque este gen no ha sido identificado como miembro del regulón Pho en este organismo. *Lc. paracasei* BL23 codifica dos homólogos de GlpF (LCABL_07210 and LCABL_08620) pero se carece de información funcional al respecto y su posible implicación en la captación de As(III) no se ha determinado. Se han descrito mecanismos para contrarrestar la toxicidad intrínseca del As(III) en varias bacterias. La resistencia al arsénico se basa generalmente en un mecanismo por el cual las moléculas de As(V) que entran en la célula (probablemente por su similitud con el Pi) son transformadas en As(III) por las enzimas arsenato reductasa (Ars). Posteriormente, esta especie de As, que es incluso más tóxica que el As(V), puede ser expulsada de las células por bombas específicas de detoxificación de As(III) (Rosen, 2002). Aunque estos mecanismos están presentes en algunos lactobacilos, por ejemplo en algunas cepas de las especies *Limosilactobacillus fermentum* y *Lentilactobacillus hilgardii* (Isokpehi *et al.*, 2014; Gustaw *et al.*, 2021), en el genoma de *Lc. paracasei* BL23 no se ha identificado ninguna bomba específica de As(III), ni genes codificantes de enzimas Ars, que pudieran sobreexpresarse eventualmente en un mutante *phoP*.

También se han descrito vínculos entre As(III) y PhoPR en otras bacterias, lo que revela otras conexiones metabólicas entre As y el metabolismo del Pi. En *Halomonas* sp., el TCS PhoBR (equivalente a PhoPR) regula la expresión de los genes *aioBA* que codifican las oxidasas de As(III) que promueven la conversión de As(III) a As(V) dependiendo de la disponibilidad de Pi (Chen *et al.*, 2015). En *Agrobacterium tumefaciens* también se ha descrito un mecanismo de detoxificación de antimonio [Sb(III)] que promueve la

Capítulo 1. Discusión

oxidación de Sb(III) a antimonato [Sb(V)], mediado por la Sb(III) oxidasa AnoA, que muestra reactividad cruzada con As(III), y cuya expresión también está controlada por el Pi a través de PhoB (PhoP) (Li *et al.*, 2019). Sin embargo, las mutaciones en *phoB* en estas bacterias conducen a una expresión reducida de estas oxidadas, lo que disminuye la conversión de As(III) y la detoxificación de Sb(III). A su vez, genes homólogos a *aioba* o *anoA* no están presentes en el genoma de la cepa BL23.

Conclusiones

En este capítulo determinamos la relación entre la captación de As(V) y el transporte de Pi en *Lp. plantarum*. Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia del sistema PstSCAB en el metabolismo del Pi en los lactobacilos y apuntan a la existencia de transportadores alternativos de Pi. Al mismo tiempo, demuestran que la captación específica del As, y no la retención celular inespecífica, como es el caso de otros metales como el mercurio, desempeña un papel en la bioacumulación de As(V) por los lactobacilos. No obstante, los posibles efectos beneficiosos de los lactobacilos sobre la toxicidad del As(V) pueden depender tanto de la bioacumulación de As(V), que conduce a la reducción de la bioaccesibilidad en el tracto gastrointestinal, como de mecanismos adicionales, como las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes exclusivas de determinadas cepas. A modo de ejemplo, experimentos recientes en modelos animales han demostrado que cepas como *Lc. paracasei* BL23, que no acumula As(III) [ni As(V)], reducen la mayoría de los efectos tóxicos intestinales de la exposición al As(III) a través del agua potable en un modelo murino (Domene *et al.*, 2024).

También hemos demostrado que cepas de *Lc. paracasei* que carecen de *phoP* o *phoR* muestran una mayor resistencia a As(III) sin presentar una detoxificación (oxidación) aparente de As(III) a As(V). Este fenotipo inesperado de resistencia en las cepas $\Delta phoP$ y $\Delta phoR$ de *Lc. paracasei* BL23, destaca la necesidad de comprender mejor los mecanismos de resistencia al As en lactobacilos. Este hallazgo suscita la necesidad de realizar una investigación exhaustiva sobre el regulón Pho en *Lb. paracasei*, con el objetivo de analizar los cambios a nivel transcriptómico asociados con la eliminación de *phoP*. Este enfoque nos permitiría una comprensión más profunda de las alteraciones inducidas por la ausencia de este regulador, así como una mejor comprensión de la red reguladora asociada a la detección de Pi a través de PhoPR en lactobacilos. Este estudio se abordará en el siguiente capítulo.

Capítulo 2

Caracterización del regulador transcripcional PhoP
y su relación con la resistencia a arsénico en
Lacticaseibacillus paracasei BL23

El estudio y caracterización del TCS PhoPR en *L. paracasei* BL23 es importante en esta tesis, ya que como se ha mencionado previamente, es posible que en las BAL exista alguna relación entre el Pi y algunas de sus características funcionales, como es la posible bioabsorción de arsénico. Aunque las evidencias disponibles hasta el momento sugieren que el regulón Pho puede desempeñar un papel fisiológico relevante en *Lactobacillaceae*, no se dispone de información sobre los genes que están bajo el control de PhoPR y de la regulación de su actividad.

En este capítulo, decidimos estudiar un fenómeno identificado en el Capítulo 1, por el cual al inactivar el TCS PhoPR se producía un aumento de la resistencia al arsenito en *Lc. paracasei* BL23, especialmente en la cepa $\Delta phoP$. Nos planteamos como objetivo la caracterización del regulador transcripcional PhoP mediante un análisis transcriptómico comparativo de *Lc. paracasei* BL23 y de nuestro mutante deficiente en *phoP*, con el fin de intentar dar respuesta al fenotipo de resistencia a As(III) identificado previamente.

Metodología

1. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas usadas en este capítulo se enumeran en la Tabla 4. Las cepas de lactobacilos fueron cultivadas rutinariamente siguiendo las mismas condiciones y los mismos medios de cultivo (MRS/MEI/MEI-LP) especificados en el Capítulo 1. Se usaron células de *E. coli* NZYStar (*endA1 hsdR17(r_km_k⁺) supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F proA⁺B⁺ lacI^q ΔlacZM15:Tn10(Tc^R)*) químicamente competentes (NZYtech) como huésped para las clonaciones y se cultivaron en medio LB a 37 °C bajo agitación. *E. coli* BL21(DE3) [*dcm ompT hsdS(r_B⁻,m_B⁻) gal λ(DE3)*] se utilizó como huésped de expresión para la purificación de proteínas. Cuando fue necesario, se añadió eritromicina 5 µg/ml para las bacterias lácticas. Para *E. coli* se utilizó ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml).

Tabla 4. Cepas de *Lactocaseibacillus* y plásmidos usados en este capítulo.

Cepa/ plásmido	Característica	Referencia
<i>Lc. paracasei</i> BL23	Cepa silvestre	(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lc. paracasei</i> DC487	BL23 Δ <i>phoP</i>	Capítulo 1
<i>Lc. paracasei</i> DC491	BL23 <i>phnD</i> ::pRV300; Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC492	BL23 Δ <i>ackA</i>	Este capítulo
pRV300	Vector integrativo; Eri ^r Amp ^r	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pQE80	Vector para expresión de proteínas; Amp ^r	Qiagen
pQEphoP	pQE80 expresando <i>L. paracasei</i> 6×(His)PhoP	Este capítulo
pRVphnD	pRV300 con fragmento interno <i>phnD</i> de 520 pb.	Este capítulo
pRVackA	pRV300 con fragmentos de <i>ackA</i> para delección.	Este capítulo

Eri^r, resistencia a eritromicina; Amp^r, resistencia a ampicilina.

2. Clonaje, expresión y purificación de PhoP

Los oligonucleótidos usados en este capítulo se encuentran en la Tabla 5. A partir de ADN genómico de la cepa *Lc. paracasei* BL23 se amplificó por PCR la región codificante del gen *phoP* con los oligonucleótidos PhoP-F/PhoP-R (Tabla 5), utilizando *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo). El producto de PCR se purificó con el kit *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen) y se clonó en el plásmido de expresión pQE80 (Qiagen) digerido con BamHI y SmaI usando el kit *GeneArt™ Gibson Assembly EX* (Invitrogen). De este modo, se obtuvo un gen que codifica

una proteína con una etiqueta N-terminal 6×(His). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* NZYa (NZYtech) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina y se confirmaron mediante PCR de colonias con los cebadores pQE-F y pQE-R. Se seleccionaron los clones que producían fragmentos del tamaño esperado y se verificó la integridad de la secuencia *phoP* mediante secuenciación del ADN. Se seleccionó un plásmido (pQEphoP) para transformar *E. coli* BL21(DE3) [pLysS] para su utilización como huésped de expresión.

Para la expresión de la proteína PhoP, la cepa se cultivó en medio LB (0.5 l) suplementado con ampicilina y cloranfenicol a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO_{595nm} de 0.5. La expresión de la proteína se indujo añadiendo 0.3 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) incubando a continuación a 27 °C durante 3 h. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con un volumen de tampón A (fosfato sódico 20 mM [pH 7,4], NaCl 500 mM, imidazol 40 mM) y se resuspendieron en 30 ml de tampón A suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. La suspensión celular se sometió a sonicación a 200 W durante cuatro ciclos de 60 s seguidos de 60 s de enfriamiento con un sonicador Labsonic V (B. Braun). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a $12.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de una membrana Filtropur S (Sarstedt) de 0.45 μm de tamaño de poro. El extracto filtrado se cargó directamente en una columna HisTrap FF (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con tampón A y acoplada a un sistema Äktaprime FPLC (Cytiva). Tras el paso de la muestra, la columna se lavó con 10 ml de tampón A y la proteína se eluyó con un gradiente de imidazol (40 mM a 2 M) en tampón A. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las que contenían la proteína purificada se agruparon y se realizó un cambio de tampón (Tris-HCl 50 mM pH 7.4; NaCl 100 mM; glicerol 10%) con un dispositivo de filtración centrífuga Amicon Ultra-15 10K (Millipore). La proteína se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Capítulo 2. Metodología

Tabla 5. Oligonucleótidos usados en este capítulo.

Oligonucleótido	Secuencia*	Uso
PhoP-F	<u>GGATCGCATCACCATCACCATCACG</u> TGAAGAAGAT	
PhoP-R	CTTGATTGTTGATG <u>ATTAAGCTTGGCTGCAGGTCGACCCTTATTCATGGG</u> GTGCCTCC	clonaje <i>phoP</i>
PhnDc-F	<u>ATATCGAATTCCTGCAGCCCAGTCGATGTTGGGTTCC</u> TTAC	Inactivación de
PhnDc-R	<u>CTAGAACTAGTGGATCCCCAAGCCTTGCTAAGCTT</u> TTTG	<i>phnD</i>
PhnD-chk	AGTAAGAGTAGTTCTAGCAG	Verificación de la inactivación de <i>phnD</i>
pQE-F	ATAGATTCAATTGTGAGCGG	Secuenciación de
pQE-R	TTCTGAACAAATCCAGATGG	construcciones en pQE-80
pRV300-F	GTTTTCCCAGTCACGAC	Secuenciación
pRV300-R	CAGGAAACAGCTATGAC	insertos pRV300
AckA-F	GATTCGCCGAAAACCAAGA	Ensayos EMSA
AckA-R	GAATGCCTGCGTTGAC	
GlnA-F	TGCCAAATTAGTGACGCTAT	Ensayos EMSA
GlnA-R	GGTTAAAAAACACCGTTACATATG	
PhnD-F	AAAAGCAGGCCGTTTGTG	Ensayos EMSA
PhnD-R	CGAACCAAGTCACTTGAACATTC	
PoxL-F	CGACGACACCATAACAGTC	Ensayos EMSA
PoxL-R	TTGATCCATGATCCTGATCATC	
PstS-F	GATGAAAAACTGCAGCCATC	Ensayos EMSA
PstS-R	ACACGAAATCCTCCATTTCA	
AckAd1-F	<u>GAATTCCTGCAGCCC</u> GATTTTGCTAACGGGGATG	
AckAd1-R	<u>TGAACCTCAGCTCACTTCAGGGTTGAACTGC</u>	Eliminación de <i>ackA</i>
AckAd2-F	<u>AACCCTGAAGTGAGCTGAGGTTTCAGCTGGC</u>	
AckAd2-R	<u>ACTAGTGGATCCCCCTTCAACGCGGTTAACg</u>	
PstAq-F	TTGGAAGATCAACTCGGAAG	RT-qPCR
PstAq-R	CGAGATTAAACAGCAGAACG	
PstB2q-F	CGCAGATCGAAAATATGCTG	RT-qPCR
PstB2q-R	AAGCCGTTTTATCGGAAATC	
PstCq-F	GTCATCGTGCCCTTTTATTCG	RT-qPCR
PstCq-R	CAGTGGGTAAAATCATGACG	
PstSq-F	AGCCAAAAGGACTCACTAAG	RT-qPCR
PstSq-R	CTTTCATTTGTGTCATCGGG	
PhoUq-F	CTATCTTGAACGAATTGGCG	RT-qPCR
PhoUq-R	AGCATTGAGTTCAATTCGG	

* Subrayadas, se indican las colas añadidas a los cebadores para su ligación mediante ensamblaje Gibson

3. Experimentos de expresión génica

Lc. paracasei BL23 y su cepa derivada $\Delta phoP$ se cultivaron en medio MEI o MEI-LP hasta alcanzar DO_{595nm} de 0.3 y 0.6. Se lavaron las células con 50 mM EDTA pH 8 y se extrajo el ARN total con TRIzol siguiendo las instrucciones del proveedor (Life Technologies). Las muestras de ARN se trataron con el kit *TURBO DNA-free™* (Invitrogen) siguiendo el tratamiento rutinario con DNasa I indicado por el proveedor para eliminar el ADN contaminante, y se analizó su integridad con un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). Se descartaron las muestras con relaciones 23S/16S inferiores a 0.85. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 μ g de RNA utilizando *SuperScript VILO-cDNA synthesis kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR en tiempo real se realizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real LightCycler®480 (Roche Diagnostics, EE.UU.) con la mezcla maestra *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)* (NZYtech) con los pares de oligonucleotidos dirigidos a los genes *pstA*, *pstB2*, *pstC*, *pstS* y *phoU* (tabla 5). Los cebadores se diseñaron utilizando Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para generar amplicones de un tamaño comprendido entre 100 y 150 pb. Se utilizaron como referencia los genes *housekeeping fusA*, *ileS*, *mutL* y *recA* (Landete *et al.*, 2010). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos con tres pasos: desnaturalización a 94 °C durante 10 s, anillado a 55 °C durante 10 s y extensión a 65 °C durante 10 s. Para cada conjunto de cebadores, los valores umbral de ciclo (punto de cruce [CP]) se determinaron mediante el método automatizado implementado en el software Lightcycler 480 1.5 (Roche). La expresión relativa basada en la relación de expresión entre los genes diana y los genes de referencia se calculó utilizando la herramienta de software REST (*relative expression software tool*) (Pfaffl *et al.*, 2002). Se determinaron la linealidad y la eficacia de amplificación de cada par de oligonucleotidos. Se analizaron al menos seis réplicas de cada muestra.

Para los análisis transcriptómicos, se utilizaron tres muestras de ARN de cada cepa cultivada en MEI-LP hasta una DO_{595nm} de 0.6 procedentes de cultivos independientes. La depleción del ARN ribosómico, construcción de bibliotecas, secuenciación y análisis diferencial se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. La construcción de las bibliotecas se llevó a cabo con 250 ng de ARNm usando el *Illumina stranded total RNA library preparation with Ribo-Zero Plus kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en una plataforma NextSeq 500. A las lecturas brutas obtenidas se les eliminó el adaptador, se recortaron y filtraron (reteniendo sólo aquellas con más de 60 pb) con Fastp v0.21 (Chen *et al.*, 2018) FastQC v0.11.5 (Chen *et al.*, 2018) El alineamiento y cuantificación de las lecturas se llevaron a cabo con STAR ver. 2.7.9a (Dobin *et al.*, 2013) y Htseq v2.03 (Anders, Pyl and Huber, 2015) utilizando como referencia el genoma de *Lc. paracasei* BL23 (Nº acceso NC_010999.1). La calidad del alineamiento de las lecturas se evaluó con Qualimap (Okonechnikov, Conesa and García-Alcalde, 2016) el análisis diferencial se llevó a cabo con DESeq2 (Love, Huber and Anders,

Capítulo 2. Metodología

2014). El análisis de enriquecimiento (GSEA) (Subramanian *et al.*, 2005) se llevó a cabo utilizando las herramientas disponibles en OmicBox software (BioBam).

Los archivos que contienen las lecturas mapeadas de los experimentos de RNAseq se han depositado en la base de datos del NCBI (biosamples SAMN42836912 a SAMN42836917) y están disponibles en el Bioproject PRJNA1141229.

4. Identificación de sitios putativos de unión a PhoP

La secuencia Pho identificada en *B. subtilis* (Eder *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1997) se utilizó para buscar secuencias similares en bacterias estrechamente relacionadas. Se seleccionó un conjunto de catorce secuencias no idénticas (Tabla 6) y se utilizó para determinar un motivo conservado con el programa GLAM2 (Frith *et al.*, 2008) implementado en la suite MEME ver. 5.5.5. Este motivo se utilizó para rastrear con GLAM2Scan una base de datos de secuencias intergénicas de todos los genes de la secuencia genómica de la cepa BL23 (Acc. N° ASM2648v1) en busca de posibles sitios de unión a Pho. El procedimiento se repitió utilizando tres secuencias de *Lc. paracasei* BL23 que fueron reconocidas por PhoP (véase la sección Resultados) para buscar otros posibles sitios de unión a PhoP.

Tabla 6. Secuencias utilizadas para rastrear sitios PHO en *Lc. paracasei* BL23 con GLAM2.

Especie	Acc. Nº	Coordenadas	Secuencia
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP054415.1	2470105-2470067	TTTACAAAACCTTAACATTTGATTATACGCATTTTACA
<i>Bacillus atrophaeus</i>	CP150480.1	2596982-2596944	TTTACAAAACCTTTACATTCGTTTAAAACGCTTTTACA
<i>Bacillus atrophaeus BA59</i>	CP024051.1	1893159-1893197	TTTACAAAACCTTTACATTCGTTTAAAACGCTTTTACA
<i>Bacillus cabrialesii</i>	CP096889.1	2498849-2498811	TTTACAAAACCTTAACATTTGATTCAAACCTTTTACA
<i>Bacillus halotolerans</i>	CP054584.1	2634078-2634040	TTTACAAAACCTTAACATTCGATTTAAACCTATTTTACA
<i>Bacillus siamensis</i>	CP025001.1	1714294-1714332	TTTACAAAACCTTAACATTCGATTATACGCATTTTACA
<i>Bacillus spizizenii</i>	CP034943.1	2456191-2456153	TTTACAAAACCTTAACATTCGATTCAAACCTTTTACA
<i>Bacillus subtilis</i>	CP136402.1	2583118-2583080	TTTACAAAACCTTAACATTCGTTCAAACCTTTTACA
<i>Bacillus vallismortis</i>	CP033052.1	2551165-2551127	TTTACAAAACCTTAACATTCATACAAACCTTTTACA
<i>Bacillus</i> sp. BPAMC26568	CP060137.1	1380677-1380715	TTTACAAAACCTTAACATTCGATTAAAACCATGTTTACA
<i>Bacillus</i> sp. BY1	CP030028.1	3483853-3483815	TTTACAAAACCTTTACAATCGATTAAAACCCCTTTAACA
<i>Cytobacillus spongiae</i>	CP089997.1	2867068-2867032	TTTACAAAAGCTTTACATTCGATTAAAACCAAGTTAATA
<i>Metabacillus dongyingensis</i>	CP082944.1	3567138-3567100	TTTACAAAACCTTAACATTCGATTAAAACCATGTTAACA
<i>Metabacillus</i> sp. McB07	CP069296.1	2807459-2807421	TTTACAAAACCTTAACATTTGATTAAAACCATGTTAACA

5. Inactivación de los genes *phnD* y *ackA*

Se amplificó un fragmento interno de 520 pb del gen *phnD* con ADN polimerasa NZYTaq II (NZYtech) a partir de ADN cromosómico de *Lc. paracasei* BL23 con los oligonucleotidos PhnDc-F y PhnDc-R (Tabla 5). El producto de la PCR se purificó como se ha indicado anteriormente y se clonó en pRV300 digerido con SmaI mediante el kit *GeneArt™ Gibson Assembly EX* (Invitrogen). Para inactivar el gen *ackA*, se eliminó una sección de 18 pb que abarcaba las bases 48 a 65 de la secuencia codificante del gen. Esta eliminación genera un codón de parada que provoca la terminación prematura de la traducción. Para ello, se amplificaron dos regiones flanqueantes [AckAd1-F/AckAd1-R (857 pb) y AckAd2-F/AckAd2-R (865 pb), respectivamente] y se clonaron en pRV300 digerido con SmaI con el kit *GeneArt™ Gibson Assembly EX* (Invitrogen). Las mezclas de ligación se transformaron en *E. coli* NZYa (NZYtech) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con ampicilina, X-Gal (50 µg/ml) e IPTG. Las colonias blancas se comprobaron mediante PCR de colonias

Capítulo 2. Metodología

con los oligonucleótidos pRV300-F/pRV300-R. Se seleccionaron los clones que producían fragmentos de los tamaños esperados y se verificó la integridad de las secuencias de inserción mediante secuenciación del ADN. Se seleccionó un clon para cada plásmido resultante (pRVphnD y pRVackA, respectivamente) y se utilizó para transformar *Lc. paracasei* BL23. La cepa se electroporó con un aparato Gene Pulser (Bio-Rad) como se describió anteriormente (Posno *et al.*, 1991).

Para los transformantes *phnD*, la integración del plásmido en el locus correcto se comprobó mediante PCR con un oligonucleótido que hibridaba en el gen diana fuera del fragmento clonado y un oligonucleótido que hibridaba en el plásmido pRV300 (PhnD-chk/pRV300-R). Los transformantes se aislaron en placas de MRS con 5 µg/ml de eritromicina incubadas a 37 °C. El uso de pRVphnD permitió obtener mutantes de disrupción de *phnD* por integración mediante cruzamiento simple. Un integrante obtenido con pRVackA se cultivó durante aproximadamente 200 generaciones en ausencia de antibiótico. Clones que habían sufrido una segunda recombinación, que condujo a la pérdida del plásmido, fueron seleccionados por ser sensibles a eritromicina mediante réplica en placas de MRS con y sin eritromicina. Entre los clones sensibles a la eritromicina obtenidos de cada construcción, se comprobó la presencia de la eliminación deseada mediante PCR y se confirmó mediante secuenciación.

6. Ensayos de crecimiento en diferentes concentraciones de fosfato y toxicidad frente al As(III)

Se realizaron curvas de crecimiento en medio MEI con diferentes concentraciones de As(III) de las cepas mutantes en los genes *phoP*, *phnD* y *ackA*, siguiendo la metodología del capítulo 1, y se compararon con la cepa silvestre *Lc. paracasei* BL23. Igualmente se realizaron curvas de crecimiento en medio MEI y MEI-LP sin As(III) de la cepa silvestre y las mutantes en los genes *phoP* y *phnD*. Se monitorizó el crecimiento de las bacterias a lo largo del tiempo con medidas espectrofotométricas cada 20 minutos a DO_{595nm}. Se hicieron 3 réplicas de las curvas de crecimiento por cada condición ensayada.

7. Fosforilación de PhoP

10 µg de 6×(His)PhoP se incubaron en 20 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM con o sin acetilfosfato (acetil-P) 20 mM a 37 °C durante 30 min. Tras este periodo de incubación, las muestras se mezclaron con tampón de carga de proteínas (0.25 % azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol) y se analizaron en geles SDS-PAGE al 8% que contenían 10 µM de reactivo Phos-tag (Fujifilm Wako Chemicals) y 20 µM de MnCl₂. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 100 V y los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie.

8. Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

Se amplificaron por PCR diferentes fragmentos de ADN que abarcaban las regiones promotoras putativas de los genes seleccionados (Tabla 5; Figura 29). Las reacciones de unión se llevaron a cabo en 15 µl de tampón de unión (2.5 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 25 mM MgCl₂, 0.25 mM EDTA, 0.25 mM ditiotreitól, 15% glicerol) que contenía 1 µg de ADN de esperma de salmón, 50 ng del ADN diana y cantidades variables de 6×(His)PhoP (0-7.2 µM de concentración final). Se añadió acetil-P 20 mM para comprobar el efecto de la fosforilación en la actividad de unión al ADN de PhoP. Tras 30 min a 37 °C, los complejos proteína-ADN se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) a 100 V y se tiñeron con RedSafe™ (iNtRON Biotechnology).

TGTGGGTGAGGGCCCGCACAGAG**GATCG**AAAACTGCAGCCATCATGCC**TTTACACAATCTTTACATTC**ATGACAT
GAACA**TTTACA**TGTAAGTATAAAATAATTGGAGCT**TGAAATGGAGGATTTCTGTG**AAAAAATTGTGACCCGTG
TGAGCCTG

Región intergénica en 5' del gen *pstS*. El codón de iniciación de *pstS* y el codón de parada de *phoR* se señalan en negrita.

TAATGCTTGACAGCTAATAAGATGATGAACAGGACCGTCCCTCGACGGTCCCTTTTT**TTGATCCATGATCCTGATC**
ATCATTAAAGTTAA**TTGTG**AAAAAG**TTTAC**CAAGCAT**GTGTAT**GGCGT**GGT**GATGCTGTATAGTTCAC**TTGTTG**
ACTGTTATGGTGTCTGTCGCTTGCTAGTTTAAAGCGTTTTATACGTAAGTTCGCAATTTGGGCGTTAAGGTTGCTTA
AACAGATGAAAGGGCTTGCA**TTGTTATCAATAAAATGTTATAC**TCTGTAATCGTAAAGAACTTACAAAATGTAAGT
AATAATATTGGAGGCAAGTGC**ATG**

Región intergénica en 5' del gen *poxL*. El codón de iniciación de *poxL* y el codón de parada de *muas* se señalan en negrita. Los posibles sitios PHO se encuentran en orientación opuesta. Subrayado, se señala un posible terminador Rho-independiente.

TAAGGATGTTACGATTAGCTCGAATAACAGACAAGCACCTGATCAGCTCAAAAATCTTTGAGATTGGTCGGGTG
CTGTTTTATTTCGATGAAGGCCTGGTGCCTTCATGATTGTCGATAGTTTTTCGGGACAAGGACATGGTAGCTGCT
GTAAAACC**TGCCAAATTAGTGACGCTAT**TTGCCAAATTCCTCCGCGACAATTT**TTAGACAATCTTTCCTTTTATTTA**
AAATCATGTAACATTAGGGCCGAACGATA**CATATGTAACGGTGTTTTTAACCG**GGGTGATCTGAATAATGGCGA
GGGCATCTAAGAGGAGGAAATCAAC**ATG**

Región intergénica en 5' del gen *glnA*. El codón de iniciación de *glnA* y el codón de parada de *puuD* se señalan en negrita.

TAATATTGTTTTCCAAACAGAATAAAAAAGTAATAGCAGTGCAGTTAATCTAATGAATTTTATATAATTTACGTTA
TTTTTTGTCACGATCCGGGCACCGAAATTTTCAAAAATCAGAAATGTTGTATCGGGTTAACCTCAGTATCGTTCT
GCACCAGACTAAATCCAAGTATAACGGTCATCA**AAAAGCAGGCCGTTTGTG**TAAAAGCCGACGAATGTATAAAA
TGTAAAATTAT**TGTAA**AGTTAT**TGATT**CAGATAT**TATAAA**AAAGTATGATTT**GAATGTTCAAGTGACTTGTTCG**TC
TCAGTTCACTCTTTGCGTCGCCGAGACAAGCAAGTTCCTGCTTACAAATGATTGATTCTACTTTTATGGAGGAAA
ACT**GATG**

Región intergénica en 5' del gen *phnD*. El codón de iniciación de *phnD* y el codón de parada de *eno2* se señalan en negrita. Los posibles sitios PHO se encuentran en orientación opuesta.

GGCATGCGCAACACCTTGACCC**GATTCGCCGAAAACCAAGA**AAAAGTCA**TGA**TGCTGTGCGATTACGTGTGCGGC
AATCCGACTACCCGTTTAGAGGAGGAAAAACA**ATG**GCAAAAATCTCGCA**GTCAACGCAGGCAGTTC**AACCCGTG
AAGTGAAGCTTTTGTAT**TGCCAGCTGAGGTT**CAGCTGGCA**GAAAGTTTGGTTGATCGGTTGGACAGCCCAAT**
CAAAAGTTAAATTAAGTATGGTGATGGGCAGAAATATGAAAGCGATACGCCAATTGCTAACTATCAAGAAG

Región intergénica en 5' del gen *ackA*. El codón de iniciación de *ackA* y el codón de parada de *csHA2* se señalan en negrita. Subrayada, se señala una posible horquilla reguladora.

Figura 29. Regiones intergénicas en 5' de los genes seleccionados para los ensayos de EMSA. Las secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos para los ensayos se marcan en amarillo. Los posibles sitios PHO están indicados en rojo.

Resultados

1. Expresión de los genes *pstSCAB1B2-phoU* en *Lc. paracasei* en condiciones de alto y bajo fosfato

Para conocer mejor la regulación del grupo de genes *pst* por Pi y el papel del TCS PhoPR en *Lc. paracasei* BL23, se determinó la abundancia relativa de transcritos del gen *pst* en la cepa silvestre y en nuestro mutante carente del regulador de respuesta PhoP ($\Delta phoP$), obtenido en el Capítulo 1. Para ello, se analizaron por RT-qPCR muestras obtenidas de células cultivadas hasta la fase exponencial temprana o media en medios con alto o bajo contenido en Pi (medios MEI y MEI-LP, respectivamente; Figura 30). Los datos obtenidos revelaron una ligera regulación a la baja de los transcritos *pst*, especialmente en medio MEI, en la fase exponencial temprana (Figura 30a). Por el contrario, a mitad de la fase exponencial, los genes *pst* aumentaron en MEI-LP en la cepa $\Delta phoP$, mientras que no se observaron diferencias en MEI. Por otro lado, la comparación de la expresión en MEI o MEI-LP de cada cepa mostró un ligero aumento de la expresión de los genes *pst* en la cepa silvestre y una fuerte inducción en la cepa $\Delta phoP$ (Figura 30b). Estos resultados sugieren que PhoP regula la expresión de los genes *pst* en respuesta a la disponibilidad de Pi, de forma dependiente de la fase de crecimiento. Al ser *Lc. paracasei* una bacteria con altos requerimientos nutricionales para su cultivo, las cantidades de Pi aún presentes en el medio complejo MEI-LP pueden explicar las escasas diferencias observadas entre los medios MEI y MEI-LP.

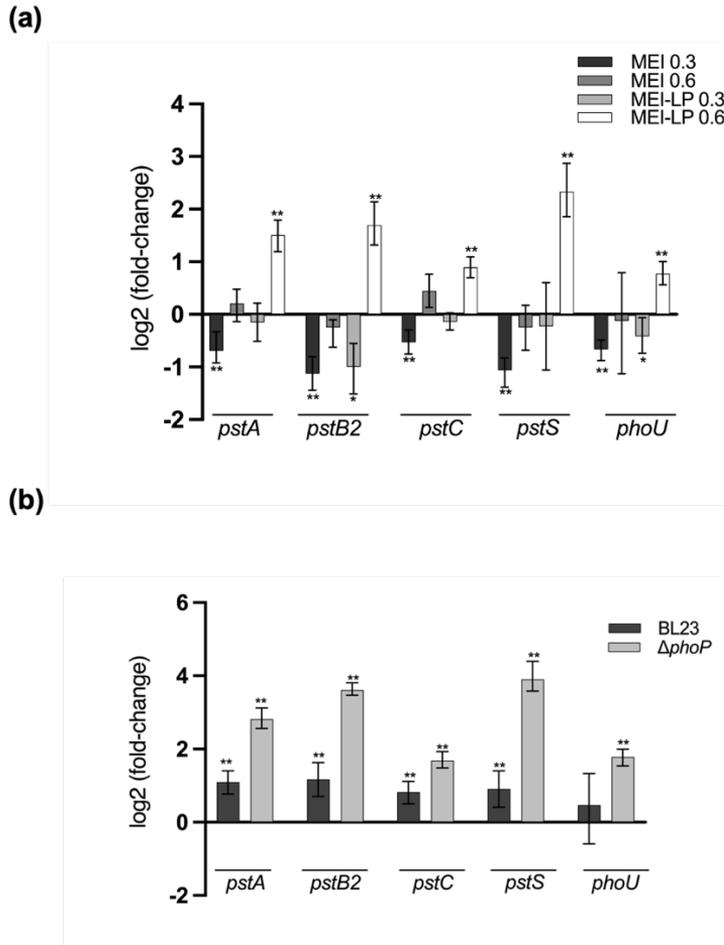


Figura 30. Análisis de la expresión de genes *pst* en *Lc. paracasei* BL23 y en la cepa $\Delta phoP$. Expresión relativa [\log_2 (fold-change)] (a). Niveles relativos de transcripción de genes *pst* en *Lc. paracasei* BL23 en comparación con su mutante derivado $\Delta phoP$ en medios MEI o MEI-LP en fase exponencial temprana (DO_{595nm} 0.3) o media (DO_{595nm} 0.6); (b). Expresión de genes *pst* en cepas *Lc. paracasei* BL23 o $\Delta phoP$ en medio MEI comparado con MEI-LP en la fase exponencial media (DO_{595nm} 0.6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2. Análisis del transcriptoma de *Lc. paracasei* y su mutante derivado $\Delta phoP$

Los niveles de transcripción en *Lc. paracasei* BL23 y su cepa derivada $\Delta phoP$ se estimaron en las células cultivadas hasta la mitad de la fase exponencial en medio MEI-LP, ya que en esta condición fue donde se observó previamente una mayor diferencia en la expresión de genes *pst* entre las dos cepas. Se obtuvieron aproximadamente 20 millones de lecturas brutas mapeadas por muestra (Figura 31) con una mediana de lecturas por gen variando entre 1251 y 1562 (Tabla 7). El análisis de la densidad de lecturas mostró

Capítulo 2. Resultados

una distribución muy similar para cada grupo de muestra, corroborando así la robustez de los datos obtenidos (Figura 32). Además, el análisis de componentes principales (ACP) muestra una clara separación de las muestras pertenecientes a cada cepa, con el primer componente explicando el 94.55% de la varianza total (Figura 33).

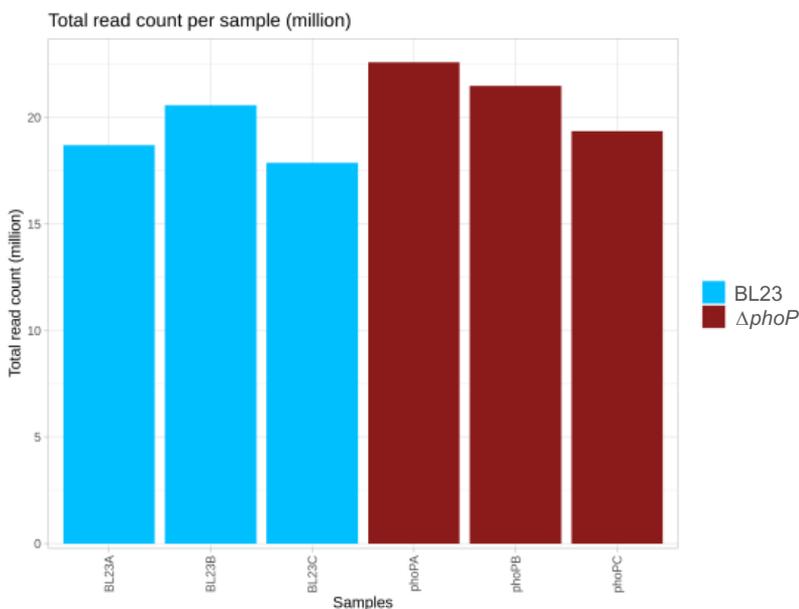


Figura 31. Número de lecturas brutas mapeadas por muestra.

Tabla 7. Resumen de las lecturas brutas por muestra.

Muestra	Mínimo	Mediana	Media	Máximo
BL23 A	0	1437	6165	482076
BL23 B	0	1562	6783	540155
BL23 C	0	1332	5894	507533
PhoP A	0	1445	7444	757543
PhoP B	0	1374	7081	656922
PhoP C	0	1251	6383	693449

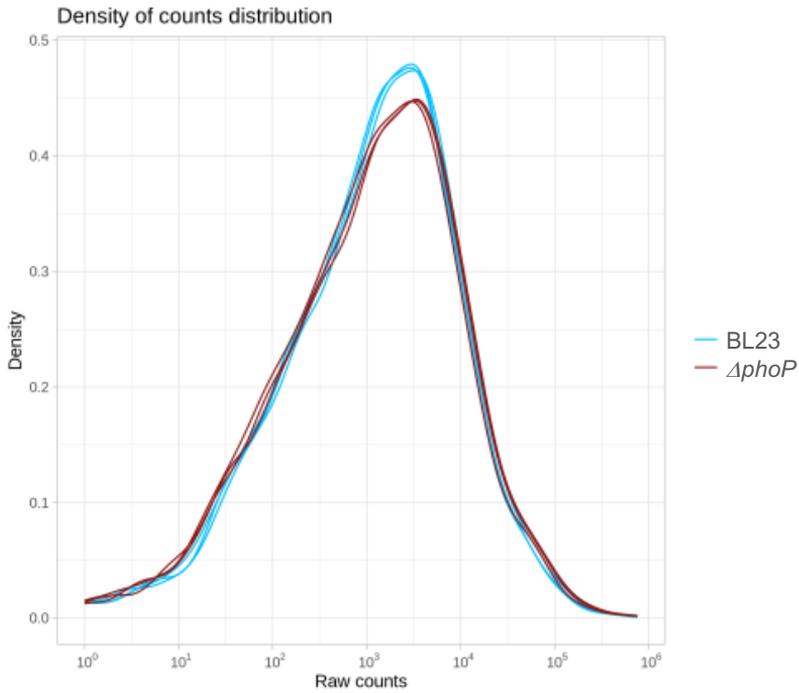


Figura 32. Distribución de la densidad de lecturas para cada muestra.

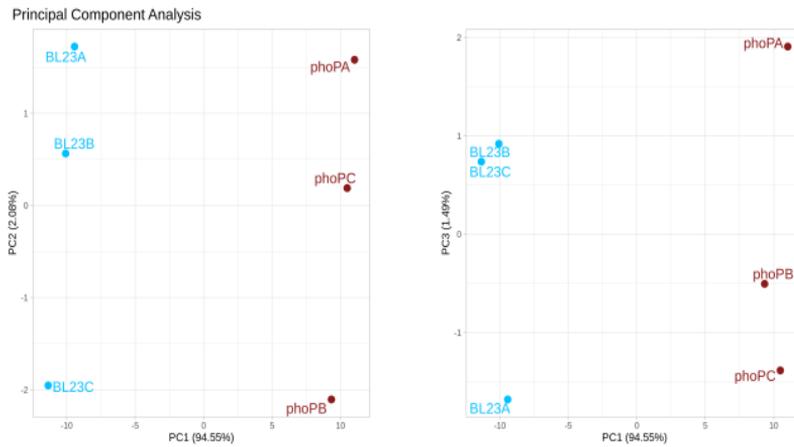


Figura 33. Representación de los primeros dos componentes del ACP. Se indican los porcentajes de varianza asociados a cada eje.

Capítulo 2. Resultados

Un número notable de genes mostraron diferencias significativas en estas condiciones, lo que indica un fuerte efecto pleiotrópico de PhoP en la expresión génica (Figura 34). Aproximadamente el 57.5% de los genes anotados mostraron cambios estadísticamente significativos en su transcripción (NCBI/biosamples SAMN42836912 a SAMN42836917), incluyendo tanto genes regulados al alza (968) como a la baja (868) cuando se comparó la cepa $\Delta phoP$ con la cepa silvestre. Sin embargo, aunque significativos, estos cambios fueron generalmente pequeños: de 1.1 a 4.1 veces para los genes regulados al alza y de 1.1 a 10.6 veces para los genes regulados a la baja. Así, los genes con cambios en su expresión superiores a 2 veces fueron sólo 92 con mayor expresión en $\Delta phoP$ y 22 y con menor expresión, respectivamente (Figura 35 y Anexo 1).

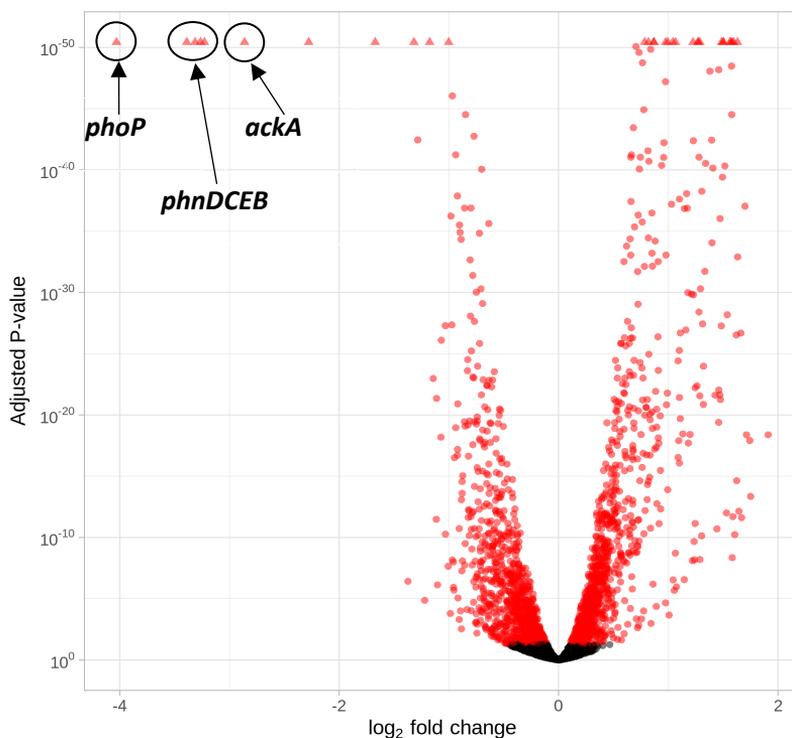


Figura 34. Análisis transcripcional de *Lc. paracasei* $\Delta phoP$ frente a la cepa silvestre. Volcano plot que muestra los genes expresados diferencialmente en rojo. Se indican las posiciones del operón *phnDCEB*, de los genes *ackA* y *phoP*. El marco de lectura abierto del gen *phoP* no se eliminó por completo en la cepa DC487 ($\Delta phoP$), lo que explica la presencia de lecturas que le corresponden en los experimentos de RNAseq.

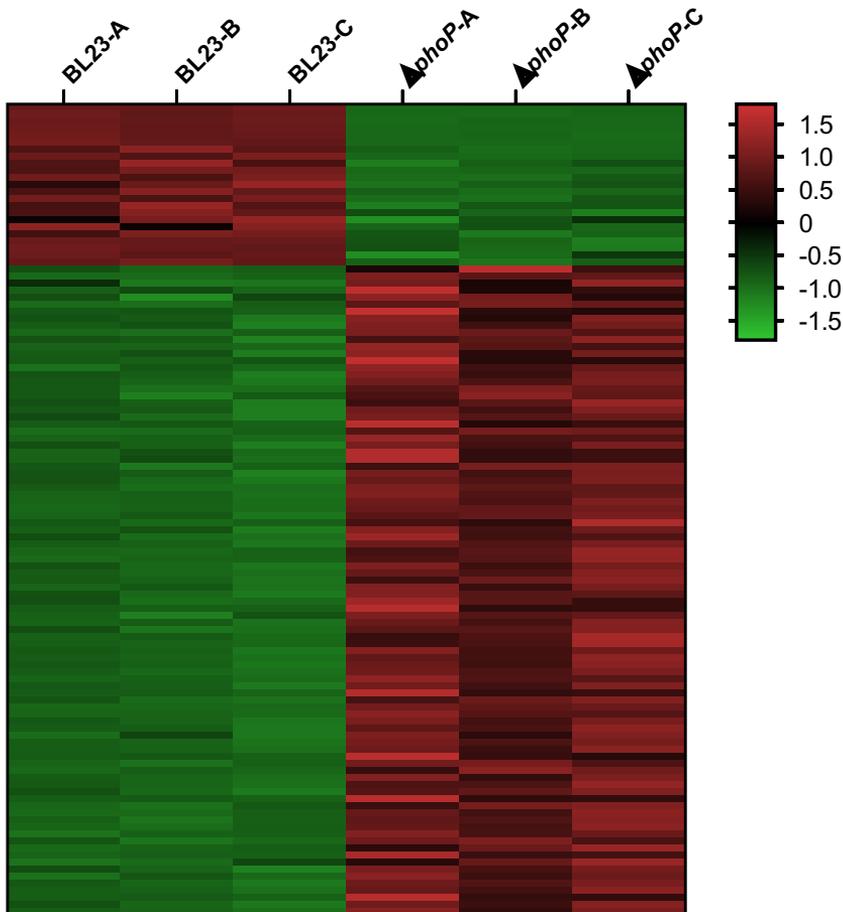


Figura 35. Heat map (Z-score) de los genes diferencialmente expresados en el mutante $\Delta phoP$ de *Lc. paracasei* BL23 con cambios superiores a dos veces.

Un análisis de las categorías funcionales de los genes afectados por la mutación *phoP* reveló que, mientras que el metabolismo de los ribonucleótidos, la biogénesis de la pared celular, el transporte y la expresión de peptidasas estaban regulados al alza, categorías como la organización de la pared celular, la morfogénesis y la biosíntesis peptídica estaban reguladas a la baja (Figura 36). Entre los genes específicos regulados al alza, aquellos con mayor expresión en el mutante *phoP* estaban notablemente enriquecidos en genes que codifican proteínas fágicas de profagos presentes en el genoma BL23 (por ejemplo, LCABL_09800 a LCABL_10010 o LCABL_11090 a LCABL_11270). Además, los grupos de genes que codifican transportadores de oligopéptidos y peptidasas (por ejemplo, los de LCABL_22420 a LCABL_22460, LCABL_21440 a LCABL_21470, y LCABL_03060 a LCABL_03070) también fueron regulados al alza, mostrando cambios de entre 2.4 y 4 veces.

Capítulo 2. Resultados

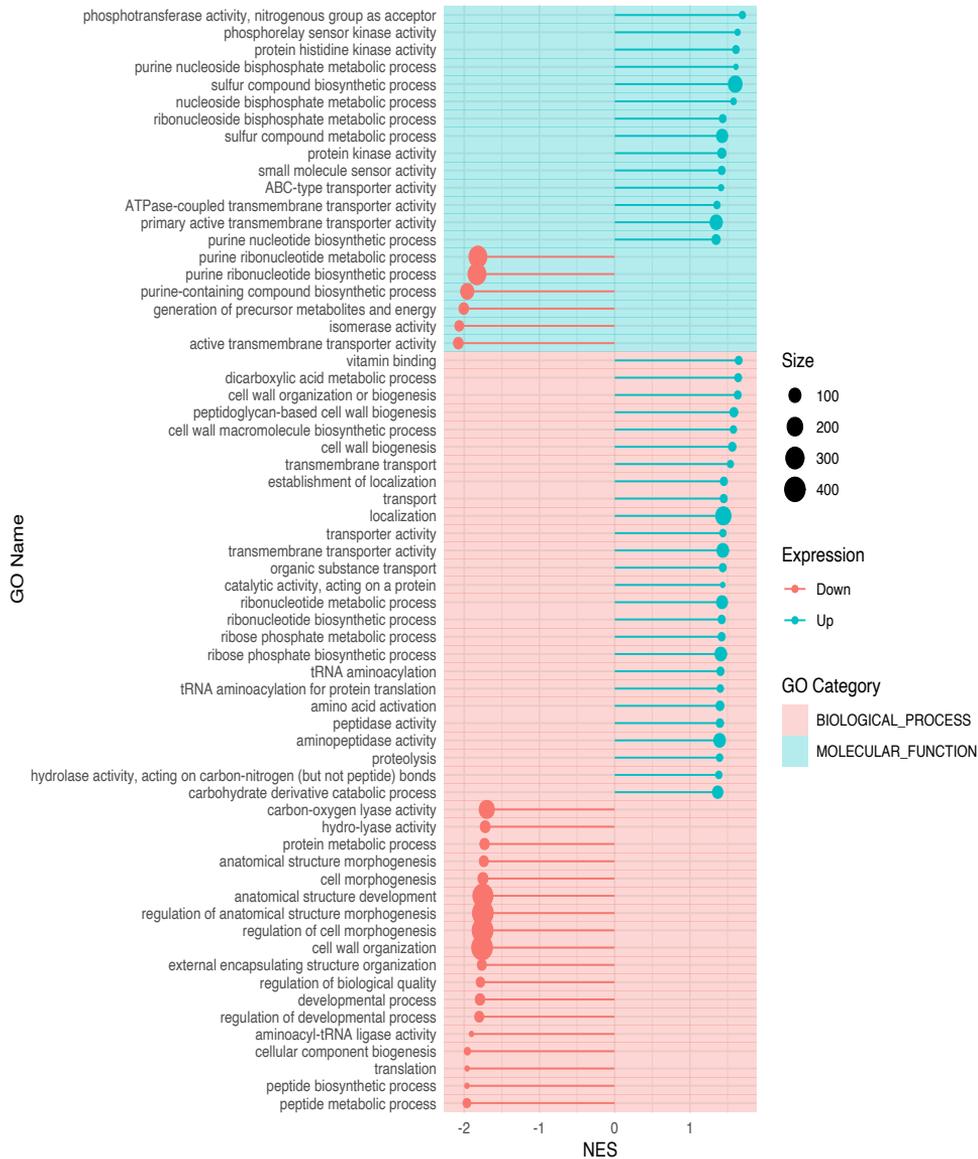


Figura 36. Análisis de enriquecimiento GSEA (*Gene Set Enrichment score Analysis*) de diferentes categorías funcionales de genes tras la eliminación de *phoP* en *Lc. paracasei* BL23. Lollipop del análisis GSEA mostrando el grado de enriquecimiento (up y down) como NES (*Normalized Enrichment Score*) de diferentes términos GO.

Los genes con la regulación a la baja más considerable en ausencia de PhoP incluyeron el operón *phnDCEB*; (LCABL_26140 a LCABL_26170 (Figura 34) que codifica un transportador putativo de fosfonato, regulado a la baja hasta 10.6 veces, *ackA*

[LCABL_01600; acetato quinasa; 7.4 veces (Figura 34)] y LCABL_16090 (5 veces; Anexo 1), anotado como una hemolisina. Este último gen se había encontrado previamente fuertemente inducido en células de *Lc. paracasei* BL23 sometidas a estrés por la presencia de sales biliares (Alcántara and Zúñiga, 2012). Otros genes regulados a la baja fueron genes implicados en la síntesis de arginina (*argG*, LCABL_30160, 2.5 veces; *argH*, LCABL_30170, 3.3 veces; Anexo 1), si bien debe advertirse que *Lc. paracasei* BL23 carece de una ruta completa de biosíntesis de arginina.

Los datos del transcriptoma corroboraron los resultados anteriores de la qPCR, mostrando sólo una ligera regulación al alza de los genes *pst* en la cepa $\Delta phoP$ (por ejemplo, *pstS*, 1.8 veces; *pstC*, 1.5 veces; *pstA*, 1.3 veces; *pstB1*, 1.3 veces; *pstB2*, 1.3 veces; *phoU*, 1.2 veces). Un ortólogo huérfano de *pstS* (LCABL_15130), no agrupado con otros genes que codifican componentes de un transportador ABC, fue regulado a la baja en 2.2 veces.

4. Análisis de la unión de PhoP a regiones promotoras de genes expresados diferencialmente en una cepa $\Delta phoP$

Se realizó una búsqueda de posibles sitios de unión a PhoP en las regiones promotoras de los genes de *Lc. paracasei* BL23 utilizando un motivo conservado identificado mediante GLAM2 (Figura 37) a partir de las cajas PHO identificadas en *Bacillus subtilis* y especies próximas (Tabla 6), puesto que es la especie más próxima de la que se dispone de evidencia experimental de sitios PHO.

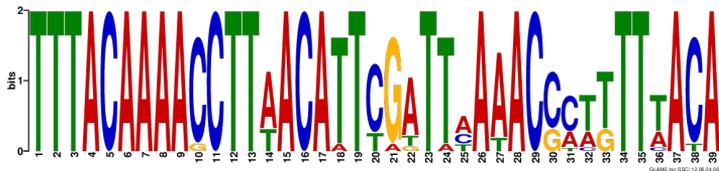


Figura 37. Mejor motivo conservado identificado con GLAM2 a partir de las secuencias listadas en la Tabla 6.

La búsqueda reveló varias coincidencias en genes diferencialmente expresados en la cepa $\Delta phoP$ (Tabla 8), entre ellos *pstS* (LCABL_10500; 1.8 veces regulado en la cepa $\Delta phoP$), el primer gen del clúster *pstSCAB1B2*, como el candidato con la puntuación más alta, seguido de *glnA* (LCABL_18680, que codifica una Gln sintasa putativa) y *poxL* (LCABL_20020, piruvato oxidasa). El gene *glnA* fue regulado a la baja (0.83 veces), mientras que *poxL* fue regulado al alza (1.475 veces) en la cepa $\Delta phoP$. También se encontraron cajas PHO putativas con baja puntuación aguas arriba de *phnD*, en el que la eliminación de *phoP* causó un efecto de regulación a la baja de 9.5 veces. Sin embargo, no se pudieron identificar cajas PHO en el gen *ackA* ni en otros genes/operones que también mostraron cambios relevantes en la transcripción (de 2.5 a 5 veces). Las cajas PHO identificadas en *pstS* consistían en cuatro repeticiones del consenso (T/A)T(T/G)ACA

Capítulo 2. Resultados

separadas por 4-6 pb. Estas cuatro cajas presentaban algunas desviaciones de este consenso en los promotores *glnA*, *poxL* y *phnD* y estaban orientadas en dirección opuesta a la transcripción en este último gen (Tabla 8; Figura 29).

Tabla 8. Secuencias identificadas con GLAM2Scan utilizando el motivo derivado de cajas PHO presentes en *Bacillus*.

Locus tag	Gen	Secuencia*	Orientación**	Valor	Cambio expresión***
LCABL_10500	<i>pstS</i>	<u>TTTACA</u>CAATCT<u>TTTACA</u>TTCA<u>ATGACAT</u>	+(44)	18.9	1.752
LCABL_05060	<i>glnA</i>	<u>TTTAGA</u>CAATCT<u>TTTCCT</u>TTTA<u>TTTAAAA</u>	+(90)	15.4	0.830
LCABL_15710	<i>fruR</i>	TCAT <u>GTAACA</u>	+	8.74	
LCABL_15720	<i>obgE</i>	TTCAGAAAAACATGTCATTTGATTATAC	-	8.74	
LCABL_20020	<i>poxL</i>	<u>ATCACCA</u>CGCC<u>ATAACAT</u>GCTT<u>GGTAA</u>	-(197)	7.09	1.475
LCABL_30470		<u>ACCTTTTTCACA</u>	+	6.06	
LCABL_30470		TTCACCAAATGCCTAAAATTGGGTAA	-	6.06	
LCABL_13260		ACTGAATTTAACC	+	6.04	1.456
LCABL_11830	<i>glnS</i>	TTCAGAAAAACATGTCATTTGATTATAC	+	5.68	1.148
LCABL_22160		TTGACAAAGCTTTAACCAACATTCAAA	-	4.10	0.689
LCABL_10310	<i>ymfH</i>	AGGATATTAATT	+	4.05	1.113
LCABL_17120	<i>rexB</i>	TTTATCAAAAATTTAACTTTATTTTAAAC	+	3.63	
LCABL_29240		CGAGTTGTCA	-	3.34	
LCABL_28610	<i>kdul</i>	ATCAAAAAACAGCTGATTTGCTTTAA	-	3.02	0.816
LCABL_26140	<i>phnD</i>	ACGAATTTACCA	-	3.00	0.107
		ATGACAACCGATTATGGTTGATTGATA	+		
		CGCAATTTGCA	+		
		TTCACAAAACCA.AATTTTTTATTTAGTC	+		
		CCTAATCATA	-		
		TCTGAAACATCGTTACCTTCAAAT.AAA	-		
		CCAATTTACCC	-		
		TTTTCAAAAAGAACACAAGCCACTAAA	-		
		ACAAATTTTTTA	-		
		<u>TTTATA</u>ATATCT<u>GAATCA</u>ATAACT<u>TTTAC</u>	-(117)		
		<u>AATAATTTTACA</u>			

* Los posibles sitios de unión de PhoP se indican subrayados y en negrita en las secuencias correspondientes a fragmentos utilizados en los ensayos EMSA.

** La distancia al sitio de inicio de la traducción se muestra entre paréntesis en los genes *pstS*, *glnA*, *poxL* y *phnD*.

*** Sólo se incluyen valores de cambio de expresión estadísticamente significativos.

Posteriormente, seleccionamos fragmentos correspondientes a las regiones promotoras de *pstS*, *glnA*, *poxL*, *phnD* y *ackA* y evaluamos su interacción con PhoP. Para ello, este

regulador se purificó como una proteína marcada con 6×(His) tras su sobreexpresión en *E. coli*. Se llevaron a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* de PhoP utilizando acetil-P como fosfodonor, mostrando que la proteína podía formar un derivado fosforilado y termolábil cuando se incubaba con acetil-P (Figura 38a). Esto evidenciaba una transferencia de fosfato, muy probablemente a nivel del residuo regulador fosforilable Asp-52. En los ensayos EMSA (Figura 38b), pudimos ver que PhoP se unió a la región promotora del clúster *pst*, aguas arriba de *pstS*, y que la unión se veía reforzada por la fosforilación de PhoP mediada por acetil-P. PhoP~P también mostró una interacción similar con el promotor de *phnD*. La unión de PhoP~P al promotor de *glnA* requirió unas diez veces más PhoP en comparación con *pstS* o *phnD*, lo que indica una interacción más débil, mientras que no se detectó ninguna unión entre PhoP~P y las regiones *poxL* o *ackA*.

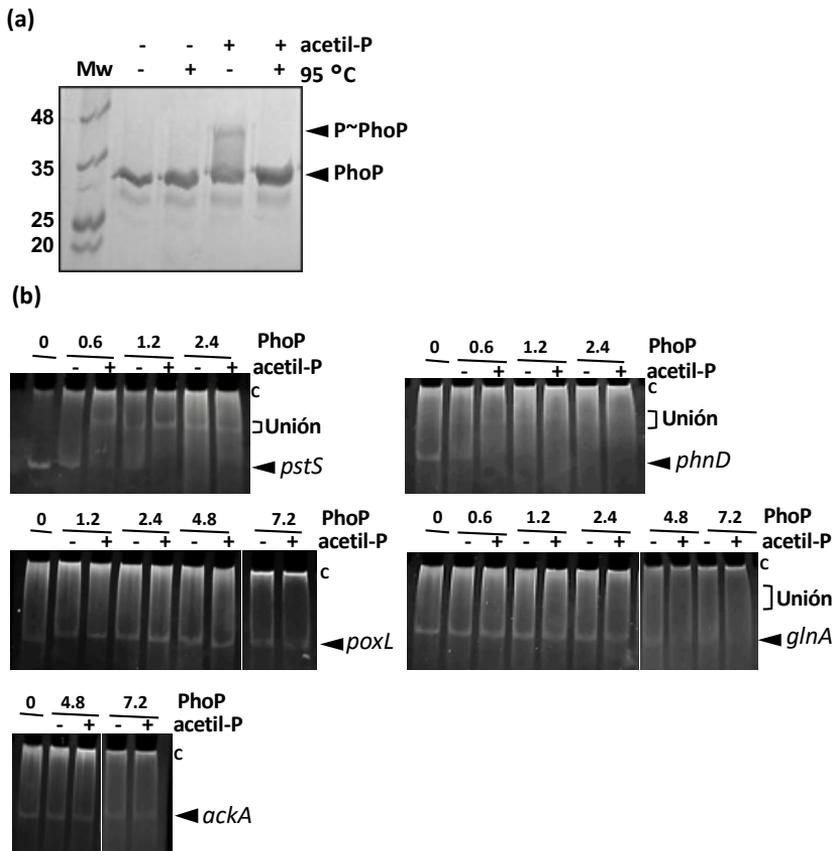


Figura 38. PhoP fosforilada se une a las regiones promotoras de algunos genes regulados por PhoP. (a) Fosforilación *in vitro* de 6×(His)PhoP por acetil-P (20 mM). Las muestras de proteína se incubaron con acetil-P y se resolvieron en geles de poliacrilamida Phos-tag. Algunas muestras se calentaron a 95 °C antes de cargarlas, lo que defosforila el enlace termolábil Asp~P. Mw, peso molecular (NZYColour Molecular Weight Marker II). (b) Ensayos EMSA de fragmentos promotoras de *pstS*, *phnD*, *poxL*, *glnA* y *ackA* con PhoP. Las muestras se incubaron con o sin acetil-P antes de cargarlas en geles de poliacrilamida en tampón TAE. Los números indican la concentración de 6×(His)PhoP en μM. "c" indica la posición del ADN competidor utilizado en los ensayos (ADN de espermatozoos de salmón).

Capítulo 2. Resultados

El rastreo de otros sitios de unión de PhoP utilizando un motivo conservado derivado de los sitios putativos encontrados en *pstS*, *glnA* y *phnD* (Figura 39) no recuperó ninguno de los genes identificados anteriormente con las secuencias de *Bacillus*, con la excepción de los tres utilizados para construir el motivo (Tabla 9 y véase también Tabla 8). Este resultado sugiere que la similitud de secuencia puede no ser suficiente para identificar sitios de unión de PhoP en *Lc. paracasei* BL23. Estos sitios adicionales no han sido investigados en este trabajo.



Figura 39. Motivo conservado identificado con GLAM2 a partir de las regiones intergénicas aguas arriba de los genes de *Lc. paracasei* BL23 genes *pstS*, *glnA* y *phnD* (véase Figura 29).

Tabla 9. Secuencias identificadas con GLAM2Scan usando el motivo derivado de las regiones intergénicas de *pstS*, *glnA* y *phnD* (Figura 39) en *Lc. paracasei* BL23.

Locus tag	Gen	Secuencia	Orientación	Puntuación	Cambio expresión *
LCABL_10500	<i>pstS</i>	ATTGAATGTAAAGATTGTGTAAA	-	29.4	1.752
LCABL_05060	<i>glnA</i>	AATAAAAGGAAAGATTGTCTAAA	-	27.0	0.830
LCABL_26140	<i>phnD</i>	ATAAAATGTAAAATTATTGTAAA	+	26.2	0.107
LCABL_25830	<i>mntH2</i>	TTTTAAAGGAAAAATTGTGAAAA	-	19.0	0.812
LCABL_25840	<i>pacL1</i>	TTTTAAAGGAAAAATTGTGAAAA	+	19.0	0.585
LCABL_26820	<i>rpoB</i>	GTTGATTGTAAAAATAATGTAAA	-	19.0	
LCABL_21880	<i>glnH1</i>	GTTGAATGGCAAAATTGTGGAAA	+	18.5	1.295
LCABL_07940		ATCAAATGTAAATTTTATGTATA	+	18.5	3.097
LCABL_00180		ATTGAATGTATTGCTTGATAAAA	-	18.0	
LCABL_24880	<i>cysS</i>	ATAAAAAGGAATGATTTTCCTAA	-	17.0	1.155
LCABL_06570		AAAGTATGTAGAAAATTTGTAAA	+	17.0	
LCABL_08520	<i>mutS</i>	TATGAATGAAAAGATTTTAAAAA	+	16.5	0.877
LCABL_25760		GTAAAATGCCAAAATTTTTTAAA	-	16.5	
LCABL_29590		GATAAATGCAAAGATAATCAAAA	-	16.5	
LCABL_00450		ATAGAAAGGAAAGATGCATTAAA	+	16.2	
LCABL_24680		AATGAACGTAAAACCTTTTTTCAA	-	16.2	0.833

* Sólo se incluyen valores de cambio de expresión estadísticamente significativos.

5. Caracterización de genes candidatos para explicar la resistencia a As(III)

En este capítulo intentábamos dar una explicación al fenotipo de una cepa $\Delta phoP$ mediante su estudio transcriptómico comparativo. Por lo tanto, decidimos centrarnos en aquellos genes que mostraron mayor variación en su expresión entre la cepa silvestre y el mutante $\Delta phoP$ como una primera aproximación para identificar genes responsables de la resistencia a As(III) observada en $\Delta phoP$. Dado que los genes *phn* y *ackA* mostraron el mayor grado de regulación a la baja en la cepa $\Delta phoP$, y estos estaban de alguna manera ligados al metabolismo del Pi, intentamos encontrar alguna posible relación entre ellos y la resistencia a As(III), estudiando su posible contribución a este fenotipo específico encontrado en la cepa $\Delta phoP$ en el capítulo anterior.

5.1 Un transportador putativo de fosfonato en el genoma de *Lc. paracasei* BL23

Los genes *phn* identificados mediante el análisis del transcriptoma y cuya regulación se redujo (de 9.5 a 10.6 veces) tras la mutación *phoP* se organizan en un operón, *phnDCEB*, que probablemente codifica un transportador ABC completo. Este transportador incluye la proteína de unión a sustrato PhnD, la subunidad ATPasa PhnC y dos componentes permeasa, PhnE y PhnB. La proteína PhnD pertenece a la familia PBP2_PhxD_like (cd01071), PhnC a la familia ABC_PhnC_transporter (cd03256), PhnE y PhnB al grupo de permeasas de transporte de fosfonato PhnE (TIGR01097). Por ello, este transportador puede estar implicado en el transporte de fosfonatos, que son ésteres de ácido fosforoso con compuestos orgánicos. Así, PhnDCEB podría funcionar como un sistema de obtención de Pi inducido por PhoP en condiciones de bajo Pi o podría servir como un sistema de transporte de Pi alternativo además de PstSCAB.

Una inspección de los genomas de *Lactobacillaceae* mostró que operones *phnDCEB* con estructuras similares están presentes en muchas especies de esta familia. Para comprobar la funcionalidad de los genes *phn* en la cepa BL23, construimos un mutante con el gen *phnD* inactivado. Esta cepa mutante no mostró defectos aparentes de crecimiento en comparación con el tipo silvestre cuando se cultivó en condiciones de bajo nivel de Pi (Figura 40).

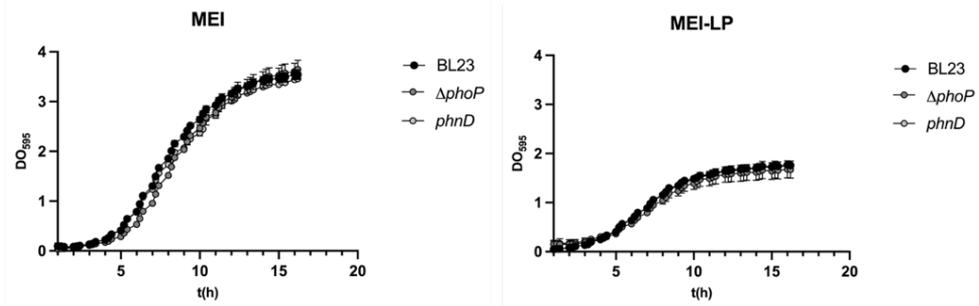


Figura 40. Curvas de crecimiento de *Lc. paracasei* BL23, mutantes *phnD* y Δ *phoP* en medio alto (MEI) y bajo (MEI-LP) Pi.

Analizamos a continuación si la expresión disminuida del transportador PhnDCEB podría estar implicada en la resistencia a As(III). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la toxicidad de As(III) entre la cepa silvestre y una cepa mutante en *phnD*, mientras que la cepa Δ *phoP* siguió mostrando una alta resistencia (Figura 41). Este resultado indica que el transportador PhnDCEB no está implicado en este fenotipo.

5.2 El déficit de acetato quinasa es el responsable de la resistencia a As(III) en un mutante Δ *phoP* de *Lc. paracasei*

El gen *ackA* (LCABL_01600) codifica una posible acetato quinasa, un enzima que cataliza la defosforilación reversible del acetyl-fosfato a acetato y transferencia del grupo fosfato al ADP para sintetizar ATP. *Lc. paracasei* BL23 contiene un segundo gen *ackA* (LCABL_23490) que no es afectado por la inactivación de *phoP*. El gen *ackA* posiblemente se cotranscribe con el gen *cshA2* que codifica un posible factor de recombinación de la superfamilia RarA (COG2256). Aunque la abundancia de transcritos de este gen fue significativamente menor en el mutante Δ *phoP*, la diferencia entre las dos cepas fue mínima (0.915) comparada con la diferencia de expresión de *ackA* (0.137). No obstante, con el fin de evitar efectos sobre la expresión de *cshA2*, se construyó el mutante deficiente en *ackA* mediante la eliminación de un pequeño fragmento en la zona 5' del gen que resulta en la pérdida de la pauta de lectura y terminación prematura de la traducción. Los ensayos de crecimiento mostraron que este mutante poseía una resistencia a As(III) idéntica a la cepa Δ *phoP*, siendo capaz de crecer a concentraciones altas de As(III) (Figura 41). Por tanto, podíamos concluir que la falta de toxicidad del As(III) en un mutante Δ *phoP* era causada por una baja expresión del gen *ackA*.

Capítulo 2. Resultados

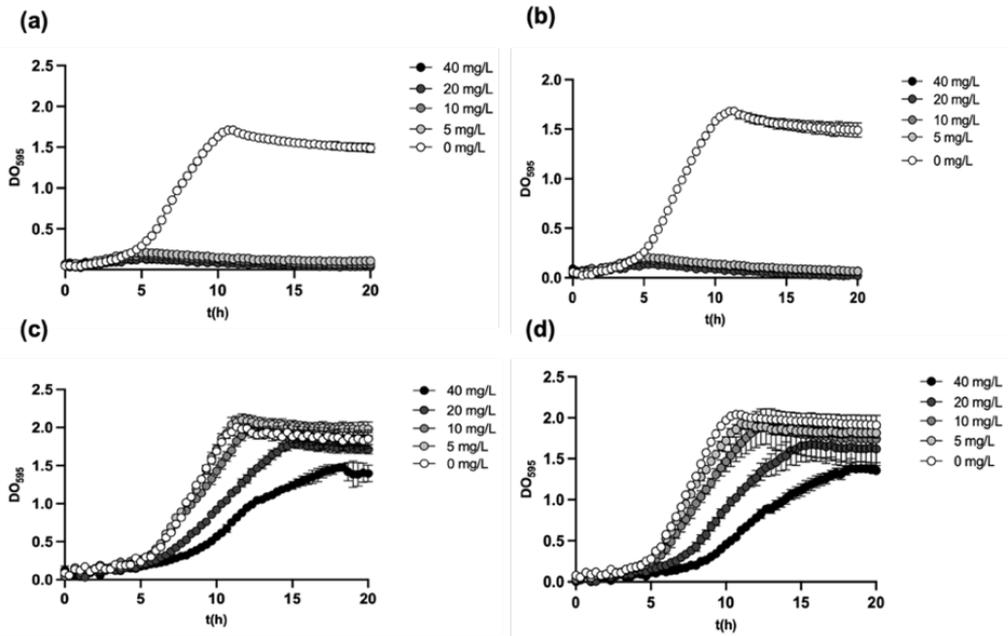


Figura 41. Curvas de crecimiento de *Lc. paracasei* BL23, mutantes en *phnD*, *ackA* y *phoP*, en medio MEI con diferentes cantidades de As(III). (a) BL23 (cepa silvestre); (b) *phnD*; (c) $\Delta ackA$; (d) $\Delta phoP$.

Discusión

En el capítulo anterior vimos como la inactivación de *phoP* en *Lc. paracasei* conducía a una mayor resistencia a As(III), sin embargo, no logramos identificar el mecanismo detrás de esto. Además, estudios previos habían demostrado que la inactivación de *phoP* conducía a un crecimiento lento y a una respuesta diferencial a distintas condiciones de estrés (Alcántara *et al.* 2011), indicando que esta mutación tiene un efecto pleiotrópico. Estos resultados nos llevaron a enfocar nuestro estudio en investigar los cambios transcriptómicos asociados a la falta de PhoP en *Lc. paracasei* BL23, y así poder dar respuesta a la resistencia a As(III) identificada previamente en nuestra cepa Δ *phoP*.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos llevaron a determinar que la disminución de la expresión del gen *ackA* es la responsable del fenotipo de resistencia a As(III). Este hallazgo es desconcertante, ya que la actividad de la acetato quinasa, que convierte el acetil-P en acetato, no implica ningún metabolito obvio que interactúe directamente con el As(III). Sin embargo, el coenzima A (CoA), que posee un grupo sulfhidrilo reactivo, es un intermediario clave en la mayoría de las vías que conducen a la síntesis de acetil-P (Figura 42). Una expresión deficiente o la ausencia de *AckA* puede conducir a la acumulación de acetil-P, lo que a su vez puede afectar a los niveles de CoA y acetil-CoA a través de la inhibición por sustrato de la fosfotransacetilasa (*Pta*). En *Staphylococcus aureus*, la inactivación de *ackA* o *pta* conduce a un aumento masivo de los niveles de acetil-CoA (Sadykov *et al.*, 2013). Se han descrito resultados similares en *Bacillus anthracis* (Won *et al.*, 2021).

Aunque no se ha medido, la acumulación de acetil-CoA posiblemente resulte en una disminución de los niveles intracelulares de CoA. Debido a la afinidad del As(III) por los grupos tiol, es posible que reaccione con la CoA. Desafortunadamente, no hemos encontrado ningún estudio sobre esta reacción o sus efectos tóxicos. También hay que tener en cuenta que el grupo tiol del CoA es menos reactivo que los que se encuentran en otros compuestos tiol de bajo peso molecular como la cisteína o el glutatión (Gout, 2019). Además, deben considerarse otras posibilidades. El acetil-P desempeña un papel importante como molécula de señalización en muchas bacterias como fosfodonor, por ejemplo, a reguladores de la respuesta de TCS (Wolfe, 2010), o como agente acetilante de proteínas (Lammers, 2021). Por tanto, un aumento de los niveles de acetil-P puede afectar a una amplia gama de vías metabólicas o de señalización.

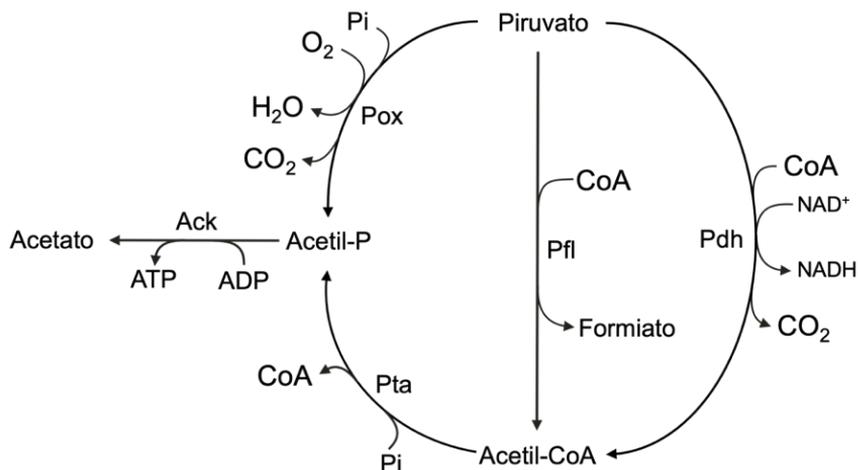


Figura 42. Vías catabólicas del piruvato que conducen a acetil-P, presentes en *Lc. paracasei* BL23. AckA, acetato quinasa; Pdh, piruvato deshidrogenasa; Pfl, piruvato:formiato liasa; Pox, piruvato oxidasa; Pta, fosfotransacetilasa.

El mecanismo de regulación de PhoP sobre la expresión de *ackA* también plantea una serie de preguntas. Los ensayos EMSA no detectaron la unión de PhoP a la región intergénica de *csHA2 ackA*. La inspección de los datos transcriptómicos del gen *ackA* mostró que la disminución de las lecturas de RNAseq en la cepa $\Delta phoP$ no abarcaba todo el marco de lectura abierto de *ackA* y sólo era identificable a partir de unos 100 pb del sitio de inicio de la traducción de *ackA*. Esta región contenía una secuencia palindrómica de 23 pb con la secuencia repetida invertida TGCCAGCTGA (Figura 43).

Este resultado sugiere que la regulación de *ackA* por PhoP está mediada por otro factor que reconoce esta estructura en horquilla y bloquea la elongación de la transcripción. La búsqueda de estructuras similares indica que este mecanismo regulador es específico de las cepas de *Lc. paracasei*, ya que la estructura de horquilla está ausente en los genes *ackA* de especies estrechamente relacionadas como *Lc. casei*, *Lc. rhamnosus* o *Lactocaseibacillus zeae* (Figura 44).

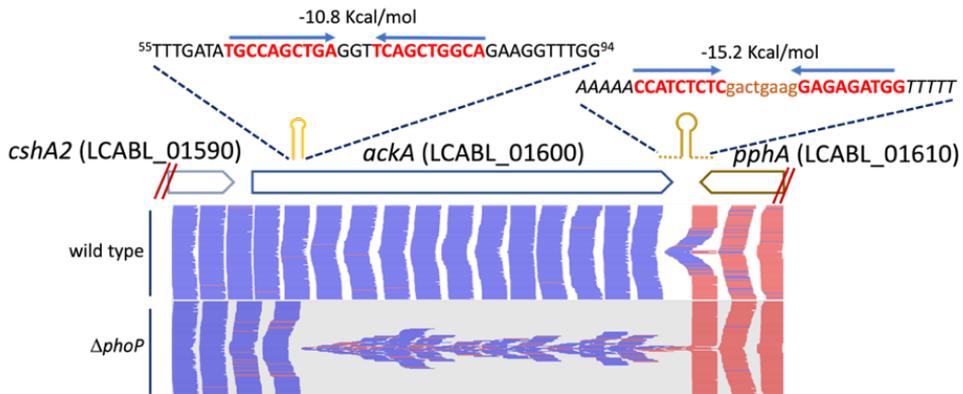


Figura 43. Análisis transcripcional del gen *ackA*. Se muestran las lecturas de los experimentos de RNAseq a lo largo del gen *ackA* y los genes circundantes. Se muestra un terminador transcripcional situado entre los genes *ackA* y *pphA*, junto con una secuencia repetida invertida de 10 pb situada en la región 5' de *ackA*, ambas representadas por horquillas. Los números en la secuencia de *ackA* mostrada son posiciones de nucleótidos con respecto al punto de inicio traslacional de *ackA*.



Figura 44. Alineación parcial de la secuencia de los genes *ackA* de *Lc. paracasei* y especies estrechamente relacionadas. Se muestra la región que abarca el elemento regulador putativo de la horquilla. Las bases idénticas dentro de los brazos de la horquilla se indican en negrita.

Este estudio también nos ha permitido conocer mejor el regulón Pho de *Lc. paracasei*, ya que el transporte y metabolismo de Pi en la familia *Lactobacillaceae* no ha sido ampliamente estudiado. En investigaciones previas se identificaron genes *pst* y el TCS *phoPR* en diferentes especies de este grupo (Zúñiga *et al.*, 2011) pero aún no está claro cómo estos genes coordinan la respuesta bacteriana a la disponibilidad de Pi. Las pequeñas diferencias en la transcripción de los genes *pst* en condiciones de alto y bajo Pi y su regulación al alza tras la mutación de *phoP* en *Lc. paracasei* aparentemente contradice el modelo de regulación propuesto en *E. coli* u otros microorganismos modelo. En este modelo, PhoP activa genes implicados en la adquisición y metabolismo

Capítulo 2. Discusión

de Pi, incluyendo el cluster *pstSCAB*, bajo condiciones limitantes de Pi (Gardner and McCleary, 2019).

En *Lc. paracasei* BL23, por el contrario, los resultados obtenidos sugieren que PhoP inhibe la expresión del operón *pst*. Aunque PhoP generalmente actúa como un activador transcripcional, en muchas bacterias, algunos genes son reprimidos por PhoP para optimizar la supervivencia y adaptación bacteriana en condiciones de Pi limitado. Estos incluyen genes implicados en una amplia gama de funciones como la movilidad, la virulencia, las respuestas al estrés y el metabolismo secundario (Chekabab *et al.*, 2014; Martín *et al.*, 2017). Aquí demostramos que algunas funciones que fueron reprimidas por PhoP en *Lc. paracasei* BL23 (es decir, reguladas al alza en la cepa Δ *phoP*) estaban relacionadas con funciones específicas que podrían necesitar ser reguladas a la baja en condiciones de bajo Pi (por ejemplo, metabolismo de péptidos y aminoácidos). En otros microorganismos, la señalización PhoPR está integrada con otros procesos reguladores como la esporulación, la respiración, la respuesta al estrés o la virulencia (Hulett 1996; Lamarche *et al.*, 2008).

En otros estudios se ha observado que la transcripción de los genes *pst* en la cepa BL23 se incrementa entre 3 y 4 veces en presencia de bilis (Alcántara and Zúñiga, 2012) y la expresión de *pstS* en *Lc. rhamnosus* fue inducida por pH básico (Wallenius *et al.*, 2011), lo que sugiere que la expresión de estos genes responde a otras señales de estrés más allá de la escasez de Pi. Nuestros resultados indican que la ausencia de PhoP en *Lc. paracasei* conduce a efectos pleiotrópicos significativos, como lo demuestran los cambios sustanciales en el transcriptoma. Sin embargo, la mayoría de las dianas directas del control de PhoP siguen sin ser identificadas, y cómo PhoP modula o integra su señal en otros procesos en *Lactobacillaceae* requiere más investigación.

En *B. subtilis*, el regulón Pho abarca más de 30 genes (Allenby *et al.*, 2005), mientras que alrededor de 10 genes/operones están regulados directamente por PhoP en *E. coli* (Gardner and McCleary, 2019; Fitzgerald *et al.*, 2023). En *B. subtilis*, se ha sugerido que los sitios de unión a PhoP~P se localizan en la cadena codificante en la región promotora en genes inducidos, mientras que los genes reprimidos por PhoP tienen los sitios de unión a PhoP~P en la cadena no codificante (Liu *et al.*, 1998), aunque se pueden encontrar excepciones a esta regla (Sun *et al.*, 1996). En *Lc. paracasei*, las cajas PHO identificadas en los promotores de los genes *pstS* y *glnA*, que fueron reprimido y activado por PhoP, respectivamente, están localizadas en la cadena sentido. Por el contrario, las cajas PHO en el promotor del gen *phnD*, cuya expresión es posiblemente activada por PhoP, se encuentran en la cadena no codificante. Las supuestas cajas PHO en el promotor de *poXL* (reprimido) también se encontraban en la cadena no codificante, pero no se detectó la unión de PhoP~P a esta región, lo que cuestiona su funcionalidad.

El éxito limitado de la búsqueda de cajas PHO utilizando motivos conservados sugiere que PhoP puede reconocer cajas PHO con un alto grado de variación. Además, aunque generalmente se encuentran cuatro cajas PHO en los promotores regulados por PhoP,

en algunos casos se ha demostrado que un número par de dos a ocho son funcionales (Allenby *et al.*, 2005). Los ensayos EMSA confirmaron la unión de PhoP~P a las regiones promotoras *pstS*, *glnA* y *phnD*. Además, la afinidad de unión diferencial de PhoP~P a los tres promotores sugiere una unión jerárquica a diferentes promotores como se ha descrito para otros organismos (Martín *et al.*, 2012; Santos-Beneit 2015). Estos hallazgos identifican por primera vez tres genes/operones pertenecientes al regulón Pho en una especie de *Lactobacillaceae*.

La unión de PhoP~P al promotor *glnA* sugiere un posible vínculo regulador entre el metabolismo del Pi y del nitrógeno en *Lc. paracasei*. La actividad de la glutamina sintetasa GlnA juega un papel importante en la regulación de los niveles de nitrógeno como vía principal de asimilación del amonio y modulando la actividad de unión al ADN de reguladores del nitrógeno como GlnR en *Streptococcus pneumoniae* (Kloosterman *et al.*, 2006) o TnrA en *B. subtilis* (Wray *et al.*, 2001). En *Streptomyces coelicolor*, PhoP controla la expresión de varios genes del metabolismo del nitrógeno, incluido *glnA* (Martín *et al.* 2011). *Lc. paracasei* BL23 codifica dos glutamina sintetetasas putativas (LCABL_05060 y LCABL_18680). La expresión de los dos genes se ve afectada por la inactivación de *phoP*. LCABL_05060 está regulado a la baja en el mutante *phoP*, mientras que LCABL_18680 se encuentra regulado al alza (Anexo 1). Desafortunadamente, ninguno de estos genes ha sido caracterizado. Por otro lado, un sistema regulador clave del metabolismo del nitrógeno en *Lc. paracasei* es el sistema TCS PrcRK, que afecta a la expresión de numerosos genes metabólicos de péptidos y aminoácidos (Alcántara *et al.* 2016), pero no se detectaron genes codificantes de GlnA entre ellos.

En contraste con el débil efecto sobre la expresión del operón *pst*, se detectó una notable regulación a la baja del clúster *phn* en la cepa $\Delta phoP$. En *E. coli*, el operón *phnCDEFGHIJKLMNOP* (Metcalf *et al.*, 1991) codifica un transportador ABC (*phnCDE*), un regulador transcripcional (*phnF*) y genes que codifican enzimas implicadas en el transporte y catabolismo de fosfonatos, fosfito ($[HPO_3]^{2-}$) y ésteres de Pi, codificados por *phnGHIJKLMNOP*. El enlace C-P presente en los fosfonatos se rompe mediante un complejo enzimático con actividad C-P liasa (PhnGHIJKLM). En *E. coli* K-12, el clúster *phn* es crítico debido a una inserción de 8 pb a nivel del gen *phnE*. Sin embargo, en cepas portadoras de una deleción de *pitA*, que codifica para una permeasa simportadora de complejos metal-Pi/H⁺ de baja afinidad (Harris *et al.* 2001), y de deleciones de *pst*, se pueden obtener revertientes en *phnE* que son capaces de utilizar Pi como fuente de P (Stasi *et al.*, 2019).

En *Mycobacterium smegmatis* coexisten los sistemas Pst y Phn, que funcionan como transportadores de Pi de alta afinidad (Km para ambos en el rango μM) (Gebhard *et al.* 2006) y su transcripción está controlada por la disponibilidad de Pi a través del regulador PhnF (Gebhard *et al.*, 2014). La ausencia de genes catabólicos de fosfonatos en muchos operones *phn* de *Streptomyces* también sugiere que pueden funcionar como sustitutos de los transportadores de Pi (Martín and Liras, 2021). La falta de genes catabólicos (por

Capítulo 2. Discusión

ejemplo, C-P liasas) en el genoma de *Lc. paracasei* cuestiona su función en el catabolismo de fosfonatos. Por lo tanto, no se puede excluir la participación de genes *phn* en el transporte de Pi en la cepa BL23. En el capítulo anterior, se observó como la delección del gen *pstC* del transportador de Pi no tuvo un fuerte efecto sobre el crecimiento en medio con bajo Pi, de manera similar al mutante *phnD*.

Las contribuciones de los transportadores Pst y Phn en la captación de Pi en *Lc. paracasei* quedan por establecer. Una inspección de los genomas de *Lactobacillaceae* mostró que genes *phnDCEB* con estructuras similares están presentes en muchas especies de esta familia. Sin embargo, con algunas excepciones, este operón no estaba adyacente o no formaba estructuras de operón con otros genes implicados en el catabolismo de los fosfonatos. Las excepciones notables incluyen algunas especies de *Agrilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Schleiferlactobacillus* y *Lactiplantibacillus*, donde *phnDCEB* forma posibles operones con *phnX* y *phnW* que codifican una posible fosfonoacetaldehído hidrolasa y una posible 2-aminoetilfosfonato-piruvato transaminasa, respectivamente.

Conclusiones

Nuestros resultados indican que la ausencia de PhoP en *Lc. paracasei* conduce a efectos pleiotrópicos significativos, como lo demuestran los cambios sustanciales en el transcriptoma. Sin embargo, la mayoría de las dianas directas bajo control de PhoP aún no han sido identificadas, y la forma en que PhoP modula o integra su señal en otros procesos en las *Lactobacillaceae* requiere más investigación. Mientras que el transportador Pst está implicado en la señalización que conduce a la activación de PhoP, es necesario establecer las contribuciones de los transportadores Pst y Phn a la captación de Pi.

Por otro lado, el hallazgo de la resistencia a As(III) por parte de la cepa $\Delta ackA$ nos proporciona nuevas perspectivas sobre los mecanismos de toxicidad del As(III) en *Lc. paracasei*. El mecanismo indirecto por el cual PhoP regula la expresión de *ackA* y la probable implicación de la estructura en horquilla que puede formarse en la región 5' del gen *ackA* necesitan ser estudiados. Además, las bases metabólicas por las cuales una cepa incapaz de transformar el acetyl-P en acetato presente una alta resistencia al As(III), la posible participación del CoA y si estos hechos son extensibles a otros lactobacilos, son cuestiones sin resolver que requieren de una investigación adicional.

Capítulo 3

Regulación y función de las exopolifosfatasas Ppx1 y Ppx2 en la síntesis de polifosfato en *Lactocaseibacillus paracasei* BL23

Esta tesis se centra en el estudio del papel que poseen diferentes procesos relacionados con el metabolismo del Pi en las BAL en algunas de sus cualidades probióticas, utilizando *Lc. paracasei* BL23 como bacteria modelo. Como hemos visto en los Capítulos 1 y 2, una relación Pi-funcionalidad puede establecerse a través de la posible bioabsorción de arsénico llevada a cabo por el transportador de Pi PstSCAB (apartado 3.2.2) y el TCS PhoPR (apartado 3.2.1). Otra posible relación, es la síntesis de biomoléculas con propiedades funcionales a partir del Pi, como el poli-P (apartado 4.1). Como se mencionó en el apartado 2.1, existen estudios que respaldan dicha relación de la actividad probiótica de ciertas BAL con el poli-P sintetizado, como es el caso de *Lc. paracasei* JCM 1163 (Saiki *et al.*, 2016) y *Lp. plantarum* (Alcántara *et al.*, 2018).

A pesar de las extensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sobre la síntesis del poli-P, la regulación de su producción en bacterias aun presenta ciertos aspectos poco claros. Como se ha mencionado previamente en la Introducción, las principales enzimas involucradas en la síntesis o utilización de poli-P son las poli-P quinazas (Ppk; EC 2.7.4.1) (apartado 4.2.1) y las exopolifosfatasas (Ppx; EC 3.6.1.11) (apartado 4.2.2), encargadas de polimerizar e hidrolizar el poli-P, respectivamente. Sin embargo, aún no se conoce completamente cómo estas enzimas, que en algunos casos se encuentran codificadas por genes adyacentes organizados en el mismo operón, coordinan sus actividades opuestas para modular los niveles intracelulares de poli-P. Un ejemplo de lo anterior se observa en los lactobacilos, donde los genes *ppk* se encuentran comúnmente en un operón con dos genes que codifican para dos posibles exopolifosfatasas (*ppx1* y *ppx2*).

Por consiguiente, nos pareció interesante profundizar en el proceso de síntesis del poli-P en *Lc. paracasei* BL23. El objetivo de este capítulo fue explorar en detalle los mecanismos implicados en la síntesis y degradación de poli-P en lactobacilos, con un enfoque especial en investigar las funciones de los genes que codifican para las exopolifosfatasas Ppx1 y Ppx2, en *Lc. paracasei* BL23. Para ello, se obtuvieron mutantes en sus respectivos genes, se estudió su impacto en la síntesis de poli-P y se ensayaron las actividades catalíticas de Ppk, Ppx1 y Ppx2.

Metodología

1. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de lactobacilos usadas en este estudio (Tabla 10) fueron cultivadas rutinariamente siguiendo las mismas condiciones y los mismos medios de cultivo (MRS/MEI/MEI-LP) del Capítulo 1. Se utilizaron células de *E. coli* NZYStar (*endA1 hsdR17*(*r_km_k*+) *supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac*[*F proA⁺B⁺lac^qΔlacZM15:Tn10(Tc^R)*]) químicamente competentes (NZYtech) como huésped para las clonaciones y se cultivaron en medio LB a 37 °C bajo agitación. *E. coli* BL21(DE3) [*dcm ompT hsdS*(*r_B*⁻,*m_B*⁻) *gal λ*(DE3)] se utilizó como huésped de expresión para la purificación de proteínas. También se utilizó *Lactococcus lactis* MG1363 como huésped para la construcción del plásmido derivado de pT1NX y se cultivó en medio M17 que contenía un 0.5% de glucosa a 30 °C. Cuando fue necesario, se añadió eritromicina o cloranfenicol a 5 µg/ml para las bacterias lácticas. Para *E. coli* se utilizó ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (25 µg/ml).

Tabla 10. Cepas de *Lactocaseibacillus* y plásmidos usados en este capítulo.

Cepa/plásmido	Característica	Referencia
<i>Lc. paracasei</i> BL23	Silvestre	(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lc. paracasei</i> BL379	<i>ppk</i> ::pRV300; Eri ^r	(Alcántara <i>et al.</i> ,2014)
<i>Lc. paracasei</i> DC405	Δ <i>ppx1</i> ::Ppx1 Δ ¹³⁹⁻³⁹⁹	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC475	<i>ppx2</i> :: pRV300; Eri ^r	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC478	Δ <i>ppx1 ppx2</i> :: pRV300; Eri ^r	Este capítulo
pRV300	Vector integrativo; Eri ^r Amp ^r	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pRV Δ <i>ppx1</i>	pRV300 Δ <i>ppx1</i>	Este capítulo
pRV <i>ppx2</i>	pRV300 <i>ppx2</i>	Este capítulo
pT1NX	Vector de expresión	(Schotte <i>et al.</i> ,2000)
pT1 <i>ppk</i>	pT1NXCAT:: <i>ppk</i> ; Cm ^r	(Alcántara <i>et al.</i> ,2014)
pT1 <i>ppx1</i>	pT1NX:: <i>ppx1</i> ; Eri ^r	Este capítulo
pET28a	Vector para expresión de proteínas; Km ^r	Novagen
pQE80	Vector para expresión de proteínas; Amp ^r	Qiagen
pET <i>ppx1</i>	pET28a:: <i>ppx1</i> ;C-terminal 6x(His)Ppx1	Este capítulo
pQE <i>ppk</i>	pQE80:: <i>ppk</i> ;N-terminal 6x(His)Ppk	Este capítulo
pQE <i>ppx2</i>	pQE80:: <i>ppx2</i> ;N-terminal 6x(His)Ppx2	Este capítulo

Eri^r, resistencia a eritromicina; Amp^r resistencia a ampicilina; Cm^r, resistencia a cloranfenicol; Km^r, resistencia a kanamicina.

2. Construcción de cepas deficientes en *ppx1* y *ppx2*

Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 0.5 kb del gen *ppx1* de *Lc. paracasei* BL23 (LCABL_27830) mediante amplificación por PCR con *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo) y con los pares de oligonucleótidos Ppx1-1/Ppx1-2 y Ppx1-3/Ppx1-4, respectivamente (Tabla 11). Los cebadores externos (Ppx1-2 y Ppx1-4) tenían sitios de restricción EcoRI e HindIII, respectivamente, en sus extremos 5'. Los cebadores internos (Ppx1-2 y Ppx1-3) se solapaban 20 pb en sus extremos, permitiendo así su fusión por PCR. El producto resultante de 1 kb contenía una delección en el marco de lectura de *ppx1* que dio lugar a la codificación de una proteína Ppx1 mutante carente de los aminoácidos 139 a 399. El producto de fusión PCR se digirió con EcoRI e HindIII, se ligó a pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) digerido con las mismas enzimas, y se transformó en *E. coli* NZYStar siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor.

El plásmido resultante, pRV Δ ppx1 (Tabla 10), se verificó mediante secuenciación y se utilizó para transformar la cepa *Lc. paracasei* BL23 mediante electroporación (Posno *et al.*, 1991) con un aparato Gene Pulser (Bio-Rad). Los integrados en el locus *ppx1* se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con eritromicina. Se cultivó uno de estos clones durante aproximadamente 150 generaciones en medio MRS líquido sin antibiótico y se seleccionaron mediante réplica en placa los aislados en los que una segunda recombinación provocó la escisión del plásmido del cromosoma y la pérdida de resistencia al antibiótico. Los aislados en los que la segunda recombinación dio lugar al intercambio de *ppx1* por la variante Δ *ppx1* se identificaron mediante PCR con oligonucleótidos apropiados que abarcaban *ppx1* y se confirmaron mediante secuenciación. Se seleccionó un aislado para estudios posteriores (cepa *Lc. paracasei* DC405).

El gen *ppx2* (LCABL_27810) se mutó por inactivación insercional. Para ello, se amplificó un fragmento interno de *ppx2* de 0.4 kb con los oligonucleótidos ppx2F y ppx2R, que contenían sitios de restricción EcoRI e HindIII en sus respectivos extremos 5' (Tabla 11). El fragmento se digirió con estas enzimas, se ligó a pRV300 y se transformó en *E. coli* NZYStar, obteniéndose pRVppx2 (Tabla 10). La electroporación de este plásmido en *Lc. paracasei* BL23 produjo la disrupción de *ppx2* (cepa DC475). El plásmido pRVppx2 también se utilizó para transformar la cepa DC405, dando lugar a la cepa doble mutante DC478 (Δ *ppx1* *ppx2*::pRV300).

Capítulo 3. Metodología

Tabla 11. Oligonucleótidos usados en este capítulo.

Oligonucleótido	Secuencia*	uso
Ppx1-1	ATGGAATTTCGAGCATGATGAC	
Ppx1-2	ATCAATCAGCACCGTGCCTTTTTGCGTAATCGATTAAAC	
Ppx1-3	AAGGCACGGTGCTGATTGATGATCTTGAAGTAACCATGGT	
Ppx1-4	AGAAAGCTTTGCGTAATACCC	Disrupción <i>ppx1</i>
ppx2F	AAAGAATTCCTCAAACGGGTGAAG	Inactivación <i>ppx2</i>
ppx2R	CGAAAGCTTCGCCAAGCG	
cpx1-F	<u>ATGTTATAATACAAGTATCATGACAGTCAGGTAGCAAACG</u>	Amplificación
cpx1-R	<u>TTTGTTAGCAGCCGGATCTATCATAAAATGTTCTTCCTTTCA</u> GC	<i>ppx1</i> para complementación
RppkF	ATACAACATTGGTTCGTTTCG	RT-qPCR
RppkR	ACAAAATCGTGCTGTTTCTC	RT-qPCR
Rppx1F	TGCAGAACATGAAATCTTGC	RT-qPCR
Rppx1R	TACATTAACAGTCGGTACGC	RT-qPCR
Rppx2F	TGATCTTGGCAGTAACTCAG	RT-qPCR
Rppx2R	ACAATCGCACCATTTCTTTG	RT-qPCR
Hppx1F	<u>ACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTGGAACGAGAATGG</u> CA	Clonaje
Hppx1R	<u>AGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTAAAATGTTTCTTCCT</u> TTCAGCTC	Ppx1
HppkF	<u>GGATCGCATCACCATCACCATCACGTGAAGAACTAGATTT</u> TTCAAG	Clonaje
HppkR	<u>ATTAAGCTTGGCTGCAGGTCGACCCCTCATGCGTCATCGTCTCT</u> C	Ppk
Hppx2F	<u>GGATCGCATCACCATCACCATCACGTGACGCATCATTTTGCA</u>	Clonaje
Hppx2R	<u>ATTAAGCTTGGCTGCAGGTCGACCCCTAATGCTCACGCTGT</u> GT	Ppx2

* Subrayadas, se indican las colas añadidas a los cebadores para su ligación mediante ensamblaje Gibson

3. Complementación de $\Delta ppx1$

Se construyó un plásmido que expresaba *ppx1* amplificando *ppx1* con *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* y oligonucleótidos cpx1-F y cpx1-R (Tabla 11). El producto de PCR se clonó en pT1NX (Schotte *et al.*, 2000) digerido con BglII y SpeI por ensamblaje de Gibson con el kit *GeneArt Gibson Assembly EX* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El plásmido pT1ppx1 obtenido portaba *ppx1* de *Lc. paracasei* bajo el control del promotor constitutivo P1 y se confirmó mediante secuenciación.

4. Aislamiento y cuantificación de Poli-P

El Poli-P se aisló a partir de células bacterianas (cultivos de 10 ml) mediante extracción con hipoclorito sódico como se ha descrito previamente (Alcántara *et al.*, 2014). El poli-P obtenido de estas bacterias se disolvió en agua y se cuantificó por fluorescencia con 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI; 10 μ M en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl) (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008) en un lector de placas Clariostar (Ex. 425 nm, Em. 550 nm). Se construyeron curvas patrón de poli-P con diferentes cantidades de poli-P y se cuantificaron con DAPI. Las curvas patrón se calibraron determinando el Pi total. Para ello, el poli-P se sometió a hidrólisis ácida (1 vol de HCl 2M, 95 °C, 15 min, seguido de neutralización con 1 vol de NaOH 2M), y el Pi total se determinó con el kit Biomol Green (Enzo Life Sciences). A continuación, los resultados se expresaron como nmol de Pi normalizado a la cantidad de células bacterianas expresada como DO_{595nm}.

5. Electroforesis y tinción de Poli-P

Las fracciones de poli-P se analizaron en geles de poliacrilamida al 8% con 8 M de urea y 1x Tris-borato-EDTA (TBE) como tampón. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de toluidina (Ghorbel *et al.*, 2006). Los gránulos de poli-P en cepas de *Lc. paracasei* se evidenciaron mediante tinción de Neisser: las células bacterianas de cultivos líquidos se depositaron en portaobjetos de microscopio, se secaron al aire y se tiñeron con una solución de azul de metileno al 0.1%, ácido acético al 5% y etanol al 5% mezclada (1:2) con una solución de violeta cristal al 0.33% en etanol al 10%, durante 1 minuto. Tras aclarar con agua, las bacterias se contrastaron con crisoidina G al 0.3% en agua y se observaron al microscopio a 100x.

6. Determinación de la expresión génica mediante RT-qPCR

El ARN total se aisló de las bacterias cultivadas en MEI o LP-MEI con TRIzol (Invitrogen) como se ha descrito previamente (Zúñiga, Miralles and Pérez-Martínez, 2002). La calidad y concentración de las muestras de ARN se evaluaron posteriormente mediante el sistema de electroforesis automatizado Experion (Bio-Rad). Se descartaron las muestras con relaciones 23S/16S inferiores a 0.85. El ARN se trató con el kit *Ambion Turbo DNA-free* (Applied Biosystems) y el ADNc se sintetizó a partir de 5 μ g de ARN con el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO (Invitrogen). La qPCR en tiempo real se realizó utilizando un sistema de PCR en tiempo real LightCycler®480 (Roche Diagnostics, EE.UU.) usando *LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix* (2x, Roche) y los pares de cebadores RppkF/RppkR para el gen *ppk* de *Lc. paracasei* BL23 (LCABL_27820), Rppx1F/Rppx1R para *ppx1*, y Rppx2F/Rppx2R para *ppx2* (Tabla 11). Los genes *housekeeping recA*, *fusA*, *pyrG* y *mutL* se utilizaron como referencia (Landete *et al.*, 2010). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de tres pasos consistentes en desnaturalización a 95 °C durante 10 s, hibridación del cebador a 55 °C durante 10 s y extensión del cebador a 72 °C durante 10 s. La expresión génica relativa

Capítulo 3. Metodología

se determinó con las herramientas implementadas en el *Relative Expression Software Tool* (Pfaffl, Horgan and Dempfle, 2002).

7. Análisis filogenético de las proteínas Ppx1

Se realizaron búsquedas mediante BLAST-P (Altschul *et al.*, 1990) de la secuencia de aminoácidos de *L. paracasei* BL23 Ppx1 (Acc. N° CAQ67834.1) en la base de datos no redundante de secuencias proteicas GenBank. La búsqueda se limitó a los taxones pertenecientes al filo Bacillota. Se descartaron las secuencias con una cobertura inferior al 80%. Para cada género se seleccionó una secuencia representativa. Las secuencias utilizadas se enumeran en el Anexo 2. La alineación múltiple se realizó con M-Coffee (Di Tommaso *et al.*, 2011). Las posiciones de homología incierta y los huecos se eliminaron con GBLOCKS (Castresana, 2000). La selección del mejor modelo de sustitución por máxima verosimilitud se realizó en Mega 11.0.3 (Tamura, Stecher and Kumar, 2021). El árbol de máxima verosimilitud se reconstruyó con iq-tree (Nguyen *et al.*, 2015) con el modelo LG (Le and Gascuel, 2008) con una distribución gamma discreta para tener en cuenta la heterogeneidad en las tasas evolutivas entre sitios. Los valores de soporte se obtuvieron a partir de 1.000 pseudoreplicados mediante la aproximación bootstrap ultrarrápida (Minh, Nguyen and Von Haeseler, 2013).

8. Expresión y purificación de proteínas con cola de histidinas

Las regiones codificantes de los genes *ppx1* (LCABL_27830), *ppk* (LCABL_27820) y *ppx2* (LCABL_27810) de *Lc. paracasei* BL23 se amplificaron mediante PCR con los pares de oligonucleótidos Hppx1F/Hppx1R, HppkF/HppkR y Hppx2F/Hppx2R (Tabla 5), respectivamente, utilizando la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Los fragmentos de PCR purificados se clonaron en plásmidos de expresión pET28a, digeridos con NcoI/XhoI (para *ppx1*) o pQE80, digeridos con SmaI-BamHI (para *ppk* y *ppx2*), con el kit *GeneArt Gibson Assembly EX* (Invitrogen), para expresar proteínas con etiquetas 6×(His) en C-terminal o N-terminal, respectivamente. Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* NZYStar y, tras la secuenciación, los plásmidos construidos se transfirieron a *E. coli* BL21(DE3). Para la expresión proteica, las cepas (0.5 l) se cultivaron en caldo LB a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta una DO_{595nm} de 0.5. La expresión proteica se indujo añadiendo 0.3 mM de IPTG e incubando a 27 °C durante 3 h (Ppx1 y Ppx2) o 0.3 mM de IPTG e incubando toda la noche a 16 °C (Ppk). Tras la centrifugación, los sedimentos bacterianos se lavaron con 200 ml de tampón A [Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 500 mM], y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 30 ml de tampón A suplementado con 1 mM de PMSF. La suspensión celular se sonicó a 200 W durante cuatro ciclos de 60 s seguidos de 60 s de enfriamiento en hielo con un sonicador Labsonic V (B. Braun). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12.000 × g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró a través de una membrana Filtropur S (Sarstedt) de 0.45 µm de tamaño de poro. El extracto aclarado se cargó directamente en una columna HisTrap FF *crude* (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con tampón A y

acoplada a un sistema Äktaprime FPLC (Cytiva). Tras el paso de la muestra, la columna se lavó con 10 ml de tampón A y las proteínas se eluyeron con un gradiente de imidazol (40 mM a 2 M) en tampón A. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las que contenían proteína purificada se agruparon y se sometieron a intercambio de tampón (50 mM MES pH 6.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂ para Ppx1 y Ppx2, mientras que el KCl se aumentó a 200 mM para Ppk), utilizando un dispositivo de centrifugación Amicon Ultra 10K (Merck Millipore). Se añadió glicerol hasta una concentración final del 20 % (vol/vol) y las proteínas recombinantes se conservaron a -80 °C.

9. Actividades enzimáticas

La actividad exopolifosfatasa se midió en 150 µl de 50 mM MES pH 5.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, poli-P aislado de *Lc. paracasei* BL23 (equivalente a 2 nmol de Pi) y diferentes cantidades (0.3 a 0.7 µg) de 6x(His)Ppx1 o 6x(His)Ppx2 purificada. La mezcla se incubó a 37 °C y se extrajeron alícuotas de 10 µl a diferentes intervalos de tiempo que se mezclaron con 140 µl de reactivo Biomol Green (Enzo Life Sciences) para determinar la liberación de Pi. La actividad poli-P quinasa se determinó en 100 µl de 50 mM de HEPES-KOH pH 7, 5 mM de MgCl₂, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de ATP, 0.05 nmol de poli-P (como Pi), 0.2 µg de 6x(His)Ppk, 2.5 mM de fosfoenolpiruvato (PEP) y 2U de piruvato quinasa (Sigma). El PEP y la piruvato quinasa en las reacciones se utilizaron para regenerar el ATP y evitar la acumulación de ADP, que puede tener actividad inhibitoria sobre la Ppk (Jagannathan, Kaur and Datta, 2010). Cuando fue necesario, se añadieron 0.2 µg de 6x(His)Ppx1 o seroalbúmina bovina (BSA) a las reacciones. La falta de actividad poli-P quinasa de 6x(His)Ppx1 o BSA también se comprobó en reacciones en las que se añadieron estas proteínas en ausencia de 6x(His)Ppk. Las mezclas se incubaron a 37 °C y, a diferentes intervalos de tiempo, se mezclaron alícuotas de 10 µl con 10 µl de EDTA 500 mM pH 8 para detener la reacción. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se cuantificó la formación de poli-P mediante fluorescencia con DAPI (apartado 4) en un lector de placas de fluorescencia Clariostar.

Resultados

1. La síntesis y degradación de poli-P están ligadas a la disponibilidad de fosfato y a la fase de crecimiento en *Lacticaseibacillus paracasei* BL23

Se ha observado previamente que el crecimiento en un medio rico en Pi favorece la formación de inclusiones intracelulares de poli-P en muchos lactobacilos, incluido *Lc. paracasei* (Alcántara *et al.*, 2014). Nuestros resultados muestran que durante la fase de crecimiento exponencial tardío (6 h de cultivo, $DO_{595nm} \sim 2.5$; Figura 45a) las cantidades de poli-P fueron unas cinco veces mayores en células de *Lc. paracasei* BL23 cultivadas en medio rico en Pi (MEI) en comparación con aquellas cultivadas en medio bajo en Pi (MEI-LP). En las células en fase estacionaria cultivadas en MEI (16 h de cultivo, $DO_{595nm} \sim 3.1$) el contenido en poli-P disminuyó, llegando a los niveles observados en las células cultivadas en MEI-LP durante la fase exponencial tardía. La diferencia en los niveles de poli-P entre células en fase exponencial y estacionaria también se observó cuando las bacterias se cultivaron en MEI-LP (Figura 45a). Al analizar el poli-P aislado mediante electroforesis en acrilamida-urea, también se evidenciaron diferencias en las longitudes de cadena en las células cultivadas en MEI. La fracción de poli-P obtenida de bacterias en crecimiento exponencial mostró un mayor contenido de poli-P de cadena larga en comparación con aquella obtenida de células en fase estacionaria (Figura 45b).

No se observaron diferencias en la longitud del poli-P aislado en diferentes estadios de crecimiento a partir de células cultivadas en MEI-LP (Figura 45b). Para comprobar si las diferencias en el contenido de poli-P podían estar relacionadas con la expresión diferencial del grupo de genes *ppx-ppk*, se determinó la expresión de *ppx1*, *ppk* y *ppx2* (Figura 46). Se demostró que la expresión de los genes *ppx* y *ppk* disminuyó ligeramente en las células cultivadas en condiciones de bajo Pi en comparación con las cultivadas en condiciones de alto Pi, tanto en la fase exponencial tardía como en la estacionaria. Este resultado sugiere que la disponibilidad de Pi tiene un efecto moderado sobre la expresión de los genes *ppx/ppk*.

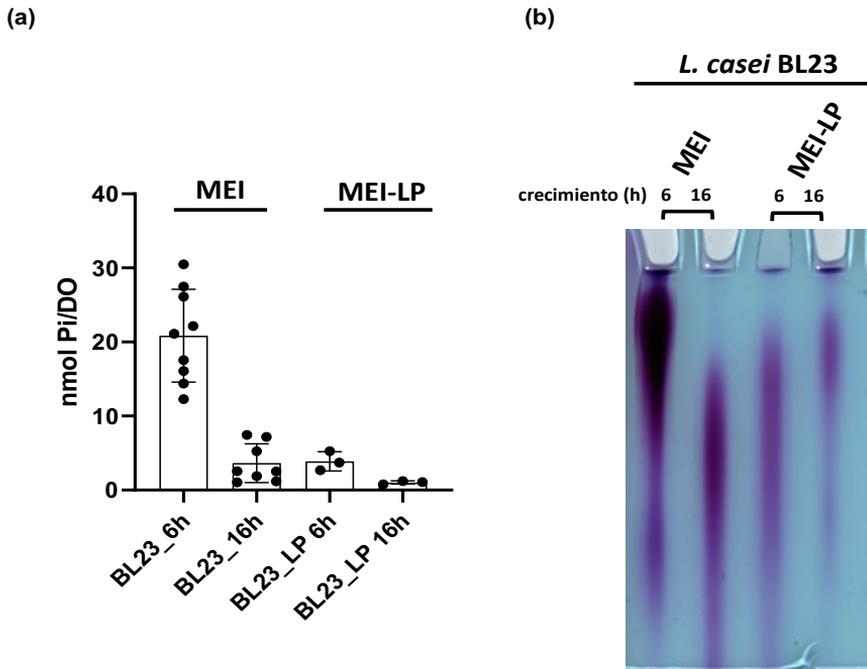


Figura 45. Acumulación de poli-P en *Lc. paracasei*. (a) Niveles de poli-P como nmol Pi/DO en *Lc. paracasei* BL23 silvestre cultivada en medio MEI (6 h, DO 2.5; 16 h, DO 3.1) y MEI bajo en Pi (MEI-LP) (6 h, DO 1; 16 h, DO 1.6). (b) Análisis de poli-P mediante electroforesis en acrilamida del poli-P aislado de *Lc. paracasei* BL23 cultivada en las mismas condiciones que en (a). Cada carril contiene el poli-P extraído de células bacterianas equivalente a 4 unidades DO.

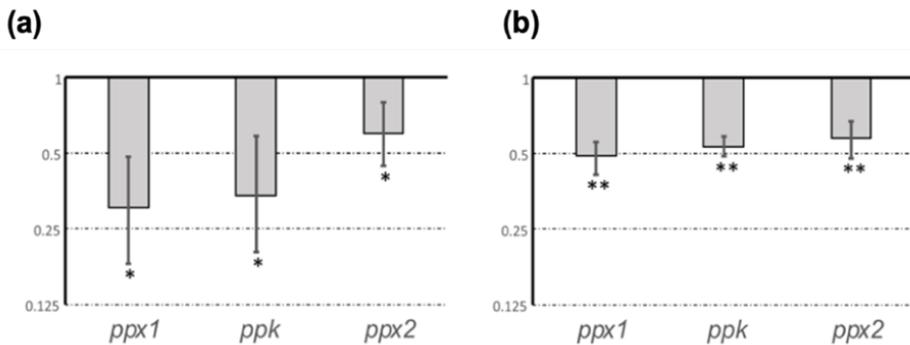


Figura 46. Expresión de los genes *ppk* y *ppx*. Expresión relativa (*fold-change*) de *ppk*, *ppx1* y *ppx2* en células de *Lc. paracasei* BL23 cultivadas en MEI-LP en comparación con células cultivadas en MEI. (a) ARN aislado de células cultivadas durante 6 h. (b) ARN aislado de células cultivadas durante 16 h. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las condiciones de referencia, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

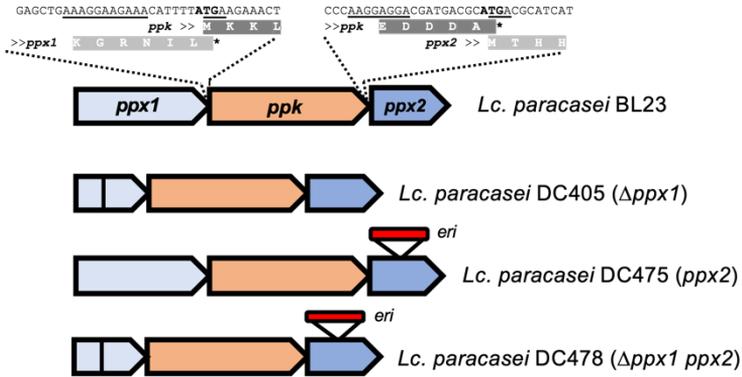
2. La inactivación del gen *ppx1* que codifica una exopolifosfatasa putativa resulta en la ausencia de acumulación de poli-P

El gen *ppk* de muchos lactobacilos, incluido *Lc. paracasei*, está agrupado junto con *ppx1* y *ppx2*, presentando una estructura de operón *ppx1-ppk-ppx2* [(Alcántara *et al.*, 2014); Figura 47]. Los codones de terminación y de inicio de los pares de genes *ppx1/ppk* y *ppk/ppx2* se solapan, respectivamente, lo que sugiere un acoplamiento traduccional en la síntesis de las tres enzimas. Ppx1 tiene una arquitectura proteica similar a la de otras exopolifosfatasas pertenecientes a la familia GppA/Ppx, como la de *E. coli*, que constan de un dominio catalítico N-terminal perteneciente a la superfamilia acetato y azúcar quinasa/Hsp70/actina (ASKHA) y un dominio HDc C-terminal presente en las fosfohidrolasas dependientes de metales (Song *et al.*, 2020). La exopolifosfatasa Ppx2 comparte una identidad aminoacídica baja (15%) con Ppx1. Ppx2 contiene el dominio ASKHA, mientras que carece del dominio HDc.

Con el fin de comprender mejor la función de estas enzimas Ppx durante la acumulación de poli-P, se construyó una cepa de *Lc. paracasei* con una eliminación parcial en fase del marco de lectura del gen *ppx1*, lo que resultó en la eliminación de los aminoácidos 139 a 399 de la proteína Ppx1, privándola así del sitio activo putativo de la enzima y de una parte sustancial de su secuencia de aminoácidos. Además, se obtuvo una cepa con una interrupción del gen *ppx2*, así como una cepa con una doble mutación, en la que se interrumpió *ppx2* en la cepa $\Delta ppx1$ (Figura 47a). De forma similar a la cepa de *Lc. paracasei* BL23 con una mutación en *ppk* descrita previamente (Alcántara *et al.*, 2014), ninguna de las cepas construidas en este capítulo mostró un impacto significativo en el crecimiento en las condiciones ensayadas (Figura 47b).

Para nuestra sorpresa, al analizar los niveles de poli-P sintetizados por estas cepas, no detectamos poli-P en la cepa $\Delta ppx1$ (Figura 48a). Sin embargo, tanto el contenido de poli-P como la distribución de tamaños en la cepa *ppx2* fueron similares a los encontrados en la cepa silvestre (Figura 48b). Además, la cepa *ppx2* siguió el mismo patrón de acumulación de poli-P que la cepa silvestre, siendo dependiente de la fase de crecimiento. Tras la observación microscópica de los gránulos intracelulares, se confirmaron las mediciones de poli-P obtenidas previamente (Figura 48c); ya que se detectaron gránulos de poli-P en las cepas silvestre y *ppx2*, mientras que no fue posible detectar gránulos en el mutante *ppk*, la cepa $\Delta ppx1$ y el doble mutante $\Delta ppx1ppx2$.

(a)



(b)

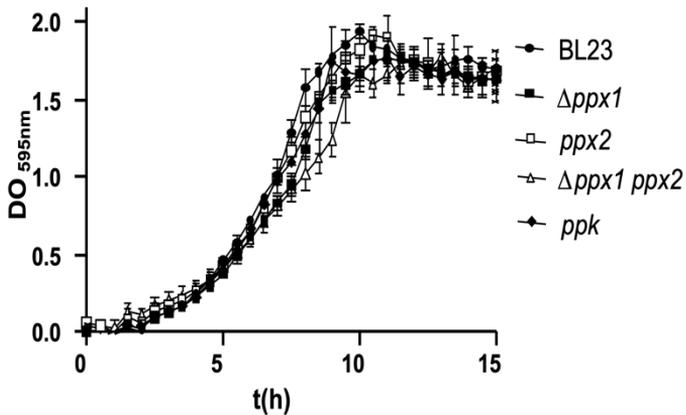


Figura 47. Cepas mutadas en el operón *ppx1-ppk-ppx2*. (a) Representación esquemática del operón *ppx1-ppk-ppx2* en *Lc. paracasei* BL23. Se muestran los codones de inicio y parada solapados para *ppx1-ppk* y *ppk-ppx2*. Las secuencias subrayadas indican sitios Shine-Dalgarno. También se muestran las diferentes estructuras del operón en los mutantes *ppx* construidos para las cepas DC405 (eliminación en fase dentro de *ppx1*), DC475 (integración del plásmido en *ppx2*) y DC478 (integración del plásmido en *ppx2* en el mutante $\Delta ppx1$). (b) Curvas de crecimiento de diferentes derivados de *Lc. paracasei* BL23. Las cepas se incubaron en medio MEI a 37 °C y el crecimiento se monitorizó a una DO_{595nm} .

Capítulo 3. Resultados

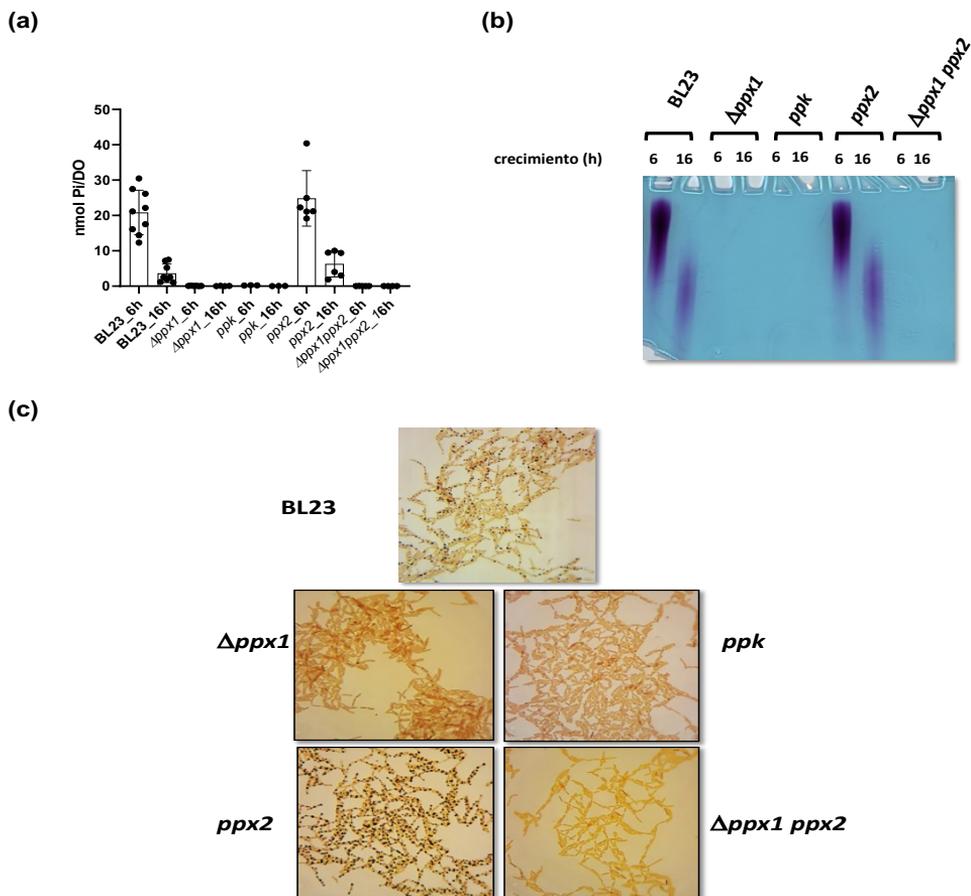


Figura 48. Efecto de las mutaciones *ppx* en la síntesis de poli-P. (a) Niveles de poli-P como nmol Pi/DO en *Lc. paracasei* BL23 (silvestre) y cepas mutantes en *ppx1*, *ppx2* o *ppk* a diferentes tiempos de crecimiento en medios MEI (6 h, DO_{595nm} 2,5 y 16 h, DO_{595nm} 3,1) y MEI-LP (6 h, DO_{595nm} 1 y 16 h, DO_{595nm} 1,6); (b) Análisis de poli-P por electroforesis en acrilamida en cada cepa cultivada en las mismas condiciones que en (a). Cada carril contiene la poli-P extraído de células bacterianas equivalentes a 4 unidades de DO_{595nm} . Los datos de la cepa silvestre (BL23) son las mismas mediciones que se muestran en la Figura 45 ($n = 9$), derivadas de experimentos independientes realizados en días diferentes. Para el resto de las cepas, $n = 3-6$. (c) Formación de gránulos de poli-P en *Lc. paracasei* BL23 y mutantes derivados. Las células se cultivaron en MEI durante 16 h, se tiñeron con tinción de Neisser y se visualizaron a 100x.

3. Ppx1 es esencial para la síntesis de poli-P en *Lc. paracasei*

Para investigar la falta de síntesis de poli-P tras la inactivación de *ppx1*, medimos los niveles de expresión del gen *ppk* en la cepa $\Delta ppx1$, los cuales mostraron que no había diferencias significativas en comparación con la cepa silvestre (Figura 49a). A pesar de la expresión similar de *ppk* entre las cepas silvestre y $\Delta ppx1$, la ausencia de la síntesis de poli-P como consecuencia de la inactivación de *ppx1* podría seguir dependiendo de las diferencias en la expresión de Ppk causadas por los cambios aguas arriba en *ppx1*. Por lo tanto, para confirmar esta hipótesis, se transformó la cepa $\Delta ppx1$ con un plásmido portador del gen silvestre de *ppx1*, lo que restauró la síntesis de poli-P y la formación de gránulos (Figura 49bcd). Además, esta cepa se transformó también con un plásmido que expresaba el gen silvestre *ppk*, que en el mutante *ppk* fue capaz de restablecer la producción de poli-P y la formación de gránulos. Por el contrario, la expresión de *ppk* en la cepa $\Delta ppx1$ no dio lugar a la detección de poli-P (Figura 49 b y c).

De acuerdo con esto, la expresión del plásmido *ppk* en el mutante $\Delta ppx1$ no dio lugar a la formación de gránulos (Figura 49d). Aunque se observó la complementación de las mutaciones $\Delta ppx1$ y *ppk* por sus respectivos alelos de tipo silvestre, en las cepas complementadas los niveles y el patrón (distribución de la longitud de la cadena) de poli-P nunca alcanzaron los del tipo silvestre. Hay que tener en cuenta que en estos experimentos los genes *ppk* y *ppx1* estaban fusionados a un promotor constitutivo y se expresaban a partir de un plásmido multicopia, por lo que probablemente no estaban sujetos a la misma regulación que los genes cromosómicos.

Como se mencionó anteriormente, la proteína Ppx1 de *Lc. paracasei* pertenece al prototipo GppA/Ppx de *E. coli*. Sin embargo, una inspección detallada de la secuencia de la Ppx1 de *Lactobacillaceae* reveló mutaciones en aminoácidos claves que han sido identificados en las proteínas Ppx como cruciales para su actividad catalítica (Figura 50). Las proteínas Ppx de la familia GppA/Ppx poseen bucles de unión a Pi ricos en glicina (P-loop) en sus dominios catalíticos N-terminales, que desempeñan un papel crucial en la interacción con las moléculas de Pi del polímero poli-P (Song *et al.*, 2020). En el caso específico de la proteína Ppx1 de *L. paracasei* BL23, se observó que carecía del primer P-loop, el cual presenta una secuencia consenso DXGS[N/Y]S, mientras que el segundo P-loop, con una secuencia consenso [D/E]XGG[G/A]SXE, mostraba una desviación significativa de ella, presentando la secuencia DISSGSVE, en la cual los residuos centrales de glicina altamente conservados estaban reemplazados por serina (Figura 50; Anexo 3). Para algunas especies de lactobacilos, la conservación de la secuencia a este nivel es incluso menor, mostrando una falta total de conservación para los residuos de aspártico y glutámico presentes en los extremos del P-loop 2, como fue el caso de Ppx1 de *Lp. plantarum* (WP_103851489.1), *Levilactobacillus brevis* (AYM03703.1), *Limosilactobacillus reuteri* (MCH5356744.1) o *Lactobacillus acidophilus* (MCT3601606.1).

Capítulo 3. Resultados

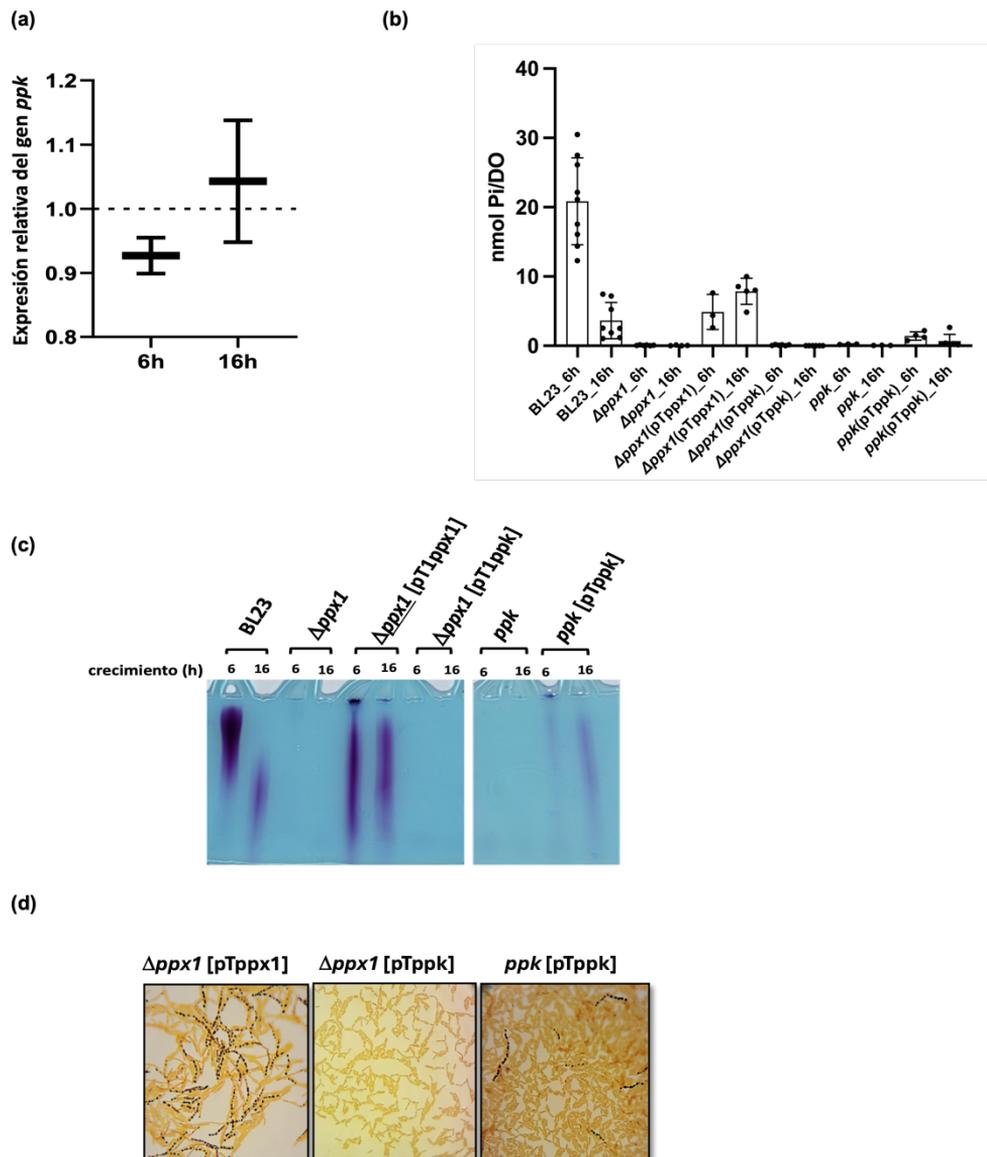


Figura 49. Contribución de Ppx1 a la biosíntesis de Poli-P en *Lc. paracasei*. (a) Expresión relativa del gen *ppk* en la cepa $\Delta ppx1$. La expresión de *ppk* se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de células cultivadas en MEI durante 6 o 16 h. Los datos expresan diferencias en número de veces (*fold-change*) en relación con la cepa silvestre. (b) Niveles de poli-P como nmol Pi/DO en *Lc. paracasei* BL23 (silvestre) y cepas mutantes $\Delta ppx1$, o *ppk* y sus respectivas variantes portadoras de plásmidos que expresan Ppx1 o Ppk. Las células se cultivaron en MEI (6 h, DO_{595nm} 2.5 y 16 h, DO_{595nm} 3.1) o MEI-LP (6 h, DO_{595nm} 1 y 16 h, DO_{595nm} 1.6). Los datos de la cepa silvestre (BL23) son las mismas mediciones mostradas en la Figura 45 (n = 9), derivadas de experimentos independientes realizados en días diferentes. Para el resto de las cepas n = 3-6. (c) Análisis de poli-P mediante electroforesis en acrilamida en cada cepa cultivada en las mismas condiciones que en (b). Cada carril contiene el poli-P extraído de células bacterianas equivalente a 4 unidades DO. (d) Tinción de gránulos de poli-P. Células bacterianas de diferentes cepas de *Lc. paracasei* se cultivaron en MEI durante 16 h, se tiñeron mediante tinción de Neisser y se visualizaron a 100 \times .

Capítulo 3. Resultados

El residuo ácido-base de glutámico de gran importancia catalítica, que en la familia GppA/Ppx se encuentra situado proximalmente al P-loop 2 (E121 en Ppx de *E. coli*), se identificó en ciertas proteínas Ppx1 de la familia *Lactobacillaceae*. Sin embargo, este residuo estaba notablemente ausente en otras (por ejemplo, *Lm. reuteri* o *L. acidophilus*). Este glutámico se alinea a través de una arginina (R93 en Ppx de *E. coli*) para facilitar la activación de una molécula de agua (nucleófilo), promoviendo su ataque al Pi terminal en el poli-P (Alvarado *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2021). Sin embargo, este residuo crucial de arginina no está presente en las proteínas Ppx1 de los miembros de *Lactobacillaceae*. Por el contrario, la proteína Ppx2 de *Lc. paracasei*, así como las de otros miembros de la familia *Lactobacillaceae* que poseen operones *ppx1-ppk-ppx2*, conservan los P-loop 1 y 2 (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos DLGSNS y DTGGASTE, respectivamente, para Ppx2 de *Lc. paracasei*) y los aminoácidos catalíticos clave (Figura 50; Anexo 3).

Se llevó a cabo un análisis filogenético de los homólogos de Ppx1 presentes en taxones pertenecientes al filo Bacillota para conocer mejor la evolución de los genes *ppx1* (Figura 51). La reconstrucción filogenética tuvo un fuerte soporte en la mayoría de los nodos; sin embargo, el árbol resultante no reflejó las relaciones evolutivas esperadas entre los diferentes taxones, lo que sugiere que la historia evolutiva de Ppx1 no puede ser explicada únicamente por herencia vertical. El análisis reveló la existencia de dos grandes grupos (Figura 51). El grupo I incluye proteínas Ppx1 presentes en taxones pertenecientes a los órdenes Bacillales y Lactobacillales, excluyendo aquellos pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae*. Por otro lado, el grupo II está formado principalmente por taxones pertenecientes a *Lactobacillaceae* y a las clases Clostridia y Negativicutes. Al examinar las secuencias, se observó que las Ppx1 del grupo I conservan motivos y residuos implicados en la actividad polifosfatasa, mientras que las pertenecientes al clúster II muestran cambios en algunos o la mayoría de estos residuos (Figura 51). Este resultado indica que las proteínas Ppx1 presentes en *Lactobacillaceae* son distintas de aquellas encontradas en sus taxones más estrechamente relacionados, como *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae* y *Streptococcaceae*. La conservación de residuos catalíticos en las proteínas Ppx1 del clúster I sugiere que posiblemente actúen como polifosfatasas, mientras que las pertenecientes al clúster II podrían desempeñar un papel similar al descrito aquí para Ppx1 de *L. paracasei* BL23.

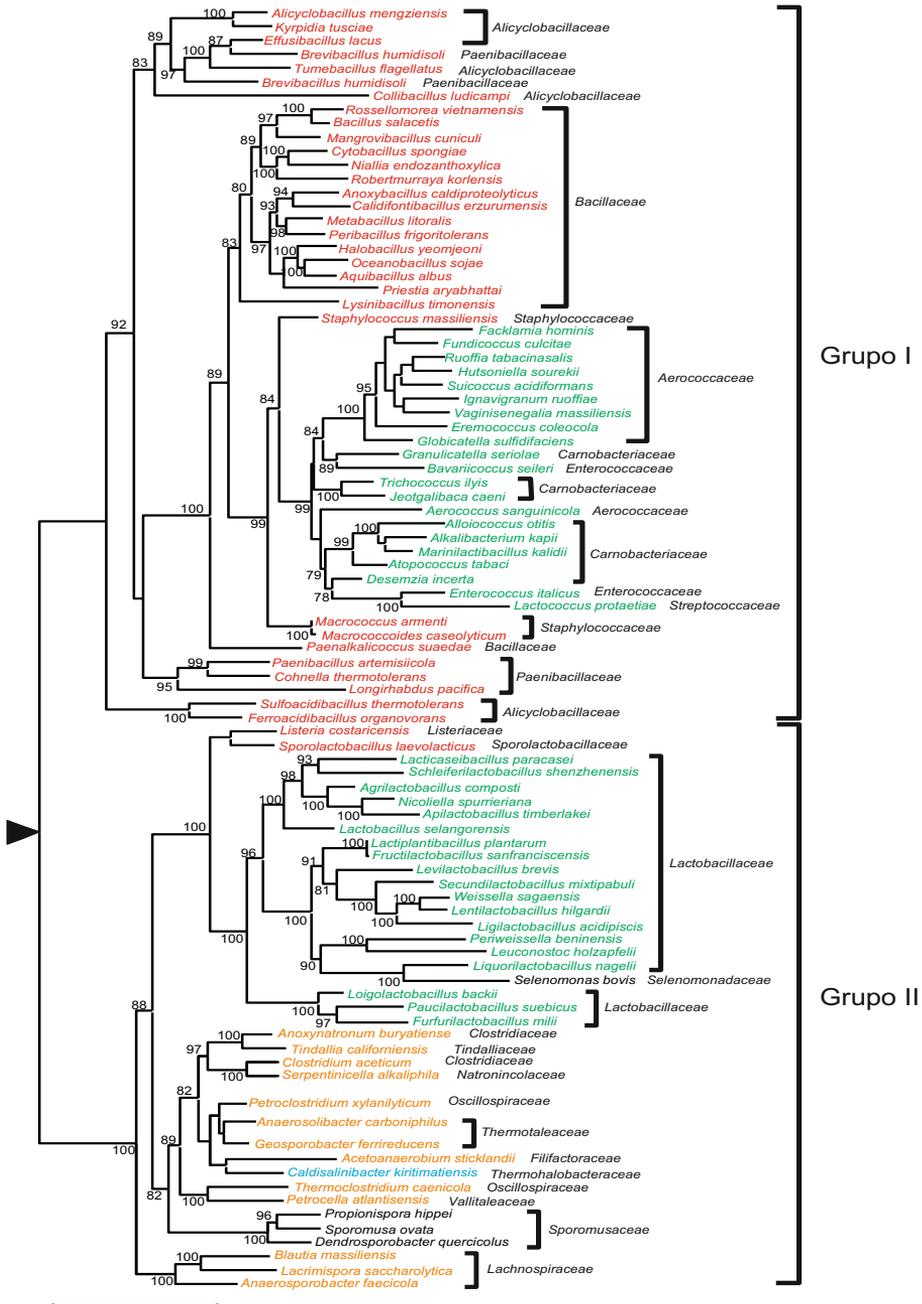


Figura 51. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las proteínas Ppx1 de especies seleccionadas del filo Bacillota. Los valores de soporte se dan para aquellos nodos con un soporte superior al 75%. El árbol se ha enraizado arbitrariamente para facilitar la visualización. Colores: negro: clase Negativicutes; marrón: clase Clostridia; azul: clase Tissierellia; verde: orden Lactobacillales; y rojo: orden Bacillales.

4. Actividades exopolifosfatasa y poli-P quinasa de las enzimas de *Lc. paracasei* BL23

Para confirmar las actividades enzimáticas de las proteínas codificadas dentro del operón *ppx1-ppk-ppx2* de *Lc. paracasei* BL23, las tres proteínas se expresaron y purificaron a partir de *E. coli* como proteínas *His-tagged* (Figura 52). La proteína Ppx2 recombinante mostró actividad sobre el poli-P de *Lc. paracasei*, liberando 2.54 ± 0.41 nmol de Pi/min/ μ g de proteína, lo que confirmó su función como exopolifosfatasa. Sin embargo, no pudo evidenciarse actividad para la proteína Ppx1 purificada (<0.003 nmol de Pi/min/ μ g de proteína; por debajo del nivel de detección). Tampoco se detectó actividad exopolifosfatasa de Ppx1 (por debajo del nivel de detección) cuando se añadió Ppk a la mezcla de reacción. En contraste con la falta de actividad polifosfatasa de Ppx1, se evidenció actividad poli-P quinasa para la enzima Ppk de *Lc. paracasei*. En comparación con la actividad de la enzima en solitario, la actividad poli-P quinasa de Ppk aumentó en las reacciones en las que se incluyó la proteína Ppx1 (Figura 53).

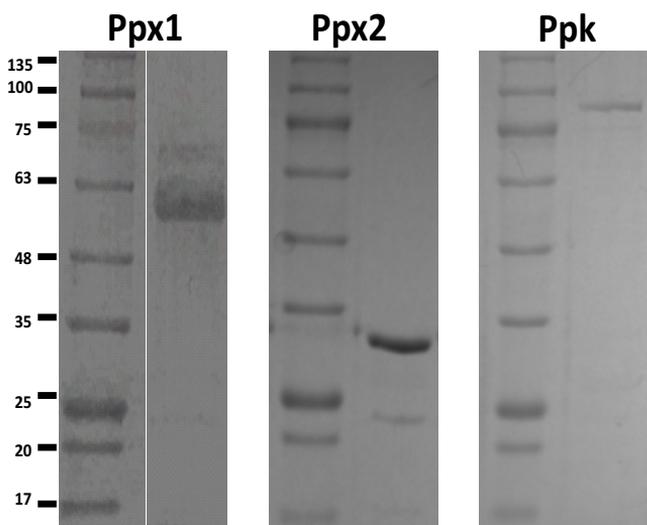


Figura 52. Geles PAGE que muestran Ppx1 (57.3 kDa), Ppx2 (35.3 kDa) y Ppk (82.7 kDa) purificados de *Lc. paracasei* BL23. Marcador de peso molecular NZYColour II.

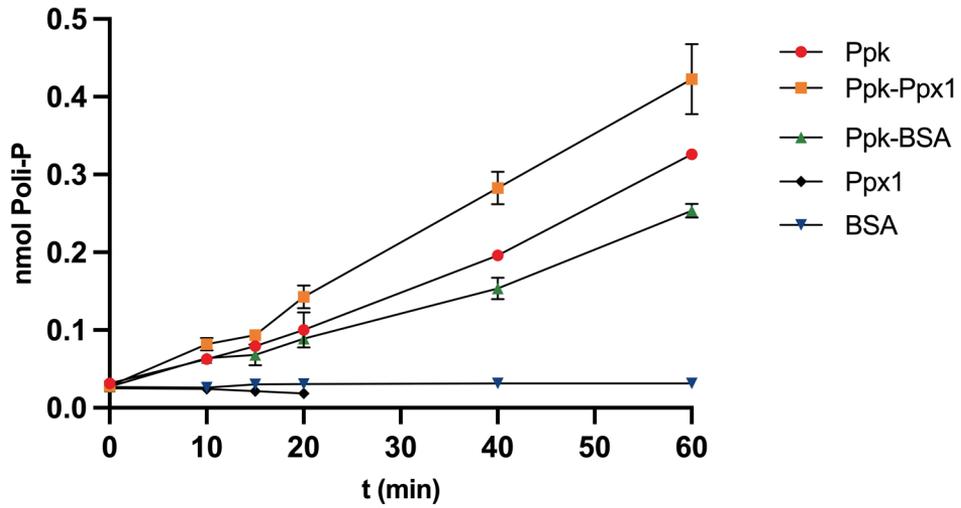


Figura 53. Actividad poli-P quinasa de *Lc. paracasei* Ppk. La 6x(His)Ppk purificada de *Lc. paracasei* BL23 se sometió a ensayos de actividad poli-P quinasa en ausencia o presencia de 6x(His)Ppx1. Se empleó BSA como proteína no relacionada de control y también se comprobó la actividad poli-P quinasa de la 6x(His)Ppx1 añadida.

Capítulo 3. Discusión

Discusión

Se ha aceptado comúnmente que los niveles de poli-P en bacterias están controlados por las actividades antagónicas de Ppk (síntesis) y Ppx (hidrólisis). Sin embargo, recientemente se ha cuestionado el modelo que implicaba a (p)ppGpp como la molécula reguladora clave que inhibía la actividad de Ppx y, por tanto, desencadenaba la acumulación de poli-P (Gray MJ., 2019). Aún se desconoce cómo se regula la síntesis de poli-P en los lactobacilos. Se ha demostrado que sus niveles en *Lc. paracasei* BL23 varían dependiendo de la cantidad de Pi en el medio [(Alcántara *et al.*, 2014) y resultados obtenidos en este capítulo], un hecho que también se ha observado en *Lc. rhamnosus* CRL 1505 (Correa Deza *et al.*, 2017). Al igual que se ha descrito en este capítulo, otros investigadores han informado que en *Lc. paracasei* JCM1163 se observa una acumulación inicial de poli-P en fases tempranas de crecimiento, seguida por una disminución de la concentración de poli-P. Además, las células tras un periodo de ayuno de Pi, acumularon poli-P tras el suministro de éste (Saiki *et al.*, 2016). Esto concuerda con los datos de acumulación de poli-P en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter johnsonii*, que se activa después de una restricción nutricional y es también transitoria (Ault-Riché *et al.*, 1998). Las diferencias en las longitudes de las cadenas de poli-P que se observaron en nuestros resultados en las distintas fases de crecimiento probablemente reflejan el proceso de degradación que se produce a lo largo del crecimiento, tras la acumulación de poli-P en las etapas iniciales.

La cuestión de si la regulación de la transcripción de *ppk* desempeñaría un papel en el control de la síntesis de poli-P es controvertida. Pudimos observar que los niveles de expresión de los genes *ppk* y *ppx* de *Lc. paracasei* fueron mayores en condiciones de alto contenido en Pi, aunque los tres genes (*ppk*, *ppx1* y *ppx2*), que teóricamente codifican enzimas con funciones opuestas, siguieron el mismo patrón de expresión. Esto concuerda con la organización genética del grupo de genes en un operón (Figura 31a). En *P. aeruginosa*, *ppk* y *ppx* no están localizadas en el mismo operón y presentan una regulación diferencial entre ellos (Munévar, de Almeida and Spira, 2017). En esta bacteria, los genes *ppk* y *ppx* no forman parte del regulón Pho y no responden directamente la disponibilidad de Pi. Sin embargo, se ha observado que su transcripción se regula tras la mutación de *phoU* (Munévar, de Almeida and Spira, 2017), que aumenta la captación de Pi y contribuye a la acumulación de poli-P (de Almeida *et al.*, 2015). Un comportamiento similar tras la mutación de *phoU* también se ha observado en *E. coli* (Morohoshi *et al.*, 2002). Por el contrario, la expresión de *ppk* en *Acinetobacter* (Geißdoerfer *et al.*, 1998) o *Streptomyces lividans* (Ghorbel *et al.*, 2006) se induce tras el ayuno de Pi. Además, otros estudios demostraron que en *P. aeruginosa*, la transcripción de *ppx* está controlada por el regulador de respuesta PhoB, que se une a su promotor en condiciones limitantes de Pi (Gallarato *et al.*, 2014). Por otro lado, en *Pseudomonas fluorescens* *ppk* forma parte del regulón Pho y está sobreexpresado en respuesta a condiciones de bajo Pi (Silby, Nicoll and Levy, 2009). Por lo tanto, la regulación

transcripcional de los genes *ppk* y *ppx* posiblemente responde a diversas vías de señalización en diferentes bacterias. No obstante, los datos obtenidos en el Capítulo 2 indican que los genes *ppx* y *ppk* no forman parte del regulón Pho en *Lc. paracasei*.

Si la actividad Ppx fuera un factor limitante para la acumulación de poli-P en *Lc. paracasei*, se esperaría que la ausencia o la disminución de su actividad condujera a un aumento en el contenido de poli-P celular. Por lo tanto, el hecho de que la inactivación de *ppx1* resultara en la ausencia total de poli-P en *Lc. paracasei* fue sorprendente. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se informa de este efecto. En *E. coli*, las cepas con una mutación en *ppx* acumulan sólo ligeramente más poli-P en comparación con las células silvestre. Esto sugiere que la activación de Ppk puede ser el principal mecanismo en la regulación de la cantidad de poli-P y que Ppx sólo controlaría sus niveles una vez Ppk esta activada (Rudat *et al.*, 2018). Asimismo, la inactivación simultánea de los genes *ppx1* y *ppx2* en *Campylobacter jejuni* (ambos codifican Ppx que contienen dominios ASKHA y HDc), sólo dio lugar a un aumento de menos de 1.4 veces en el poli-P (Malde *et al.*, 2014) y la eliminación del gen *ppx2* de *Corynebacterium glutamicum* afectó la concentración de poli-P en dos veces (Lindner *et al.*, 2009). Por último, la eliminación de *ppx* en *Pseudomonas putida*, que se encuentra aguas abajo de *ppk* pero se transcribe de forma convergente, redujo las cantidades de poli-P tanto en células en fase exponencial como estacionaria en un 30%-40% (Nikel *et al.*, 2013).

Las enzimas Ppx de *Lactobacillaceae* no se han estudiado hasta el momento, por lo tanto, se desconocen sus funciones en el metabolismo del poli-P. Mientras que la Ppx1 se asemeja a las exopolifosfatasa típicas de muchos microorganismos, la Ppx2, es más corta y carece del dominio HDc C-terminal (Aravind.,1998), que en la Ppx de *E. coli* juega un papel en la procesividad de la enzima (Bolesch and Keasling, 2000). Sin embargo, la interrupción de *ppx2* en *Lc. paracasei* no tuvo efecto sobre la acumulación de poli-P en las condiciones ensayadas. Algunas especies de *Actinomycetales* también poseen dos genes *ppx2* en sus cromosomas (Lindner *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2012), pero estos no están agrupados con *ppk* y carecen de homólogos *ppx1*. Por otro lado, en la bacteria verde del azufre *Chlorobium tepidum* se han caracterizado dos Ppx diferentes con arquitecturas proteínicas similares a las de *Lc. paracasei*. Para algunas de estas enzimas caracterizadas, los datos bioquímicos revelaron diferentes preferencias de sustrato (por ejemplo, hacia (p)ppGpp o poli-P con diferentes longitudes de cadena (Lindner *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2012; Albi and Serrano, 2014).

Las diferencias de aminoácidos en posiciones críticas para la actividad exopolifosfatasa en Ppx1 de *Lc. paracasei* y en proteínas ortólogas de otros *Lactobacillaceae* son desconcertantes. La introducción de mutaciones en aminoácidos específicos en estas posiciones provoca una pérdida completa de la actividad enzimática en enzimas prototipo de tipo Ppx1 de *E. coli* (Alvarado *et al.*, 2006), *Helicobacter pylori* (Song *et al.*, 2020) o *P. aeruginosa* (Beassoni *et al.*, 2015). Así, nuestra incapacidad para detectar cualquier actividad exopolifosfatasa con Ppx1 purificada en las condiciones ensayadas plantea la cuestión de si esta proteína funciona realmente como una exofosfatasa que

Capítulo 3. Discusión

actúa sobre poli-P. El análisis filogenético de las secuencias de la proteína Ppx1 reveló que las proteínas Ppx1 de *Lactobacillaceae* se agrupan con otros homólogos de Ppx1 (grupo II; Figura 36) que comparten una escasa conservación de los aminoácidos identificados como críticos para la actividad exopolifosfatasa de las enzimas Ppx. Esta observación sugiere que las proteínas Ppx1 del grupo II pueden desempeñar un papel similar al de su homóloga de *Lc. paracasei*. Desafortunadamente, hasta el momento no se ha llevado a cabo ninguna caracterización bioquímica o fisiológica de otras proteínas Ppx1 del grupo II para confirmar o refutar nuestra hipótesis. Los mecanismos moleculares por los que se activa la síntesis de poli-P siguen siendo desconocidos. El hecho de que en *Lc. paracasei* se requiera de Ppx1 para la síntesis de poli-P fue totalmente inesperado y reflejaría una acción coordinada de Ppx1 y Ppk por la cual la enzima Ppk podría requerir Ppx1 para la síntesis de Poli-P *in vivo*. En el caso de *E. coli* se ha planteado la hipótesis de la existencia de factores que activan la función quinasa de Ppk. En esta bacteria, se han identificado sustituciones específicas de aminoácidos en Ppk que dieron lugar a un marcado aumento de la acumulación de poli-P sin afectar a la actividad específica de la enzima (Rudat *et al.*, 2018). Las cepas que portaban estos alelos mutantes de *ppk* sintetizaban constitutivamente poli-P, aunque su nivel seguía respondiendo (aumentando) al disminuir la disponibilidad nutricional. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que los cambios de aminoácidos en estas Ppks mutantes hacen que las enzimas se vean afectadas en la interacción *in vivo* de Ppk con factores que activan la función quinasa (Rudat *et al.*, 2018).

El hecho de que la Ppk recombinante de *Lc. paracasei* pueda sintetizar poli-P *in vitro* sugiere que la falta de actividad *in vivo* de Ppk en ausencia de Ppx1 puede deberse a algún mecanismo de regulación estricta que sólo se alivia en presencia de Ppx1. Una hipótesis de trabajo para explicar el fenotipo de la inactivación de *ppx1* en *Lc. paracasei* sería que, *in vivo*, la activación de Ppk en *Lc. paracasei* requiere una interacción directa con Ppx1 o que Ppx1 participa en la señalización molecular que conduce a la activación de Ppk. La observación de que la inclusión de Ppx1 en reacciones de Ppk *in vitro* mejora la síntesis de poli-P sugiere uno de estos posibles escenarios.

El mecanismo por el que este posible proceso podría operar *in vivo* y la señal o señales a las que respondería son temas de investigación futura. Se sabe poco sobre la ultraestructura de los gránulos donde se acumula el poli-P y donde debería estar asociada la maquinaria para su síntesis. Distintos análisis proteómicos y bioquímicos han identificado varias proteínas unidas a los gránulos de poli-P, como la proteína similar a histonas AlgP de *P. aeruginosa* (Chawla *et al.*, 2022), o proteínas portadoras de dominios *Conserved Histidine α -helical Domain* (CHAD), que interactúan con poli-P, en *Ralstonia eutropha*, *Magnetospirillum gryphiswaldense* y *P. putida* (Tumlirsch and Jendrossek, 2017). También se ha observado que diversas enzimas Ppk están asociadas a gránulos de poli-P en *R. eutropha* (Tumlirsch, Sznajder and Jendrossek, 2015), *Caulobacter crescentus* (Henry and Crosson, 2013) o *P. aeruginosa* (Chawla *et al.*, 2022), aunque la enzima Ppx aún no ha sido identificada en este tipo de análisis (Chawla *et al.*, 2022).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron que, al igual que ocurre en otras bacterias, la síntesis de poli-P en los lactobacilos está estrechamente regulada. También revelaron un fenotipo inesperado para la falta de Ppx1 en *Lc. paracasei*, que es radicalmente diferente del descrito para mutantes *ppx* de *E. coli* o mutantes de otras especies bacterianas en las que se eliminó *ppx1* y/o *ppx2*.

Por otro lado, la regulación de la producción de poli-P puede tener implicaciones en la funcionalidad de muchas cepas probióticas, donde el poli-P puede considerarse un factor funcional con consecuencias en la homeostasis intestinal. Además, la cuestión de cuáles son los mecanismos que controlan la síntesis de poli-P sigue abierta y debería investigarse si se quieren obtener cepas con mayor capacidad para producir este factor probiótico. Por lo tanto, en el siguiente capítulo continuaremos explorando en detalle su síntesis, además estudiaremos cómo el poli-P podría estar involucrado en ciertos procesos celulares en *Lc. paracasei* BL23.

Capítulo 4

Regulación de la síntesis de polifosfato y su impacto en la supervivencia de *Lacticaseibacillus paracasei* BL23

Como se ha mencionado previamente, el poli-P ha sido estudiado por su papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal a nivel probiótico. Sin embargo, también se ha visto que desempeña un papel crucial en varios procesos fisiológicos microbianos, como fuente de energía, reservorio de Pi, protección contra el estrés, plegamiento de proteínas o virulencia, entre otros (apartado 4.3).

Con los resultados del capítulo anterior hemos demostrado que una de las dos exopolifosfatasa de *Lc. paracasei* BL23 es esencial para la síntesis de poli-P ya que, *in vivo*, Ppk es incapaz de producir poli-P sin la presencia de Ppx1. Además, las peculiaridades de la secuencia de aminoácidos de Ppx1 y su falta de actividad enzimática detectable *in vitro* plantean dudas sobre su papel como exopolifosfatasa.

En este capítulo se explora la regulación de la síntesis de poli-P y su posible implicación en la supervivencia de *Lc. paracasei* BL23. Hemos demostrado que la transición a la fase estacionaria y la posible limitación de nutrientes desencadenan la acumulación de poli-P. Además, evaluamos cómo la mutación de un residuo conservado específico en Ppx1 afecta a la acumulación de poli-P en la cepa BL23, y analizamos cómo la variación de los niveles de poli-P influye en la supervivencia bacteriana durante la fase estacionaria. Por último, demostramos que la supresión de un gen *ppk2* identificado en el genoma de *Lc. paracasei* BL23 también afecta negativamente a la supervivencia durante esta fase, lo que sugiere su papel en el metabolismo del poli-P en los lactobacilos.

Metodología

1. Condiciones de cultivo bacteriano

Las cepas de lactobacilos usadas en este estudio (Tabla 12) fueron cultivadas rutinariamente siguiendo las mismas condiciones y los mismos medios de cultivo (MRS/MEI) del Capítulo 1. Se utilizaron células de *E. coli* NZYStar cells [*endA1 hsdR17(r_km_k+) supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F'proA+B+lacIq ΔlacZM15::Tn10(Tc^R)*] (NZYtech) químicamente competentes como huésped para las clonaciones y se cultivaron en medio LB a 37°C bajo agitación. Cuando fue necesario, se añadió eritromicina a 100 µg/ml para *E. coli* y 5 µg/ml para las cepas de *Lc. paracasei*.

Tabla 12. Cepas de *Lactocaseibacillus* y plásmidos usados en este capítulo.

Cepa/plásmido	Características	Referencia
<i>Lc. paracasei</i> BL23	Silvestre	(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lc. paracasei</i> BL379	<i>ppk</i> ::pRV300; Eri ^r	(Alcántara <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lc. paracasei</i> DC405	Δ <i>ppx1</i>	Capítulo 3
<i>Lc. paracasei</i> DC475	<i>ppx2</i> ::pRV300; Eri ^r	Capítulo 3
<i>Lc. paracasei</i> DC493	<i>ppx1</i> (E112A)	Este capítulo
<i>Lc. paracasei</i> DC494	Δ <i>ppk2</i>	Este capítulo
pMGΔ <i>ldh</i>	Derivado de pMG36e; Eri ^r	Gu <i>et al.</i> , 2022
pMG <i>ppx1</i> E112A	Derivado de pMG36e para introducir la mutación <i>ppx1</i> E112A mediante CRISPR-Cas	Este capítulo
pMGΔ <i>ppk2</i>	Derivado de pMG36e para eliminar el gen <i>ppk2</i> mediante CRISPR-Cas	Este capítulo

Eri^r; resistencia a Eritromicina.

2. Construcción de un mutante en el residuo catalítico de Ppx1 (Glu-112) y una cepa deficiente en *ppk2* utilizando el sistema CRISPR-Cas9 endógeno de *Lc. paracasei* BL23.

Para la construcción de las cepas mutantes, nos basamos en el sistema endógeno CRISPR-Cas9 de tipo II presente en la cepa BL23, estudiado y utilizado previamente en la cepa *Lc. paracasei* ATCC 27092 (Gu *et al.*, 2022). Para la edición de los genomas se utilizó un derivado del plásmido pMG36e (Gu *et al.*, 2022), cedido amablemente por el Dr. Jin Zhong de la University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China. El esqueleto de este plásmido se amplificó por PCR con el par de oligonucleótidos pMG_1/pMG_2 (Tabla 13) que amplificaban desde aproximadamente el sitio HindIII hasta el sitio XhoI,

obteniendo así el origen de replicación y el gen de la resistencia a eritromicina. Para las ediciones génicas se utilizó un sgARN y dos brazos homólogos. La secuencia conteniendo un promotor constitutivo (del gen *pgmA* de *Lactobacillus crispatus*) para expresar el sgARN fue sintetizada por GeneArt (Thermo Fisher Scientific) e incluía 30 pb homólogas a la secuencia específica del gen diana en el genoma de *Lc. paracasei* BL23 y la secuencia del gARN de sistema CRISPR-Cas de esta cepa (Figura 54). Los dos brazos homólogos (1000 pb) con las mutaciones deseadas fueron amplificados por PCR a partir del ADN genómico de *Lc. paracasei* BL23 aislado con el *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (Roche Applied Science).

Para realizar la sustitución de nucleótido A>C y generar un cambio de aminoácido del sitio catalítico de Ppx1 se amplificaron del ADN genómico de *Lc. paracasei* BL23 dos brazos homólogos solapantes de 1000 pb cada uno, con las parejas de oligonucleótidos F1REV/ppx1D112A_F y F1FOR/ppx1D112A_R, que introducían la mutación deseada, el cambio del codón codificante del Glu-112 de GAA a GCA (E112A). A su vez, se introdujeron otros cambios, como la creación de un nuevo sitio HindIII y una mutación de la secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*; de 5'-CGAAA-3' a 5'-CTGAA-3') que generaba a su vez un nuevo sitio Acul en la zona, sin afectar a la secuencia de aminoácidos de Ppx1. La secuencia del sgARN sintetizado con las 30 pb homólogas a *ppx1* de *Lc. paracasei* BL23 se amplificó por PCR con la pareja de oligonucleótidos F2FOR/F2REV a partir de la secuencia clonada en un plásmido proporcionada por GeneArt. Para la eliminación de *ppk2*, el sgARN que contenía una secuencia de 30 pb homologas a *ppk2* de *Lc. paracasei* BL23 aguas arriba de la PAM (5'-TGAAA-3'), se amplificó con los oligonucleótidos *crisp-ppk2-F/F2REV* a partir del ADN sintetizado por GeneArt. Los dos brazos homólogos para la reparación fueron amplificados con las parejas de oligonucleótidos *dppk2-F1/dppk2-R1* y *dppk2-F2/dppk2-R2*, los cuales se solapan entre sí, obteniendo un producto con un marco de lectura de *ppk2* que solo conservaba 24 bases del gen en el extremo 3' y la consiguiente eliminación de la secuencia PAM. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo).

Capítulo 4. Metodología

Tabla 13. Oligonucleótidos usados en este capítulo.

Oligonucleótido	Secuencia*	Uso
pMG_1	ATTGCAAAGTCTGAAAACGAAG	Amplificación
pMG_2	TGAATATTTAGATGCGATTC	plásmido
F1REV	<u>AATCGCATCTGAAATATTCATCTGTTGGCGAGATGC</u>	pMG36e
ppx1E112A_F	CTACA AAGCTT ATCAGAAG CAGCCTTCTTCAGAACC CAAGCG	Amplificación del segmento 5' de <i>ppx1</i>
F1FOR	<u>ATGTGAGCTCTTTTCGATCATTGACGATACCG</u>	Amplificación del
ppx1E112A_R	GGCT GCTT CTGATA AAGCTT GTAGTTTTAATG	segmento 3' de <i>ppx1</i>
ppx1-4	GGGTATTACGCAAAGCAATCT	Comprobación clones <i>ppx1</i> (E112A) en <i>Lc. paracasei</i> BL23.
dppk2-F1	<u>GAAAGAAAGTTATGTGAGCTCCGGTCATATTGACC</u> AGCAAG	Amplificación del segmento 5' de <i>ppk2</i>
dppk2-R1	<u>GTCITTTCAAAGCCTCAACAGCAGAAGTTTCAAGGA</u> CATTGTGC	
dppk2-F2	<u>GCACAATGTCCTTGAAACTTCTGCTGTTGAGGCTTT</u> GAAAGAC	Amplificación del segmento 3' de <i>ppk2</i>
dppk2-R2	<u>GAATCGCATCTGAAATATTC</u> ACTGAACGATCCATTG CACC	
crisp-ppk2-F	<u>CTTGCTGGTCAATATGACCGGAGCTCACATAACTTT</u> CTTTCATTAAT	Amplificación del promotor <i>pgmA</i> + sgARN
F2FOR	<u>TGATCGAAAAGAGCTCACATAACTTTCTTTCATTAA</u> AT	
F2REV	<u>TTCGTTTTCAGACTTTGCAATCTAGAAAAAAATGT</u> ATGGCCCA	

Los nucleótidos en negrita corresponden a los cambios introducidos en el gen *ppx1*.

* Subrayadas, se indican las colas añadidas a los cebadores para su ligación mediante ensamblaje Gibson

(a)

GAGCTCACATAACTTTCTTTTCATTAAATTTTTCTTCTAGTATAGCAAGAATAACGTTACAAAATTGAAA
 AAACACGATTTTTTTAGTCTTAACTCTATGAAAAAATTTGTGAAATGTGTAATAATGGATGAAACATT
 GAATTTTAAAT**GCGGAAACTTCACCATGATCGCTTGGGTA**GTCTCAGGTAGATGTCTGAATCAATCTTC
GACATCTACACGTTGAGATCAAACAAAGCTTCGGCTGAGTTTCAATTTTTGAGCCCATGTTGGGCC
ATACATTTTTTTTCTAGA

(b)

GAGCTCACATAACTTTCTTTTCATTAAATTTTTCTTCTAGTATAGCAAGAATAACGTTACAAAATTGAAA
 AAACACGATTTTTTTAGTCTTAACTCTATGAAAAAATTTGTGAAATGTGTAATAATGGATGAAACATT
 GAATTTTAAAT**ATCGGTTTGACGGTAAAGGCAAGTTTGATA**GTCTCAGGTAGATGTCTGAATCAATCTTC
GACATCTACACGTTGAGATCAAACAAAGCTTCGGCTGAGTTTCAATTTTTGAGCCCATGTTGGGCC
ATACATTTTTTTTCTAGA

Figura 54. Fragmentos de DNA sintetizados para expresar los sgARN para la edición por CRISPR-Cas en *Lc. paracasei* BL23. La secuencia del gARN del sistema CRISPR de la cepa BL23 está en negrita. En rojo se muestran los 30 pb homólogos a los genes *ppx1* (a) y *ppk2* (b) genes, respectivamente. El fragmento en 5' al sgARN se corresponde al promotor constitutivo fuerte del gen *pgmA* de *Lactobacillus crispatus*.

Una vez obtenidos todos los fragmentos de PCR, estos fueron purificados y ligados con el kit *GeneArt Gibson Assembly HiFi* (Invitrogen) para la generación tanto del plásmido para mutar *ppx1* (pMGppx1E112A) como para eliminar *ppk2* (pMGΔppk2). Las mezclas de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* NZYStar siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Los clones obtenidos se confirmaron mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos F1REV/F2REV para *ppx1*(E112A) y fragment2-r/dppk2-r2 para Δ*ppk2* usando NZYTaq II ADN polimerasa (NZYtech). Se confirmó también la creación en *ppx1*(E112A) del nuevo sitio HindIII mediante digestión de los productos de PCR amplificados previamente. Una vez comprobados los clones en *E. coli* NZYStar, se aislaron y purificaron los respectivos plásmidos con el *NucleoSpin Plasmid Kit* (Machery-Nagel), se secuenciaron y fueron usados para transformar células electrocompetentes de *Lc. paracasei* BL23 preparadas siguiendo el protocolo descrito previamente (Posno *et al.*, 1991). Las células transformantes fueron sembradas en placas de MRS con eritromicina 5 μg/ml que fueron incubadas a 37 °C por 48 h. La introducción de las mutaciones tras la transformación de los plásmidos se comprobó por PCR en diferentes transformantes de *Lc. paracasei* con oligonucleótidos que hibridaban en el gen diana fuera del fragmento clonado en el plásmido: para *ppx1*(E112A) (ppx1-4/F1FOR) y para Δ*ppk2* (ppk2-F1/ppk2-R2). En el caso de *ppx1*(E112A) se confirmó la introducción de la mutación en el cromosoma por la aparición de un nuevo sitio HindIII como se mencionó anteriormente, mientras que la delección de *ppk2* se evidenció por un fragmento de PCR de menor tamaño comparado con la cepa silvestre. La eficacia de la edición con el sistema CRISPR-Cas endógeno de la cepa BL23 fue superior al 90% en ambos casos. Clones portadores de las mutaciones se cultivaron durante varias generaciones en ausencia de eritromicina para propiciar la pérdida del plásmido. Cepas que habían sido curadas del plásmido fueron seleccionadas por ser sensibles a eritromicina mediante réplica en placas de MRS con y sin eritromicina. Entre los clones sensibles a la

Capítulo 4. Metodología

eritromicina obtenidos se comprobó nuevamente la presencia de las mutaciones por PCR, que fueron posteriormente confirmadas mediante secuenciación. La Figura 55 muestra el sistema CRISPR-Cas de *Lc. paracasei* BL23, un esquema de los plásmidos utilizados y el ejemplo de la construcción del mutante *ppx1*(E112A).

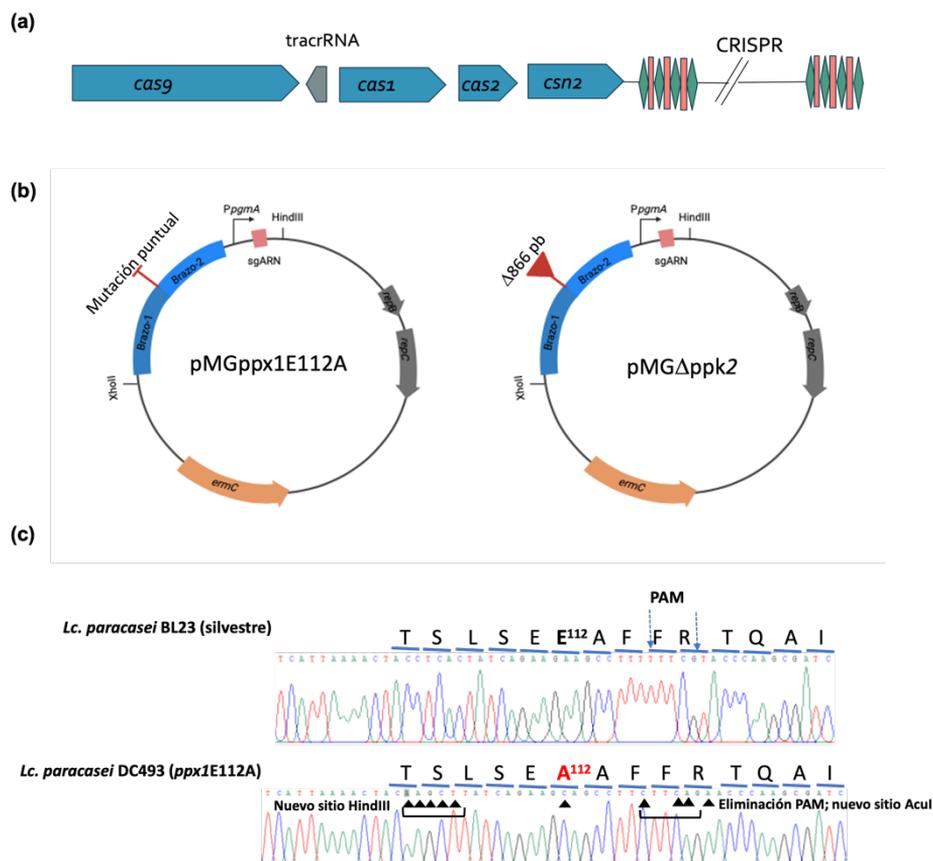


Figura 55. Mutación puntual en el residuo catalítico de Ppx1 (Glu-112) y deleción del gen *ppk2* usando el sistema CRISPR-Cas9 endógeno de tipo II en *L. paracasei* ATCC 27092. (a) Sistema CRISPR-Cas9 endógeno de tipo II en *L. paracasei*. El cual incluye 21 espaciadores (cuadrados rosas) intercalados con repeticiones (rombos verdes). (b) Esquema de los plásmidos para edición; el plásmido original (*pMG36e*) fue amplificado desde el sitio *HindIII* hasta el sitio *XhoI*; *repB* y *repC*, genes de replicación del plásmido; *ermC*, resistencia a eritromicina; brazo 1 y 2 con la mutación puntual o deleción deseada; *PpgmA*, promotor de la fosfoglicerato mutasa de *Lactobacillus crispatus*; los respectivos *sgARN* se muestran en la Figura 54. (c) Resultados de la secuenciación de la cepa silvestre y de la cepa *ppx1*(E112A) con el cambio de nucleótido A>C, la creación del nuevo sitio *HindIII*, la eliminación de la secuencia PAM y nuevo sitio *AcuI*.

3. Acumulación de poli-P en cepas mutantes y silvestre bajo diferentes condiciones del cultivo

Las cepas *Lc. paracasei* BL23 y mutantes derivados se cultivaron toda la noche en medio MRS. Los cultivos se centrifugaron, lavaron con PBS y las suspensiones celulares resultantes se utilizaron para inocular alícuotas de medio MEI ($DO_{595\text{ nm}}$ inicial de 0.1). Estos cultivos se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugaron durante 10 min a 4000 $\times g$ y los sedimentos bacterianos resultantes se resuspendieron en medio de cultivo con diferentes condiciones: MEI sin triptona pH 5.9; MEI sin extracto de levadura pH 5.9 y MEI sin extracto levadura y sin triptona pH 5.9. Este pH correspondía al pH alcanzado por los cultivos tras 3h de crecimiento. También se evaluó el efecto de diferentes antibióticos, resuspendiendo las células en MEI con ciprofloxacina 64 ng/ml, rifampicina 4 $\mu\text{g/ml}$, cloranfenicol 4 $\mu\text{g/ml}$, ampicilina 4 $\mu\text{g/ml}$ o mupirocina 50 $\mu\text{g/ml}$. Como referencia se utilizó un cultivo que fue resuspendido en medio MEI a pH 5.9. Para las diferentes concentraciones de antibiótico se confirmó que a estas concentraciones las cepas eran capaces de crecer, además de verificar su viabilidad por citometría de flujo utilizando el *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* de Invitrogen. Una vez realizado el cambio de medio de cultivo, las bacterias se incubaron durante 2 horas adicionales. Transcurrido el tiempo se recogieron por centrifugación (10 min a 4000 $\times g$) y se aisló y se cuantificó el poli-P siguiendo el protocolo mencionado anteriormente en la metodología del Capítulo 3.

5. Determinación de la viabilidad

Para determinar la evolución de la viabilidad a lo largo del tiempo, se muestrearon cultivos de las diferentes cepas en medio MEI transcurridas 16h, 24h y 48h de incubación a 37 °C. Las bacterias fueron preparadas según las instrucciones dadas por el kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit*. Se centrifugó 1 ml de cultivo durante 2 min a 12000 $\times g$, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de solución NaCl 0.9% y se centrifugaron nuevamente (2 min a 12000 $\times g$). Se hicieron las diluciones adecuadas para tener aproximadamente 1×10^6 células/ml y se tiñeron 200 μl de cada muestra con 0.6 μl de la solución A+B del kit. Las suspensiones celulares se incubaron durante 15 min a 37 °C antes de ser medidas por citometría de flujo (MACSQuant Analyzer 16 de Miltenyi Biotec) con un láser de excitación de 488 nm (50 mW) y detectores de emisión 525/50 nm para SYTO 9 (fluorescencia verde/células vivas) y 615/20 nm para yoduro de propidio (fluorescencia roja/células muertas). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados se analizaron con el programa MACSQuantify. Para calibrar las medidas, se mezclaron diferentes proporciones de suspensiones bacterianas vivas o muertas. Una suspensión bacteriana de células de la cepa BL23 incubada durante 20 min a 80°C definió un 100% de células muertas. El análisis de las mezclas de poblaciones comparando el gráfico log-integrado de fluorescencia verde frente a fluorescencia roja mostró que las poblaciones bacterianas se distribuían en tres poblaciones (células vivas, células muertas y una población menor de viabilidad indeterminada) y el número de

Capítulo 4. Metodología

bacterias encontradas dentro de estas regiones se utilizó para estimar el porcentaje de organismos viables en las poblaciones.

6. Supervivencia bajo diferentes condiciones de estrés

Para estudiar la posible asociación del poli-P con la resistencia a distintos tipos de estrés, se tomaron cultivos de 16 h en medio MEI de la cepa silvestre *Lc. paracasei* BL23 y de la cepa Δppk , incapaz de sintetizar poli-P. Estos cultivos fueron centrifugados y resuspendidos en solución salina hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/ml. Luego, se expusieron a diferentes tipos de estrés (pH 3.5 y 55 °C), durante distintos periodos de tiempo (15 min; 30 min; 45 min; 1h). Cinco μ l de diluciones de las alícuotas tomadas a estos tiempos se colocaron en placas de medio MRS que fueron incubadas a 37 °C durante 48h.

7. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett y la prueba de la t de Student implementadas en GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$.

Resultados

1. *Lc. paracasei* acumula poli-P durante la entrada en la fase estacionaria.

En el capítulo anterior observamos que *Lc. paracasei* BL23 acumulaba poli-P en respuesta a la disponibilidad de Pi presente en el medio de cultivo, con cantidades variables detectadas en diferentes puntos de muestreo (células en fase exponencial tardía y células en fase estacionaria). La medición de los niveles de poli-P a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 56) reveló una acumulación mínima durante las primeras horas de crecimiento, seguida de un aumento constante a lo largo de la fase de crecimiento, que alcanzó su máximo al inicio de la fase estacionaria. Posteriormente, los niveles de poli-P disminuyeron rápidamente, volviendo a los niveles iniciales observados al comienzo del crecimiento.

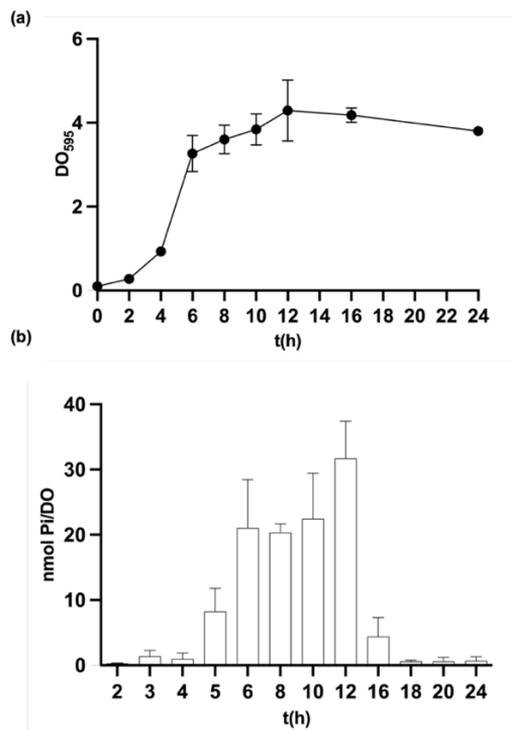


Figura 56. Síntesis de Poli-P en *Lc. paracasei*. (a) curva de crecimiento de la cepa BL23 en medio MEI. (b) Cantidades de poli-P extraídas de células recogidas a diferentes tiempos de incubación. Los datos se han normalizado con la DO del cultivo.

2.El poli-P se acumula como respuesta a la falta de nutrientes

Realizamos una serie de experimentos en los que los cultivos se transfirieron a diferentes condiciones de crecimiento, imitando el agotamiento de nutrientes, y se cuantificaron los niveles de poli-P tras dos horas de incubación. La Figura 57a muestra que la transferencia de células en crecimiento a un medio MEI carente de extracto de levadura, triptona o ambos, produjo un aumento de los niveles de poli-P (de 2 a 3 veces), en comparación con las células transferidas a un medio MEI completo. Del mismo modo, la exposición de las células en crecimiento a diversos antibióticos afectó a los niveles de poli-P. El cloranfenicol, un antibiótico que bloquea la síntesis proteica, mostró el efecto más pronunciado con un aumento de 3 veces en poli-P. En cambio, la ciprofloxacina (síntesis de ADN), la rifampicina (síntesis de ARN) y la ampicilina (síntesis de la pared celular) tuvieron efectos menores; de hecho, esta última provocó una disminución de los niveles de poli-P (Figura 57b).

Estos resultados sugieren que el agotamiento de nutrientes desencadena la acumulación de poli-P. El observar que el cloranfenicol también inducía la acumulación de poli-P nos llevó a investigar si pudiese existir una conexión entre la respuesta estricta y la síntesis de poli-P como en otros organismos (Albi and Serrano, 2016). Para investigar esto más a fondo, medimos los niveles de poli-P tras la exposición a la mupirocina, un antibiótico que induce una deficiencia de ARNt-Leu cargado (Hughes and Mellows, 1980), imitando la falta de aminoácidos. En estas condiciones, los niveles de poli-P fueron elevados en comparación con las células no tratadas, proporcionando pruebas adicionales de la conexión entre la respuesta estricta y el inicio de la síntesis de poli-P (Figura 57b).

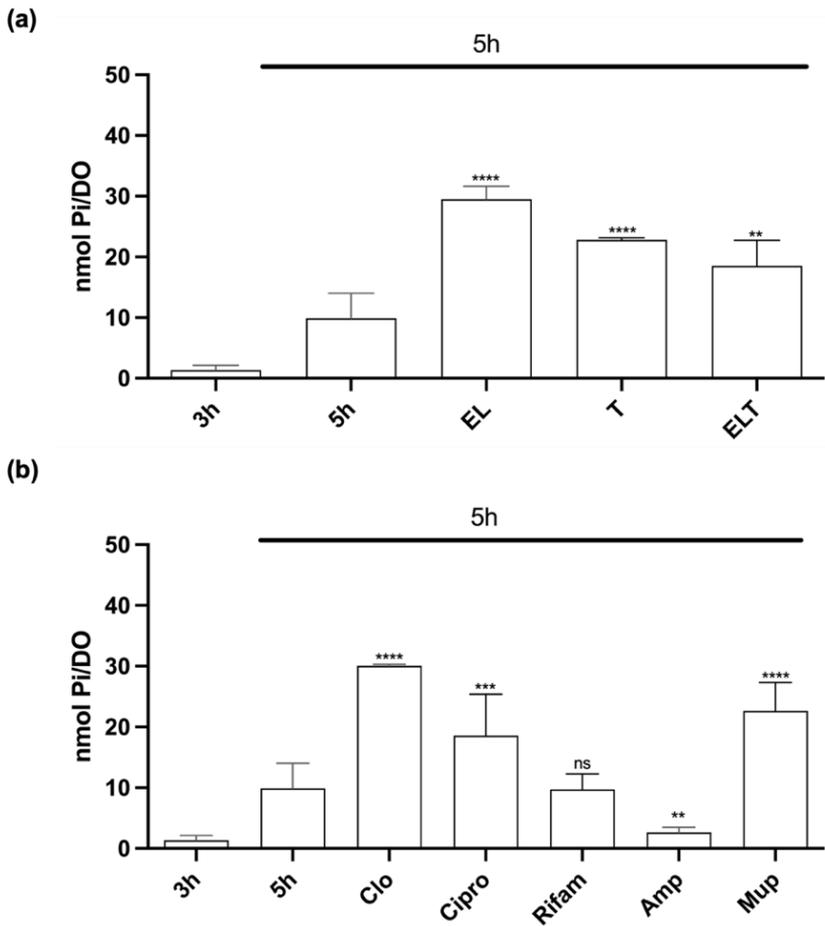


Figura 57. Cantidad de Poli-P en *Lc. paracasei* en experimentos de transferencia. Las células se cultivaron durante 3h en medio MEI y se transfirieron a diferentes condiciones de cultivo. (a) medio MEI completo (5h), MEI sin extracto de levadura (EL); MEI sin triptona (T) o MEI sin extracto de levadura y triptona (ELT). (b) MEI con diferentes antibióticos; medio MEI sin antibiótico (5h), Clo, cloranfenicol; Cipro, ciprofloxacino; Amp, ampicilina; Rifam, Rifampicina; Mup, mupirocina. Tras la transferencia, las células se incubaron durante 2 h más, para un total de 5h. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns, no significativo, en relación con las bacterias transferidas a MEI completo (5h).

3.Una mutación en Glu-112 en la exopolifosfatasa Ppx1 resulta en una mayor acumulación de poli-P.

En la familia *Lactobacillaceae*, el gen que codifica la Ppx1 (*ppx1*) precede al gen que codifica la Ppk. En los análisis llevados a cabo en Capítulo 3, no se detectó actividad polifosfatasa *in vitro* de la enzima Ppx1 de *Lc. paracasei* BL23. Además, se observó que las enzimas Ppx1 codificadas por especies de *Lactobacillaceae* presentan cambios de

Capítulo 4. Resultados

aminoácidos en posiciones críticas esenciales para la actividad exopolifosfatasa. Para explorar el papel de los aminoácidos conservados en la Ppx1 en los niveles de poli-P, diseñamos una cepa de *Lc. paracasei* en la que el Glu-112 se sustituyó por Ala en la enzima Ppx1. Sorprendentemente, la cepa que expresaba la proteína mutante Ppx1E112A mostró un aumento de 4 veces en los niveles de poli-P en comparación con la cepa silvestre (Figura 58). En experimentos de transferencia, el cambio de cultivos de la cepa mutante *ppx1E112A* a condiciones que imitaban el agotamiento de nutrientes (falta de extracto de levadura, tratamiento con antibiótico) no promovió una mayor acumulación de poli-P, como se observó en la cepa silvestre (Figura 59).

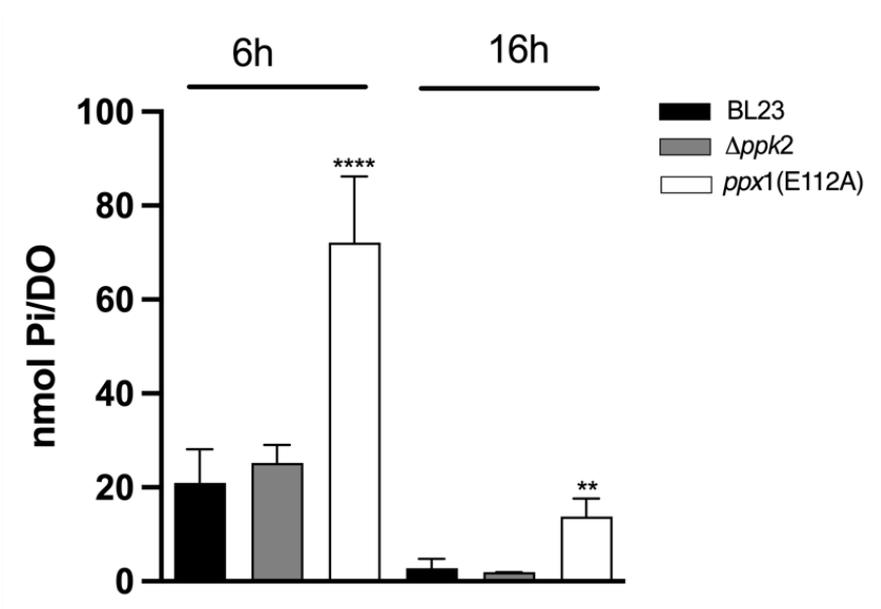


Figura 58. Cantidades de poli-P en diferentes cepas de *Lc. paracasei*. Las células se cultivaron en medio MEI durante 6 y 16 h; se extrajo y cuantificó el poli-P. **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$, en comparación con la cepa silvestre para cada tiempo.

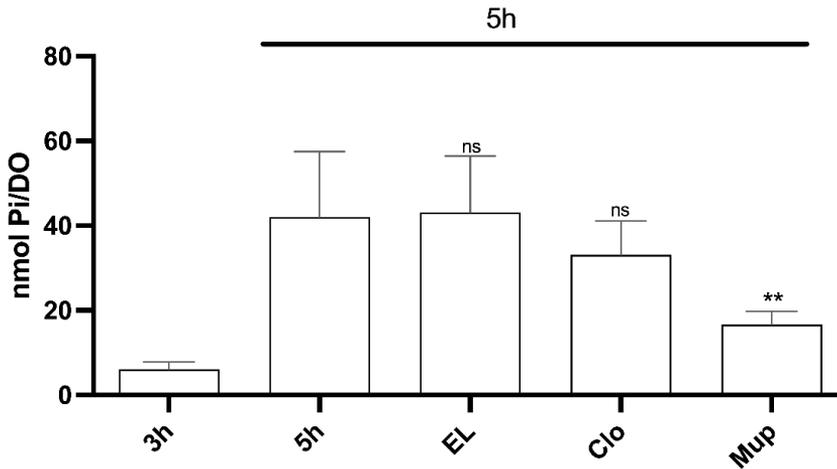


Figura 59. Cantidad de Poli-P en la cepa *Lc. paracasei ppx1E112A* en experimentos de transferencia. Las células se cultivaron durante 3 h en medio MEI y se transfirieron a medio MEI completo (5h), MEI sin extracto de levadura (EL); MEI con cloranfenicol (Clo) o MEI con mupirocina (Mup) y se incubaron durante 2 h más para un total de 5 h. ** $p < 0.01$; ns, no significativo, en relación con las bacterias transferidas a MEI completo (5h).

4. Una poli-P quinasa de tipo Ppk2 de *Lc. paracasei*

La inspección del genoma de *Lc. paracasei* BL23 reveló la presencia de un gen (locus LCABL_12290) que codifica una segunda enzima Ppk perteneciente al tipo Ppk2 (Neville, Roberge and Jia, 2022). De acuerdo con la clasificación de enzimas Ppk2 de Motomura *et al.* (2014) la enzima Ppk2 de *Lc. paracasei* está englobada en la clase III, que se caracteriza por fosforilar ambos nucleósidos mono o difosfatos con poli-P como donante de Pi (Motomura *et al.*, 2014). El gen *ppk2* se eliminó en la cepa BL23, demostrando que su ausencia no tenía ningún efecto aparente sobre la acumulación de poli-P (Figura 58). Estos resultados concuerdan con los observados previamente, en los cuales la inactivación de *ppk* es suficiente para provocar la ausencia total de síntesis de poli-P (Alcántara *et al.*, 2014 y en el Capítulo 3)

5. Efectos de los niveles de poli-P en la supervivencia bacteriana en la fase estacionaria

La síntesis de poli-P se ha asociado a la resistencia a diversas condiciones de estrés en numerosas especies bacterianas. Nuestro estudio demostró que en ausencia de síntesis de poli-P (debido a una mutación en *ppk*), el choque ácido (pH 3.5) o térmico (55 °C) no afectaba significativamente a la viabilidad celular (Figura 60).

Capítulo 4. Resultados

Empleando cepas mutantes *ppk*, $\Delta ppx1$, *ppx2*, *ppx1E112A* y $\Delta ppk2$ investigamos el impacto de diferentes niveles de poli-P en la supervivencia bacteriana durante la fase estacionaria. Las cepas mutantes *ppk* y $\Delta ppx1$, que son incapaces de sintetizar poli-P, mostraron un menor porcentaje de células viables a las 24 y 48 horas de cultivo, en comparación con la cepa silvestre (Figura 61). No se observó ningún cambio aparente en la viabilidad de una cepa mutante *ppx2*, pero, en cambio, la cepa portadora del alelo *ppx1E112A*, que sintetizaba más poli-P, mostró una mayor supervivencia durante la fase estacionaria en comparación con la silvestre. Curiosamente, una cepa defectuosa en *ppk2*, a pesar de su capacidad para sintetizar poli-P, mostró una viabilidad reducida durante la fase estacionaria que fue comparable a la encontrada en las cepas *ppk* o $\Delta ppx1$ que carecían de poli-P.

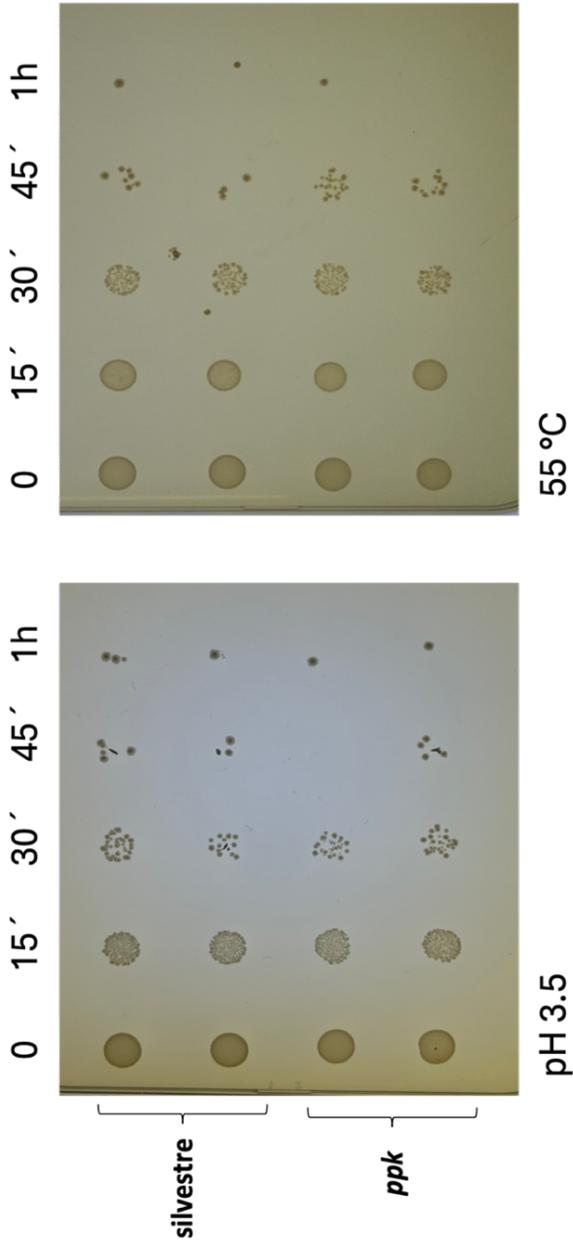


Figura 60. Supervivencia de células de *Lc. paracasei* a estrés por pH y temperatura. Se cultivaron células de la cepa silvestre y de la cepa Δppk durante 16 horas en medio MIEI, se resuspendieron en solución salina hasta 10^6 UFC/ml y se expusieron a pH 3,5 o 55 °C durante distintos tiempos. Se colocaron 5 μ l de las suspensiones bacterianas en agar MRS a 37 °C por 48h.

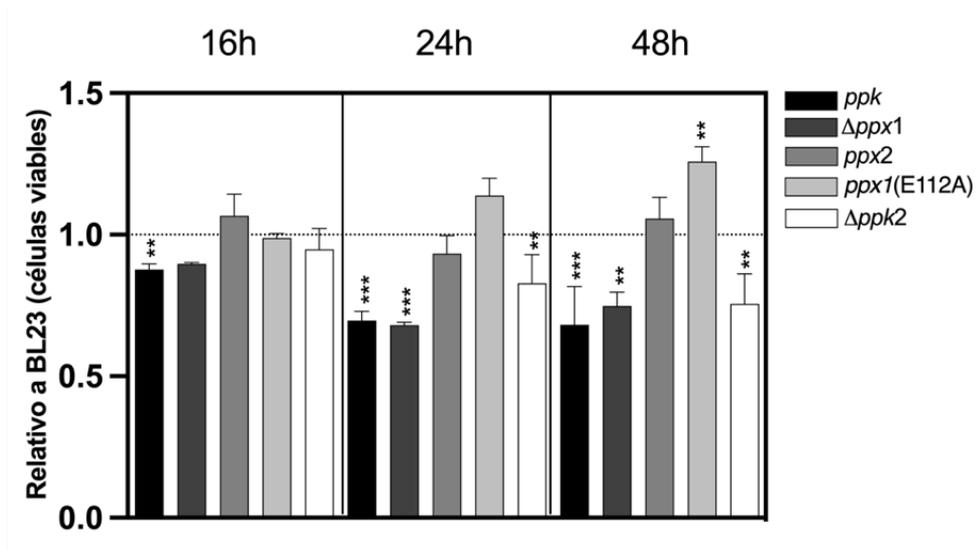


Figura 61. Supervivencia de diferentes cepas de *Lc. paracasei* durante la fase estacionaria. Las células se cultivaron en medio MEI y la cantidad de células vivas se determinó a las 16, 24 y 48 h mediante citometría de flujo utilizando el kit *LIVE/DEAD™*. El porcentaje de células vivas de la cepa silvestre BL23 se fijó en 1 a cada tiempo para la comparación. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, en relación con la cepa silvestre BL23.

Discusión

Los primeros estudios sobre la síntesis de poli-P en varios microorganismos modelo revelaron que la acumulación de poli-P suele ser un fenómeno transitorio que se inicia tras un descenso nutricional (Ault-Riché *et al.*, 1998). En nuestros resultados, tanto en este capítulo como en el anterior, hemos observado un patrón similar en *Lc. paracasei*, donde el poli-P se acumuló al inicio de la fase estacionaria. Adicional a esto, en este capítulo pudimos corroborar que la reducción nutricional o las condiciones que la imitan (por ejemplo, la exposición al cloranfenicol o a la mupirocina) provocan un aumento de la acumulación de poli-P en esta especie.

Como se ha mencionado previamente en esta tesis, se creía que los niveles intracelulares de poli-P eran controlados por las actividades opuestas de las enzimas Ppk y Ppx [la cual era inhibida por (p)ppGpp] (Kuroda *et al.*, 1997). No obstante, el modelo que relacionaba la acumulación de poli-P con la respuesta estricta, mediante los efectos inhibidores de la alarmona (p)ppGpp sobre la Ppx, ha sido recientemente cuestionado (Downey, 2019). Por lo tanto, los mecanismos que desencadenan la acumulación de poli-P aún no están claros. Además, generalizar ciertos aspectos de la dinámica del poli-P basándose en *E. coli* presenta limitaciones, dado que otras bacterias pueden presentar diferencias en el número y la función de las enzimas Ppk y Ppx.

Las cepas de *E. coli* con mutaciones específicas en *ppk* que conducen a niveles significativamente más altos de poli-P, siguen mostrando un aumento de la síntesis de poli-P después de una reducción nutricional (Rudat *et al.*, 2018). Análisis bioquímicos recientes de estas Ppks mutantes revelaron que algunas, a pesar de tener actividades específicas idénticas a las de la enzima silvestre, eran más resistentes a los efectos inhibidores del ADP sobre su actividad quinasa (Bowlin *et al.*, 2024). Este hallazgo explicaría el aumento de los niveles de poli-P en las cepas portadoras de estos alelos mutantes *ppk*, pero aún deja sin respuesta la cuestión de cuál es la señal o señales que provocan la síntesis de poli-P.

Los análisis filogenéticos realizados en el Capítulo 3 de las Ppx revelaron que las enzimas Ppx1 de las *Lactobacillaceae* forman un grupo diferenciado junto con otras Ppx de miembros de las clases Clostridia y Negativicutes. Estas enzimas comparten características que las separan de las Ppx clásicas y cuestionan su función catalítica, ya que acumulan diferentes cambios en aminoácidos que se han descrito como críticos para la actividad exopolifosfatasa (Song *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el Capítulo 3 se observó que la Ppx1 de *Lc. paracasei* BL23 presentaba P-loops degenerados, que en las enzimas Ppx son los responsables de unir el poli-P, y carecía de uno de los dos aminoácidos catalíticos (Arg en la posición 93 en la Ppx de *E. coli*). No obstante, el residuo catalítico Glu, que está ausente en algunas Ppx1 de las *Lactobacillaceae*, estaba presente en la enzima de *Lc. paracasei* (Glu-112). Paradójicamente, los resultados obtenidos en

Capítulo 4. Discusión

el capítulo anterior mostraron que la supresión de *ppx1*, sin afectar a la expresión de *ppk*, resultó en la ausencia de síntesis de poli-P, al igual que el efecto observado en la cepa Δppk . Esto nos llevó a postular que Ppx1 podría participar en la señalización que conduce a la activación de Ppk.

La mutación del residuo Glu-112 por Ala en Ppx1 dio lugar a un aumento de los niveles de poli-P. Aunque es necesario investigar si este resultado se debe a que la proteína mutante Ppx1E112A ha perdido el control hipotético ejercido sobre la actividad Ppk y esta enzima está desregulada, o simplemente se debe a que Ppx1 desempeña una actividad de hidrólisis de poli-P *in vivo* que se vio afectada por este cambio de aminoácido. Es importante mencionar que, en muchas bacterias, la inactivación de genes *ppx* no conduce a aumentos significativos en las cantidades de poli-P (Malde *et al.*, 2014; Rudat *et al.*, 2018), lo que sugiere que Ppx puede simplemente controlar los niveles de poli-P una vez que su síntesis por Ppk ha sido activada (Rudat *et al.*, 2018). En varias especies de *Lactobacillaceae* el clúster de genes *ppx-ppk* codifica una segunda enzima Ppx (Ppx2) que muestra una conservación completa de aminoácidos en posiciones claves típicas de la Ppx catalíticamente activa. Sin embargo, los resultados obtenidos en el capítulo anterior mostraron que la interrupción de *ppx2* en *Lc. paracasei* BL23 no tuvo un impacto aparente en la acumulación de poli-P.

Entre las diversas funciones atribuidas al poli-P, se ha asociado su acumulación con la resistencia bacteriana a varios tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo y el estrés debido a pH ácido, así como con la supervivencia bacteriana en la fase estacionaria (Kornberg, Rao and Ault-Riché, 1999; Rao, N.N and Kornberg, A. 1999). Resultados obtenidos previamente en el laboratorio demostraron que una cepa Δppk de *Lc. paracasei* era menos resistente a los productos químicos generadores de radicales libres y mostraba un menor crecimiento bajo un pH ácido (Alcántara *et al.*, 2014). En este capítulo demostramos que la acumulación de poli-P no afectaba a la supervivencia tras la exposición a estrés por temperatura o por ácido. No obstante, los niveles de poli-P afectan claramente a la supervivencia durante la fase estacionaria, como se evidenció por la disminución y aumento de la viabilidad en las mutaciones *ppk* y *ppx1E112A*, que resultan en ausencia o aumento de poli-P, respectivamente. Los mecanismos detrás de esto aún no se comprenden completamente, pero se ha sugerido que el poli-P podría servir como una molécula de almacenamiento de energía que puede utilizarse en estas condiciones (Achbergerová and Nahálka, 2011).

Lc. paracasei codifica una enzima Ppk2 perteneciente a la clase III, que estaría implicada en la síntesis de ADP/ATP y GDP/GTP a partir de AMP/ADP y GMP/GDP, respectivamente, utilizando poli-P (Motomura *et al.*, 2014). Esta clase parece ser la Ppk2 predominante en los lactobacilos, ya que también se ha identificado en *Lv. brevis* y *Lm. reuteri* (Motomura *et al.*, 2014). Sin embargo, otros lactobacilos, como *Lp. plantarum* o *Lactobacillus delbrueckii* carecen de Ppk2 y sólo tienen Ppk (Rao, Gómez-García and Kornberg, 2009). La función de las enzimas Ppk2 en bacterias no ha recibido el mismo interés que la Ppk.

En algunos microorganismos, la mutación de *ppk2* se ha relacionado con una reducción de la virulencia, así como con una disminución de la supervivencia en fase estacionaria (Ishige, Zhang and Kornberg, 2002; Neville *et al.*, 2021; Neville, Roberge and Jia, 2022). Las enzimas Ppk2 se han estudiado más exhaustivamente en *P. aeruginosa*, que además de Ppk posee tres Ppk2. La expresión de la enzima Ppk2A de *P. aeruginosa* fue inducida 100 veces durante la fase estacionaria (Ishige, Zhang and Kornberg, 2002) y las cepas carentes de *ppk* y de los otros dos genes *ppk2* siguen siendo capaces de sintetizar poli-P debido a la actividad de Ppk2A (Racki *et al.*, 2017). La sobreexpresión de Ppk2C en *R. eutropha*, una de las cinco Ppk2 codificadas por este microorganismo, también indujo la formación de gránulos de poli-P en una cepa que carecía de todas las enzimas Ppk (Hildenbrand, Reinhardt and Jendrossek, 2019). De forma similar, se ha planteado la hipótesis de que el gen *ppk2* de *Lm. reuteri* es responsable de la reducción de sólo el 50% en la síntesis de poli-P tras la mutación de *ppk* (Pokhrel *et al.*, 2019). Sin embargo, el gen *ppk2* de *Lc. paracasei* BL23 no parece desempeñar ningún papel en la síntesis de poli-P, ya que la inactivación de *ppk* abolió por completo la síntesis del polímero en esta cepa y la de *ppk2* no afectó a la síntesis de poli-P.

De forma similar al mutante *ppk2* de *Lc. paracasei*, una cepa de *C. jejuni* que carece de *ppk2* mostró una menor supervivencia durante la privación de nutrientes en la fase estacionaria (Gangaiah *et al.*, 2010) y los mutantes *ppk2* de *Mycobacterium smegmatis* también fueron sensibles a varias condiciones de estrés (Sureka *et al.*, 2009). Aunque la actividad sintetizadora de nucleósidos fosfato de la enzima Ppk2 de *Lc. paracasei* todavía necesita ser confirmada experimentalmente, el hecho de que un mutante *ppk2* mostrara una supervivencia reducida en la fase estacionaria es consistente con el papel de Ppk2 en la modulación de las reservas de nucleótidos a partir del poli-P acumulado en esa fase.

Conclusiones

Los resultados obtenidos aquí sugieren que la acumulación e hidrólisis de poli-P en *Lc. paracasei* pueden formar parte de procesos complejos, que abren varias áreas de interés para futuras investigaciones. Aunque se ha identificado que la reducción de nutrientes induce la síntesis de poli-P, es necesario explorar cómo esta señal podría estar interactuando con otras vías de regulación para entender mejor el papel del poli-P en la adaptación a condiciones adversas. Igualmente, es importante determinar la relación entre la respuesta estricta mediada por (p)ppGpp, así como la función de los genes responsables de su síntesis/hidrólisis (*relA* y *spoT*), en la acumulación de poli-P en *Lc. paracasei*.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que Ppx1 es necesaria para la producción *in vivo* de poli-P y el análisis de la secuencia y los ensayos de actividad *in vitro* sugieren que podría no funcionar como una exopolifosfatasa. No obstante, una mutación en su residuo Glu-112 incrementa la formación de poli-P, lo que indica una función reguladora o catalítica para este residuo de la proteína. Por lo tanto, sería útil realizar estudios adicionales para determinar la función precisa del Glu-112 y ver cómo contribuye a la actividad de Ppx1. Finalmente, es necesario investigar más a fondo la función exacta del poli-P en el mantenimiento de la viabilidad bacteriana durante la fase estacionaria y la posible implicación de Ppk2 en este proceso.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en la presente tesis han dado lugar a las siguientes conclusiones.

- La capacidad de captación de As(V) de *Lp. plantarum* está asociada al transporte de Pi y no a una retención celular inespecífica como ocurre con otros metales, como el mercurio. El transportador PstSCAB se encuentra ampliamente distribuido en los lactobacilos, por lo que podría ser un importante sistema de captación de Pi en este grupo bacteriano.
- La inactivación de *phoP* en *Lc. paracasei* BL23 aumenta la resistencia a As(III) y genera efectos pleiotrópicos significativos, evidenciados por cambios sustanciales en el transcriptoma. Se ha demostrado que los operones *pst*, *phn* y el gen *glnA* forman parte del regulón PHO de *Lc. paracasei*.
- El fenotipo de resistencia a As(III) observado en la cepa Δ *phoP* se debe a la disminución en la expresión del gen *ackA* en este mutante.
- La síntesis y degradación de poli-P en *Lc. paracasei* BL23 están estrechamente relacionadas con la fase de crecimiento y la disponibilidad de Pi en el medio. La regulación de los niveles de poli-P desempeña un papel relevante en la supervivencia durante la fase estacionaria, como lo demuestran los cambios en la viabilidad inducidos por las mutaciones *ppk* y *ppx1E112A*, las cuales provocan la ausencia o el aumento de poli-P, respectivamente
- La enzima Ppx1 de *Lc. paracasei* BL23 presenta mutaciones en aminoácidos claves que han sido identificados en las enzimas Ppx como cruciales para la actividad catalítica exopolifosfatasa. Además, Ppx1 es necesaria para la síntesis *in vivo* de poli-P, ya sea a través de su interacción directa con la polifosfato quinasa 1 o participando en alguna vía de señalización molecular que activa a esta enzima. Por otro lado, la proteína Ppx2 recombinante mostró actividad *in vitro* sobre el poli-P de *Lc. paracasei*, lo que confirma su función como exopolifosfatasa.
- La acumulación de poli-P en respuesta a la escasez de nutrientes, especialmente a la carencia de aminoácidos imitada por la exposición a la mupirocina, sugiere una conexión entre la respuesta estricta y la síntesis de poli-P.
- La mutación en el residuo Glu-112 de Ppx1 resulta en un incremento en la síntesis de poli-P, lo que sugiere que este residuo desempeña un papel crítico

Conclusiones generales

en la actividad de la proteína Ppx1 como reguladora de la actividad de la polifosfato quinasa.

- La inactivación de *ppk2* no tuvo ningún efecto sobre los niveles de poli-P, indicando que Ppk2 no juega un papel directo en su síntesis. Sin embargo, la supervivencia reducida en la fase estacionaria observada indica que Ppk2 podría estar implicada en la modulación de las reservas de nucleótidos a partir del poli-P acumulado.

Referencias bibliográficas

- Abdul Hakim, B. N., Xuan, N. J., & Oslan, S. N. H. (2023). A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(15),2850. <https://doi.org/10.3390/foods12152850>
- Achbergerová, L., & Nahálka, J. (2011). Polyphosphate--an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial cell factories*, 10,63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-63>
- Akiyama, M., Crooke, E., & Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*: The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1),633–639. [https://doi.org/10.1016/s00219258\(18\)54198-3](https://doi.org/10.1016/s00219258(18)54198-3)
- Akiyama, M., Crookes, E., & Kornberg, A. (1992). The Polyphosphate Kinase Gene of *Escherichia coli* isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein*. *Journal of Biological Chemistry*. 267(31), 22556–22561.
- Albi, T., & Serrano, A. (2014). Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* TLS. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 9), 2067–2078. <https://doi.org/10.1099/mic.0.080952-0>
- Albi, T., & Serrano, A. (2015). Two strictly polyphosphate-dependent gluco(manno)kinases from diazotrophic Cyanobacteria with potential to phosphorylate hexoses from polyphosphates. *Applied Microbiology and biotechnology*, 99(9),3887–3900. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6184-7>
- Albi, T., & Serrano, A. (2016). Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32(2),27. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1983-2>
- Alcántara, C., & Zúñiga, M. (2012). Proteomic and transcriptomic analysis of the response to bile stress of *Lactobacillus casei* BL23. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 5), 1206–1218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055657-0>
- Alcántara, C., Bäuerl, C., Revilla-Guarinos, A., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., & Zúñiga, M. (2016). Peptide and amino acid metabolism is controlled by an OmpR-family response regulator in *Lactobacillus casei*. *Molecular Microbiology*, 100(1),25–41. <https://doi.org/10.1111/mmi.13299>
- Alcántara, C., Blasco, A., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2014). Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus spp.* and its involvement in stress resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1650–1659. <https://doi.org/10.1128/AEM.03997-13>
- Alcántara, C., Coll-Marqués, J. M., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2018). Polyphosphate in *Lactobacillus* and its link to stress tolerance and probiotic properties. *Frontiers in Microbiology*, 9,1944. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01944>
- Alcántara, C., Perez, M., Huedo, P., Altadill, T., Espadaler-Mazo, J., Arqués, J. L., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2023). Study of the biosynthesis and functionality of polyphosphate in *Bifidobacterium longum* KABP042. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38082-0>
- Alcántara, C., Revilla-Guarinos, A., & Zúñiga, M. (2011). Influence of two-component signal transduction systems of *Lactobacillus casei* BL23 on tolerance to stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1516–1519. <https://doi.org/10.1128/AEM.02176-10>
- Allenby, N. E., O'Connor, N., Prágai, Z., Ward, A. C., Wipat, A., & Harwood, C. R. (2005).

Referencias bibliográficas

Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 8063–8080.

<https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8063-8080.2005>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Alvarado, J., Ghosh, A., Janovitz, T., Jauregui, A., Hasson, M. S., & Sanders, D. A. (2006). Origin of exopolyphosphatase processivity: Fusion of an ASKHA phosphotransferase and a cyclic nucleotide phosphodiesterase homolog. *Structure (London, England : 1993)*, 14(8), 1263–1272.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2006.06.009>

Alvarez-Martin, P., Fernández, M., O'Connell-Motherway, M., O'Connell, K. J., Sauvageot, N., Fitzgerald, G. F., MacSharry, J., Zomer, A., & van Sinderen, D. (2012). A conserved two-component signal transduction system controls the response to phosphate starvation in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5258–5269.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00804-12>

Amemura, M., Makino, K., Shinagawa, H., Kobayashi, A., & Nakata, A. (1985). Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 184(2), 241–250.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90377-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90377-8)

Aravind, L., & Koonin, E. V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(12), 469–472.

[https://doi.org/10.1016/s09680004\(98\)01293-6](https://doi.org/10.1016/s09680004(98)01293-6)

-6

Aschar-Sobbi, R., Abramov, A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J., & Pavlov, E. (2008). High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of Fluorescence*, 18(5), 859–866.

<https://doi.org/10.1007/s10895-008-0315-4>

Atalla, A., & Schumann, W. (2003). The pst operon of *Bacillus subtilis* is specifically induced by alkali stress. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 5019–5022.

<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.5019-5022.2003>

Aukrust, T., & Blom, H. (1992). Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International*, 25, 253–261.

[https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90121-K](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90121-K)

Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., & Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1841–1847.

<https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1841-1847.1998>

Bachhawat, P., Swapna, G. V., Montelione, G. T., & Stock, A. M. (2005). Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure (London, England : 1993)*, 13(9), 1353–1363.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2005.06.006>

Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., & Sadeghi, M. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 643972.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>

Bange, G., Brodersen, D. E., Liuzzi, A., & Steinchen, W. (2021). Two P or Not Two P: Understanding Regulation by the Bacterial Second Messengers (p)ppGpp. *Annual Review*

- of *Microbiology*, 75,383–406.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-042621-122343>
- Basu Thakur, P., Long, A. R., Nelson, B. J., Kumar, R., Rosenberg, A. F., & Gray, M. J. (2019). Complex Responses to Hydrogen Peroxide and Hypochlorous Acid by the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri*. *MSystems*, 4(5),e00453-19.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00453-19>
- Beassoni, P. R., Gallarato, L. A., Boetsch, C., Garrido, M. N., & Lisa, A. T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* Exopolyphosphatase Is Also a Polyphosphate: ADPPHosphotransferase. *Enzyme Research*, 2015,404607.
<https://doi.org/10.1155/2015/404607>
- Bekker, M., Teixeira de Mattos, M. J., & Hellingwerf, K. J. (2006). The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Science Progress*, 89(Pt3-4),213–242.
<https://doi.org/10.3184/003685006783238308>
- Bisanz, J. E., Enos, M. K., Mwanga, J. R., Chungalucha, J., Burton, J. P., Gloor, G. B., & Reid, G. (2014). Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *MBio*, 5(5),e01580-14.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01580-14>
- Blanco, A. G., Sola, M., Gomis-Rüth, F. X., & Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (London, England:1993)*, 10(5),701–713.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00761-x](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00761-x)
- Bolesch, D. G., & Keasling, J. D. (2000). Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33814–33819.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002039200>
- Bowlin, M. Q., & Gray, M. J. (2021). Inorganic polyphosphate in host and microbe biology. *Trends in Microbiology*, 29(11), 1013–1023.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.002>
- Bowlin, M. Q., Lieber, A. D., Long, A. R., & Gray, M. J. (2024). C-terminal Poly-histidine Tags Alter *Escherichia coli* Polyphosphate Kinase Activity and Susceptibility to Inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 436(16).
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168651>
- Brouwer, S., Rivera-Hernandez, T., Curren, B. F., Harbison-Price, N., De Oliveira, D. M. P., Jespersen, M. G., Davies, M. R., & Walker, M. J. (2023). Pathogenesis, epidemiology and control of Group A *Streptococcus* infection. *Nature Reviews.Microbiology*, 21(7),431–447.
<https://doi.org/10.1038/s41579-023-00865-7>
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019). Two-Component Sensing and Regulation: How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level?. *Annual Review of Microbiology*, 73, 507–528.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Carmany, D. O., Hollingsworth, K., & McCleary, W. R. (2003). Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1112–1115.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1112-1115.2003>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370.
<https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Castresana J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use

Referencias bibliográficas

- in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4),540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molb.ev.a026334>
- Chan, F. Y., & Torriani, A. (1996). PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *Journal of Bacteriology*, 178(13),3974–3977. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3974-3977.1996>
- Chawla, R., Klupt, S., Patsalo, V., Williamson, J. R., & Racki, L. R. (2022). The Histone H1-Like Protein AlgP Facilitates Even Spacing of Polyphosphate Granules in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*,13(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.02463-21>
- Chekabab, S. M., Harel, J., & Dozois, C. M. (2014). Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence*, 5(8),786–793. <https://doi.org/10.4161/viru.29307>
- Chen, F., Cao, Y., Wei, S., Li, Y., Li, X., Wang, Q., & Wang, G. (2015). Regulation of arsenite oxidation by the phosphate two-component system PhoBR in *Halomonas* sp. HAL1. *Frontiers in Microbiology*, 6, 923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00923>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chiocchetti, G. M., Jadán-Piedra, C., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2019). Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1534–1545. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421521>
- Choi, M. Y., Wang, Y., Wong, L. L. Y., Lu, B. tai, Chen, W. yang, Huang, J. D., Tanner, J. A., & Watt, R. M. (2012). The two PPX-GppA homologues from *Mycobacterium tuberculosis* have distinct biochemical activities. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042561>
- Chuang, Y. M., Belchis, D. A., & Karakousis, P. C. (2013). The polyphosphate kinase gene *ppk2* is required for *Mycobacterium tuberculosis* inorganic polyphosphate regulation and virulence. *MBio*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00039-13>
- Ciont, C., Epuran, A., Kerezi, A. D., Coldea, T. E., Mudura, E., Pasqualone, A., Zhao, H., Suharoschi, R., Vriesekoop, F., & Pop, O. L. (2022). Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. *Foods(Basel, Switzerland)*, 11(17), 2693. <https://doi.org/10.3390/foods11172693>
- Clemente, M. J., Devesa, V., & Vélez, D. (2017). In Vitro Reduction of Arsenic Bioavailability Using Dietary Strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(19), 3956–3964. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05234>
- Clemente, M. J., Serrano, S., Devesa, V., & Vélez, D. (2021). Arsenic speciation in cooked food and its bioaccessible fraction using X-ray absorption spectroscopy. *Food Chemistry*, 336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127587>
- Clemente, M. J., Vivó, M. de los Á., Puig, S., Zúñiga, M., Monedero, V., Devesa, V., & Vélez, D. (2020). In vitro evaluation of the efficacy of lactobacilli and yeasts in reducing bioavailability of inorganic arsenic. *LWT Food Science and Technology*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109272>
- Correa Deza, M. A., Grillo-Puertas, M., Salva, S., Rapisarda, V. A., Gerez, C. L., & de Valdez, G. F. (2017). Inorganic salts and intracellular polyphosphate inclusions play a role in the thermotolerance of the immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505. *PLoS ONE*, 12(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179242>

Cox, G. B., Webb, D., & Rosenberg, H. (1989). Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1531–1534. <https://doi.org/10.1128/jb.171.3.1531-1534.1989>

Cox, G. B., Webb, D., Godovac-Zimmermann, J., & Rosenberg, H. (1988). Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *Journal of Bacteriology*, 170(5), 2283–2286. <https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2283-2286.1988>

Cullen, W. R., & Reimer, K. J. (1989). Arsenic Speciation in the Environment. *Chemical Reviews*, 89(4)713–76. <https://doi.org/10.1021/cr00094a002>

Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C., & Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 317–364. <https://doi.org/10.1128/membr.00031-07>

De Almeida, L. G., Ortiz, J. H., Schneider, R. P., & Spira, B. (2015). *phoU* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppGpp and polyphosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3006–3015. <https://doi.org/10.1128/AEM.04168-14>

Del Rio, B., Fernandez, M., Redruello, B., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2024). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. *Food chemistry*, 435, 137558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137558>

Devesa, V., Vélez, D., & Montoro, R. (2008). Effect of thermal treatments on arsenic

species contents in food. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1)1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.021>

Devine K. M. (2018). Activation of the PhoPR-Mediated Response to Phosphate Limitation Is Regulated by Wall Teichoic Acid Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2678. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02678>

Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobittg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., Taly, J. F., & Notredame, C. (2011). T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr245>

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Docampo R. (2024). Advances in the cellular biology, biochemistry, and molecular biology of acidocalcisomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 88(1), e0004223. <https://doi.org/10.1128/membr.00042-23>

Domene, A., Orozco, H., Rodríguez-Viso, P., Monedero, V., Zúñiga, M., Vélez, D., & Devesa, V. (2024). *Lactobacillus* strains reduce the toxic effects of a subchronic exposure to arsenite through drinking water. *Environmental Research*, 245, 117989. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117989>

Douglas, G. L., & Klaenhammer, T. R. (2010). Genomic evolution of domesticated microorganisms. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 397–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124134>

Referencias bibliográficas

- Downey, M. (2019). A stringent analysis of polyphosphate dynamics in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 201(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00070-19>
- Du, F., Yang, Z., Liu, P., & Wang, L. (2019). Bioaccessibility and variation of arsenic species in polished rice grains by an in vitro physiologically based extraction test method. *Food Chemistry*, 293, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.079>
- Echols, H., Garen, A., Garen, S., & Torriani, A. (1961). Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 3(4), 425–438. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80055-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80055-7)
- Eder, S., Liu, W., & Hulet, F. M. (1999). Mutational analysis of the *phoD* promoter in *Bacillus subtilis*: implications for PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2017–2025. <https://doi.org/10.1128/JB.181.7.2017-2025.1999>
- Elsanhoty, R. M., Al-Turki, I. A., & Ramadan, M. F. (2016). Application of lactic acid bacteria in removing heavy metals and aflatoxin B1 from contaminated water. *Water Science and Technology*, 74(3), 625–638. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.255>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization, Rome. FAO food and nutrition paper no.85.2002.
- Fitzgerald, D. M., Stringer, A. M., Smith, C., Lapiere, P., & Wade, J. T. (2023). Genome-Wide Mapping of the *Escherichia coli* PhoB Regulon Reveals Many Transcriptionally Inert, Intragenic Binding Sites. *MBio*, 14(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.02535-22>
- Frith, M. C., Saunders, N. F. W., Kobe, B., & Bailey, T. L. (2008). Discovering sequence motifs with arbitrary insertions and deletions. *PLoS Computational Biology*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000071>
- Fu, Y., Yin, N., Cai, X., Du, H., Wang, P., Sultana, M. S., Sun, G., & Cui, Y. (2021). Arsenic speciation and bioaccessibility in raw and cooked seafood: Influence of seafood species and gut microbiota. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 280, 116958. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116958>
- Fuller, R. (1989) Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>.
- Gallarato, L. A., Sánchez, D. G., Olvera, L., Primo, E. D., Garrido, M. N., Beassoni, P. R., Morett, E., & Lisa, A. T. (2014). Exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for the production of virulence factors, and its expression is controlled by NtrC and PhoB acting at two interspaced promoters. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 2), 406–417. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074773-0>
- Gangaiyah, D., Liu, Z., Arcos, J., Kassem, I. I., Sanad, Y., Torrelles, J. B., & Rajashekara, G. (2010). Polyphosphate kinase 2: A novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012142>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* 2,106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>

- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63,133–154.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Garbinski, L. D., Rosen, B. P., & Chen, J. (2019). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Environment International*, 126, 585–597.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.02.058>
- Gardner, S. G., & McCleary, W. R. (2019). Control of the *phoBR* Regulon in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 8(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2019.
<https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2019>
- Gardner, S. G., Johns, K. D., Tanner, R., & McCleary, W. R. (2014). The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of Bacteriology*, 196(9),1741–1752.
<https://doi.org/10.1128/JB.00029-14>
- Gardner, S. G., Miller, J. B., Dean, T., Robinson, T., Erickson, M., Ridge, P. G., & McCleary, W. R. (2015). Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in *Escherichia coli*. *BMC Genetics*, 16 Suppl 2(Suppl 2), S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-16-S2-S2>
- Garen, A., & Echols, H. Properties of two regulating genes for alkaline phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 83(2), 297–300.
<https://doi.org/10.1128/jb.83.2.297300.1962>
- Gatesoupe, F. J. (2007). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: Natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1–3), 107–114.<https://doi.org/10.1159/000106089>
- Gebhard, S., Busby, J. N., Fritz, G., Moreland, N. J., Cook, G. M., Lott, J. S., Baker, E. N., & Money, V. A. (2014). Crystal structure of PhnF, a GntR-family transcriptional regulator of phosphate transport in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 196(19), 3472–3481.
<https://doi.org/10.1128/JB.01965-14>
- Gebhard, S., Tran, S. L., & Cook, G. M. (2006). The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. *Microbiology(Reading,England)*, 152(Pt11),3453–3465.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.29201-0>
- GeCoViz: genomic context visualisation of prokaryotic genes from a functional and evolutionary perspective. *Nucleic Acids Research*,50,W352-W357;
doi.org/10.1093/nar/gkac367
- Geissdörfer, W., Ratajczak, A., & Hillen, W. (1998). Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 896–901.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.896-901.1998>
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., Revol-Junelles, A. M., Borges, F., & Foligné, B. (2018). Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9,2899.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>
- Ghorbel, S., Smirnov, A., Chouayekh, H., Sperandio, B., Esnault, C., Kormanec, J., & Viroille, M. J. (2006). Regulation of *ppk* expression and in vivo function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6269–6276.
<https://doi.org/10.1128/JB.00202-06>
- Gout I. (2019). Coenzyme A: a protective thiol in bacterial antioxidant defence. *Biochemical*

Referencias bibliográficas

- Society Transactions*, 47(1),469–476.
<https://doi.org/10.1042/BST20180415>
- Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Oxidative stress protection by polyphosphate--new roles for an old player. *Current Opinion in Microbiology*, 24,1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.004>
- Gray, M. J. (2020). Interactions between DksA and stress-responsive alternative sigma factors control inorganic polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 202(14)e00133-20.
<https://doi.org/10.1128/JB.00133-20>
- Gray, M. J., Wholey, W. Y., Wagner, N. O., Cremers, C. M., Mueller-Schickert, A., Hock, N. T., Krieger, A. G., Smith, E. M., Bender, R. A., Bardwell, J. C. A., & Jakob, U. (2014). Polyphosphate Is a Primordial Chaperone. *Molecular Cell*, 53(5), 689–699.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.012>
- Gu, S., Zhang, J., Li, L., & Zhong, J. (2022). Repurposing the Endogenous CRISPR-Cas9 System for High-Efficiency Genome Editing in *Lactocaseibacillus paracasei*. *ACS Synthetic Biology*, 11(12),4031–4042.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00374>
- Gustaw, K., Koper, P., Polak-berecka, M., Rachwał, K., Skrzypczak, K., & Waśko, A. (2021). Genome and pangenome analysis of *lactobacillus hilgardii* flub—a new strain isolated from mead. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073780>
- Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 160–165.
<https://doi.org/10.1111/j.1472765X.2007.02276.x>
- Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonon, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1),30-35.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040>
- Harris, R. M., Webb, D. C., Howitt, S. M., & Cox, G. B. (2001). Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(17),5008-5014.
<https://doi.org/10.1128/JB.183.17.5008-5014.2001>
- Heldal, M., Norland, S., & Tumyr, O. (1985). X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(5),1251–1257.
<https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1251-1257.1985>
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2013). Chromosome replication and segregation govern the biogenesis and inheritance of inorganic polyphosphate granules. *Molecular Biology of the Cell*, 24(20), 3177–3186.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E13-04-0182>
- Hildenbrand, J. C., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2019). Formation of an Organic-Inorganic Biopolymer: Polyhydroxybutyrate-Polyphosphate. *Biomacromolecules*, 20(9), 3253–3260.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00208>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8),506-514.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Holo, H., & Nes, I. F. (1989). High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Applied and Environmental*

Referencias bibliográficas

- Microbiology*, 55(12),3119–3123.
<https://doi.org/10.1128/aem.55.12.3119-3123.1989>
- Hsieh, Y. J., & Wanner, B. L. (2010). Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion in Microbiology*,13(2)198–203.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.014>
- Huang, J. H., Ilgen, G., & Fecher, P. (2010). Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(6), 800–802.
<https://doi.org/10.1039/c002306j>
- Hughes, J., & Mellows, G. (1980). Interaction of pseudomonadic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *The Biochemical Journal*, 191(1),209–219.
<https://doi.org/10.1042/bj1910209>
- Hulett F. M. (1996). The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 19(5), 933–939.
<https://doi.org/10.1046/j.13652958.1996.421953.x>
- Hulett, F. M., Lee, J., Shi, L., Sun, G., Chesnut, R., Sharkova, E., Duggan, M. F., & Kapp, N. (1994). Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 176(5),1348–1358.
<https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1348-1358.1994>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012). Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100(Pt C), 11–465. Disponible en <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Arsenic-Metals-Fibres-And-Dusts-2012>.
- Ishige, K., Zhang, H., & Kornberg, A. (2002). Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26),16684–16688.
<https://doi.org/10.1073/pnas.262655299>
- Isokpehi, R. D., Udensi, U. K., Simmons, S. S., Hollman, A. L., Cain, A. E., Olofinsae, S. A., Hassan, O. A., Kashim, Z. A., Enejoh, O. A., Fasesan, D. E., & Nashiru, O. (2014). Evaluative profiling of arsenic sensing and regulatory systems in the human microbiome project genomes. *Microbiology Insights*, 7, 25–34.
<https://doi.org/10.4137/MBI.S18076>
- Jagannathan, V., Kaur, P., & Datta, S. (2010). Polyphosphate kinase from *M. tuberculosis*: an interconnect between the genetic and biochemical role. *PLoS One*, 5(12), e14336.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014336>
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8),2357–2373.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Jiang, W., Metcalf, W. W., Lee, K. S., & Wanner, B. L. (1995). Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonate pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 177(22),6411–6421.
<https://doi.org/10.1128/jb.177.22.6411-6421.1995>
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3),209–224.
<https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kang, J. P., Huo, Y., Hoang, V. A., Yang, D. U., Yang, D. C., & Kang, S. C. (2021). *Bombilactobacillus apium* sp. nov., isolated from the gut of honeybee (*Apis cerana*). *Archives of Microbiology*, 203(5), 2193–2198.
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02249-y>

Referencias bibliográficas

Keasling, J. D. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 829, 242–249. <https://doi.org/10.1111/j.17496632.1997.tb48579.x>

Kieps, J., & Dembczyński, R. (2022). Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. *Foods(Basel,Switzerland)*, 11(15),23-30. <https://doi.org/10.3390/foods11152330>

Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., Kim, H. B., & Lee, J. H. (2019). Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1335–1340. <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... & Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>

Kloosterman, T. G., Hendriksen, W. T., Bijlsma, J. J. E., Bootsma, H. J., van Hijum, S. A. F. T., Kok, J., Hermans, P. W. M., & Kuipers, O. P. (2006). Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35),25097–25109. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601661200>

Kočan, M., Schaffer, S., Ishige, T., Sorger-Herrmann, U., Wendisch, V. F., & Bott, M. (2006). Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: Deletion analysis and involvement of the *phoS-phoR* system in the phosphate starvation response. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 724–732. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.724732.2006>

Kornberg, A., Rao, N. N., & Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule

of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68,89–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.89>

Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Nonno, R., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Prieto Maradona, M., ... Herman, L. (2024). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 19: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2023. *EFSA Journal*, 22(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8517>

Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, 9(9),1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>

Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V. (2004) The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Kulakovskaya, T. V., Lichko, L. P., & Ryazanova, L. P. (2014). Diversity of phosphorus reserves in microorganisms. *Biochemistry. Biokhimiia*, 79(13),1602–1614. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130100>

Kumble, K. D., Ahn, K., & Kornberg, A. (1996). Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14391–14395. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14391>

Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., & Kornberg, A. (1997). Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*.

Journal of Biological Chemistry, 272(34), 21240-21243.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21240>

Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwenhand, A. C., Salminen, S. J., & Ahokas, J. T. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21(2), 158–164.
<https://doi.org/10.1080/02652030310001639521>

Lamarche, M. G., Wanner, B. L., Crépin, S., & Harel, J. (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 461–473.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>

Lammers M. (2021). Post-translational Lysine Ac(ety)lation in Bacteria: A Biochemical, Structural, and Synthetic Biological Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 12, 757179.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.757179>

Landete, J. M., García-Haro, L., Blasco, A., Manzanares, P., Berbegal, C., Monedero, V., & Zúñiga, M. (2010). Requirement of the *Lactobacillus casei* maeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 84–95.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02145-09>

Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>

Leloup, L., Ehrlich, S. D., Zagorec, M., & Morel-Deville, F. (1997). Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacl* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2117–2123.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2117-2123.1997>

Li, J., Qiao, Z., Shi, M., Zhang, Y., & Wang, G. (2019). Regulation of antimonite oxidation and resistance by the phosphate regulator PhoB in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Microbiological Research*, 226, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.008>

Li, X., Hong, W., Du, X., Yu, W., Jingwen, J., Geng, Y., Guo, X., Fan, X., & Ma, C. (2017). Lactobacilli inhibit cervical cancer cell migration in vitro and reduce tumor burden in vivo through upregulation of E-cadherin. *Oncology Reports*, 38(3), 1561–1568.
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5791>

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3659), 747–748.
<https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

Lindner, S. N., Knebel, S., Wesseling, H., Schoberth, S. M., & Wendisch, V. F. (2009). Exopolyphosphatases PPX1 and PPX2 from *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3161–3170.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02705-08>

Liu, W., Eder, S., & Hulett, F. M. (1998). Analysis of *Bacillus subtilis* tagAB and tagDEF expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P. *Journal of Bacteriology*, 180(3), 753–758.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.3.753-758.1998>

Lorentzen, M. P. G., & Lucas, P. M. (2019). Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 2937–2945.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09689-z>

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12).
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Referencias bibliográficas

- Lv, H., Zhou, Y., Liu, B., Guan, J., Zhang, P., Deng, X., Li, D., & Wang, J. (2022). Polyphosphate Kinase Is Required for the Processes of Virulence and Persistence in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e0123022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01230-22>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., ... Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, S., Nakata, A., & Ishihama, A. (1988). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 203(1), 85–95. [https://doi.org/10.1016/00222836\(88\)90093-9](https://doi.org/10.1016/00222836(88)90093-9)
- Malde, A., Gangaiah, D., Chandrashekhar, K., Pina-Mimbela, R., Torrelles, J. B., & Rajashekara, G. (2014). Functional characterization of exopolyphosphatase/guanosine pentaphosphate phosphohydrolase (PPX/GPPA) of *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 5(4), 521–533. <https://doi.org/10.4161/viru.28311>
- Martín, J. F., & Liras, P. (2021). Molecular Mechanisms of Phosphate Sensing, Transport and Signalling in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>
- Martín, J. F., Rodríguez-García, A., & Liras, P. (2017). The master regulator PhoP coordinates phosphate and nitrogen metabolism, respiration, cell differentiation and antibiotic biosynthesis: comparison in *Streptomyces* coelicolor and *Streptomyces avermitilis*. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 534–541. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.19>
- Martín, J. F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L. T., Prieto, C., & Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00235.x>
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143(6), 754–758. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
- Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 12(6), 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>
- Matte, A., Tari, L. W., & Delbaere, L. T. (1998). How do kinases transfer phosphoryl groups?. *Structure (London, England : 1993)*, 6(4), 413–419. [https://doi.org/10.1016/s09692126\(98\)00043-4](https://doi.org/10.1016/s09692126(98)00043-4)
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M. J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beauflis, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J. F., Zagorec, M., Francke, C., ... Deutscher, J. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2647–2648. <https://doi.org/10.1128/JB.00076-10>
- Mei, Z., & Li, D. (2022). The role of probiotics in vaginal health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 963868. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.963868>
- Metcalf, W. W., & Wanner, B. L. (1991). Involvement of the *Escherichia coli phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in

the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 587–600.

<https://doi.org/10.1128/jb.173.2.587600.199>

1

Miller, E. A., Beasley, D. E., Dunn, R. R., & Archie, E. A. (2016). Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique?. *Frontiers in Microbiology*, 7,1936.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01936>

Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>

Mitra, A., Gultekin, M., Burney Ellis, L., Bizzarri, N., Bowden, S., Taumberger, N., Bracic, T., Vieira-Baptista, P., Sehoul, J., & Kyrgiou, M. (2024). Genital tract microbiota composition profiles and use of prebiotics and probiotics in gynaecological cancer prevention: review of the current evidence, the European Society of Gynaecological Oncology prevention committee statement. *The Lancet. Microbe*, 5(3), e291–e300.

[https://doi.org/10.1016/S26665247\(23\)0025](https://doi.org/10.1016/S26665247(23)0025)

7-4

Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure (London, England : 1993)*, 17(10), 1282–1294.

<https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>

Monedero, V., Revilla-Guarinos, A., & Zúñiga, M. (2017). Physiological Role of Two-Component Signal Transduction Systems in Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 99, 1–51.

<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.12.0>

02

Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., & Kuroda, A. (2002). Accumulation of inorganic polyphosphate in phoU mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* strain PCC6803.

Applied and Environmental Microbiology, 68(8),4107–4110.

<https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4107->

[4110.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4107-4110.2002)

Motomura, K., Hirota, R., Okada, M., Ikeda, T., Ishida, T., & Kuroda, A. (2014). A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (Class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation.

Applied and Environmental Microbiology, 80(8),2602–2608.

<https://doi.org/10.1128/AEM.03971-13>

Munévar, N. F. V., de Almeida, L. G., & Spira, B. (2017). Differential regulation of polyphosphate genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Genetics and Genomics*,292(1),105–116.

<https://doi.org/10.1007/s00438-016-1259-z>

Myers, C. L., Li, F. K. K., Koo, B. M., El-Halfawy, O. M., French, S., Gross, C. A., Strynadka, N. C. J., & Brown, E. D. (2016). Identification of two phosphate starvation-induced wall teichoic acid hydrolases provides first insights into the degradative pathway of a key bacterial cell wall component. *Journal of Biological Chemistry*,291(50),26066–26082.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.760447>

National Research Council (US) Panel on the Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods. (1992). *Applications of Biotechnology to Fermented Foods: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development*. National Academies Press (US).

Neville, N., Roberge, N., & Jia, Z. (2022). Polyphosphate Kinase 2 (PPK2) Enzymes: Structure, Function, and Roles in Bacterial Physiology and Virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 670.

<https://doi.org/10.3390/ijms23020670>

Neville, N., Roberge, N., Ji, X., Stephen, P., Lu, J. L., & Jia, Z. (2021). A dual-specificity inhibitor targets polyphosphate kinase 1 and 2 enzymes to attenuate virulence of *Pseudomonas*

Referencias bibliográficas

aeruginosa. *MBio*, 12(3)e0059221.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00592-21>

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Nikel, P. I., Chavarría, M., Martínez-García, E., Taylor, A. C., & de Lorenzo, V. (2013). Accumulation of inorganic polyphosphate enables stress endurance and catalytic vigour in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-50>

Nocek, B., Kochinyan, S., Proudfoot, M., Brown, G., Evdokimova, E., Osipiuk, J., Edwards, A. M., Savchenko, A., Joachimiak, A., & Yakunin, A. F. (2008). Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 17730–17735. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807563105>

Oliphant, S. A., Watson-Haigh, N. S., Sumbly, K. M., Gardner, J., Groom, S., & Jiranek, V. (2022). *Apilactobacillus apisilvae* sp. nov., *Nicolia spurrieriana* gen. nov. sp. nov., *Bombilactobacillus folatiphilus* sp. nov. and *Bombilactobacillus thymidiniphilus* sp. nov., four new lactic acid bacterial isolates from stingless bees *Tetragonula carbonaria* and *Austroplebeia australis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(9), 10.1099/ijsem.0.005588. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005588>

OMS 2022 Arsénico. Disponible en : <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>.

Orla-Jensen S. 1919. *The lactic acid bacteria*. Fred Host and Son, Copenhagen, Denmark.

Ouwehand, A. C., DongLian, C., Weijian, X., Stewart, M., Ni, J., Stewart, T., & Miller, L. E. (2014). Probiotics reduce symptoms of antibiotic use in a hospital setting: a randomized dose response study. *Vaccine*, 32(4), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.053>

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turrioni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/mubr.00076-15>

Peng, L., Luo, W. Y., Zhao, T., Wan, C. S., Jiang, Y., Chi, F., Zhao, W., Cao, H., & Huang, S. H. (2012). Polyphosphate kinase 1 is required for the pathogenesis process of meningitic *Escherichia coli* K1 (RS218). *Future Microbiology*, 7(3), 411–423. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.3>

Pessione E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086>

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

Pokhrel, A., Lingo, J. C., Wolschendorf, F., & Gray, M. J. (2019). Assaying for Inorganic Polyphosphate in Bacteria. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (143), 10.3791/58818. <https://doi.org/10.3791/58818>

Posno, M., Leer, R. J., van Luijk, N., van Giezen, M. J., Heuvelmans, P. T., Lokman, B. C., & Pouwels, P. H. (1991). Incompatibility of

- Lactobacillus* Vectors with Replicons Derived from Small Cryptic *Lactobacillus* Plasmids and Segregational Instability of the Introduced Vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6),1822–1828.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1822-1828.1991>
- Pourmollaei, S., Barzegari, A., Farshbaf-Khalili, A., Nouri, M., Fattahi, A., Shahnazi, M., & Dittrich, R. (2020). Anticancer effect of bacteria on cervical cancer: Molecular aspects and therapeutic implications. *Life Sciences*, 246,17413.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117413>
- Principi, N., Cozzali, R., Farinelli, E., Brusaferrero, A., & Esposito, S. (2018). Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: The potential role of probiotics. *The Journal of Infection*, 76(2), 111–120.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.12.013>
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H., Jr, Bork, P., & Sander, C. (1993). Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(7), 247–248.
[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90172-j](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90172-j)
- Qi, Y., Kobayashi, Y., & Hulett, F. M. (1997). The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2534–2539.
<https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2534-2539.1997>
- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E., & Gänzle, M. G. (2022). After the storm-Perspectives on the taxonomy of *Lactobacillaceae*. *JDS Communications*, 3(3),222–227.
<https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>
- Racki, L. R., Tocheva, E. I., Dieterle, M. G., Sullivan, M. C., Jensen, G. J., & Newman, D. K. (2017). Polyphosphate granule biogenesis is temporally and functionally tied to cell cycle exit during starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2440–E2449.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1615575114>
- Rangarajan, E. S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M. N., Schrag, J. D., Cygler, M., & Matte, A. (2006). The Structure of the Exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 Suggests a Binding Mode for Long Polyphosphate Chains. *Journal of Molecular Biology*, 359(5), 1249–1260.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.031>
- Rao, N. N., & Kornberg, A. (1999). Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 23, 183–195.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-58444-2_9
- Rao, N. N., Gómez-García, M. R., & Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review of Biochemistry*, 78,605–647.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039>
- Rashid, M. H., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*, 182(1),225–227.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.1.225-227.2000>
- Reusch, R. N., & Sadoff, H. L. (1988). Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12),4176–4180.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4176>
- Ribera, C., Sánchez-Ortí, J. V., Clarke, G., Marx, W., Mörtl, S., & Balanzá-Martínez, V. (2024). Probiotic, prebiotic, synbiotic and fermented

Referencias bibliográficas

- food supplementation in psychiatric disorders: A systematic review of clinical trials. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 158, 105561. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2024.105561>
- Rice, C. D., Pollard, J. E., Lewis, Z. T., & McCleary, W. R. (2009). Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB 2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 573–582. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-08>
- Rodríguez-Viso, P., Domene, A., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2024). Protective effects of oral administration of lactic acid bacteria strains against methylmercury-induced intestinal toxicity in a murine model. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 185, 114461. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114461>
- Rodríguez, J. M., Fernández, L., & Verhasselt, V. (2021). The Gut–Breast Axis: Programming Health for Life. *Nutrients*, 13(2), 606. <https://doi.org/10.3390/nu13020606>
- Rojas, D., Marcoleta, A. E., Gálvez-Silva, M., Varas, M. A., Díaz, M., Hernández, M., Vargas, C., Nourdin-Galindo, G., Koch, E., Saldivia, P., Vielma, J., Gan, Y. H., Chen, Y., Guiliani, N., & Chávez, F. P. (2024). Inorganic Polyphosphate Affects Biofilm Assembly, Capsule Formation, and Virulence of Hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Infectious Diseases*, 10(2), 606–623. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00509>
- Rosen B. P. (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, 529(1), 86–92. [https://doi.org/10.1016/s00145793\(02\)03186-1](https://doi.org/10.1016/s00145793(02)03186-1)
- Rosenberg H. (1966). The isolation and identification of "volutin" granules from Tetrahymena. *Experimental Cell Research*, 41(2), 397–410. [https://doi.org/10.1016/s00144827\(66\)80147-7](https://doi.org/10.1016/s00144827(66)80147-7)
- Rossi, M., Martínez-Martínez, D., Amaretti, A., Ulrici, A., Raimondi, S., & Moya, A. (2016). Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3), 399–406. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12405>
- Rouxinol-Dias, A. L., Pinto, A. R., Janeiro, C., Rodrigues, D., Moreira, M., Dias, J., & Pereira, P. (2016). Probiotics for the control of obesity - Its effect on weight change. *Porto biomedical Journal*, 1(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.005>
- Rudat, A. K., Pokhrel, A., Green, T. J., & Gray, M. J. (2018). Mutations in *Escherichia coli* Polyphosphate Kinase That Lead to Dramatically Increased *In Vivo* Polyphosphate Levels. *Journal of Bacteriology*, 200(6), e00697-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-17>
- Saccà, M. L., & Manici, L. M. (2021). Honey bee-associated bacteria as producers of bioactive compounds for protecting hives. A biosynthetic gene-based approach. *Microbiological Research*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126860>
- Sadykov, M. R., Thomas, V. C., Marshall, D. D., Wenstrom, C. J., Moormeier, D. E., Widhelm, T. J., Nuxoll, A. S., Powers, R., & Bayles, K. W. (2013). Inactivation of the Pta-AckA pathway causes cell death in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 3035–3044. <https://doi.org/10.1128/JB.00042-13>
- Saiki, A., Ishida, Y., Segawa, S., Hirota, R., Nakamura, T., & Kuroda, A. (2016). A *Lactobacillus* mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(5), 955–961.

<https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1135041>

Santos-Beneit F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>

Scientific Opinion on Arsenic in Food. (2009). EFSA Journal, 7(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1351>.

Schotte, L., Steidler, L., Vandekerckhove, J., & Remaut, E. (2000). Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 761–765. [https://doi.org/10.1016/s01410229\(00\)00297-0](https://doi.org/10.1016/s01410229(00)00297-0)

Segawa, S., Fujiya, M., Konishi, H., Ueno, N., Kobayashi, N., Shigyo, T., & Kohgo, Y. (2011). Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One*, 6(8), e23278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023278>

Shi, X., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17061–17065. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407787101>

Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N. N., & Kornberg, A. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11210–11215. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11210>

Shinagawa, H., Makino, K., & Nakata, A. (1983). Regulation of the pho regulon in *Escherichia coli* K-12. Genetic and physiological regulation of the positive

regulatory gene phoB. *Journal of Molecular Biology*, 168(3), 477–488.

[https://doi.org/10.1016/s00222836\(83\)80297-6](https://doi.org/10.1016/s00222836(83)80297-6)

Silby, M. W., Nicoll, J. S., & Levy, S. B. (2009). Requirement of polyphosphate by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 for competitive fitness and heat tolerance in laboratory media and sterile soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3872–3881. <https://doi.org/10.1128/AEM.00017-09>

Sinha, S., Lin, G., & Ferenczi, K. (2021). The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clinics in Dermatology*, 39(5), 829–839.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.08.021>

Song, H., Dharmasena, M. N., Wang, C., Shaw, G. X., Cherry, S., Tropea, J. E., Jin, D. J., & Ji, X. (2020). Structure and activity of PPX/GppA homologs from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *FEBS Journal*, 287(9), 1865–1885. <https://doi.org/10.1111/febs.15120>

Stasi, R., Neves, H. I., & Spira, B. (2019). Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3>

Steed, P. M., & Wanner, B. L. (1993). Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6797–6809. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6797-6809.1993>

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.

[https://doi.org/10.1016/s01681605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/s01681605(96)01233-0)

Referencias bibliográficas

- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M. F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S. D., & Hulett, F. M. (1996). Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1374–1385. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1374-1385.1996>
- Sureka, K., Sanyal, S., Basu, J., & Kundu, M. (2009). Polyphosphate kinase 2: A modulator of nucleoside diphosphate kinase activity in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1187–1197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06925.x>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tanaka, K., Fujiya, M., Konishi, H., Ueno, N., Kashima, S., Sasajima, J., Moriichi, K., Ikuta, K., Tanabe, H., & Kohgo, Y. (2015). Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(3), 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.159>
- Tang-Fichaux, M., Chagneau, C. v., Bossuet-Greif, N., Nougayrède, J.-P., Oswald, É., & Branchu, P. (2020). The Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* Is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin. *MSphere*, 5(6), e01195-20. <https://doi.org/10.1128/msphere.01195-20>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia supplementum* (2012), 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- The Genomic Context Visualizer* (GeCoViz; <https://gecoviz.cgmlab.org/>; Jorge Botas, Álvaro Rodríguez del Río, Joaquín Giner-Lamia, y Jaime Huerta-Cepas. (2022)
- Tumlirsch, T., & Jendrossek, D. (2017). Proteins with CHADs (conserved histidine a-helical domains) are attached to polyphosphate granules in vivo and constitute a novel family of polyphosphate-associated proteins (phosins). *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7), e03399-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03399-16>
- Tumlirsch, T., Sznajder, A., & Jendrossek, D. (2015). Formation of polyphosphate by polyphosphate kinases and its relationship to poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* strain H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24), 8277–8293. <https://doi.org/10.1128/AEM.02279-15>
- Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2019). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>.
- Wallenius, J., Uuksulainen, T., Salonen, K., Rautio, J., & Eerikäinen, T. (2011). The effect of temperature and pH gradients on *Lactobacillus rhamnosus* gene expression of stress-related genes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(9), 1169–1176. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0568-1>
- Wanner, B. L., & Chang, B. D. (1987). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5569–5574. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5569-5574.1987>
- Wanner, B. L., & Latterell, P. (1980). Mutants affected in alkaline phosphatase, expression:

evidence for multiple positive regulators of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Genetics*, 96(2),353–366.

<https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.353>

Webb, D. C., Rosenberg, H., & Cox, G. B. (1992). Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(34), 24661–24668.

Willisky, G. R., Bennett, R. L., & Malamy, M. H. (1973). Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology*, 113(2), 529–539.

<https://doi.org/10.1128/jb.113.2.529-539.1973>

Wolfe A. J. (2010). Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2),204–209.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.002>

Won, H. I., Watson, S. M., Ahn, J. S., Endres, J. L., Bayles, K. W., & Sadykov, M. R. (2021). Inactivation of the Pta-AckA pathway impairs fitness of *Bacillus anthracis* during overflow metabolism. *Journal of Bacteriology*, 203(9), e00660-20.

<https://doi.org/10.1128/JB.00660-20>

World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Probiotics and prebiotics. (2023). Disponible en <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics>.

Wösten, M. M. S. M., Parker, C. T., van Mourik, A., Guilhaert, M. R., van Dijk, L., & van Putten, J. P. M. (2006). The *Campylobacter jejuni* PhosS/PhosR operon represents a non-classical phosphate-sensitive two-component system. *Molecular Microbiology*, 62(1), 278–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05372.x>

Wray, L. V., Jr, Zalieckas, J. M., & Fisher, S. H. (2001). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*, 107(4),427–435.

[https://doi.org/10.1016/s00928674\(01\)00572-4](https://doi.org/10.1016/s00928674(01)00572-4)

Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., & Lebeer, S. (2017). Large-Scale Phylogenomics of the *Lactobacillus casei* Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade-Associated Features. *MSystems*, 2(4), e00061-17.

<https://doi.org/10.1128/mSystems.00061-17>

Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M. (1991). Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* 352,516–519.

<https://doi.org/10.1038/352516a0>.

Yan, F., & Polk, D. B. (2020). Probiotics and Probiotic-Derived Functional Factors-Mechanistic Insights Into Applications for Intestinal Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 1428.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01428>

Yang, H. C., & Rosen, B. P. (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, 39(1), 5–13.

<https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.08.003>

Yu, A. O., Leveau, J. H. J., & Marco, M. L. (2020). Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology Reports*, 12(1),16–29.

<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12794>

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(9),1283.

<https://doi.org/10.3390/foods11091283>

Zhang, A., Lu, Z., Xu, Y., Qi, T., Li, W., Zhang, L., & Cui, Z. (2021). The structure of exopolyphosphatase (PPX) from

Referencias bibliográficas

- Porphyromonas gingivalis* in complex with substrate analogs and magnesium ions reveals the basis for polyphosphate processivity. *Journal of Structural Biology*, 213(3). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107767>
- Zhang, H., Ishige, K., & Kornberg, A. (2002). A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16678-16683. <https://doi.org/10.1073/pnas.262655199>
- Zhao, X., & Drlica, K. (2014). Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.008>
- Zheng, J. J., Sinha, D., Wayne, K. J., & Winkler, M. E. (2016). Physiological Roles of the Dual Phosphate Transporter Systems in Low and High Phosphate Conditions and in Capsule Maintenance of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6,63. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00063>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* *beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, L., Grégori, G., Blackman, J. M., Robinson, J. P., & Wanner, B. L. (2005). Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 2(1), 10-22. <https://doi.org/10.1515/jib-2005-11>
- Zhu, Y., Huang, W., Lee, S. S. K., & Xu, W. (2005). Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Reports*, 6(7), 681–687. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400448>
- Zúñiga, M., Gómez-Escóin, C. L., & González-Candelas, F. (2011). Evolutionary history of the OmpR/IIIa family of signal transduction two component systems in *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *BMC Evolutionary Biology*, 11,34. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-34>
- Zúñiga, M., Miralles, M. del C., & Pérez-Martínez, G. (2002). The product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6051–6058. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6051-6058.2002>

Anexos

Anexos

Anexo 1. Genes que mostraron cambios significativos en su transcripción cuando se comparó la cepa $\Delta phoP$ con la cepa silvestre. (a) Genes regulados a la baja (\log_2 fold change <-1) o (b) al alza (\log_2 fold change >1) en la cepa $\Delta phoP$.

(a)

RefSeq	NCBI	Product Name	Locus	Normalized read means		log2FoldChange	padj
				BL23	PhoP		
LCABL_RS12775	LCABL_26160	Phosphonate ABC transporter, permease protein	phnB	1660	158	-3,389	6,78E-248
LCABL_RS12770	LCABL_26150	Phosphonates import ATP-binding protein phnC	phnC	2824	283	-3,313	0
LCABL_RS12780	LCABL_26170	Phosphonate ABC transporter, permease protein	phnE	2275	235	-3,264	4,98E-275
LCABL_RS12765	LCABL_26140	Phosphonate ABC transporter, substrate binding protein	phnD	5372	571	-3,229	0
LCABL_RS00800	LCABL_01600	acetate kinase	ackA	4901	672	-2,863	0
LCABL_RS07860	LCABL_16090	Hemolysin III	hly	5673	1144	-2,278	7,78E-95
LCABL_RS14750	LCABL_30170	argininosuccinate lyase	argH	2060	638	-1,672	4,31E-94
LCABL_RS04630	LCABL_124	IRNA-Val		59	19	-1,373	3,78E-07
LCABL_RS04145	LCABL_08410	DNA-damage-inducible protein P	dinP	2826	1122	-1,318	2,00E-72
LCABL_RS14745	LCABL_30160	argininosuccinate synthase	argG	1273	515	-1,283	3,53E-43
LCABL_RS02665	LCABL_05380	hypothetical protein LCABL_05380	-	46	16	-1,22	1,35E-05
LCABL_RS03435	LCABL_06990	Lsa	lsa	4884	2139	-1,175	5,33E-53
LCABL_RS03995	LCABL_08110	ABC transporter ATPase and permease protein	mutT	494	218	-1,142	1,07E-23
LCABL_RS07145	LCABL_14590	hypothetical protein LCABL_14590	-	226	99	-1,114	3,28E-12
LCABL_RS03400	LCABL_06910	serine/threonine transporter SstT	ssT	796	358	-1,112	4,46E-22
LCABL_RS01290	LCABL_r07	5S ribosomal RNA		189	77	-1,104	7,36E-07
LCABL_RS06800	LCABL_13870	F0F1 ATP synthase subunit gamma	atpG	37024	17040	-1,072	6,55E-19
LCABL_RS00310	LCABL_00610	HTH-type transcriptional repressor Bm3R1	bm3R1	1142	533	-1,069	7,98E-27
LCABL_RS02135	LCABL_04300	Sodium-dependent dicarboxylate transporter sdcS (Na(+)/dicarboxylate symporter)	sdcS	960	459	-1,032	5,20E-28
LCABL_RS12000	LCABL_24590	General substrate transporter:Major facilitator superfamily MFS_1	-	181	83	-1,031	5,40E-11
LCABL_RS03140	LCABL_06360	hypothetical protein LCABL_06360	-	151	69	-1,006	2,20E-08
LCABL_RS00305	LCABL_00600	MMPL precursor	-	9914	4904	-1,002	2,21E-54

(b)

RefSeq	NCBI	Product Name	Locus	Normalized read means		log2FoldChange	padj
				BL23	PhoP		
LCABL_RS04885	LCABL_09900	Phage protein	-	33	137	1,911	4,12335E-19
LCABL_RS17195	LCABL_13030	hypothetical protein LCABL_13030	-	27	103	1,751	4,44033E-14
LCABL_RS17060		hypothetical protein LCABL_RS17060	-	42	154	1,743	1,24372E-18
LCABL_RS16965	LCABL_09930	hypothetical protein LCABL_09930	-	50	177	1,713	4,12335E-19
LCABL_RS04860	LCABL_09850	hypothetical protein LCABL_09850	-	235	793	1,7	9,18032E-38
LCABL_RS10940	LCABL_22430	Oligopeptide ABC transporter, ATP-binding subunit	oppD	2390	8679	1,668	2,41165E-12
LCABL_RS04890	LCABL_09910	Major tail protein, ph13 family	-	114	379	1,662	2,06873E-27
LCABL_RS04940	LCABL_10010	hypothetical protein LCABL_10010	-	30	105	1,644	7,1953E-13
LCABL_RS04925	LCABL_09980	orf59	orf59	173	558	1,633	1,26887E-33
LCABL_RS03915	LCABL_07940	hypothetical protein LCABL_07940	-	1312	4155	1,631	1,68985E-56
LCABL_RS04880	LCABL_09890	hypothetical protein LCABL_09890	-	37	125	1,624	2,34982E-15
LCABL_RS04895	LCABL_09920	Phage protein	-	163	525	1,62	2,97701E-27
LCABL_RS10935	LCABL_22420	Oligopeptide ABC transporter, ATP-binding subunit	oppF	2765	9722	1,606	5,84453E-11
LCABL_RS05490	LCABL_11160	Phage protein	-	2112	6528	1,596	1,07736E-53
LCABL_RS10945	LCABL_22440	Oligopeptide ABC transporter, membrane-spanning subunit	oppC	2073	7020	1,59	1,97513E-12
LCABL_RS04865	LCABL_09860	hypothetical protein LCABL_09860	-	21	76	1,583	4,41009E-09
LCABL_RS05485	LCABL_11150	hypothetical protein LCABL_11150	-	1764	5373	1,583	1,58817E-67
LCABL_RS05495	LCABL_11170	Major tail protein, ph13 family	-	3628	11119	1,579	3,01993E-45
LCABL_RS05500	LCABL_11180	Phage protein	-	5293	16156	1,577	3,35621E-49
LCABL_RS10995	LCABL_22530	hypothetical protein LCABL_22530	-	1424	4291	1,572	1,8067E-82
LCABL_RS05170	LCABL_10490	Sensor protein (Fragment)	hpk2	3018	8968	1,562	1,938E-172
LCABL_RS04920	LCABL_09970	hypothetical protein LCABL_09970	-	133	403	1,538	6,57289E-29
LCABL_RS10950	LCABL_22450	Oligopeptide ABC transporter, membrane-spanning subunit	oppB	1862	5967	1,531	9,97482E-13
LCABL_RS05465	LCABL_11110	hypothetical protein LCABL_11110	-	13886	40734	1,516	4,72962E-41
LCABL_RS13755	LCABL_28150	HTH containing DNA-binding domain and MocR-like aminotransferase	-	4269	12269	1,503	1,42789E-69
LCABL_RS05535	LCABL_11250	hypothetical protein LCABL_11250	-	1883	5407	1,501	3,60425E-70
LCABL_RS05470	LCABL_11120	hypothetical protein LCABL_11120	-	1028	2973	1,495	3,87055E-40
LCABL_RS05545	LCABL_11270	P163	P163	2689	7676	1,486	2,59628E-51
LCABL_RS04855	LCABL_09840	Clp protease domain protein	clpP	152	442	1,484	5,37986E-28
LCABL_RS06455	LCABL_13150	hypothetical protein LCABL_13150	-	119	348	1,476	5,48893E-22
LCABL_RS16970	LCABL_11190	hypothetical protein LCABL_11190	-	1819	5188	1,473	9,49615E-37
LCABL_RS04935	LCABL_10000	Holin	ejh	107	311	1,471	2,30394E-22
LCABL_RS04930	LCABL_09990	hypothetical protein LCABL_09990	-	99	285	1,461	9,26694E-23
LCABL_RS05530	LCABL_11240	orf59	orf59	1403	3937	1,46	6,59258E-49
LCABL_RS05540	LCABL_11260	hypothetical protein LCABL_11260	-	93	269	1,459	4,03315E-20
LCABL_RS10450	LCABL_21440	Prolyl aminopeptidase	pepL	910	2752	1,444	1,9757E-11
LCABL_RS05480	LCABL_11140	Phage protein	-	187	524	1,427	2,42591E-22
LCABL_RS05550	LCABL_11280	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	lys	3698	10019	1,407	7,02006E-41

LCABL_RS06400	LCABL_13020	hypothetical protein LCABL_13020	-	390	1057	1,399	8,86431E-35
LCABL_RS05525	LCABL_11230	hypothetical protein LCABL_11230	-	1550	4163	1,396	3,67652E-43
LCABL_RS05460	LCABL_11100	Ctp protease domain protein	ctpP	12971	34328	1,38	8,88653E-49
LCABL_RS06415	LCABL_13050	RecT protein	recT	379	980	1,341	2,96004E-41
LCABL_RS06425	LCABL_13070	hypothetical protein LCABL_13070	-	582	1505	1,334	1,92092E-32
LCABL_RS06450	LCABL_13140	hypothetical protein LCABL_13140	-	157	407	1,321	1,05616E-24
LCABL_RS16855	LCABL_13170	hypothetical protein LCABL_13170	-	140	363	1,32	1,38175E-21
LCABL_RS06410	LCABL_13040	hypothetical protein LCABL_13040	-	223	570	1,313	3,68196E-28
LCABL_RS06420	LCABL_13060	Prophage pi1 protein 12	pi112	372	940	1,306	5,58026E-39
LCABL_RS06390	LCABL_12990	Helix-turn-helix motif	-	49	132	1,304	7,26438E-11
LCABL_RS15080	LCABL_30870	hypothetical protein LCABL_30870	ps609	1004	2525	1,294	4,96849E-31
LCABL_RS06405		helix-turn-helix domain-containing protein	-	38	104	1,289	6,34229E-09
LCABL_RS01235	LCABL_02480	Cell wall-associated hydrolase	-	19210	47176	1,288	2,2359E-128
LCABL_RS06435	LCABL_13110	hypothetical protein LCABL_13110	Ujo_1453	129	327	1,288	2,78509E-22
LCABL_RS06465	LCABL_13180	Putative autolysin regulatory protein arpU	arpU	395	978	1,281	9,15582E-42
LCABL_RS05510	LCABL_11200	Tail tape measure protein	tmp	23956	59706	1,28	3,95624E-29
LCABL_RS02485	LCABL_05020	pyruvate oxidase	pyr	2979	7268	1,272	2,6911E-66
LCABL_RS15180	LCABL_31070	Glucosamine-6-phosphate deaminase (Glucosamine-6-phosphate isomerase) (GNPDA) (GlcN6P deaminase)	nagB	2480	6055	1,272	5,16183E-63
LCABL_RS04850	LCABL_09830	Phage portal protein, HK97	-	166	412	1,262	4,20285E-23
LCABL_RS06395	LCABL_13000	hypothetical protein LCABL_13000	-	290	710	1,246	5,99194E-23
LCABL_RS06445	LCABL_13130	hypothetical protein LCABL_13130	ORF38	60	151	1,245	7,23652E-12
LCABL_RS10955	LCABL_22460	Oligopeptide ABC transporter, substrate-binding lipoprotein	oppA	8961	23624	1,239	6,68225E-09
LCABL_RS10465	LCABL_21470	Oligopeptide ABC transporter, substrate binding protein	oppA	2043	5251	1,236	2,13361E-10
LCABL_RS05520	LCABL_11220	hypothetical protein LCABL_11220	-	25116	60235	1,229	1,55324E-30
LCABL_RS11075	LCABL_22670	hypothetical protein LCABL_22670	-	1778	4234	1,229	4,11437E-43
LCABL_RS10575	LCABL_21680	ABC transporter related	-	3465	8174	1,226	1,4883E-75
LCABL_RS10460	LCABL_21460	Peptidase M42 family	ysdC	1135	2948	1,221	7,99146E-09
LCABL_RS05515	LCABL_11210	Gp13 protein	-	3740	8857	1,212	1,36523E-30
LCABL_RS16980	LCABL_13010	hypothetical protein LCABL_13010	-	164	391	1,199	3,92356E-19
LCABL_RS06440	LCABL_13120	hypothetical protein LCABL_13120	-	210	498	1,183	1,94679E-18
LCABL_RS16960	LCABL_07510	hypothetical protein LCABL_07510	-	4073	9420	1,179	1,03102E-30
LCABL_RS05430	LCABL_11040	hypothetical protein LCABL_11040	-	497	1139	1,174	1,33621E-37
LCABL_RS04905	LCABL_09940	hypothetical protein LCABL_09940	-	965	2203	1,167	8,6668E-39
LCABL_RS05455	LCABL_11090	Phage portal protein, HK97	-	20756	47504	1,161	1,17965E-27
LCABL_RS03420	LCABL_06950	Cold shock protein A	cspA	28602	64409	1,147	1,41882E-37
LCABL_RS10455	LCABL_21450	D-aminopeptidase	dppA	1196	3021	1,146	2,73789E-07
LCABL_RS15070	LCABL_30850	hypothetical protein LCABL_30850	-	478	1087	1,133	3,49988E-19
LCABL_RS11070	LCABL_22660	Hydantoinase/oxoprolinase	-	4719	10417	1,11	2,01677E-27
LCABL_RS17175	LCABL_04900	hypothetical protein LCABL_04900	-	1758	3916	1,11	1,99902E-20
LCABL_RS11080	LCABL_22680	Permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin	-	1479	3223	1,102	2,42165E-38
LCABL_RS15065	LCABL_30840	hypothetical protein LCABL_30840	-	517	1142	1,102	3,77849E-22
LCABL_RS14125	LCABL_28890	hypothetical protein LCABL_28890	-	126	281	1,101	8,58165E-17
LCABL_RS15085	LCABL_30880	RepA protein	RepA	2138	4695	1,101	5,41864E-26
LCABL_RS15090	LCABL_30890	Putative head-tail joining protein	ORF8	472	1045	1,096	1,27404E-18
LCABL_RS00210	LCABL_00410	Orf2	orf2	303	661	1,09	3,79337E-25
LCABL_RS16990	LCABL_15640	hypothetical protein LCABL_15640	-	207	457	1,09	2,93175E-17
LCABL_RS01520	LCABL_03060	Peptidase T	pepT-2	1989	4800	1,075	1,07192E-06
LCABL_RS10570	LCABL_21670	hypothetical protein LCABL_21670	-	8627	18217	1,066	4,59517E-66
LCABL_RS17075	LCABL_06070	hypothetical protein LCABL_06070	-	112	254	1,065	1,89148E-09
LCABL_RS01525	LCABL_03070	Oligopeptide ABC transporter substrate binding protein	oppA	2545	6093	1,055	2,08215E-06
LCABL_RS06480	LCABL_13210	hypothetical protein LCABL_13210	-	65	150	1,044	2,9013E-07
LCABL_RS10220	LCABL_20970	ABC transporter ATP-binding protein	yjJC	1291	2686	1,042	7,52815E-53
LCABL_RS08050	LCABL_16480	Histidinol-phosphate aminotransferase (Imidazole acetol-phosphate transaminase)	hisC	1428	2958	1,03	6,40302E-38
LCABL_RS15075	LCABL_30860	hypothetical protein LCABL_30860	-	15	41	1,007	0,00021617

Anexos

Anexo 2. Alineamiento múltiples de homólogos de Ppx1 de 91 miembros de Bacillota usado para construir el árbol de la Figura 51. Los aminoácidos en rojo corresponden a los bucles P1 y P2 y a dos residuos catalíticamente relevantes (R y E).

```

alimeng/1-510 -----M---TDELNAVMDLGSNSVRLVIYQQGPHG-TQQELDNLKQTVRLSSHLDSHN
efflacu/1-515 -----MGTFIGIIDLGSNTARLVVYYKDEQG-SFYEFDNIKRVLRLSNHLQPNQ
tumflag/1-518 -----M---NTQQLAIIDLGSNSARLVIYEQDEQG-LLFETDNVQVRLSSHLTPDG
kyrtusc/1-515 -----M---SHELGAVVDLGSNSVRLVIYRLGSQG-TQQEIDNLKQTVRLSSHLGDDG
sulther/1-503 -----M---MTLTGIMDIGNSMRLSILKRFDNGG-FYVVDHKKSTPRLSNAIQADG
ferorga/1-501 -----M---MNVGTIIDLGSNSMRLSIIASLQSGA-YYVLDQKTSRPLSQQIKRDG
colludi/1-486 -----M---MTERIGIIDLGSNSRFLVIYEIRSNG-AYQPIFEMKQTVRLAQYMDEEK
rosviet/1-509 -----M---MNKSAIVDIGSNTIRLVIYSHYPDG-RYKEIENVKAVARLRTYLGEDM
anocald/1-508 -----M---MKEKYGLIDLGSNTIRLVIYERSKSG-RLREIENVKAVARLRNYLNYNH
bacsala/1-510 -----M---MSNKSAILDIGSNTIRLVIYEHYKKG-RYKEIENVKAVARLRTFLDGDM
calerzu/1-509 -----M---MQKFALIDLGSNTMRLVIYRHEKIG-SFKEIENKTVARLRNLFDENH
halyeom/1-513 -----M---TKRYYSIIDLGSNTVRLVIYMSDNGG-RLREIENVKVVARLRNYLMDDG
priarya/1-508 -----M---MKRKVGIIDLGSNTTRLVIYVQPKGVPFKEVENIKMGVRLRXYLNDEK
mancuni/1-511 -----M---MKSKIAIIDLGSNTIRLVIYDVQEDG-RIKEIENKTVARLRXYLDKES
ocesoja/1-511 -----M---KTQNYAIDLGSNTMRLVIYEKTKSN-RLKEIENVKASRLRFLFLEEDN
lystimo/1-515 -----M---RRLKTAIDLGSNTIRLVIYKDKND-GLNEFNIKAVARLRNYIQSNG
paesuae/1-508 -----M---MEQIGIIDLGSNSIRFVIYEIDYK-CYKEIQNLKI PARLSTYIDDEG
cytson/1-514 -ML---EK---TPPKWAIIDLGSNTIRLVIYEVKVF--TYKEAENIKAVARLRNYLNEGE
aqualbu/1-510 -----M---EKKHYAIDLGSNTMRLVIYLQEKAG-RLREVENVKAVARLRNHLNDNS
metlito/1-509 -----M---MQEKYAIIDLGSNTMRLVIYLRKESG-RLKEIENVKVVARLRNLYLSDG
robkorl/1-506 -----M---MNKWAVIDLGSNTIRLVIYVETNN-FYKEVENIKAVARLRQYLNEEK
perfrig/1-509 -----M---IKEYYAIIDLGSNTMRLVIYQRDKSQ-RLKEIENVKI AARLRNLYLNDDS
niaendo/1-511 -----M---TKEKWAVIDLGSNTIRLVIYAKILSG-SYKEAENIKTVARLRNYLNQDN
liscost/1-511 -----M---MVKPKLFSAVTIGSQSVTLKIMDISR---QEVLEALRADVSIPTDIYNHK
brehumi/1-511 -----M---MESYIGMIDLGSNTARLVVYHQDNQG-LLYEIDNMKRTLRLSNYLH-DG
anedani/1-509 -----M---MDKYSAVI DMGSNSVRLVIYETAEG-TSYEVDNIKNTIRLSTFLNEHN
paearte/1-509 -----M---EQRIGIIDLGSNSVRLVYERTAGGA-NRVLDGSKRAARLSEHVDENG
lonpaci/1-502 -----M---LQRIIGIIDLGSNTIRLSIFKTNINT-LHILDKNKYPARLSQSSNN
cohther/1-517 -----M---MK-PFNQVTGMI DIGSNTVRLAVYQVAANGA-YRVIDQGRWPARLSQKLD SHG
spolaev/1-505 -----M---MAKHKLFASITVGLQITIVLKIADLTN---MSILDYVKANVSIGADIYNQQ
stamass/1-510 -----M---MERICLIDLGSNTIRLVIYFYNRMI-GLNETQNIKT PARLSQYLTDQD
macarme/1-510 -----M---MKRIGLV DIGSNTIRLVIYFDYSVEI-GLQELQNIKT PARLYQLSDDK
maccase/1-511 -----M---MMKRIGLV DIGSNTIRLVIYFDYSVEI-GLQELQNIKT PARLYQLSDDK
fachomi/1-520 -----M---HDQKIALIDLGSNTIRLVIYGINAYC-DMNELLNLKTPARLSQYLDQTK
ruotaba/1-517 -----M---YKEVIGVI DIGSNTIRLVIYFGLDEQY-NYIEIQNIKT PARLSQYLITDK
aersang/1-515 -----M---KERIGLV DIGSNTIRLVIYVDDIDHF-GLHEIQNIKI PARLYHHLDEES
suiaacid/1-517 -----M---NYTEKVAIDLGSNTIRLVIYIGIDAQY-NYIEIQNIKT PARLSHFLEEDD
glosulf/1-517 -----M---YNEKIGLI DIGSNTIRLVVYAI DHRF-NITELQNIKT PARLSQYLSERK
funculc/1-519 -----M---FKEKVAIDLGSNSIRLVIYIGIDEEY-NFVELQNVKT PARLSENIQMIN
hutsour/1-517 -----M---FKEKVAIDLGSNTIRLVVYIGIDSNY-DYIELLNKTPARLSQFLSDD
ignruof/1-517 -----M---HTERLAIIDLGSNTIRLVIYGINRYF-DIEELHNKTPARLAEFLHEKK
erecole/1-517 -----M---YTEKIALIDLGSNTIRLVIYIGIDQTH-HFVELHNEKI PARLSQYLDQKK
vagmass/1-517 -----M---YKEKVGIDLGSNTIRLVIYIGIDHYY-NYIELQNIKT PARLSQNLQEQIG
allotit/1-519 --M---VHQNKQANRIGLI DVGSNTIRLVIYFIDAVN-SFREILNKNPARLAQYLDG--
alkkapi/1-521 -----M---RERIGLL DVGSNTIRLVIYFEKDDHQ-GFIELQNIKT PARLVQYVDDK
markali/1-519 -----M---MV---NRIGLI DVGSNTIRLVIYFIDQNG-TITELQNIKT PARLVQYLDTD
atotaba/1-521 -----M---TNQRIGIIDLGSNTVRLVIYFIDNYY-SMIELQNIKT PARLVQYLDDE
desince/1-519 -----M---STERIGLI DIGSNTVRLVIYFETDAYY-NLHELQNIKT PARLYLYLSEE
triilyi/1-512 -----M---LLERIGLI DIGSNTIRLVIYFIDEHF-TMFQVQNIKT PARLFQYLDKK
graseri/1-519 -----M---VLEKVGIDLGSNTIRLVIYFIDENY-QYRELQNIKT PARLFQYLDAD
jeocaen/1-522 -----M---SSERIGLI DIGSNTIRLVIYFIDENY-NIRQLQNIKT PARLSQYLNEE
entital/1-516 -----M---MG---KTKKVAIDLGSNTVRLVIYQVSPVG-NISQLQNVKL PARLYQYLDENQ
bavseil/1-519 -MT---KT---KKDRIGLMDIGSNTIRLVVYELSANH-IPYELQNVKT PARLSQYVDDD
lacBL23/1-509 --M-----AN---NIQGFVMI GAQAVFVSI TNLRT---LKTIERGRYPAVIGDDFYAEH
lacsele/1-510 --M-----AK-KVDYGVVIG AQSVYCSI INLKT---LQELERVEYEVSIGDDVFARH
agrcomp/1-512 --M-----ARKQKLI AVVVI GAQNI FLQIADITS---RQIIESVHYDIDLGEDIFSEK
schshen/1-515 --M-----AKGTGIIGFVVI GAQAVFIRAVDR-K---MHVVESAQTDVDIGEDIFTNQ

```

lacplan/1-509 -----MAAKLFGIMMINVQ**S**IELSIVNLR-----LRQVERVRSDVSLGEDIYDQH
frusanf/1-509 -----MAAKLFGIMMINVQ**S**IELSIVNLR-----LHQVERVRSDVSLGEDIYDQH
nicspur/1-512 --M-----PVNINFSIAIVMGAQNIYVQVIDLTH----AKVVEDTRYDIDLGEDVFSER
loiback/1-509 --M-----AKAKLFGAIVMSAQ**S**IDLTVNLRN----LETVERVSAPVALGDRLFTEG
apitimb/1-512 --M-----PNEYNFSAVIVM**GS**QNIYVQIVDINN----ASLIENAHYDIDLGEDVFSER
levbrev/1-510 -----MADDFYFAMLVNV**S**IELSIVNLR-----GTQVERVKSTVAIGENIYNHE
secmixt/1-510 -----MATHYFGTMLISVQGLDLLIVDLKT----LKTIERVHKELSVGDNLYHHQ
weisaga/1-513 -----MTQKYFGVMTVNITGVLELVIVNLR-----HKSLEKVNKEINLGDVVYRNR
ligacid/1-508 -----MTRSYFGAIIILNVVGLLELRIADLKT----GKTLEHVQKNLQSLDDIYNQN
lenhilg/1-521 --MSKWENVDMAQYFAGAIMVNVSGVELLIVNLR-----RKTIERVTKEINLSDDIYHDH
pausueb/1-508 --M-----SQPNLTAQIVINAQ**S**IDLCTIDLK-----MKIEEQASAPVTLGDHLFISG
fumili/1-508 --M-----AKGSLYGAMVISAQDMQLIIVDVKR----QAVIERVSAPIHLGNDLFAGK
perbeni/1-504 -----MAKNLIGEILV**GT**TSVKLVVSNINT----FKVIEKVKHDKMVGAEIYDSN
liqnage/1-502 -----MAGLFGVYIYTPRQIKLSIDLKT----LKLIES-STATYF-QVTDE--
leuholz/1-497 -----M-ATLEGIILLNSSTAALQIVNTKT----GEKLENTVREFSE-SD-INSP
lacprot/1-510 -----M-----KRHKIALI**DIG**SSVRLVIYDIQKEY-TYKEIQDKMPIRLYQYLDKEY
anobury/1-524 MPE-----TRKKAVMSA**DI**GSYSLKMKIVEVDEEDG-QVHTIEKLSKAPLGRDTFSMG
cloacet/1-516 MDE-----KQALTTVAGISV**GS**YAVRMKISEVLPPEG-KTRTLERTSKSIALGRDTFSKG
petxyla/1-521 MSR-----KNKSEI IAGI**DV**GSHALRMKIAEVDWENG-EIKTLEMLRHPIFLGRDTFAMG
thecaen/1-520 --M-----YCPPRLFAA**DI**GSYRLKMKIVEVTPPEG-RIRDLETVDHLILLGRDTFNDG
blamass/1-514 --MK-----TMAVTFFAA**DI**GSYEVSMKIFEMSKRI-GFREINDVRYQLBLGRDGYAAG
anafaec/1-521 -----MPINTFAA**DI**GSNEVSMKIFEISKKN-GIHELHDVHRHTIELGSETYTNQ
lacsacc/1-513 -----MQMATFAA**DI**GTVDVFLEIFEISRKQ-RRSIDKIRHRIELGKDTYTNG
petatla/1-512 -----MSKNLIAA**DI**VGSHAIRMKIGEINKAG-DFRLEKFRKIAVLGHDTFANE
acestic/1-513 M-----GKSTKLVS**AI**DVGSNTIRMI IAEIGEST-GINI IDEVKKPIDIGKDTYNYG
seralka/1-514 MNK-----SKKPLTIAGISV**G**SHALKIKIVEVTEKQ-EIITLEKVSCKTSLGRDTFSKG
anacarb/1-518 -----MKKNQIIAA**DI**VGSHALRMKIAQISNHG-QMKALELLRYPISLGRDTYAMG
geoferr/1-520 MNQ-----KTKREAMAG**DI**GSHALRMKIVEVHNEE-KVKILEMLRHPISLGRDTFTMG
tincali/1-522 MNR-----KRKPTVMSA**DI**GSYSLKMRIVEVDEEG-NTRLLDRVTHPAALGKDTFSTG
selbovi/1-507 -----MAAKNLFGVIYMSTAKLEMLIVSLKP----LHVVEHMSKSAFV-QRMDKSK
prohipp/1-516 -MS-----GKAPDLFAAVH**IG**SEQISLQIVEYKSLQ-DIKVIERANYQMVLGEEFTKGT
spoovat/1-515 -MG-----RHAPDRFAA**I**HVGSSEQIGIQIVEYTNMD-DVKIEIQSYRQVMLGEEFTKGT
denquer/1-519 MLK-----EATCNLFAA**I**HLGSSEQVGIQIVQYRNID-DIKVVDQARQVSLGEEFTKSG
calkiri/1-518 MSK-----DLNSELIAG**DI**GS**S**IKMKIAEINENG-EIRTLNLRRTASLGDFTTTG
////
alimeng/1-510 -----MLSEKGIQRTVRIISQFKQLCDAVGVTRIVGVATQAV**RM**AVNRDITLLQRITHTG
efflacu/1-515 -----LISETGQFETMDCMRQFKELCDARQVSEVIGVATAAV**RQ**ASNGQELAAIHRNTG
tumflag/1-518 -----QLDESGVHLTLNCLRHFKDCDARGVTEIVGVATAA**AM**RQANGAELRDRIERETG
kyrtusc/1-515 -----RIAEAGIKAALRVLEQFCQLCRAYGVTHITGIATQAV**RM**AVNREEVLKRIYEATG
sulther/1-503 -----TLSERGIVELMTHLSEFQGLCKAYNVSRVAIGTAAL**RA**AKNRDDIVRLVQRQIG
ferorga/1-501 -----ALAEAAVRDLIEKLGHFIGLCRAHHRNIEAVGTAAL**RA**ATNRKEIVERIERETG
colluda/1-486 -----HITDEGIQRAIACVKLFYRTGQLYGVTHWIPVTTAAV**RQ**AGANKNIQLQSLEFETR
rosviet/1-509 -----ELMSDEGLDKLVKLSISEILEFHEISAARCVATAT**IR**QAGNREEIISAVKRETG
anocald/1-508 -----ILTDEGIAILLDTLRSFQEI TRYHQLKRVKCVATAT**IR**QAKNQNEIIRLVEENTD
bacsala/1-510 -----KLAATEGIDKLMNLIKGFMEVDFHEIPNVRCVATAT**IR**QAKNKEEVLTIKKETG
calerzu/1-509 -----CLNEEGMNLIDTLKNEYEITNYHQVETVKAVATAA**IR**QAKNQEILERIRANTG
halyeom/1-513 -----RLSDEGLDVLNLTLSFKFVADVYTLLEKVCVATAT**IR**QANQEQIISVSEQGTG
priarya/1-508 -----IVSDEGISLLIDTLHSFQSLHHYKVTDITCVATAT**IR**QAKNKEEILHIVQEKGTG
mancuni/1-511 -----VLSDTGINKLLNALSGFKEIILHHDVQYVAVATAT**IR**QANNQETIIEVKEKGTG
ocesoja/1-511 -----TLNQAGIDRLIDTLKSFQEVLATYTLQDTICAATAA**IR**QAVNKKEIETQIVQKGTG
lystimo/1-515 -----QLDESGIQLSNTLVSFKEILEDEYVTDIKAVATAA**AV**RQAKNGKKI IARMKKETG
paesuae/1-508 -----AMTKDGDVKVLETLRKFEPPVANYELSSMRGVATAA**IR**NATNSEEILDAIKEHSI
cytspon/1-514 -----ILEEEGIQVLLKVLGAFKDIKFKHQINSVKCVATAT**IR**QSNQKSI LEKVNTEGTG
aqualbu/1-510 -----MLTDDGLTILINTLKSFKFVANTYELTDLIVATAT**IR**QAKNQDSIQQIVEDKLG
robkorl/1-506 -----ILSDQGVQKCLTILKGFKEIIDFNGIKEIKCVATAT**IR**QAVNKVELEKVMGEVGV
perfrig/1-509 -----FLNDEGISVLVSALHSFQEVTRHHDLKNVKCVATAT**IR**QSENREALEKVVQETD
niaendo/1-511 -----DLSKEGIALIDILQGFKEILAFHQVTKIHCTATAT**VR**QSNQNEVQALVKEKGTG
liscost/1-511 -----TIAASTMHETSTALAGFVQLMRDYDVTEYRAVATAS**V**REALNAEYVKEQIRLQGT
brehumi/1-511 -----YLAKEGIDQTL SVMRQFRSLEEARQVKHVGVATAA**AV**RQARNGLTLLKEIEHETG
anedani/1-509 -----EIIIEPGIKEVLRVLTQYRQLCEARKVSSVIGVATAA**AV**RKAINKEELLTRIYETTG
paearte/1-509 -----ALPEGTVDELVDMVNHFRITCAHHKTMIRAVATAA**IR**NSANRDRVLRRIEAGT

Anexos

lonpaci/1-502 -----DIPIQELDDIVSTLLHYKNLCHLHHVATIHTVATAAIRNADNTQHVQKYLEMKTG
cohther/1-517 -----RLPLEAIDELADVLRHFRRICSMHGAQRIRAVATAAIRQANRAEVLDRLSRETG
spolaev/1-505 -----MIAFQTVDAQACHQLAGFVQIMKDYGVTSYRAVAASSVQEARNAEYVREQIRIKTG
stamass/1-510 -----QMTDEGIDVLTDTLKSFKKVSDDYKVPIDALYPIATAAIRQSANQDVLQVRKDAID
macarme/1-510 -----VMSDKGIDVLCDTLQSFQKQVADKFNVDALYPVATAAVRQSQNIDAI IARVKAETG
maccase/1-511 -----VMSDKGIDVLCDTLQSFQKQVADKFNVDALYPVATAAVRQSQNIDAI IARVKAETG
fachomi/1-520 SGEIT--LSPQGIKVLVDTLTAHFRTCAHKNVNEEII LATAAIRQSQNQDEIRQAVKTTTG
ruotaba/1-517 DGKNPQMAQDGIKDLIEALISFKVVAESFNVAQILPMATAAVRQSVNKA SILEQVKEATG
aersang/1-515 -----IMDQAGIDLLCQILDNFAHESQILKADKLLPKATAAIRQSKNYQEILD TVKERTG
suiacid/1-517 -GQK--WMRQEGIDRLIQTLSFNVEVCWHYNVDVIRPMATAAIRQSANQEDIFAQVIEATG
glosulf/1-517 KSVV--MSQGTGIDLLIEVLQSFKIVADKAGVDKLFPPVATAAIRQSDNRDDILAQVKKQVG
funculc/1-519 EQAI--LDQTDGIDKLISALDSFKYVIESYQADTVI PKATAAIRQSANQASIEEQVEQATG
hutsour/1-517 QGQK--WMNQAGIDRLVEALNSFKQAAESLEANQIKSMATAAIRQSANQAEIFQQVQAKTG
ignruof/1-517 GQTI--LDQAGIDRVIMTLNSFKQVMRRFQVDTV KAMATAAIRQSSNQEKILAAIDQATG
erecole/1-517 GQVI--LNKDGLNVLIEILHNYHQVCQEFKVDITLPKATAAIRQSSNQADIDTVKTVTG
vagmass/1-517 GQTV--MSQAGIDKLVETLQSFKYVWQAAQAQTLKVMATAAVRQSANQEDILAQVKAQTG
allotit/1-519 -----TMSDQGVNLDLIDILKNYADIAKLYQIKQLPIATAAIRQSQNADRIQLQVRKKTG
alkkapi/1-521 ----NIMSEEGIQKLITVLKSFTEIAGRYAIDLISIATAAIRSKNKNTILRRVEEEVVG
markali/1-519 ----STMSKKGIDVLAALLESFTEIAERYHIETMIPVATAAIRSKNKAAILKTVKSKTD
atotaba/1-521 ----NHMSQEGIDVLIQIMKSFREISVRYKIDALLPVATQAIRQAKNAEIVQQI TAATD
desince/1-519 ----KILNQEGIDKLTEIMHSFKQVAIQYEVDTLMPVATAAIRQSNQEQEILDHKEETG
triilyi/1-512 ----KMSQAGIDMLVKVLKSFKAVADQYKVSVLMPVATAAIRQSSNRDDIMKQVRKATG
graseri/1-519 ----KVLSPQEGIQNLSDILSSFSVVLKEYKVEVTVIPVATAAIRQSTNQEKIVKTIKKNTG
jeocaen/1-522 ----KWMQAGIDVLEILQSFQVAVYYQVALLPMATAAIRQSSNREEIEQVAKAG
entital/1-516 ----ELSESGTAKLVEVIQLFQELSEFVDVEI IATATAVIRQATNRQAVLAKVEQTK
bavseil/1-519 ----GVLSAEGIAVLITAVKSFKAICDGAKVNTLLPMATAAVRNATNQAEIVAATKEATG
lacBL23/1-509 ----EILPDTVDAIVQAFDAINQIFKDYGVPTVNVFASTSWAEADNAEFVRDQLYTRTG
lacsela/1-510 ----EQIETVDTVIEALTACQRLKDYGLKPDVVATNAFHEAANA EYVRNQIYVRTG
agrcomp/1-512 ----VIHSQTVNEISTALFSVQQLLTDYQVPETQCYATHSFHEADNGEFVRDQLFERTG
schshen/1-515 ----RIQPATVNRLLTEVLNQARLIFAGVGADAVYVVATHSFVAEDNAEFVRDQLQDRTG
lacplan/1-509 ----TIDYDSVEQAAQALSGFVQIMNDYGVKDYHLWGSWSLSANNADYIQDQLLVRTG
frusanf/1-509 ----TIDYYSVEQAAQALSGFVQIMNDYGVKDYHLWGSWSLSANNADYIQDQLLVRTG
nicspur/1-512 ----VVHSDTVNEIATALNVIKDLLNEYHVSNYQFYATHAFHEAKNESEFVREQLERSH
loiback/1-509 ----GIDYDVVDEAVSALRGFQQQLMTDDGVTDERVVASHTITDAENISYVRDQIYTKTG
apitimb/1-512 ----FIAGDVTNEIVSSLEVVKNLLLDYQVSDYQFFATNAFHEARNSEFVRDQLQKRTN
levbrev/1-510 ----DIDFETVAAEAEALRGFLQIKIDYGVTHYQLWGSQALSAPNAEFIRDQLYVRTG
secmixt/1-510 ----PIQFELVDQMTSSLRGFLQLLNDYQIEDYQLWGSSEALS RATNADF IADQVFLRTG
weisaga/1-513 ----PVQFTEVNVKIVEALTGFIQILRDYDIENYQLWGSQGLSQA INADF IADQIFLHTG
ligacid/1-508 ----VLSVDSVNQIVDGLRGFVQLLHDYRIKDFQLWSSQAISNVKNADFVADQLYMHMTG
lenhilg/1-521 ----RVQYIEIVSKVAEALTGFIQILHDYGVENYELWGSQALSQA INADF IADQLFMHTG
pausueb/1-508 ----GTTAAIVDDAIDVLVKFKMVMADYGVTDANLVASHAVSQAENINFIQDQIYIQTG
furmili/1-508 ----RIDPERSDEVVTILQRFLQLLNDYNTDYLRLVASHITRAENIDYIRDHIYIMTG
perbeni/1-504 ----TVPMELESLELITLQGFRI LADYGVITRHIWASEMFMQADNAAYIADQILHATG
lignage/1-502 -----HYPKNIQMVAEKLRGFQQLLRDYGVKNYRLWGNQQLDDVSARYLAEQIFVRTG
leuholz/1-497 ----IFSTEIMRRALEQVHKFQQLLRDYAVKTVQLFGSETLSQMKNAYVFADQVESTTG
lacprot/1-510 ----NLSQIGIDELIKTLRIFEDIKLYHPKKTIT TATAVIRQARNSSDVLKELERRSN
anobury/1-524 ----KVSYETVEEACDVTGFRQLMQEYQSKHYRAVATSAIREAQNRDYLVDQIKLKTG
cloacet/1-516 ----KVSYEIANEVCEVLRGFKKLMNEYKVKTYRAVATSGIREAENNDYILDQIYSKTG
petxyla/1-521 ----KVSFETVDETCEILKGFKRLM TDYHIKTYRAVATSAVREAQNKDYIVDQIKLKTG
theacaen/1-520 ----KLSFESVKKTCEAIQGFKRLMADYGVTEWRVVATSA LREANRDFMIDRIKQFTG
blamass/1-514 ----RLEMETVDELCEILLNDFKRMMAEFVGSWRACATSS LRELENPVILEQIYQRTG
anafaec/1-521 ----KISHTMVNELCQVLHGFTKKMKEYHVEDY TACATSALREALNLLILDQIKITSK
lacsacc/1-513 ----KISPEMEEELCSVLGDFVRIMDGYKVNAYRAVATSS LREAE NSFLILGKIRQLTG
petatla/1-512 ----KVSFESVDKTECILKNFRMTMDDYGVKRYVMMATSAIREASNKDYIMDQIKLKTG
aceratic/1-513 ----KISJETIKEACKILKNFKLMLDYRVTEYRAVTSGIREANNDYILEQIYRISG
seralka/1-514 ----KVSYEVVDEVCQILKGFKRLMNTYKVQTYQAFAT TGIREAENRDYILDQIKSKTG
anacarb/1-518 ----RVSFKTVDETCEILKGFKRLMADYGVKMYRAIATSAVREAQNRDYIADQIRLKTG
geoferr/1-520 ----KVRFETVDETCEILKGFKRLMNDYHIETRYRAVATSAIREAQNRDYIVDQIKLKTG
tincali/1-522 ----KVSYETVEHICEILTGFFQLMQEYGSRHYRALATSAIREANREYILDQIRLKTG
selbovi/1-507 ----IYQSELGKIFSLQGFQVLDKDYGVKRYHFWASQQLID DVTARYLAEQIEVRTG
prohipp/1-516 ----QISFSAVSELCELLKGYRRLLA EYGVTEYRLVATTAIREADNQYIIDQIRVKTG
spooovat/1-515 ----RISFGAVSEICE LLKGYRRLLEGEYGVDRYRLVATTAIREAQNPYIIDQIKVKTG

denquer/1-519 -----RISFLAINELCELLQGYKRLLAEYGVDRYLAVATTAVREAVNRYIILDQIKVKTG
calkiri/1-518 -----KISFKTVDIEICEILKGYKQVLNDYRIKQYRAVATSAVREATNKDYVVDQIKLKTG
////
alimeng/1-510 IEFRVVSGQEEAHYGYLAVVNSI-----P--F-EQGVTDIGGGSTEITYFQDRKLVY
efflacu/1-515 IPFRLLTGEEEAAYGYLAVVNSM-----N--V-SDGISVDLGGGSTEVLTLIRDRKLQE
tumflag/1-518 ISVRILSGPEEAQYGYLAVVNTM-----N--V-RDAFTVDIGGGSTEVTWVEDRRCVH
kyrtusc/1-515 IPFRVVSQEEEAARYGYLAVVNSL-----A--L-EEGVTVDIGGGSTEITVFRDRRLVLR
sulther/1-503 LDIQVISGEEEALLGYSAITHTL-----R--V-DTAYVIDIGGGSTEISLLEGGKLI
ferorga/1-501 LHVEVISGVEEAALGYSAVAHTM-----T--L-CDALLDIGGGSTEVLTVRGGSAIA
colludi/1-486 LTFRVLDFGFEGRYGLGVINTI-----D--V-QDALLFDIGGGASIELMYVRGRQLEQ
rosviet/1-509 MNIEILSEEQEAIFYGYLAVISST-----P--A-ETALTDIGGGSTEITFFEERKLKE
anocald/1-508 FRVRVLTGEEEAAYGFLAVVNST-----P--I-PEAVTIDIGGGSTEITYYKNRQLVH
bacsala/1-510 MDIEILSEEQEAAYGFLAVISTT-----P--A-DTALTDIGGGSTEITYFENRKLHI
calerzu/1-509 LQVKVLSYEAEAYGFLAVVNST-----S--I-TEGITIDIGGGSTELTYFKDRKLIE
halyeom/1-513 FDMRILSEEEAAYGYLAVVNST-----P--I-TEGVTVDIGGGSTEITYFKDRKIE
priarya/1-508 FTLMLLNEYEAIFYGYTAVTHST-----D--I-KEGIVDMGGGSTEITYFRNRELIE
mancuni/1-511 LDIQILSEQEAAYGFLAVVNTM-----P--V-QSGITIDIGGGSTEITYFKDRKLIH
ocesoja/1-511 LNIRILSEEEEAAYGYLAVVHST-----S--L-KEGIVTDIGGGSTEVTYFENRELKD
lystimo/1-515 IRIELLSSEEAEAYGFLAVVHSM-----D--T-PSAVTIDIGGGSTEITLYIEKRLQK
paesuae/1-508 FPDVILSEEQEAAYGYLAVVNSM-----D--V-PEGITIDIGGGSTEVTYFKDRELLH
cytspoon/1-514 FNIQILSEQEAAYGYGYAIHHT-----P--I-EEGVTIDIGGGSTEITYFKDRKLIH
aqualbu/1-510 LHIRILSEKEEAIFYGYLAVVNST-----S--I-KEGIVTDIGGGSTEITYFRNRKLIE
metlito/1-509 FVIRILSEYEAEAYGFLAVVNTT-----P--F-DHGITIDIGGGSTELTYFANRKLIS
robkorl/1-506 YDIDILSEEEEAAYLGLAVVNTT-----A--V-KDGVTDIGGGSTEITYYQNKTLVH
perfrig/1-509 FSRIRLSEYEAEAYGFLAVVNST-----Q--I-SSGITIDIGGGSTEITYFENRKLHI
niaendo/1-511 FDMKILSEKEEAFFGYAVVHST-----P--I-DTGVTIDMGGGSTEITYFENRKLHI
liscost/1-511 LEIAVWSNAERFLHSQAALKTPNFSQ-L--I-SEGTMIDIGSGSIQLTVYDEGEFMM
brehumi/1-511 ISIRLLSGEQEAARYGFLAVASSM-----N--L-EEGITIDIGGGSTEITYFTDRRLQE
anedani/1-509 FTFRVLSGEEEAAYGYLAVVNTM-----S--V-SEGFTIDIGGASSELVKFADRKLVE
paearte/1-509 LPIELLSEQEAAGYGLGMINTM-----P--V-RDGFLLDIGGGSTEIVLTKDRSLVQ
lonpaci/1-502 LTIDVNLNGQEAAMYGFIGATYYL-----P--I-QEGFFIDIGGGSELVYFRDRKIIH
cohther/1-517 LSIELLSGDEEAARYGSAVLRMT-----D--V-ADGFLVDIGGGSTEISLIRNRKLTE
spolaev/1-505 LNVEWLANAEERYLHNQAVAYNTDTFSE-L--I-QDGMTLIDIGSGSMQLTVYNDGHFLF
stamass/1-510 VDIQIVPEDEEAAYGYAVVHTT-----S--V-PDGVTVDIGGGSTEITLTKDRKLIH
macarme/1-510 IDVRIISEEEEAIFYGYAVVINTL-----D--Y-TDGVTVDIGGGSTEVTYFEDKELKF
maccase/1-511 IDVRIISEEEEAIFYGYAVVINTL-----D--Y-PDGVTVDIGGGSTEVTYFEDKELKF
fachomi/1-520 STLRLSEKEEAASYGQYAVNHSL-----S--L-EDMVTIDIGGGSCELTSLHNSNLVH
ruotaba/1-517 LDINLVSEEEEAASYGQYAVHST-----V--V-NDAITDIGGGSCIEITYEDKNMVQ
aersang/1-515 ITIDIVSGDKEAAYGYNAIHTM-----S--D-HDALTIDIGGGSTEITYFKNKEIQ
suiacid/1-517 FNIELVQEEEAALYGYAVVHTN-----T--I-KDAITIDIGGGSCIEITYEDKQGVY
glosulf/1-517 IEITILSEKQEAATFGQYAILHSV-----D--V-PDGITIDIGGGSCIEITLTKDRKLIH
funcul/1-519 IRIQLVSEQEAALYGLYAVLHST-----T--I-EDAVTIDIGGGSTEITYFEDKELKH
hutsour/1-517 LTIELISEEQEAALFGYAVVHTM-----I--T-PTAVTIDIGGGSCIEITYFEDKQPIH
ignruof/1-517 IQVELLSEQEAAYGYAVVNTM-----N--V-HDAITIDMGGASTEVTYFKDKEMVA
erecole/1-517 LTIEIVTSEEEAKSGAYAVHST-----D--I-DNALTIDIGGGSCIEITLTKDRKLIH
vagmass/1-517 LTIEIVSEEEEAASFGQYAILHSL-----P--I-EDAITIDIGGGSCIEITLTKDRKLIH
allotit/1-519 VDLELLSEKKEAAYGNYAVRHTL-----P--I-QDGISIDIGGGSTEITLTKDRKQVRA
alkkapi/1-521 LKLDILTEKKEAAYGNYAVRHTM-----D--I-VEGISVDIGGGSTEVTYFKNKEVKK
markali/1-519 LALRILNEEEEAIFYGNYAVRHTM-----D--I-RDGVTDIGGGSTELTFLKDRKQVVD
atotaba/1-521 IEMRILTEKEEAIFYGNYAVRHTM-----H--Y-PDGLSVDIGGASTEITLTKDRKQVVD
desince/1-519 IKITPLLAEEQEAAYGNYAVLHSI-----D--E-PNGVTIDIGGGSTEITYFEDKELKH
triilyi/1-512 IEMMLLPEEKEAIFYGNYAVLHST-----Q--F-SSGITIDIGGGSTEITYYENKELKQ
graseri/1-519 IKLQVFSEEEEAIFYGQYAVVHTI-----S--Y-VDGITVDIGGGSTEITYFKNKLIEN
jeocaen/1-522 IDLMIVPEEKEAAYGNSAVVHTL-----Q--T-KDSVTVDIGGGSTEVTYFENKEIKQ
entital/1-516 LNLRLSEEEEAAYGQYAVVHTT-----Q--F-SEGVTDMGGGSTEITYFKDQNIQH
bavseil/1-519 VEIQIVSDEHEAIFYGQYAVVHST-----H--Y-KNGVTIDIGGGSAEITHEFQGNIN
lacBL23/1-509 WLIKTTSLSEEAFFRTQAIMVKFPQFKS-I--T-QKGTVIDISSGSVELTTFNSGVFGF
lacsela/1-510 LEIEWINPSEQEALYRNQAAAVYLPKFNE-I--V-KDGTLLLDVSSGNVELTAYTGQGFIF
agrcomp/1-512 FQITWLSQSQEALFRSQATNAYMGDFPE-I--I-AKNAVLIDISSGSVELTAYSSGKFI
schshen/1-515 HDIMYLNQSQESLYRNLATDAFLPSFRD-I--I-KTAAIILVDISSGSVELTAYRERQFIF
lacplan/1-509 LKIDWLSSSQETYLRSVAVAVHFPFRFKQ-M--I-TKPTYLLGINSGSVGI SHYDQSNFVF
frusanf/1-509 LKIDWLSSSQETYLRSVAVAVHFPFRFKQ-M--I-TKPTYLLGINAGSVGI SHYDQSNFVF

Anexos

nicspur/1-512 FNIKWISQSQEALYRNLATNTYLKDFDK-I--T-QKNTLLIDISSGSVELIAYRDGKFTT
loiback/1-509 LTVHFMTVSEELMFRYQAAAAYLPNFR-E--I-DEGTVLIQIGASSITLMVFQAGELTL
apitimb/1-512 FEINWISQSQESLYRNLATNFYKDFKK-I--V-RDNTLLIDISSGNIELMGYKNGDFIY
levbrev/1-510 LEIRWLSMSEEFYVRNEAVALKFDHYHH-L--V-KHHAAIIGLNSGNTTSLFFAQQLVA
secmixt/1-510 IKLNWLSISEETYYRNQAVLVDLHQKRVPT--E-QNLTYLIGINSNTTITFEFNHFSFVY
weisaga/1-513 LEINWLSISDEAYYRNQNI ALEFAKKQS-S--A-PGIVYVLIIGTSGNTSITRFDNGNFTIT
ligacid/1-508 LSI EWLSLSQETFFRVQEV LHRASQSKK-K--L-KGITYIISITS GDTMIVKLDGDKFTA
lenhilg/1-521 LEIRWLSMSEEFYVRNEAVALKFDHYHH-L--V-KHHAAIIGLNSGNTTSLFFAQQLVA
pausueb/1-508 MRPKLLTVNEELMYRVQACAAFLPHFKK-L--I-QKGIVIIQV GASMMTLTIFQDQGITL
furmili/1-508 VTLHFMTVNEESLSFSYEA-QLLSNFNE-L--I-SGRTVLMQV GASMVHFMFVDGHLTL
perbeni/1-504 FTIESLNSSQEVFVRNQALRMFYQFAT-L--A-AASLQIIGISSGRLDIGYYAKQAFKY
lignage/1-502 IHVHWNLSQLTYKAIGIITHLDNFKE-I--T-SEQTFLLSLGSERVLSQFQQKFFVS
leuhoiz/1-497 LKIQWLNQNEEFYRQLALRQADNQQQL-M--QAGQNTFVGLGMSSTRIDLGYFEHDFAF
lacprot/1-510 FKIRLLSEKEEAAYGQYAVSHLT-----T--F-EEAYTVDMGGGSTEVTYYRGNELIH
anobury/1-524 LKVEVLTNAQERFLTYKAIARENLPDHKT-I-R--KDGVMVVEIGSGSIEMSLYHQGALQR
cloacet/1-516 LDIEIINSSVKRFLAYKGIRESLQNYQK-L-R--AEGVMVLDIGSGNIEVSIYQQGSLTF
petxyla/1-521 LDIDIVSNSEERFLTYKSLREKIPNYRE-I-R--NAGTMLLDIGSGSIEVSYRGGHSLVF
thecaen/1-520 FDVEIINNSQEKFLTYKAIKWQLMNGI-I-DI-SEPTLILNIGAGSIQLLMENNLLAS
blamass/1-514 IRVEILSNAEQHFLGYKSI AAIESGFKK-A-I--QKGTAILDIGGGNLQISLFDKDALVT
anafaec/1-521 LKVSIIINSEQRFLLYKAVALKEKRFNQ-I-I--EHGTAIVDVGAGSIQISLNFKGLIT
lacsacc/1-513 LKVTILSNSEQRFLGYKALATMETDFNK-I-I--EKGTAIVDVGAGSIQISLNFKGLIT
petatla/1-512 LDIRIIDNSQEQYLTALKKHKLEHYNT-V-T--AEGAVVIVI GAGSIQITTFKLGELKS
acestic/1-513 LSLEIINNAQERLLTYKAI EDYLPDFSN-I-K--QAGVLIVDIGSGGVEVSLYD SKLQF
seralka/1-514 LNVELINSSLRFLTYKAVREKLPNYQQ-R-R--SEGSMLFDIGSGSIELSIYSNGNLTF
anacarb/1-518 LNLEIISNAERFLTYKAIARENLSDEK-V-R--QEGAMIVDIGSGSIEVSYRGGHSLAM
geoferr/1-520 LKIDVIDNTEERFLTYKSIRENLPYHQK-I-R--SEGAMIVDVGSGSVEISVYKNNHLAL
tincali/1-522 LKVEVINNAQERYLTYKAIARENLPDHA-I-R--EEGVLVVEVSGSGSIEMTIYDRGSMQL
selbovi/1-507 LAVTWLSTSQINFLRATAMGGTKLFHK-I--A-ERSTYLLSISGVAATLSHPDHGHFVH
prohapp/1-516 FRVEVAGMTQEIFYKYVALYRRMQEQL-ANR--TDAVLFVDISSGGLGITLYKQGALIY
spoovat/1-515 LNVEVDMPEEIFYKYVSLVKTVDNRGL-LNS--QDGLMFLVDISSGGLGITLYKEGNLRY
denquer/1-519 LRVEIVDMPQEIFYKYAAVFNKI QDHGL-TNT--PDGLLFVDISSGGLGITLYKNGALKY
calkiri/1-518 LHIEVITNSEEKYLTYSIRDNLKDYKR-F-R--NERTLIVDVGSGNTEMTSYNKGKQLQF
///
alimeng/1-510 STSIPYGAVSLTREAHS-DPPTAK-DLKALEKAILSQLEQHSWLKD-----LNCP----
efflacu/1-515 SHSFPFGIVTLTKRFLQRE-IPDQ-EIVHLKQFLQQQFSSRPWLFN-----QKFP----
tumflag/1-518 KISFPFGAVSLTQRFFKSD-NPAQD-ELKKELEAFREQFAGAPWLTK-----RPRVPP----
kyrtusc/1-515 ADSIPYGAVSLTREFLRSD-LPSMK-DMKNLDRIQRELDRRPWLGT-----LGFP----
sulther/1-503 THSFPFGAVTLSHNWPT---VSTRE-SIQSAISPIVAALRAKPYLTAH---P--GIE----
ferorga/1-501 SHSFPPIGAVTANRDLGQ---LS-RE-QMMQRIQPLFAKV---ELLTQA---K--NLE----
colludi/1-486 VISLPYGAVNLTKRFQNV---PEKM-HGETIYREFMKEQFSNIDWLNQ---I--HVS----
rosviet/1-509 SHSFPFGVSLKQFQFIKGD-SITEE-ERKNLIQFLQGEFSLKPLWLN---K--RVP----
anocald/1-508 YESFPFGALS LKQAFVSGN-VPTQE-ELQRLSSYLTEQFQLLPWISR---K--RVP----
bacsala/1-510 SHSFPFGVSLKQRFIQGD-SITEE-ERSTLTDLFLSEFSRLLPWLKN---R--RVP----
calerzu/1-509 YHSFPFGVSLRQFVKGD-VPTQE-ELKQLSTFLLDQISQLEWLKD---K--KVP----
halyeom/1-513 SHSFPFGALTLKRDFIEKD-LPSDK-EMSELRHLYTSQFKSLPWLTN---K--DVP----
priarya/1-508 YCSLPFGSLSLRDLFVKGS-VPNDK-EKKQIRQYVRAQLEGIPWIFN---K--TVP----
mancuni/1-511 SHSFPFGVSLKNQFLKGD-SVTLE-ERKNLRSFIEAQLQVLPWLKE---S--NKC----
ocesoja/1-511 SHSFPFGALTLK-DFFKKS-IPTEE-ELTTLRQYLRQFATLPWLKD---R--EVK----
lystimo/1-515 TYSFPFGTVSLKEKFFVRS-DVISNT-ETKELRQYIKKQFTNIPWIFN---A--GLP----
paesuae/1-508 SYSFPFGALTLKQFQFIKGD-TPTEE-EWKRLRDLFKESYRSLSWIKD---K--NVP----
cytsson/1-514 SHSFPFGVSLKBERFFQGS-DTELE-NHAKLNEFIKASLNQLPWLKD---V--GAP----
aqualbu/1-510 SHSFPFGALTLR-QFFQKE-VPTES-ESRKLNVYLQEQFNLLPWLKN---K--TIP----
metlito/1-509 YHSFPFGALS LKQFQFIKGD-VPNTD-ELKELRAYIYKQFQTLDWVKN---R--KLP----
robkorl/1-506 SHSFPFGVSLKKEKFMSSG-RMTNE-EKMALQKVMMALESPLWLN---K--HVP----
perforig/1-509 YHSFPFGVSLKQFVVKQE-IPTEK-EVDDLKQFLSREFHTLPWLSN---K--ELP----
niaendo/1-511 YHSFPFGVSLKQFQFIKKN-PI TEQ-ERKGLSDFIQDSLKQLPWLKN---L--QVP----
liscost/1-511 SRNIKGLPLRVRELLAELK-VQTSN-FADLLEDFIFSKIRDYAQFAPK-DV--A---YK-
brehumi/1-511 CTSLPFGVVTLSKQFLQHD-PPTSE-ELEQLRAYVAEQLAACPWIWS-----KRCP----
anedani/1-509 SYSFPFGAVTLAKQFFRNG-IP TDA-ELVSLEKYLKEQFLAHPWIKE-----KKYS----
paearte/1-509 AVSFPFGVSLTRQYAKNG-MLSQD-SLKELEQHVQAVARHSWLKQA---S--GQP----
lonpaci/1-502 STSLPFGAVNVFKKYTHQG-LMTSE-QQMLKDKLEKEFSALS WLNQH---P--HLP----
cohther/1-517 AVSFPFGCVNTASRHALNGAVSFS-QLEQIGELIQSALRSEPWIAHH---A--GLP----

spolaev/1-505 SRNIKLGPLRIREMLGDLE-SKTGD-FVEIMEDYIRSKIDGYHQFAPK-GV--V---YK-
 stamass/1-510 AHSFPFGVVTLLKRKFFNGE-PHNNDKNSIKKMEKFLSEQFKSLDWIQD---Q--DIP----
 macarme/1-510 SHSFPFGVVTLLKQLFFDQK-EHNDEEAIKQAGKYIKTQFESLKWLEK---R--KCP----
 maccase/1-511 SHSFPFGVVTLLKQLFFDQK-GHNDKEAIKQAGKYIKTQFESLKWLEK---R--KCP----
 fachomi/1-520 YHSFPFGVVTLLKERFFKDV-PHNDPQAIENRKFIEKQFKSLDWLKK---C--QVP----
 ruotaba/1-517 YHSFPFGVVTLLSKQFFQDK-DHNDPNAIEAVQEYVRKQFKQFDWIKK---A--KLP----
 aersang/1-515 SHSFPFGAVSLTEKFFADK-DHDDKSAIKKARKFVRKQFTDFDIKE---A--QLP----
 suiacid/1-517 LHSFPFGAVSLKQDFEFGK-AHNDPDAIAAAREYVSNAFKEYEWIRK---A--KKP----
 glosulf/1-517 FHSFPFGVVTLLKEKFFKKN-KHNDASAVDAVRKYIREQFKSLPWLKK---A--KLP----
 funculc/1-519 YKSFPFGAVSLRKDFFTDK-AHNDPEAMEAVRKFVRKQFKAFPWIKK---A--KLP----
 hutsour/1-517 FHSFPFGVVTLLKEKFFKDK-DHNDPEAIDELRAYVKKAFKSLDWLRQ---A--QVP----
 ignruof/1-517 YHSFPFGVVTLLKDRFFDQK-SHNDRKAIDKTS AFLKDAFKSLPWLKK---S--KLP----
 erecole/1-517 YHSFPFGVVTLLKQDFEFANK-DHNDSDQAMSNLSNFVKKAFRDYDWIKK---A--KVP----
 vagmass/1-517 YHSFPFGAVSLKQKFFNGL-NHNDSAMAALRRYVKNQKLSLDWLKK---A--KLP----
 allotit/1-519 SHSFPFGVVTLLKQHFQDK-DHNDKAIKKAASKWVADQFQEFPLWLD---C--QVP----
 alkkapi/1-521 VHSFPFGVVTLLKQDFEGL-DHDNKAIAKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 markali/1-519 SHSFPFGVVTLLKDFEFGK-DHNDKAIKKAQKVVKEQFTFLDWLPD---V--NVP----
 atotaba/1-521 SHSFPFGVVTLLKRKFFGGK-EHNDPKAIKKAQKVFVEEQFKTLDWVVK---A--KVP----
 desince/1-519 STSFPFGVVTLLKEMFFDQK-AHNDRKAIAKKAQKVFVEEQFKTLDWVVK---A--KVP----
 triilyi/1-512 YHSFPFGVVTLLKQHFQDK-EHNDKAIKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 graseri/1-519 YISLFPFGVVTLLKQDFEGL-DHDNKAIAKKAQKVVKEQFTFLDWLPD---V--NVP----
 jeocaen/1-522 YHSFPFGVVTLLKQMFQDK-EHNDEKAIKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 entital/1-516 SHSFPFGVVTLLKQMFQDK-EHNDEKAIKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 bavseil/1-519 WISLFPFGVVTLLKQMFQDK-EHNDEKAIKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 lacBL23/1-509 SRNLSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 lacsele/1-510 SRNLSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 agrcomp/1-512 SRNLSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 schshen/1-515 SRTLKLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 lacplan/1-509 SRTLKLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 frusanf/1-509 SRTLKLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 nicspur/1-512 SRTLKLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 loiback/1-509 TRELQGLPQVAVQMAQLE-HQVDT-YEDVLADYLSKLLDVWRLLEPE-K---Q---FK
 apitimb/1-512 SKTSLGLPVRVYETMSDVK-PDISN-FNEVLHDYIDSQLEFVRLLPN-IE--S---TK
 levbrev/1-510 SHNMLGSPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 secmixt/1-510 SNYSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 weisaga/1-513 STNFSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 ligacid/1-508 NQTFSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 lenhilg/1-521 STNFSLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 pausueb/1-508 AQEVPLGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 furnili/1-508 TRELQGLPQVAVQMAQLE-HQVDT-YEDVLADYLSKLLDVWRLLEPE-K---Q---FK
 perbeni/1-504 SRNALGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 liqnage/1-502 TWNIDVLEHSLSDLDVID-LSPSD-PIEVVDDYIGSKLENLRKHFVLP-NQ--Q---AP
 leuholz/1-497 SQHSVAVGPVRIKELVLDLQ-RSVPN-YVEVLDDYISSQIVDFGRLLPGR-RR--D---QPS
 lacprot/1-510 SHSFPFGVVTLLMEMFFQDK-EHNDKAIKKAQKVVKEQFESLDWLFD---L--EVV----
 anobury/1-524 THNLKLGHLRRLREVLSLE-QRTQD-FPNLLEEYIESHLDILRFIRE-R-Y--Q---LN
 cloacet/1-516 SQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 petxyla/1-521 SQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 thecaen/1-520 SQSLKLGALRIKESIAKIE-KHTLN-FSRVLEEYIEAHIESVEYLKS-S-N--E---LK
 blamass/1-514 TQSIRMGSLRIRERLKELE-KTTPH-YDRLIEEFIRNDLISFQRLYLKD-K--E---IS
 anafaec/1-521 TQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 lacsacc/1-513 TQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 petatla/1-512 SQNVKMGALRIKESIAKIE-KHTLN-FSRVLEEYIEAHIESVEYLKS-S-N--E---LK
 acestic/1-513 TEYVKIGSLRVMETLADLE-KITLD-FASVIEDYIESNIYILKDRIK-P-Y--N---LS
 seralka/1-514 SQDLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 anacarb/1-518 TQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 geoferr/1-520 TQNLKLGSLRRLKEILSELE-SKTLD-FPKLLEDYIKSNADILLKTFD-INT--N---IQ
 tincali/1-522 THNLKLGHLRRLREVLSLE-QRTQD-FPNLLEEYIESHLDILRFIRE-R-Y--Q---LN
 selbovi/1-507 AWNIGLGYLEIDQLTNDLR-HAATD-VSGIISDYISSKQLALRHRLEA-EG--R---EA
 prohapp/1-516 QQNLHIGILRIKESFEKHQ-RESLH-FHKALEEYIYSVIAPEVQEELGR--H--Q---IK
 spoovat/1-515 QQNMHIGALRIKESFDKNQ-RDSAH-FQQALAEYIYSTIEPVETEMSQ--H--N---VK
 denquer/1-519 QQNLHIGILRIKESFEKHQ-RESLH-FHKALEEYIYSVIAPEVQEELGR--H--Q---IK
 calkiri/1-518 SQSIKLGALRIKESFEKHQ-RESLH-FHKALEEYIYSVIAPEVQEELGR--H--Q---IK

Anexos

////

alimeng/1-510 -VIGMGGTARSVGRIHQR---QRDYPLNILHGYAMRPAEVTAILDMVRSI-LPVEKRSETN
efflacu/1-515 -LIAMGGTARNLGKIHQQ---QIHYPMASLHHYLLDDQSVDRIFQWIRKL-SLEQRKEVN
tumflag/1-518 -LIAMGGTARNIGNMDQK---KRNYSFQSLHGYTMNPAVAQSYQTLVIRL-PLDKRRKIK
kyrtusc/1-515 -VIGMGGTARSLARIHQ---RRHYPLLIHGYEMWPTEVTAIILDMVRSI-PIVKKRNIT
sulther/1-503 -IIGIGGTLRNLASVHQA---RIGYPLSITHNYTMSAEELRETIVWLGLAL-PVNQRKKVE
ferorga/1-501 -LIGIGGTTIRTIARVHQ---LSGYPLALTHNYFMRRSDVEETVAHLDLI-PLARRKKVE
colludi/1-486 NLIIGMGGSAKTLAKIDHN---KKGLDFKRIHGYEVSQKSLHGYEQRINSL-SNDQRKKMK
rosviet/1-509 -IVGVGGSARNLAQIDQQ---QRDYEIAGVHQYILSGNTISSIRDQLFPL-SYQEIIEKVE
anocald/1-508 -IIAMGGGSARNVQVHQF---MKNYPLAGVHQYEMNQKDLMEVERLLTSL-AFEDIQKLE
bacsala/1-510 -IIGVGGGSARNIAQIDQQ---QKDYELSGVHQYVLSGTAISSILEQLFPL-SYKIEIEKVE
calerzu/1-509 -FIGIGGSARNIAQVDQR---LKNYPLGGLHQYKMNSSDLRIVKNHLTKL-TIDELKKVE
halyeom/1-513 -LIGIGGSARNLVQIDQN---LKEYPLAGLHQYKMKDSDLAIFIKNYLFTL-SMKKLQKVE
priarya/1-508 -LIGMGGSARNLAQLHQH---LINYPLSGIHQYKMDVSTIQEIKKLSL-TLTELQNL
mancuni/1-511 -LIAIGGSARNVAQMNQA---EENYPIAGVHQYEMNIDSLELREKLVGV-EYKAIESIE
ocesoja/1-511 -LVAIGGSARNLAQIHQN---LESYPLAGLHGYQMFQKDIIEVSSYLTSL-KPSKLAKVE
lystimo/1-515 -IIAIGGSARNVAQVHQH---QINYPISGIIHGYITKENLANLNSKLQSL-TFSELQRL
paesuae/1-508 -VIGIGGSARNVAQVHQA---DISYPMGLHQYEMTAKEVHDSDELSSM-SLKKREKVD
cytspon/1-514 -IVAIGGSARNIAQVHQN---LINYQVAGIHQYQMTNQQKLEKFLFGL-NIEELQKLE
aqualbu/1-510 -LIGIGGSARNLVQVDQS---LKNYPLAGLHQYKMNSSDIHQTLKYLRL-TVELKKVE
metlito/1-509 -IIIGIGGSARNVAQVHQH---RIGYPIAGVHQYLMNEDINEINQYQLSL-TFSELQRL
robkorl/1-506 -IVAIGGSARNIAQVHQH---VKNYPLAGIHQYDMSPNLDLNNILRMMETM-EVSDIEKLE
perfrig/1-509 -IIAIGGSARNVQIHQA---MQEYPLAGVHLIEMTHRNLDVQHFSL-TL-SHELQRAD
niaendo/1-511 -VIAIGGSARNIAQIDQT---LKKYPIAGIHQYVMSYSDLQKIOMYLGQL-TIEQLEKVE
liscost/1-511 HFILIGTDLFFKQAFMG---G---SED-----HQITRDYFDQLYMHMLEM-PEQVLAKKY
brehumi/1-511 -VVAIGGTARNLAKIHQR---QIHYSMASLHHYTMSAAQVDEMELTGLSL-PLQQRKQLP
anedani/1-509 -LIGMGGSARNLAKVHQK---MMRYPFASLHNYHMKKYHVDTVFHYLKL-SPTQMGGVE
paearte/1-509 -LVGVGTVRSLGKMHQA---YVKYPFESTHNYPIAGDAAGELFELLRKL-PIGKRKNFP
lonpaci/1-502 -LVCIGGATRTICKIHQK---QRKYPLKQKHGYEMTMTQIHELHNFITSR-TEQQLSQVE
cohther/1-517 -LIGLGGTARNLAKLQCR---AGEYPIANLHGYEVTGKTLNLANLNSKLQSL-SLDKRRKIP
spolaev/1-505 NFVLVGTDLALFQTFME---T---SSN-----KISRTRFAELYQHILTI-PPQALAKE
stamass/1-510 -LVGIGGSARNVARIHQ---NLSYPIAGVHQYTMDDKDIQKVYDMIRKS-SRDDLTNLD
macarme/1-510 -IIAIGGSARNIARIHQ---LTEYPIAGVHQYGMKEKDELELVFETLINT-PEDNLEDLD
maccase/1-511 -IIAIGGSARNIARIHQ---LTYPIAGVHQYGMKEKDELELVFETLINT-PEDNLEDLD
fachomi/1-520 -LVGIGGSARNIAQVYQR---LTDYPIAGIHGYHLSHKMLEKTLDFQSK-SLDELDDLD
ruotaba/1-517 -IVAIGGSARNIANVHQ---LVDYQVAGVHQYSMDEDDIKETLDFIST-DIDDMTDIE
aersang/1-515 -IIAVGGSARNVTRVHQL---QHDYPLAGIHNYQMSEEDLEDLDFLFLS-SDKELRKL
suiaacid/1-517 -IIAIGGSARNVANVHQL---ATNYPMAGIHGYEMNEVLSDTLNLVFNVT-PYEEMSDIE
glosulf/1-517 -IVAMSGSARNIAYVHQ---LNEYPIAGIQGYHMTASLNQTLDFMAT-DLEDMGNID
funculc/1-519 -IIAIGGSARNVANVHQ---LVHYPLAGIHGYMTDDAIDMTLQTFVIT-EASKLGDID
hutsour/1-517 -IIAIGGSARNIANVHQL---ASNYPMAGIHGYHMSKETLQETLDFVTS-TEDEMREDIE
ignruof/1-517 -LIAIGGSARNVANVHQ---MTAYPMAGLHGYPMTNDNLLTLNLFLFLET-EAENLSDID
erecole/1-517 -VIAIGGSARNVANVHQ---SIDYPMAGLHGFVMTKDLQTLQFLFANT-PFDKMNID
vagmass/1-517 -IIAVGGSARNIALVHQF---LTDYPLAGVHQYQMKFDDLQTLKLFQAT-PFSQLDNID
allotit/1-519 -LIGIGGSARNIAEVYQH---QEDYPLAGIHGYSMQDQGLDQVFTFAET-SFKDLSDDL
alkkapi/1-521 -LVGIGGSARNYAEVYQR---QTDYPIAGIHEYYMSKENLDDTFLKFEKS-SMKELADLD
markali/1-519 -LIGIGGSARNLADVHQ---QHDYPIAGIHGYTMSGNELETFDLIANT-SLKQLSKLD
atotaba/1-521 -LIGVGGGSARNIGEIHQR---QIHYPPIAGIHGYEMNREELETVFELLKNT-TLEEKEDLD
desince/1-519 -VIAIGGSARNIANIHQR---MIDYPLAGIHGYQMERHLSKTLDTLENL-DTDELNDLD
triilyi/1-512 -IVAMGGSARNIANVHQ---QINRYLAGVHQYRMYRNDLQRTLDFLQSL-SIPQLQNL
graseri/1-519 -IIAIGGSARNIYVHQ---LTYPIAGIHGYRMYRNDLQRTLDFLQSL-SIPQLQNL
jeocaen/1-522 -ITAIGGSARNIANVHQ---QIDYPLAGVHQYQMSGDLDLTLELFLKSL-SISELENLD
entital/1-516 -IIGIGGSARNIASVYQI---ASNYPLSGIHEYEMTKENLNELSELFQSL-TLAEQLNLD
bavseil/1-519 -VIGIGGSARNIANVHQ---QVHYPLAGVHQYEMSEKNLEEMEDLTNL-SYKDLTDL
lacBL23/1-509 NMIIGGSNLSIFQNIPE---G---KHQ-----VETDRPGDFLDEVTNA-SDQYLADTY
lacseila/1-510 NIILMGSSISIFENAI PN---K---KMA-----TKVTGTRVKGLYEEILHA-SQYLIIEHY
agrcomp/1-512 NVILMGSSVSI FEPMIK---D---NRT-----VKLSIEEFQKMYSEVHG-NDQFLVDRY
schshen/1-515 TMIILMGSALESIMSLIPA---G---KRS-----VALPVAQFTEFYSRAVHS-SQYLTAYH
lacplan/1-509 NVVMLGVAP-FATLFRQQ---Q---SKA---GVEELSKADFQALYEDVINA-SDQYLMDKY
frusanf/1-509 NVVMLGVAP-FATLFRQQ---Q---SKA---GVEELSKADFQALYEDVINA-SDQYLMDKY
nicspur/1-512 NVILMGSSVAIIKPLISD---L---HKT-----LRFNSKNEFNELYNEVKAS-NDQMLVQKY
loiback/1-509 QVILMGSKLTLEENLIPE---N---KRA-----LALSHADFNQRFDQVMTL-SDQLEDEQE

apitimb/1-512 NVILGSSVTLKLLFGT---D--KDT----NKLTMKDFDNLYHKMRRAN-DQELTHRY
 levbrev/1-510 QVILIGAEP-LNAYFIPQ---G--AIS---A--PLTLDDFNQFSREVAGA-SDQYLMERL
 secmixt/1-510 DLILLSSMP-LSQLTIEN---E--QHH-----TITAKQFDALFDRVIDA-SDQFLIDQY
 weisaga/1-513 QVMLLGTSS-LKKIVAERY---T--KNS---NDGSLDIDTFRDLLDTLVDA-SDQYLMERL
 ligacid/1-508 NVILVGTLP-LKNLITHG---N--DDA---K--ELVFKEFEELQDSLINA-SGQFLAEHY
 lenhilg/1-521 KIFLLGTSP-IKSLVSHY---E--KDH---SLMSIDVNAFALVDDIVDA-SDQYLLIEQL
 pausueb/1-508 RVILMGSKLTLEENLIPK---G--ERA-----VELTHQDFDQHFNDVMKL-SDQDLDS--
 furmili/1-508 KVILMGSKLNLENLIPK---G--KRY-----VQLSRKDFDKQFQSVVQM-TPQDMLNQN
 perbeni/1-504 HLILVGSEV-LNTLFIKA---G--QTT-----ATISLAQFEELKQQIFNNQTNQVLGEKY
 liqnage/1-502 HLILQDARA-LNQLKLI PH---G--QDT-----VLLTLERFNELFEMVIHS-SEQFLINYF
 leuholz/1-497 SLILLGADA-AQQIFLPE---N--QHR-----MTVSRTAIQVVTDDLSNL-NDQAIMEKY
 lacprot/1-510 -IVAMGSSRRMASIHQR---MVSYPITGLHGYSMTVENIKSTKFFLAAK-SLKQLRDL
 anobury/1-524 HFIALGSEMRTISKLCNQ---TDQ-----ADRLRTISMEAFTRFYREMVKK-PTPLLRD
 cloacet/1-516 HFIVLGDVMKDLGKLCDC---PD-----NYIDKSQFLMVYQSLLLHK-PTHKISSTY
 petxyla/1-521 NFIALSGEIRIISKLCNK---TDD----HEKLRFIKREDFETVYKELMYK-SAHSLIKDY
 thecaen/1-520 HFVLASGELDYLAEARL---GVD-----KGVVSLDKQEFERIYVQALGK-TPRALSEEY
 blamass/1-514 NLILMGDFLT--DTIFQ---DRSGEN-----ITKDFLKKYETIVNM-SDHDLAESM
 anafaec/1-521 NIIAVGDNLDLLRFKEYVEKQDKQSLSSSTNKDSMDRSGFHSLYTKLLSK-NTSQISTML
 lacsacc/1-513 NIMLLGGFFT--ESIFQ---NEQEKNT-----RIISRKTYRNWFDKINGH-SPMELAVKM
 petatla/1-512 HLIIVGGEIGVQSLMDE---DVT-----EETYRMKKKDFRAISDEIMSK-TTDEIKRDY
 aestic/1-513 NFIGGGEFTEIYKISKK---TDK-----EKSIFVSKENLTDLYKKIKQEM-NTYVEAQYM
 seralka/1-514 HFVLVGDIIKIDICISICNC---TD-----YLIDKTRFLTIIYQELLKN-PHHKAIYRH
 anacarb/1-518 NFIALGGEIRI IKDICNK---EKG----KEQEKI IEREHFQLYDPLMDK-STYSISEEY
 geoferr/1-520 NFIALGGEIRIISQLCNC---TSD----YHKLKYIKKEDFIRVYKELMEQ-PGYAAKQY
 tincali/1-522 HLVLGSEMKAINRLCND---PDS----LENKNTISIEALEKLFKEVQEK-PAEFMADTY
 selbovi/1-507 NLILQDFSH-FNDMLLQP---G--EDI-----APMTQQQFQAIEQDNLHA-SQEYLRHHF
 prohipp/1-516 YLVLSGLETNLLLSILG---REPQEA---SYISLHDFYQLYKQVNNL-NLSQIIDIF
 spoovat/1-515 RLVLSGPEPKLLKMLG---KESGRI-----NFVLSSEFNPLYKQVSSL-NLPQLITTY
 denquer/1-519 YLVLGPEPKLLKILG---YGLKDGL-----ALVELTDFYKLYDKVKKL-NLPQIIKTF
 calkiri/1-518 NFIAVGGEISII SRICNE---TKD----KEKSKYIDRNKFEVYNELMYK-PYHHIKEY
 ///

alimeng/1-510 GLSGDRADIIAGMTILDQVLKXVDGTEFVINSKGLRDGVLMEQVQLQTLN---QTEL-PD
 efflacu/1-515 GLSKDRADVIIAGIAVQTLMEWIGTKQLIVSNKGLRDGVLYEKVLPLQN---ISCT-DD
 tumflag/1-518 GLSKDRADLIVAGA AVFVSVLLDVTGSAEFVISTKGLRDGLFELMQLQGVN---DNVV-PD
 kyrtusc/1-515 GLSADRADIITAGLAILDQILKRVGTSRFVINSKGLRDGVLMEHILHIRG---QELL-PD
 sulther/1-503 GLSKDRVDLIVPGATILLALIELLHSQQVRSVGRGLRDGVFYSHILGEP---LEP-AR
 ferorga/1-501 GLSKDRADLIVPGGMILLSLMRYTESAVLRISGRGLRDGTFTRVLGAER---DTQK-ED
 colludi/1-486 GVSQQRAEVLPAGLATMHALSEKFPVKGKLMISRSGLREGLFYEFVFRFNQ---SPVV-ES
 rosviet/1-509 GLSKDRADIIIPAAEVFHFQLFDYTQAPYFMVSRKGLRDGLVLEMANGSVE--KAVNR-DS
 anocald/1-508 GLSKDRADTIIIPALEVFRVLYEVVDAPVFLSRKGLRDGIFYEEGMPQ-F--GTPIF-PS
 bacsala/1-510 GLSKDRADIIIPAAEVFNQLFSYTPDACYFMI SRKGLRDGLVIEEMANESG--VEMSR-DS
 calerzu/1-509 GLSTDRADIIIPAVEVFIYQFINATSFILCRKGLRDGVFFEQQLKP-Y--EMTFP-PS
 halyeom/1-513 GLSKDRADIIIPATEVVFHTLYDVIRADGFI LSRKGLRDGIFYEQQLTK-M--GTSVF-PN
 priarya/1-508 GLSKERADTILPSIEVFDILLESSKATQFIISKKGLREGI LYNKIDKQD---DS--P-TS
 mancuni/1-511 GLSKDRADIIIPATEVVFHALYQMSSTGIMVSRKGLREGIIFEETIYANLE--DLQEV-
 Docesoja/1-511 GLSKDRADIIIPATEVVFHCLYQTIQAESLILSRKGLRDGVLYEHLAKE-S--DSSLYPN
 lystimo/1-515 GLSTDRADIIIGIALEVFLSLMDVNSNVFQISKKGLREGIINRVLQANP--EAFDK-YN
 paesuae/1-508 GLSKDRADTILPAIAAMEALIKEVNTKSFIVSSRGLRDGLFFELLAPIE---VTHF-PN
 cytspon/1-514 GLSKDRSDIILPAVEVVFVQLCDFAASQFLMVSRRKGLRDGLFLNEIDQD-Q--LLPTT-KQ
 aqualbu/1-510 GLSSDRADIIIPAITVHFCLFQTMADSFILSRKGLREGVFFEQQLSND-F--GSILF-PN
 metlito/1-509 GLSKDRADIIIPAVEVVFHCLVEIVNTNKFALS KGLRDGFFEEELTKE-F--GISIF-PN
 robkorl/1-506 GLSKDRADIIIPALEVFDMLCMYVQATRFIFSKRGLREGI LYKEKGRG-K--KP--S-DF
 perfrig/1-509 GLSKDRADTIIIPAAHVFTALYEIVRADNFILSRKGLRDGVFYEDLRKG-T--GSAIF-PS
 niaendo/1-511 GLSKDRADIIIPALEVVFVGLCEYSQSFSFMSKGLRDGILSKTSETD-D--VFLDT-DQ
 liscost/1-511 QLSYDAISQLPSAMLLKELLKVTGAESILSDAELVDGAEISIRYKIKLSDH-FNE
 brehumi/1-511 GLSKDRADVIIPGIIVFEQLLKSAGTRLLISNKGLRDGLLHEKAGHNEH---VPAA-RT
 anedani/1-509 GLSKERADIIIPGIYI IKVLECI GSERFIVSNKGLRDGVHMESRLKAKN---LTL-LL-DD
 paearte/1-509 GLSKDRVDIIVPGLAILRTIFRAVGASHYVICGAGLRDGLFYSTRFP-D---KPR-LL-DD
 lonpaci/1-502 GLAKDRDLIIPGMKLFQVIYEQPSQLLSEFSLRDGLAIHHFSPD-----YHT-SQ
 cohther/1-517 GLSKDRADIVPGLAILRAVARQCSASRIVVCGAGLRDGLFETCLPLAQ---TPTS-DD
 spolaev/1-505 RVPYDSATQLLPSAMILKMTLEITGAESIIISDADLADGILVHELFRTRNNSLNHS-FTE
 stamass/1-510 GLSQDRVDIILPAVEVFKTYEIEDATQFTFSRGLREGIYVMSSELSKTYK--DEFDS-KK

Anexos

macarme/1-510 GLSRDRQDIIVPSCVLFNNTLFDEVDATFIFSRKGLREGVIMQVLEQEY--LPFDK-DN
maccase/1-511 GLSRDRQDIIVPSCILFNNTLFDEVDATFIFSRKGLREGVIMKVLEQEY--LPFDK-DN
fachomi/1-520 GLSSDRRDIIPANLAFLELFAITKAPTFLISKQGLREGVIMHYLNQRYN--RPFDP-DL
ruotaba/1-517 GLSADRKDLIIPANIVFLELFFKIVKAKEFLSSQGLREGIILKYINHTYN--YPLDN-QL
aersang/1-515 GLSTDRADIITPAACLVFSELMACVQAPCFKFSQYGLREGILYEYIEDHYP--APYDI-FH
suiaacid/1-517 GLSNDRDLDIIPATIVFQELMKVTKADIFSLSSQGLREGIILKYINEKYD--TPIDN-KL
glosulf/1-517 GLSNDRVDIIPANIVFLELLNVTVKAPIFILSNQGLREGFVLTINEHYH--SPIDA-RN
funculc/1-519 GLSSDRQDIIPATIVFQELYNVVKASFIAISTQGLREGIVIMEYLINEKYN--TPIDM-SL
hutsour/1-517 GLSNDRTDIIPANLVFLELFRVVKATCFLISSQGLREGIILKYINNNYN--TPLDN-DQ
ignruof/1-517 GLSNDRVDIIPANLAFLELMNVIIRAPEMLISSQGIREGIILYHINTTYN--MPLDN-QQ
erecole/1-517 GLSSDRLDIIPANLVFIELVKAASDAFVISTRGLREGVMVKYINDNYD--GPIDN-AT
vagmass/1-517 GLSTDRRDIIPANIVFIELMDFSKAPSFAPSSQGLREGIILKYINQSYN--SPIDI-HL
allotit/1-519 GLSSDRRDIIPATLVFLELFFKAMGATAFVVSSYGIREGLIIEYINQLPY--HPYSL-HF
alkkapi/1-521 GLSEDRRDIIPAGIVFTELLNVMKSETFAISNRGLREGIIEERLNRDHE--DAYDL-FG
markali/1-519 GLNEDRKDIIPAGLVFLELFDMDSTEFASISNRGLREGIIVDYINRTDN--QPYEL-YD
atotaba/1-521 GLSEDRRDIIPAGIVFTTLYDVTVKADCFALSNRGLREGIIMDYLNREFN--NPFSL-HQ
desince/1-519 GLSRDRDIIPANLVFNALFDTVKASAFIFSNKGLREGVIMEYLINEHNN--HPFDL-QE
triilyi/1-512 GLSRDRSDIIPANVVFNNTLFDEVKAPVFLFSNKGLREGIVMEYLNKNYEN-KAFSI-FN
graseri/1-519 GLSRDRWDIIPANLVFNLFVFNAPIFLFSNQGLRQGIILNHNKTYN--NPYSL-QH
jeocaaen/1-522 GLSQDRTDIIPANVVFNALFDEVKASLFIKSNKGLREGIILDYVNERANG-TAFTK-HN
entital/1-516 GLSKDRADIIPANLTFALCEITEAEKVFVFCNKGLREGILLKELSNTE--QVYDP-DR
bavseil/1-519 GLSRDRRDIIPATIMFEELLSYVGTKTFFVSNRGLREGIILSYINNTYD--NPFKL-DE
lacBL23/1-509 DLTSDQSLVLPVTVLLVYRLVETLNSQSIWIISDLKAIDGIEVNAAEHGGFKKLGFD-PNE
lacselal/1-510 HVSADKVPQVLPVTVMLNELLELLKVKTVYLSQLKLDIGVAVNAAVQNGKKIGSWD-SDA
agrcomp/1-512 DINEDDVPQVLPVMILVDQLLNHFVKVTLWVAALKLIDGIIVQVNERVNERPKSLAL-QEE
schshen/1-515 QLADADMAQVQVPLMLVHQMMNFFGTSELDITNLKLVGLAVNYALRQNNAKLLIK-PEE
lacplan/1-509 EVDEEDVRLIVPELLLINELLQLTNAEKIWLGNVTVDGLIIQEAIKLGYKKY-N--FND
frusanf/1-509 EVDEEDVRLIVPELLLINELLQLTNAEKIWLGNVTVDGLIIQEAIKLGYKKY-N--FND
loisback/1-512 DVDEDDVPQILPFMTLLHELFKIFHPKRLVWSDLKFINGLTYDLSKTSNGKSHI-LRQ
nicapitimb/1-512 GLPEIEVNEVLPFLFLLDEVFNLHTKSIHLTDFKVIDGCVVDEEMSRKHPRNTYDVQ
apitimb/1-512 KIDENDLSQVPLVTVIIHELDRLSVQKIWLSSLKFDGLTCELIEDKQENNIQQM-LNN
levbrev/1-510 HLTEENVELIPLVLLIKKLLTVVHAEKIQLVNLNVIDGLTTNQAIMAGYHKT-AH-FEN
secmixt/1-510 GKVESEISLLPEILLVRKLMHLTQATTLHFSHNTVLDGLAINEAVRSQYSKY-D--FSE
weisaga/1-513 MVNESVILPLVPELLLIDRIVQLTNAKTLRFSDSSVIDGCVVNEEAVLGFSKH-D--FSN
ligacid/1-508 GIESQYLPLVLPPELLLKLHFTLTNAQKINLSNASMLDGLVLNRAVQHGFLLKR-D--FSK
lenhilg/1-521 EVNEDSVPLILPELLLIRRVILQLTNAEKIRFSDSGIVDGLVNNEAATLGYSKD-D--FTH
pauusueb/1-508 QLPQMEADEVAPLFLMLDQIFDHLQVQKINDIIDLKLTDLGLIANLNAQDKQTSNAWN-YDQ
furmili/1-508 NLPADQVNEVLPFLFLLDEVFNLHTKSIHLTDFKVIDGCVVDEEMSRKHPRNTYDVQ
perbeni/1-504 GLSEQVIKALPEILVLERALNLAQVPKIIILLDISVVDGLVFADAGKNSI-----GDT
liqnage/1-502 DIDEHIVERLIPNFILIEKIIIRLLNVQQLILSNITVSDGLAIEQAQKNRLIKQ-D--LNN
leuholz/1-497 AVELNDVPFVLTEMLLLNVMQAINVSSQLISDLTVLDGLSVKDVH-----ADD
lacproby/1-510 GLSRDRADIIPATITFQALIEITSAERMYFVKEGLREGIILNMINAEVFP--ETYPV-SG
anobury/1-524 GLPFDMAEMLLPMMVVKCVEMTDAQCLYTPVLSLADGIVADHIDQRFKTRNRQOE-FLE
cloacet/1-516 KISKEGAYTLIPSFILKVFDMTSSPQIYTPLVNLEDGIVADLVQKLIITQRKQE-FLH
petxyal/1-521 GVPHESADILLPSMMIFKMFDMTEAKGMYAPQISLADGIIISDIIDRNFDTQRQED-FVE
thecaen/1-520 DIPLADAEFLVPSLILIKKFLDKTCSDKLIIPSVSLVDGLILERYNDELEKGISMD-FDA
blamass/1-514 ELEPEYASLIVPNMVIIRNFIEIFQAEALWIPGVSLDDGIAAYDHAENKYLKSVHN-FEN
anafaec/1-521 QISKEQASLLLPAMTAMIVHKMFEEKSKASKMYLPGVTLTDGLVVDYAQKKEKVIILTHD-FRQ
lacsacc/1-513 GIPLNASLMSPAAVICNSLIEEMDAEQIWIIPGTHLARGLAYEYAEKLLIKVSHN-FEN
petatla/1-512 AIKRERAEIIVPSLMLINMFDVKTAGEIIPNISLADGIIIRYIHEDIYNLHTNDI-STQ
acestic/1-513 QISEKQAEMLVPLVIFKFKFVLDLTQADGIVAPRVSRLRHGILADMAENIYNTKRKEE-FLN
seralka/1-514 NISQEGAYILLPTMMLTKIFLDTTSSAKIYTPVLSLEDGIVSNIIIEKFNTRNRKQE-FLQ
anacarb/1-518 GVSPEARADILLPSMMIFKMFDMTQATGIHTPLVSLRDGIISDVIDKLLHTKRKEE-FTE
geoferr/1-520 GLAQERAEILLPSMMIFKMFDMTSAKGIHAPVLSLRDGIISDVIDKFNTRNRKQE-FME
tincali/1-522 QIMSDLAISLLPSLIMMKFFQMTQATQYITPLVLSLDGIVSDPFDQRFYTRNLRKE-FNK
selbovi/1-507 KMDETAASRVIPSLMLIRQIISMTHAGHLYLTRLNINLGLALHQAQKDFLKT-D--FDD
prohipp/1-516 NLAENKADMVLPITILYRQIMALTDVEQIVIANDQFIDGITTLYIAENTKDAWLQD-IEA
spooovat/1-515 RLTENKAEIVLPTIVLYKQIVSLTGPEEIVVLSVDQFADGVIKIKHSEKTSHAHQKL-IDS
denquer/1-519 ELSEAKAEMVLPITIVLYKQILGLTIDIKIIVIPDDQFIDGICLLHIMEKTRDKWSEV-IDR
calkiri/1-518 DVPENRIEILIPSLILFKFIDMTDAKGIYVPLVSLRDGLISDFVKKYNTNRDKK-FRE
////
alimeng/1-510 MLMYSIQNIHDFHR-L-NDNHAFHVWKLAEQLLFDLMEY-RVIT--DNYEASRCLQVAAL

efflacu/1-515 IIRISTEQFMNRYQ-V-PKGHAQHVNKLACTLFDELK-DLQILN--LGANERKLLLEIAAL
 tumflag/1-518 VSLFSARQWMKRYR-V-NQTRAEHVSRLAVSLFDQLN-DLGLLQ--ADAGQRRLLOISGL
 kyrtusc/1-515 TLMYSIENIHDOFG-L-NRNHAFHVWKLADRLFTAMV-NHGLVE--ASEEHRRLWOVAAL
 sulther/1-503 VLRSVLTNLRRFQE--SEVHATHVTDLAFYLYRDMI-KWG--F--LSAGADRILFTAAM
 ferorga/1-501 VLEASVHNLLERCRV--PKDAETVTNLALSARPLC-ERG--D--LNPARLRLLYAAAM
 colludi/1-486 VLDHSVLNFKQLFH-V-NVDLASKVTRTALFLFDSLRL-PIH--A--LGEYERKLLQVFSQ
 rosviet/1-509 VIEMSMKELCHEFD-I-NESHKQMI FLAGEFWKQLS-NLGYWN--LESGLKMLQYGAA
 anocald/1-508 VLQESFFELAQDYD-I-DVHHVHYVNRLLTEFIEQIR-RLDLYP--LTDDDVDRDVKWAAH
 bacsala/1-510 VIRRSLEELCHEFD-I-NDLHSHKQMKFLASTLTGSLD-DLGYLD--LTHEDFKMLQYSAA
 calerzu/1-509 VIEESLFELEYEYK-I-NIDNAFQVSR LAVNILHLSLE-KIGVVS--LTD AHN ETNRRGAY
 halyeom/1-513 VLEESI QELITDYD-L-NIKQIHHIQHLAHQLFHRLQ-EKGI GG--LRKEDWMEV KRASY
 priarya/1-508 LVDIGIEEIIYDFR-I-NIDNSRQMIKIANVIVEQVN-KINKMEGYITKQDRMVLEQASS
 mancuni/1-511 VYEEAKELAVEFS-L-NQHTNMMKKLSAELLNGLN-DQHSLT--VKNGLPLIQKAAA
 ocesoja/1-511 VLEESI QELVNDYD-L-DRKHIRHVQNLTEQVDFCK-ENGLIQ--LDKQDRKLLKMASF
 lystimo/1-515 VFEENAKRIAYEYG-R-SEEEYETLLKLA INLYECC-RVNLF--YKETDFELIKKAAK
 paesuae/1-508 VKEESFYQLSNYYR-L-NLDHQQKISVLSYLTSELV-EHDLVN--LSKLDMEHLRLGAN
 stamass/1-514 IIDRGIYALMVNYK-I-DCSHSKYVEQLSTMLFNELQ-KEGLLS--HSKLELDIKRSSY
 aqualbu/1-510 VLEDSIQELINDYD-L-DPKQILHVQFLTRKLFYEFK-EKGIGA--IDQEDWVYLKRASY
 metlito/1-509 VIEESFYELATDYS-I-NLNHVVFHTTNALMITLLH-KAELAS--FNKDELELLKRGAF
 robkorl/1-506 ILESSIDQLIRDYG-I-EEGSHDVAWLAKQIYFELS-AIFGKK--TNGYSERLIEQSAR
 perfrig/1-509 VIEESFIDLSDYD-I-DLHHVQYVTKIAIKLYKDLA-EKGLLS--SSDDDIILIRRAF
 niaendo/1-511 IVQNSVAELLIDYD-V-APASHRAKLAEILFEKTS-TYYHCE--NKQALS KFVKKGAE
 liscost/1-511 DLIASA EHSRRYM-T-DQKHSEIVRKFALHLFNQLK-SLH--G--LKKRERLLEBLAAI
 brehumi/1-511 VRQTSIEQFMTRYQ-M-NRHLAFHVRHLASSLFDHLN-QLNLID--LGSEEKDWLEAAAL
 anedani/1-509 VVEGIYALMVNYK-V-NQVHARHVDNLSCTLFEQLA-KEGLHS--YGPEKRLVLSVAAR
 paearte/1-509 VVSYSVNNLAALHPEA-PLQHTSQVNRLALQLAELLC-PRL--A--DAGSAKLYLDIAST
 lonpaci/1-502 ILDRCVKRLYAKIPMV-PIPHVHQVEEFAMQLFNALC-AEQ--A--WGEQEKTYVHIASR
 cohther/1-517 VLEESVRNLTALYPAA-PEAHLAQVNRLALKLYDRLA-PHA--G--LDPSARKLLDAAASR
 spolaev/1-505 DIIVSARNIASRYN-C-DTEHIKMEYFALHLFDRLR-RLH--G--LGKRRDRLLQLAAI
 stamass/1-510 IRVQDALFHLNLEYK-I-ESKGAEQVRVLAEMLFNLQ-LFGLLN--HSKLELDIKRSSY
 macarme/1-510 VFKDSLRLN LADSYN-I-KHDEAMQRTMIAETLYYELE-KHDLIK--GNKKDKTFLKHAAY
 maccase/1-511 VFKDSLRLN LADSYN-I-KHDEAMQRTMIAEALYEME-KHDLIK--GNKKDKTFLKHAAY
 fachomi/1-520 VKRSRSVSRACREFK-V-NTVNASTRSKLAMDLYRQLC-ELDLFN--YQYNQOLEIELAAI
 ruotaba/1-517 IRVRSIRQVVRDFF-I-NTVGAQIIVDIIISLYQQQLC-ELGLLT--YSDNLEKVEIEFAAY
 aersang/1-515 IQRQTI EGLTNTYHF--SMADHAQRVDIVRQVYTCLS-QQEFLD--WNEQEKRLLIY GAY
 suiacid/1-517 IRKRSVEGVVRDFF-I-NTFGSDIDIHITLSLFEELV-KWQLE--ESAEIREELTFATI
 glosulf/1-517 NKLRVTVQVADKMN-I-LPEGSILRVNYAIKLYQALS-EADVIR--YDEQLKNELEFASY
 funculc/1-519 IRARTIRGILHLPF-V-DTSRNYLRINYALSLYQQQLC-ELNLTP--YSYEHIEIEFAAY
 hutsour/1-517 IRARTIRNLRDLP-V-NTLGADQQVKFILKLYQELN-RHQLMA--Y SFDQQEELEYAAI
 ignruof/1-517 IRVRTVQQLMRNLP-M-NDFGAYLRVDFITNLYLQAC-RLGIFE--YDYEQHVELEFAAY
 erecole/1-517 IRARAI FQMKEDLP-M-AGIGPQTAVDTSISLSYQLC-HLGLLE--YNYKIQELLEYYAAS
 vagmass/1-517 IKARTIQKILYDFP-NQIALSSEIRAKYITIDLYHQAS-QLGCDF--YTYCQVEELEYAAY
 allotit/1-519 IQQQT VYRMAKQYR-M-MDLPASQRMNIMSRLLDVLA-DFGLLH--YPSALQVEFAHFGAA
 alkkapi/1-521 IKRQTVQR LFKQYD-I-RPISAHQRILLADQLIELIQ-DKGILN--VPAEDLSLLHYGAT
 markali/1-519 IKRQTVVERMAKRYH-V-RAIGAYQRILLSDRLNLLK-DKEIIS--VDEAHLILVHYAAS
 atotaba/1-521 LQKQTIERTARQYG-I-RPLGSRQVVAIDKLFVTVLN-NEVPLT--QDPYLKLMRF GAY
 desince/1-519 IRKQTVERTARLYN-I-HPMVARQRVSIADKLFVLA-NENILE--ADAYWKT YLRSGAY
 triilyi/1-512 IAAQTVNRLAAS YH-T-LAHVAQHRV KLVDRLYEELC-RLGIFE--KNPEMEKLLHFGSY
 graseri/1-519 IDQESVMQMANTYF-I-RKSVSQRQKLTNLNLDQLT-KLDLFF--LDDHYRKFYGYGAY
 jeocantal/1-522 ISTQSIYRLGLAYQ-T-QNQVADQRGNLVSMLYDEFC-KANLFE--KDKYIARLLQYGSY
 entital/1-516 VVEGVLMMRTESYG-I-DVSLAQKRRALAEKLLTLQC-EEGLVT--LDPKLLQYVYVYAAF
 bavseil/1-519 LEDGTVKRLSETYHQM-AKIVAQ-REKLAFLQLLGEFE-QHKDVD--VPKYWDTLLCYAAK
 lacBL23/1-509 EIVISANNLAERYQ-V-DEAHMQATRTVALQLFDRLR-KLH--G--MGKRERLLEVAAT
 lacselal/1-510 ETIRSAVNLSNRYH-V-DPKHRDSTVKFALTLFDRLK-KIH--G--LGKKERLLEHIAAL
 agrcomp/1-512 QMLTSAYNLADHYR-V-NRQHQQFVNFQRFLDRLK-KIH--G--MAKKERILLEIAAI
 schshen/1-515 QIIR SARALSDRYQ-V-DAHRDQVTFALQLFDRLR-KLH--S--LGKRERLLEIAAT
 lacplan/1-509 QIVTAAKNIADRYN-V-EPKHRDLVTKFSLHLFDQLK-PLH--H--LGKRERLLLQVAAI
 frusanf/1-509 QIVTAAKNIADRYN-V-EPKHRDLVTKFSLHLFDQLK-PLH--H--LGKRERLLLQVAAI
 nicspur/1-512 QMILSAHNLANQYQ-V-EPRHQQFVEKFVQLFDELK-PLH--G--LNERDRLLIEIAAI
 loiback/1-509 TMIISAAKNLAKRYQ-V-DQAHQKVLTFVQLFDRLR-KIH--G--LGPRERLLLQLAAI
 apitimb/1-512 QTLVSAKNMAKQYN-V-EPKHQAMVEKFALKLFDLSLE-DIH--G--LDDRQRLLLQVSSI
 levbrev/1-510 QILASAEDLAQRVYR-V-EPHHMELVRRFALHLFDQLR-ALH--H--LTTRDRLLLEVAAI

Anexos

secmixt/1-510 QTINSAITMANHYR-V-EPVHRELVTKFALHLFDQLK-PIH--Q--LTARDRLLQMAAI
weisaga/1-513 QTIKMSMNLANHYN-V-EPIHRDIVTKFALHLFNQLK-PLH--R--LGKREAVLLEVASI
ligacid/1-508 QTIKQAEENLARHYQ-I-EPKHQQLVTDFAHLHLFDQLK-PMH--Q--MGKRERLLLKVAAI
lenhilg/1-521 QTIITMAVNLADHYD-V-EPIHRDLVTRFAMHLFDQLK-PLH--M--LGKRERVLLQVASI
pausueb/1-508 MILDEAQNISKRYL-V-DQDHQQVVLKFAMQLFDRK-KFH--G--LSKRDRLLQLSAI
furmili/1-508 VMLGAAYELARRFH-V-DERHQQSVVLFATQLFDRK-KIH--G--LGRERLLQLAAI
perbeni/1-504 EIITAAQDIADQYR-V-ANNHRQQVEHFALHLFDQLK-AVH--H--LTQRDYLLLDVVCL
liqnage/1-502 IILTSAENIANRYL-T-SHSHRQIVTSLALHLFDQLK-KLH--H--LGKHERLLQIAAT
leuholz/1-497 DIITAARGIADRYM-V-EKQHRELVLTYAHQLFDRK-KIH--H--LTARDRLLGVAAL
lacprot/1-510 IRRTSIARLLVNYG-I-DPANAKQLKRVRLFQDLMI-RAGLVI--PSEQLNDYLYYASM
anobury/1-524 DVQELALGLARKYH-A-DMNHAADVETKSI AIFDALK-KTH--G--MKEREKYLRLRAAK
cloacet/1-516 DIYTLVRSLAKKYH-Y-DENHANEVMDKSLCLFDGSK-RLH--G--LGEERFLLQLATI
petxyla/1-521 DIISAAGFLARRYR-Y-DQPHAQDVEQKSLALFDALY-KLH--G--LGRERLLQLAAI
thecaen/1-520 DILSCVREMATRYR-T-NEKHVRYVERVALQIFDRLT-GIH--G--LGERERFILQIAAI
blamass/1-514 DILVASRNIAKRY-S-GKNHIAAGTDDVALDIFDSTR-KIH--G--MGKRERLLQIAVL
anafaec/1-521 DIITQAARNIARRYH-C-NQEHMKNVEYIALTLFDSL-T-KLH--G--LNNRDRLLQIAVI
lacsacc/1-513 DILMAAKNIGKRYA-V-NRPHIQNIDMIATELFDMSK-KIH--G--MGVREKLLKIAVM
petatla/1-512 DIITSATVMAKKFY-Y-DETHCNHVEAHALLFDKLR-KIH--G--MK-EERILLRVATI
acestic/1-513 DILSSVAYLGRRYR-I-DDSHALHVREMAIKIFDKTK-KIH--E--LGSNDRFLLLEIAAL
seralka/1-514 DTYSLVKTIAEKYR-C-DQNHAEVEKKSILFDALK-KFH--G--LGDQERLLLSLAAV
anacarb/1-518 DIITASARVQKKRYE-Y-DEAHAREVEAKALLFDELK-KLH--G--LGKREKLLQLAAI
geoferr/1-520 DILCSARYLAVKY-Y-DEKHGREVEEKALLIFDALK-RMH--G--LGERQRFLQLAAI
tincali/1-522 DIQQQAMNLLKKYH-G-DEKHALDVEEKAVLFFDALK-KTH--G--MKEREKFLKLKACK
selbovi/1-507 IIRTVAENRARRYQ-S-DDAHRAITLKLALHLYDQLR-KLH--R--LGRERLLLEIGVR
prohupp/1-516 QLVSLARSFYHYR-Y-NEAHAEKVEEIALI IYDRIV-KLH--G--MGKRERLLLKVAAI
spoovat/1-515 QIISLCEWISKKYY-Y-DPTHAAAVETWSMLLFDKLA-RIH--G--LSERHRQLLRIAAI
denquer/1-519 QIISLACSLGAKYK-Y-DCRHADAVAGALLLFDHMA-KIH--G--LGRERLMLHTAGI
calkiri/1-518 DIISSAAYLAKRYK-S-DMKHVMVMDKSMI I FDRK-DIH--G--LGKERFMLQLAAI
///

alimeng/1-510 LHDIGRTISIYNARNHNFYLLQVPLLGITHRERVLAAAIAAFKTTKQITAVLA-DYQEF
efflacu/1-515 LHDVGRSINVYEASQHTFYLLSNVLLGLTHKQRI LIAMTASYKNKQLQQQS-RYAGI
tumflag/1-518 LQDIGLSINTFDAAQHTFYLLTNVLLYGLTHRERLILGMLASYKNDKKEKQLI-QHSDM
kyrtusc/1-515 LHDIGRAISINYTSKHTFYLLQIPLFGISHRDRVMAAAIAAFKSTKQIQTYLS-MYQEF
sulther/1-503 LHRIGVQVSYHYDRHTFYLLILNSALYGLTHREI ILAAAAASFYKSKLRKICA-PYRLL
ferorga/1-501 LHRVGIHIHYDFDRHTFYLLNLGTYGLTHSELLIVAAAASYKSRNRTRKQCA-PFRAL
colludi/1-486 IESCGYINPDSWAKHSSYLVLSSHLYGLSHEELVHLSLLKGEVNRNLKVV-----
rosviet/1-509 LYLLGEYIDSDSSQHTFYIMANRSINGFFHKERVQLASISSFKNKLSLKQYK-LFSEW
anocald/1-508 VFYLGQYIDSESSQHTFYILANRTIDGLMHKDRVKLALMASYKNTVFQYIE-PFQHW
bacsala/1-510 LYLLGEYIDSDSSQHTFYILANRPVNGFFHKERVMLACISSFKNKTALKQYML-PFLGW
calerzu/1-509 LFHLGRYIDDEASSQHTFYLLANRTIDGLMHIDRLRLAIA SFKSKALKQYIE-PFEDW
halyeom/1-513 VFNLGEYIDSEASYQHTFYLLANRTIDGLMHKERLRLALMASFKNKT VYKQFMN-PYKDW
priary/1-508 IFHLGKYIDSESSSHHTFYLLSNRSILGLSHRERVKLLALVASYKNTVFQYIE-PFKDW
mancuni/1-511 VYLLGEYIDSESSQHTFYILANRSINGLYHKERVKIAALASFKNYSTKQYCN-PFEAW
ocesoja/1-511 LFNLGEYIDSESSQHTFYLLANRTIDGLEHRERVKLLALVASFKNKT VFNQFIQ-PYKSW
lystimo/1-515 VYSIGEYIELDSASQHTFYLIANQS IAGVSHIDRVKLLALASYKNRDYFRFRSS-PFETW
paesuae/1-508 VFYIGNTIHPESKSEHTFYLLTNQSIDGLPHSERLAVAFIASFKSKS QLKKYAD-PYRPW
cytsson/1-514 VYLLGEYIDSDASSQHTFYLLANRTSINGLVHKKRVRLALMASFNKNLKLKYYLS-PLPDW
aqualbu/1-510 VFNLGNIDSESSQHTFYLLANRTIDGLLHRDRMLLALIASFKNKAI FKQYVK-PYKSW
metlito/1-509 VYDLGSYIDSESSQHTFYLLANRTIDGLLHRDR IIALIASYTSKTNFKRYVS-SYSDW
robkorl/1-506 IYYIGQYVDPDVSSQHTFNLLAHQSIDGITHKERLILALIASYKNWALLKQYST-PFVEW
perfrig/1-509 VYNLQYIDSESSQHTFYLIANRTIDGLLHKERLQALIASFKSKSAFKQYGA-PYKHW
niaendo/1-511 LYLLGQYIDDDSSQHTFYLLANQSI NGLFHKDRKLAYIASFKNKTLLKQYFT-PFSNW
liscost/1-511 LQDVGSFIDMNNHYVHSEYLI EATELIGLSETEQKIVA AVARYSTETPSAGLE-NFGRY
brehumi/1-511 LHDIGRSINVYESSQHTFYLLSHVLLPGFSHRERLLIAMISSYKNSKQLQAQLS-RHSDI
anedani/1-509 LHDIGRMINIGEWNQHTFYLMVNVFLPGLTHKQRLLAALIASYKNTVFQYIE-PYESM
paearte/1-509 LHRIGASIDYDYKHTFYLMINSRLNGLSHRELLICSLIASYKSKNRVQRTAV-LYKPL
lonpaci/1-502 LSLFGAIDPYAPKGHTFDLLIGQSFGVLSHREWVI ICLIASFQTKKAMQYAO-KYKNM
cohther/1-517 LFKIGAVIDYNDPCDHTFYILMHAHWNGLSHREI LLLTAIASYRSASPLRRKLA-PYRSI
spolaev/1-505 LQDTGSYIDMNAHYVHSYIIVSSEIIGISEHERDIVANIARYHSAETPSSNSS-AFQKL
stamass/1-510 LYLLGSYIDSDASSQHTFYI ISNSSINGFTHKNRVKLLALASFNKNTLLKFYSH-EIG-W
macarme/1-510 LYLLGSYIDSDAASQHTYIILSNSLNGI SHKNRVKLLALASYKNKSLFKFYEE-ETQ-W
maccase/1-511 LYLLGSYIDSDAASQHTYIILSNSLNGI SHKNRVKLLALASYKNKSLFKFYEE-ETQ-W

fachomi/1-520 LFQCGQFIDQEAESQHTFYLLSNMNLGAFNHHKERVRLAILASFRNKSLLKQYIQ-AFTGW
ruotaba/1-517 IYRFGGFISPEADSQHTFYLLSNMNLGFSHRKRLRLALLASYNRNSLFLKQYLT-NYENW
aersang/1-515 LYFCGRFIERGASQHTFYLLSNMNLGFDHKKERVAISLIASYNKNTLTKQYSE-EFQDL
suiacid/1-517 LYRFGGFISTEADSQHTFYLLSNMNLGFSHYKRLRLALLASFRNRTLYKQYLE-TFADW
glosulf/1-517 LYRFGSMISSEADSQHTFYIISNMDLLGFSHHDRLRLALLSSFKSKSMRMYLR-DFPDW
funculc/1-519 LYHFGSFDIVDEADSQHTFYLLSNMNLGFSHRKRLRLALLSSYRNSLQNYQYLE-IFPGW
hutsour/1-517 LYRFGFISPEADSQHTFYLLSNMNLGFSHKKRLRLALLASYNRNSLFLKRYLE-DFKSW
ignruof/1-517 LYRVGAFISSEADSHHTFYIISNMNLGFTHKRRLRLALLASYNRNSLFLMQFLE-DFADW
erecole/1-517 IYRFGGFLSAEADSQHTFYICANMNLGFSVHKDRKLKALLASYNRNSLFLKQYLS-NYQGW
vagmass/1-517 LYLFGDFISPEADSQHTFYLLSNMNLGFTHKGRIRLALLASYNRNTLNFHNYLR-GLDHW
allotit/1-519 LYYLKGVIEDKAESQHTFYIISNTNLKGFTHKDRVKLALIASYKNSLFLHQYTK-STSDW
alkkapi/1-521 LYLLGSYIEDDSKSQHTFYIISNTNLHGHNKDRVRLALLASYNRNSLFLKQYTK-AFKDW
markali/1-519 LYLLGSYIEDDSKSQHTFYIISNSNLHGHNKDRVRLALLASYNRNSLFLHQYIK-TVDDW
atotaba/1-521 LYFLGSYIEDDSQHTFYIISNSNLHGHNKDRVRLALLASFKNSLFLNQYSS-DFLGW
desince/1-519 LYLLGSYIDNDAQSQHTFYIISNSNLGAGLNKDRVILALLASYNRNSLFLKQYIK-EIKDW
triilyi/1-512 LYLLGQFVETGASSQHTFYIISNSDLGISHKERSIALLASFKNSLFLNQYLT-GYTDW
graseri/1-519 LYLLGAYVEVDASSQHTFYIISNSNLGISHRDRVRLALLASYNRNSLFLKQYTA-NLPGW
jeocaen/1-522 LYLLGEYIESGAGSQHTFYIISNSELNAITHKERI I IALLASYNRNSLFLNQYLE-PFNDW
entital/1-516 LYHIGSYIEDDSMSHSFYLLANSNLGFTHKERVALALLASYNRNSLTRKFLQ-NVPDW
bavseil/1-519 IYFIGNRIEPEAESQHTFYIVSNSNLGFKHHDRI I AALASYNRNSLFLKQYLQ-PFEGW
lacBL23/1-509 VSDIGSYIETHKHYSNSYI I KASEIMGLNDELVTMVAITRHFHSSI TPQSDLK-NFPTM
lacsela/1-510 VNDVGSYVDNHNHYFHSYI I IRASKIVGLSSTAQLMVAARIARYHSTDTPSAELD-RFDQL
agrcomp/1-512 LDDVGSYVNNHNHTAHSYI I QNSEVVLGSLDVELKMAAVARYHSSSTPSNELS-RFDEL
schshen/1-515 LNDIGSFVDVHEHYRHSYLIQASEILGLSTQEQQMVGTITRFHSTDSDPSIEEL-QESPL
lacplan/1-509 VHDVGSYIDPHQHYLHSDYILQATELMGLTDTEKRMVALISRYHSAQTPSKDIR-HFGHL
frusanf/1-509 VHDVGSYIDPYQHYLHSDYILQATELMGLTDTEKRMVALISRYHSAQTPSKDIR-HFGHL
nicspur/1-512 VDDVGSFINNHNHYVHSEYIVKNSI I IGLSESELMVAARIARYHSHKATSSALK-HLENM
loiback/1-509 LQDTGLYLDANQAHAFHSEYI I IRASEVVLGDLTEQFAVAARIARYHSSRAPAGLS-HLSRL
apitimb/1-512 VDDVGNFVNYNHYAHSEYIVKNSI I IGLSNIELIMVAMI SRYHSHSATSSIFK-MLDKL
lebbrev/1-510 VHDIGNYIDTHQHYLHSDYVLLKQSDLLGLSQQEETQI I AAVSRYHSTRTPGEDLA-HFQQL
secmixt/1-510 LHDVGAYVEPHEHYLHSDYI I RHTSI I IGLSVHERQI I AARIARYHSSKTPSEDLS-HFQKL
weisaga/1-513 LHDVGNYSIVSHSYIHSYI I IRHSDI I IGLSQEKEI I AARIARYHSSVTPSADLS-HFNQI
ligacid/1-508 LHDCGNYIGGDHYIHSYI I IRNSDI I IGLSKLETE I VALVSRYSVQTPGNDYS-SFTQM
lenhilg/1-521 LHDVGNVIGIHEHYIHSYI I IRHSDI I IGLSRIERSI I AAVARYHSSSTPSEDLS-HFSQI
pausueb/1-508 LADTGLYLNSHHHSFHSEYI I EASEI I IGINENEQQI I AAVARYHSSSSPSLNLN-NLVQF
furmili/1-508 LQDSGLFIDSTQAHAFHSEYI I INHSEMLGLRADEQVEVAARIARYHSSSETVSDLS-RFN-I
perbeni/1-504 VHDIGSFVNSHAHYLHSENLIKNIIDFYGLSDNETAI I AAVARYHSSQIPVNEHY-I LKNF
lignage/1-502 VDDIGNYINQGHYRHSAYI I LEANKLIGLSDDENQI I AARIARYHSSAEPEVDEP-HFQRL
leuholz/1-497 VHDVGSFINSQKHYQYSEEILTGDIDLYGLATVEQRMIAIARYHSAETPDDALR-TVEDF
lacprot/1-510 LYLAGSYIEADDSMHTFYLLANSNLGFKHRDRVI I IALLASYNRNSLFLNQYLT-PFHDW
anobury/1-524 LHDIGKFMVNLNKHYSYNI I KASEMLGVTEEEQDI I ANVARYHSSQIPQQSHE-NYWHM
cloacet/1-516 LHDVGKFININQHYNHSYDI I IMASNIMGISQQOLE I IANVAKYHSTLTPKISHE-NFNRL
petxyla/1-521 LHDIGKYINFNHYSYI I IMASDLIGISKEELE I IANVARYHSSREVPQYSHENFRKL
thecaen/1-520 LHDIGKYIASDPHYVYSYNI I IRASQI I IGLSDEELTMAACIARYHSSPELPGST-GLVKL
blamass/1-514 LHDCGKYISMSEVAECSYRI I MATEI I IGLSTEERQVIASAVRYNTRFGCYKEINRETSM
anafaec/1-521 LHNCGEYINLNAGALNSYQI I LSTEI I IGLSHTERELIAYLVRFNIGNYPKYADLN--NSF
lacsacc/1-513 LHDVGNYSINLNAALCTYHI I MSNEI I IGLSHTEREMIALIARYNTAPLPQYDQFAQI SAI
petatla/1-512 LHDIGKFISLDHNEHSYNI I KSLLELFGMSTLEVEMVANIARYHGI VVPKQDR-NLAAL
acestic/1-513 LHDIGKYINLNEHIEHSYI I IKAQDIMGISDSDLNI I AHTARFHNNEENPKSI -D-SYQIL
seralka/1-514 LHDIGKFINMNKHYKHSYDI I IASNIMGISQQOLE I IANIAKYHSDLTPTMAHK-NFNQL
anacarb/1-518 LHDIGKYIDLNRHYVHSYHI I MALELMGISWEEKQI I ANVARYHSAVDPDE-NFKEL
geoferr/1-520 LHDIGKFMVNPHEHYIYSYHI I IASNLMLGSLREEME I IANI SRYHSHKVVPRADHD-NFRKL
tincali/1-522 LHDIGKFMVNLNQHYSYTLIKASPI I LSLSEEELEMVANVSKYHSSRTPRKDHD-SYLRL
selbovi/1-507 LEDLGNFIQAHGHYRHSAYI I EANPVIGLSDDENI I AEIARYHSAEAEPEVRQH-HYSHL
prohipp/1-516 LHDIGKFINLRRHYLYSYRLI I SSDILGFSKAEERHE I ANIAYYHSHKGVPSDADAN-FAYL
spoovat/1-515 LHDIGKFMVSLRQHSYSYQLI I DSSDIMGFSEMEKNI I ANVARYHSHKIPVSDNLS-LAGL
denquer/1-519 LHDIGKFMVSLRQHSYSYQLI I DSSDIMGFSEMEKNI I ANVARYHSHKIPVSDNLS-LAGL
calkiri/1-518 LHDIGKYVNLVDHYDNSYDI I IASDLIGMSDRQMEI I ANVARYHSHKIPVSDNLS-LAGL
////
alimeng/1-510 LTEEDVLLISQLGTVLGLARMLDRTESKVVKDIHLVP--K-T-----K--G-FVLRVK
efflacu/1-515 VDKSDKEMVEKLGHLVLLARILDRSMSQQIRSIRLLE--K-K-----K--N-IVIECT
tumflag/1-518 VMPMELPGIKRLAQLGMLARILNRPLAGQVRSIQVEK--R-P-----D--G-VRLLCR

Anexos

kyrtusc/1-515 FDEEDIPTITQLGVILRLVRAFDRDTETGVVTGLDLQP--D-G-----R--A-WKLIVK
sulther/1-503 LTEEDLQATKLGVLVRLAEALDRRHERRIHRVSVKS--D-D-----H--Q-LVLMTY
ferorga/1-501 LSDDLTEITKIGVIVRLAEALDRRHEKRVSAVRMKT--E-K-----T--R-AILYVN
colludi/1-486 -----WMIHELAKIMTLHLSH--ESQQLFCKI-----D-G-----E--D-IYIGRA
rosviet/1-509 FTKEEMKIREMGAVLKLVSLSNASKRNIVKQLNITK--S-G-----C--S-LEVSAH
anocald/1-508 FTKEEQRTIRFLGALLKFVYSLNETKRNIVQTVQLSK--Q-N-----G--S-ILIEVI
bacsala/1-510 FTKEEMQKAREMGALLKLAYS LNATKRNIVQSIDIER--N-A-----D--R-LDISVY
calerzu/1-509 FSKKELHELRLGLAVLRFYSALNATKRNIVNSIQIIE--E-E-----N--N-LTMNII
halyeom/1-513 FLKEERKKLRLGLALLKFCYSLDSTRRTITDLDVDV--Q-K-----E--D-IQVTCY
priarya/1-508 YTKEEQKMKCLLGSILKVAQSLNITKRNIVDDIKISS--K-N-----D--G-WVMDIR
mancuni/1-511 ITKEEIKKLRELGAALKIAYALNATKRNIVKKEIEVKN--E-G-----K--T-VWLYIY
ocesoja/1-511 FLKDERRKLLELGSLLKFTYCLDARRQIVDRIDFKL--K-K-----K--N-ILIRVY
lystimo/1-515 ITKDELKSMRDYGAMLKFFVYALNMTKRNIVLSIQLER--Q-E-----N--Q-ILVFIQ
paesuae/1-508 VSKEDLVQYELLGAIKFKSFALNISEQSIKRTEITE--CDK-----E--D-ITITVT
cytsonp/1-514 FSKEEVYIIRIAGALIKFASALDASKREIVKNIRMVHPN-G-----E--E-LTFHIE
aqualbu/1-510 FTKLERKKLRLGLALLKFVYCMDATKRQVVKDFDLEI--K-D-----T--S-IELTMY
metlito/1-509 FTKDELAKYRMLGSILKFSYALNATKRNII RTLDLKL--E-Q-----D--K-LVFNVI
robkorl/1-506 FSKGELKDRIAGGMVKLASALDSSKRMQVKGIKVHK--K-Q-----D--E-LIFHLS
perfrig/1-509 FSKVEQRNMLLGAIIKLAYS LNATRRNI INALKLEE--D-H-----D--R-VKYTVV
niaendo/1-511 FTKKEMEDIRMAGAVAKLATALDASKRGIVKNIHFEEASN-----D--L-MQLTIY
liscost/1-511 DTA--TRLTIAKLTAILRIADALDSDSHQKVERISVSL--K-K-----E--L-LQISVW
brehumi/1-511 VDKSDKKMIEELGYIILLARALDRSMTQQIQNVLLRM--N-G-----E--N-LVLECV
anedani/1-509 VSEADLQMVQELGLLLLMARALDRTESQQISDVKLLC--S-D-----G--V-VVLYCW
paearte/1-509 LTEDDIALVALLGMLLQLAIALDRSETQAIGRLEAEA--A-D-----GA-L-HLRAVR
lonpaci/1-502 LMDGDI DLVFRLGSILLMSAALDRSQKPI TSLSTQL--E-E-----Q--K-LIVQPH
cohter/1-517 LKEGDFDTAAKLGSLQLLAAALDRSEQAIGTLDVSV--S-G-----GN-K-LRLTAT
spolaev/1-505 PTK--SRLVAAKLAAILRIADALDSDRQKVEKMTVSL--K-N-----D--Q-VTITVH
stamass/1-510 FDSKEIDEIQALGGI IKFVNAMVNSIN SVS QLDLQP--A-K-----K--KGFNLFVH
macarme/1-510 FNSDEKDV IQMLGSILKFSYALNISNTNIVNTLYFEQ--K-D-----D--K-YNLIIE
maccase/1-511 FNSPEEFLMIAMGGLIKFAEALNDSKTNPINQLKLER--V-KD-----D--Q-LEKIIY
fachomi/1-520 FDDMELAQLIKLGGLKFSQALDSDQTHPIQTLKLT--S-K-----S--S-YQLSLY
ruotaba/1-517 LTDEEISNLEVLGGVLFKFSALNDSKTGPIEDLKLYR--T-KD-----K--N-YKLDIY
aersang/1-515 FTEDELDRIQAMGGLIKFSES LNDSHFNI ISSVDMII--Q-N-----D--T-LILRIF
suiaacid/1-517 LTQEEFDLLERLGGLLKFAQALNDSKTAPIKDIRLLK--A-DQ-----N--T-YELLIY
glosulf/1-517 LTEDEIKELLILGGI IKVSDALNDSQTQPIKDLNFIK--K-SK-----N--K-YQLVIY
funculc/1-519 FTDEEQQLLQKLGGLKFSQALNDSQTDPI DLSLELVA--L-DD-----G--N-YRLDIY
hutsour/1-517 FSDEEIQDLQKLGGLKFSAGLNDSKTAVIEDIQLEA--T-KD-----H--N-YLLKIY
ignruof/1-517 LSPPEEFLMIAMGGLIKFAEALNDSKTNPINQLKLER--V-KD-----D--Q-LEKIIY
erecole/1-517 LAEDEKKELOILGGVLFKFAANINDSNIEHISKVHLKQ--V-EV-----K--N-YQLDIY
vagmass/1-517 FTDQELEQLQRLGGLIKFAQALNDSQTPISKIQLVR--N-KN-----K--H-LELQIY
allotit/1-519 FSQDELDMLCGLSLAKFAEALNDSHVNTVENIDLEK--E-KE-----G--YSLTVT
alkkapi/1-521 YEKSELDLLYMGSI IKFAEALSDSQVNVQSMKLIIE--S-D-----D--S-YELLIT
markali/1-519 FSEEEKETLLHLGSI IKFAEALNDSHVNLVKDIQLFK--N-KD--KNIED--K-YELTVT
atotaba/1-521 FSDEELSTLMYLGGI IKFSEALNDSHVNI VRDIHLEP--S-EN--K---E--E-YDLYVT
desince/1-519 FTEDELTLHHLLGGI IKFSEALNDSHINVVKDLAIEK--T-DD-----D--T-YTLRIV
triilyi/1-512 YTVTQVDQLQSLGGI IKFADAINDSHMEVIKNIKIKK--T-K-----N--G-HDLVLY
graseri/1-519 FTDVELDKILAAAGL IKFCEALNDSKLDTPVESLQLEK--I-ASNKQTEKN--R-YRLTVF
jeocaen/1-522 FTVSFIDQLKAFGGMIKAFANALDSDSHMNVVKDIKLOK--K-N-----G--A-YELLIY
entital/1-516 FSSQELSLIRQAGSLIKFTESLLITRVNEICSI SLTK--D-K-----K--S-YVLVID
bavseil/1-519 FSDDEVRWLIICGGILKFS DGLTTSHLN TVKSVKIAL--K-K-----N--K-ATLYIY
lacBl23/1-509 STE--NRLVVAKLSALLRVADSLDASRQKIQQLRVSV--K-P-----N--E-VLLTAR
lacseila/1-510 PID--KRMTIAKLTAILRLADALDASRQKIKTISVSV--R-D-----P--Q-VIVTAT
agrcomp/1-512 PIQ--QRMTIAKLAAILRLADALDASRQKIQSIRVSL--K-D-----PT--K-VVIQAT
schshen/1-515 PNT--KRMVAKLAAAILRLADALDVSRRQKIKTLTVSL--K-K-----T--A-IQITAE
lacplan/1-509 QVE--QRLVAKLSAILRIADALDDGRKQKIDKISVSI--R-N-----P--R-VIITCF
frusanf/1-509 QVE--RLLVSKLSAILRIADALDDGRKQKIDKISVSI--R-N-----P--R-VIITCF
nicspur/1-512 NID--RRMRIMKLSAILRIADALDASRQKIKSIDIGT--W-N-----PT--Q-IIITAT
loiback/1-509 PLE--ARLTIAKLAAAILRLADALDSDSHRAKISKISVSI--R-K-----Q--T-FTVTAT
apitimb/1-512 SIS--DRMVVIKLAAAILRIADSLDASRLQKVRTIDINL--D-D-----PT--K-LIIYVT
levbrev/1-510 DSD--KRLVAKLSAILRLADALDDAHQQTIVKISVSV--R-A-----D--R-VIITVF
secmixt/1-510 DTE--ERLLVAKLAAAILRLADALDDDQKIRRISVSI--K-A-----P--E-LVLTIVY
weisaga/1-513 STE--NRRLISKLAAAILRLADALDDDRQKIKKISVSI--K-N-----H--H-VIISAY

ligacid/1-508 PVA-QRIIVAKLAAIIRLADALDDDRQQKIKDIIIVSL--K-P-----Q--K-VIITAK
 lenhilg/1-521 SAE-NRRLIAKLAAILRLADALDDDRQQKIKKISVSI--K-T-----H--S-VVITVY
 fausueb/1-508 QIN-DKLRIAKLAAIIRLADALDDSHLAKIKKITLHL--D-N-----ESRQ-IEITAS
 furnili/1-508 TMD-NRLVMVKLAAIIRLADALDDSRHLKHKISVSI--K-K-----P--E-IIIHAT
 perbeni/1-504 NAP-ERLLIAKLTALLRLADALDDSRQQKIKKIAVSI--K-K-----D--K-VIITAH
 liqnage/1-502 APA-VQMKVAKLAAMLRLADALDDSREEKIQKISVSL--Q-T-----D--Q-LIYAY
 leuholz/1-497 SPA-QRLRIAKLSAILRLADALDDGRRQKITQLTVSI--G-E-----S--Q-VTITAQ
 lacprot/1-510 FEDSEIELILKAGNLVRFCDALNVI PMNKIEKAELLK--E-G-----A--K-YRLRIK
 anobury/1-524 RAR-NRVITAKLVAIIRADALDRSHRQKISGLSIAM--K-G-----E--T-MMIKGE
 cloacet/1-516 SHK-DRVVIKLVSIIRIADALDRSHQKIKTIEVKL--Q-E-----N--K-MI IKAS
 petxyyla/1-521 DEK-NRVIVAKLVAIIRLADALDRSHKQKIRGMKINL--E-E-----K--E-VI IKVE
 thecaen/1-520 GTE-ERIKAMKLI A IIRADAMDTSHKQKLSISAMDV--S-G-----D--Q-FIVRVE
 blamass/1-514 SRE-NYLLTAKLTA IIRLANAMDRSHYQVKALNVTL--K-D-----R--I-LYLVVD
 anafaec/1-521 NKE-TYIKISKLSAIFRIANAMDKSHKQKFSNISVNY--R-D-----H--H-LTITGT
 lacsacc/1-513 SEQ-QYLKVAELTA IIRLANTLDRSHMQVQQIRASL--R-E-----R--E-LTLNLT
 petatla/1-512 PTR-ERIIIVAKLIGIIRADALDRSHKQKIKIESVRV--K-D-----K--E-LIIRGK
 acestic/1-513 PYE-NRIKTKLSSILKLCDAMDITHKRKIKSIDIKV--K-D-----T--N-LIITAH
 seralka/1-514 SFQ-DRVVAKLVSIIRIADALDRSHQKIKDIRVKF--Q-E-----K--K-MI IKAI
 anacarb/1-518 NGK-NKVIAAKLIA IIRLADSLDRSHKQKVKEMRIVL--D-D-----K--K-VLVKVN
 geoferr/1-520 SEE-NRVVSKLVAIIRLADALDRSHRQKIKTVQIVW--E-E-----K--E-ILFRVD
 tincali/1-522 K GK-DRVTTAKLTA IIRLADAMDRSHRQKIYDVKVRQ--Q-N-----K--E-MVILGI
 selbovi/1-507 GAD-IQMTVAKLVAIIRLADAMDDSRQQKIKSISVSV--R-E-----D--A-VTITAH
 prohipp/1-516 TKE-QKVTVAKLAA IIRLANSLDCTHRQKIVKCTASF--N-E-----E--M-LFVAVE
 spoovat/1-515 TPD-QKVAVSKLSA IIRLADADRSHRQKVSQAVAL--R-G-----D--E-LIITVT
 denquer/1-519 TDQ-QQVTGKLLAA IIRLADADRHRQKSTSLAIEL--K-G-----N--Q-ITIKVN
 calkiri/1-518 SEK-DKLIISKLSAMLKLANSLDMSHKQKIWDIVNT--D-E-----K--I-VVITAR
 ///
 alimeng/1-510 ADKP-LHLELELASDWLKKWRKTFQSD-IRLEVEQI-----D
 efflacu/1-515 SIKE-NLLEYALLEDLKRVSKVFTRS-FSFVVKTPATFTN---S
 tumflag/1-518 VLPQ-HILDRGLVDEMELALSPTYGIK-FGYELTPVPTVETT---N
 kyrtusc/1-515 ARQP-LGIELDLALEWTKKCRKVFQRE-IRLEVDDLDHASR----L
 sulther/1-503 STQG-IEVEQAAAQSCAPYVKKNFKR-TLRIESEE----K-----
 ferorga/1-501 AHEG--DIEYQAANELLPFRKAFGF-PLSISSEKGA--P-----
 colludi/1-486 PGIK-HTIPLTAEAQFMEQFQKVF GK-KL--HFVEE-----
 rosviet/1-509 CKGD-YLAEKYQTEKQKRHLEKALRT-DITMNFKRI----E-----
 anocald/1-508 CCGD-FRAEYQAEKKNKKHLEKVLKH-PIELRFQO----K-----
 bacsalu/1-510 CKGD-FLAEYQTEKQKRHLEKAIKT-DLDINFSRI----D-----
 calerzu/1-509 CTHN-WQAELYAEKQKRHLEKALKR-KIILQFIAM----K-----
 halyeom/1-513 CDHE-WMPEEYQAEKQKKHLEKAIKK-GVELSFVKNGQW-G----
 priarya/1-508 CHGD-YKPEEHRMEKQKKHLEKSLKI-SLTPNFN-----R-----
 mancuni/1-511 YQGN-IQAEYQFEKQKKQLEKAIKH-TVEAIYIEWRT--E-----
 ocesoja/1-511 TKAN-AMPEEYQAEKQKKHLEKAI GK-DVELEFIADSQ--M-----
 lystimo/1-515 TKGS-AVAEKYQADRQKKHIERVFKQ-PVTIEFIEEGWKDL-----
 paesuae/1-508 YDGD-AFFEEEQANKYKKHLEKALDK-NITLTFNHV-----
 cytspon/1-514 CTGN-FFVEYQAEKQKKNLEKILKK-NIVFHFQKS-----
 aqualbu/1-510 CDQD-WTPEAYQVEKQKKHLEKAMHT-KINVHFLTIH---S-----
 metlito/1-509 CNRD-WKPEYQVEKQKKHLEKVLKR-SISINFIE-----E-----
 robkorl/1-506 CMGN-TFVEYQAEKQIRHLEKSLKY-KITLEFTSN---R-----
 perfrig/1-509 CDGN-YSPEYQAEKQKKNLEKILKK-NIVFHFQKS-----
 niaendo/1-511 CEGN-PFVEYQETEKHIRQLEKVLQK-AIHLKFIQY---A-----
 liscost/1-511 ANDDL-MLEKWTTFDEKAFFAEVYGI-KPQIEKGGI-----S-----
 brehumi/1-511 GTKK-ELIEYSLLEQVVLVKMSKLLKRP-VTYLAIQNPAK-----D
 anedani/1-509 GRVNEQSLEAQTLEHKKKFRKQFGLP-LRLEWKS-----K-----
 paearte/1-509 ANGA-LAIERKEVDALAGDFKKLWGL-SPVLYAPDL---R-----
 lonpaci/1-502 SSSN-MDIEHWEVQKRRKIFECIWNM-EFHLK-----F-----
 cohther/1-517 ASRS-LPMEKMEVESIAKEFRKVGWV-SPKLTVAQPLAAK-----
 spolaev/1-505 SDDL-SLEKQTFKDKAAYFEEVFGI-KPILR-----G-----
 stamass/1-510 YKGE-PVAEYQANRQKKHIERILKE-DMNITFTKT-L-----
 macarme/1-510 YNGD-PIAEYQAEKQKKHIEKIKS-KINLIFTKALQ-----
 maccase/1-511 YNGD-PIAEYQAEKQKKHIEKIKS-KINLIFTKALH-----
 fachomi/1-520 CNGP-VVAEQYRAQKHAKHLKRALDGANLCLDFVPLESLS-----
 ruotaba/1-517 HSTP-VIAEKYRSMRHAKHFERALDG-DLEIEFIQ---K-----

Anexos

aersang/1-515 YNGT-LISEVYRAEDQKKHIERIIDRD-IQPDFIPTTAHNL-----
suiacid/1-517 HNES-IVAEKYRANRHKHLERLALDG-SLKLNFVYTE--R-----
glosulf/1-517 HTAP-VVAEAYRTNRHLKHLRSVLDG-NLELKFIELE--S-----
funculc/1-519 HHKP-IIAEKYRAQRHLKHLERLALDG-QLSLNFIAINQPA-----
hutsour/1-517 HHGP-ALAEYYRTHRYAKHLERLALDG-KLELKFID---I-----
ignruof/1-517 HDRP-VLAEQYRTQRHKKHIERSLNA-QVALNFIQQE--P-----
erecole/1-517 HVGP-ILSEKFRANRHQKHLERLALDG-KLTLHFINTD--A-----
vagmass/1-517 HHPH-IVAEYRINRHIKHLERLALNSSDIALSYFL---I-----
allotit/1-519 YKGN-IIAERYRAEKQRNHLERVI GD-KVDIHFTIAQND-----Q
alkkapi/1-521 YSGD-ATAEKYRANKHKNHIERVLGK-SLDITFNKNEETSSQTE-V
markali/1-519 YNGD-VVTEKYRANKHKNHLERVLGD-TVHITFKSESD-----Q
atotaba/1-521 YTGD-VLSERYRSNKQKKHIERILDK-SVTVHFTDEPASQEI-Q-Q
desince/1-519 HKGD-VLAEYRANRQKKHLERILDA-KVDIQFIEADDPVYT---S
triilyi/1-512 YKGD-ILAEYRAERQRKHIERLLSG-KLNIIIFTE-----S
graseri/1-519 HKGD-IIAEDYRSQRQKKHLEKVVGK-KVDIVFEA-----K
jeocae/1-522 HKGS-VIAEKYRAMRQKKHLARVLKD-DVITFPVDMESGEKETAEQ
entital/1-516 WSKL-PLAESYRANRQKKNFVAVINK-SVKLEFTRSEKKE-----L
bavseil/1-519 HSGT-ILTESYLANRRLKHLNRIIAQ-ELSLEFIDMTQDK----K
lacBl23/1-509 ADDDI-ELERWTLARKGKFFSEVFG-LGLELKGKRN-----L
lacsela/1-510 AKENF-ELEKWTFRKGGFFEEVYGL-QPILKKGKGR-----L
agrcomp/1-512 ANDDI-ELERWTFERKGEFFESVFGV-QPELKGRLK-----L
schshen/1-515 SREDI-ELEKWSFHNRAFFAEVYGM-TAELKKGQYGLGK-A---
lacplan/1-509 AHDDL-FLENWVFAQKAEFFKEVFG-LTPVIKLRGV-----R
frusanf/1-509 AHDDL-FLENWVFAQKAEFFKEVFG-LTPVIKLRGV-----R
niscpur/1-512 ADQOI-ELEKLDLDRKGAFFESVFGV-KPKLKGRLK-----I
loiback/1-509 ANDDI-ELEKWTFSQKGTFFREVFGL-QPILKRRGT-----L
apitimb/1-512 TDEL-TLETNLNRKGAFFESVFGI-KPILKGEIR-----Q
levbrev/1-510 SDDL-SLIHWAFYTKAKFFTDVFG-LQPVLKQRRLLH-----K
secmixt/1-510 SNEEN-SFEQWFEFSYKSKQFFETTFGL-KPRLKQRSVTS-----K
weisaga/1-513 SNDSL-AYENWIFNSKSKQFFQETYGL-KPILKQKGVK-----P
ligacid/1-508 SNERL-SFENWVFKSKSKQFFETTFGL-KVTLKQRRRIQANG--K---
lenhilg/1-521 SNANL-AYENWIFNSKSKQFFKEAYGL-KAVLKGKRGV-----D
pauueb/1-508 ADKNI-ALEQLTFQKADFFQTVYGL-KPILKSSR-----K
furmili/1-508 ANDDI-ELETWTFNGKRRKFFEEVYGM-TPILRRTGR-----P
perbeni/1-504 TNHNI-LLENWVFKQKAQFFQDVFGM-LPILKRRVNR-----K
liqnage/1-502 ATQNI-ALEKWSFKNKAALFTEVFGI-QPILKQRRRL-K-----
leuholz/1-497 TSADL-QLEIFVFTQKASFFFAVFGM-PIVLKRRKGR-----S
lacprot/1-510 WSLP-PYGELSRERQKKKIEYILGK-KVILDFY-----N
anobury/1-524 SVEEA-LLEEWTFEVKSEFFQEVFGI-RPQLKVKRKMMAHAENA---
cloacet/1-516 TVEEI-LLEEWTFEAKSFFQEVFGI-TPILNIKREISC-----G
petxya/1-521 TVEDA-LLEEWTFETKAEFFQEVFGV-TPILKIKRRIKY---E---
thecaen/1-520 SWEEA-LENWTFNMKSEFFSEVFG-LKPMVIRNRMVGEK-----
blamass/1-514 SARVD-SLELGLLKDKKEFFEEVFGI-RLVMRRKGR-R-----
anafaec/1-521 TLEDL-TLERGLFEKKADFFEEVYGI-RPQLKQRRS-S-----
lacsacc/1-513 VNGDF-TLEQGLCREKMDFFYEVFSV-RPKLKVKRE-M-----
petatla/1-512 SVKNT-TLEEWNFAKKSEFFKEVFGI-KPVLIIKREL-----
acestic/1-513 AKDDI-PLEKWFYMKKADFFEDVTGY-RPILKVK-----G
seralka/1-514 AKADT-LLEEWTFHNKSEFFEEVFGI-TPILSIERE--A-----
anacarb/1-518 VADDF-LLEEWTFETKAEFFEEVFGV-TPVLKTRMMKH---G---
geoferr/1-520 TEEDI-LLEEWTFETKAEFFKEVFGV-TPIMKIKRKM---I---
tincali/1-522 ADVDT-LLEEWTFEIKSEFFQEVFGI-KPTLKVRRRLTNG--T---
selbovi/1-507 SMENL-ALEEWAFQRKAKLRFREYGI-PAVLKQRRSLKK-----
prohipp/1-516 AREDI-SLEEWTFEDKARFFENVFGI-RAILKQRA--G-----
spooat/1-515 SREDM-SLEEWNFADKAGFFEDVFGI-KAILIRRA--R-----
denquer/1-519 TQADI-SLEEWTFDKVFFESVFGI-RAILTRSAEVS-----
calkiri/1-518 TKEDV-LLEIWTFEANSDLFKEVFGV-VPILKIDRV-----M

Anexo 3. Alineamiento de aminoácidos de las proteínas Ppx. (a) Ppx1 de *Lc. paracasei* (WP_003606084.1), *Lv. brevis* (AYM03703.1), *Lp. plantarum* (WP_103851489.1), *Lm. reuteri* (MCH5356744.1) y *L. acidophilus* (MCT3601606.1), miembros de Lactobacillales, familia *Lactobacillaceae*; Ppx de *Alloiococcus otitis* (WP_273341723. 1), miembro de Lactobacillales, familia *Carnobacteriaceae* y *Clostridium acetikum* (WP_044826117.1), miembro de Eubacteriales, familia *Clostridiaceae* (b) Ppx2 de miembros de *Lactobacillaceae*: *Lc. paracasei* (CAQ67832.1), *Lv. brevis* (WP_135367400.1), *Lp. plantarum* (WP_003641094.1), *Lm. reuteri* (KRK50994.1) y *L. acidophilus* (AZN76677.1). La Ppx de *E. coli* (WP_001121363.1) se incluyó en ambos alineamientos para su comparación. Para Ppx2 sólo se muestran los primeros 347 aminoácidos de la Ppx de *E. coli*. Las secuencias consenso del bucle P1 y P2 conservadas en la familia GppA/Ppx se muestran en azul sobre los alineamientos. Los aminoácidos en negrita muestran los que coinciden con ese consenso. Los aminoácidos en recuadro indican los residuos de glutámico y arginina implicados en la catálisis en la familia GppA/Ppx. Los dominios ASKHA (acetato y azúcar quinasa/Hsp70/actin) y HDc en Ppx1 se indican en azul y rojo, respectivamente. Los aminoácidos característicos del dominio HDc en Ppx1 C-terminal están marcados con círculos rojos.

(a)

ASKHA domain >>		
DXGS[N/Y]S (P-loop 1)		
Lm. reuteri Ppx1	---MKRSLT---AIIYLEPDQVNLN---IIEIPTLKVINNVRSGLLNIGN--AKVANYS	48
L. acidophilus ppax1	---MKKTLF---GMIYMSYKIQLN---IVDLRDLTIIEKLDSPFLQAN--SKSQVFE	48
Cl. acetikum Ppx	---MDEKQALTTVAGISVGSYAVRMKISEVLPEGKTRTLERTSKSIALGRDFTSGKGVSY	57
Lc. paracasei Ppx1	---MANNIQ---GFVMIQAQIVFS---ITNLRTLKTIERGRYPVAIGDDFYAEHEILP	50
Lv. brevis Ppx1	MKFMADDYF---GAMLVNVSSIELS---IVNLKTGTQTERVKSTVAIGENIYNHEEISF	53
Lp. plantarum Ppx1	---MAAKLF---GIMMINVQSIELS---IVNLRTLRQVERVRSIVSLGEDIYDQHTIDY	50
E. coli Ppx	MPIHDKSPRPQFAAVD IGSNS FHMVIARVVDG-AMQIIGRLKQVFLADGLGPDMLISD	59
A. otitis Ppx	--MVHQNKQANRIGLID IGSNT IRLVIFEIDAVNSFREILNIKPARLAQYLD-GTMMSD	57
. : . : . : .		
[D/E]XGG[G/A]SXE (P-loop 2)		
Lm. reuteri Ppx1	ENMTTIVNNIEGFKQIINDYQATAVKFGDLEDLDPVATRYVADQLEVRTGLRIEWLNNN	108
L. acidophilus ppax1	QDMDKICDAIEGFKKLAQYQIENFKFYGNEQLIDEMASAFIADQIKVRTGLKIVWLNGG	108
Cl. acetikum Ppx	EIANEVCEVLRGFKKLMNEYKVKTYRAVATSG RE AENNDYILDQIYSKTLGDIIEINSS	117
Lc. paracasei Ppx1	DTVDAIVQAQDAINQIFKDYGVPTVNVFASTSWAEADNAEFVRDQLYTRTGWLKTTLSL	110
Lv. brevis Ppx1	ETVADAVEALRGFLQILKDYGVTHYKLGWSQALSSAPNAEFMRDQLYVRTGLHIEWLSLG	113
Lp. plantarum Ppx1	DSVEQAQAALSGFVQIMNDYGVKDYHLWGSWSLSANNADYIQDQLKVRTGLKIDWLSSS	110
E. coli Ppx	EAMTRGLNCLSLFAERLQGFSPASVCIVGHT RR ALNATDFLKRKAEKVIYPPIEISGN	119
A. otitis Ppx	QGVDLLIDLKKNYADIAKLYQIKQLIPIATA RR SDNATRILRQVKETGVDLLELSEK	117
: : . : . : . : . : . : .		
[D/E]XGG[G/A]SXE (P-loop 2)		
Lm. reuteri Ppx1	QLMAQMSYLLTLL--PDFEKLKSHNMYLLS IGLS STLTFPHGSGFERAWDIDLGNAKI	166
L. acidophilus ppax1	QIVYAKVLSGLKLEVINQEDSTSESTYLLS IGSAM INLSLFKHKHVSWNPLGPREI	168
Cl. acetikum Ppx	VKRFLLAKGIR--ESLQNYQKLRAGVMVLD IGSGN IEVSIYQQGSITFSQNLKLSLRL	175
Lc. paracasei Ppx1	RE AFFRQAAM--VKFPQFKSITQKGTVLID ISSGS VELTTFNSGVFGFSRNLSLGPLRV	168
Lv. brevis Ppx1	RE SFVRNEAIA--LKLDRYHHLVKEHAAIIGLNS GST LSFFAHEDLVASHNMKLGPIRI	171
Lp. plantarum Ppx1	RE TYLRSVAVA--VHFFRFKQMITKPTYLL IGNSGS VGISHYDQSNFVRSRLRGLPVRI	168
E. coli Ppx	RE ARLIFMGVEHTQ--P-----EGKRKLVID IGGGST ELVIGENEPILVESRRMGCVSF	172
A. otitis Ppx	RE AYYGNVAVRHTL--P-----IQ-DGISID IGGGST ELVLFKDKQVRASHSPFFGTVSL	169
: : . : . : . : . : . : *		
[D/E]XGG[G/A]SXE (P-loop 2)		
Lm. reuteri Ppx1	SQLMGRLRKTATNPTEI---IQDYISSKLEYLTPELTKKK---HTVMVMQ---NALSIN	216
L. acidophilus ppax1	QEIAEITNETPNPIDV---INDYLRAIRGHARQLKENP---SSSIIQ---HADALN	218
Cl. acetikum Ppx	KEILSELESKTLDFPKL---LEDYIKSNADILLKTFDINTNI--QHFIVLG--DVMKDL	227
Lc. paracasei Ppx1	YEIMSDVQRSVTNYVEV---MRDYIDSRLDFMRLLPQGVETN--MILMG---SNLSIF	224
Lv. brevis Ppx1	KEVLQNLRAITAPNFVDV---LDDYINSKVDDFYRFLPDEMQTVPNQVMLVG---A-APLN	220
Lp. plantarum Ppx1	AEVLEDLQSSVPNYVEV---LDDYISSQIVDFGRLLPGRRD-QPSNVMLG---V-APFA	224
E. coli Ppx	AQLYFP--GGVINKEN-FQRARMAAQKLETLTWQFRIQG---W-NVAMGASGTIKAAH	224
A. otitis Ppx	KQHFFQ--DKDHNDAKAIKKASKWVADQFQEPFLKDCQV---P-LIGIG--GSARNIA	220
: : . : . : . : . : . : *		
[D/E]XGG[G/A]SXE (P-loop 2)		
Lm. reuteri Ppx1	KLFLP-----HGQQ--IAEVPLDKFHDDYQKILSPVKDGLMKSIIQDDQFELLPNYL	268
L. acidophilus ppax1	NAYLK-----QSNS--ANKITHKQDFDFYQNLIEMLNDVMQTYHLEPAVAEHTIPNAI	270
Cl. acetikum Ppx	G-----KLCDCPDNYIDKSQFLMVYQSLHLKPTHKISSYTKISKEGAYTLIPSEFI	270
Lc. paracasei Ppx1	QNIIP-----EGKH--QVETDRPGFDLLYDEVTKASDQYLADTYLTSQTLVLPVTL	272
Lv. brevis Ppx1	TYFIP-----KGDY--SYSLSIKDFNKFCSEVAGASNQYLMERLHLEENVEIVLPPVL	276
Lp. plantarum Ppx1	TLFRQ-----QSKAGVEELSKADFPQALYEDVLNASDQYFLMDKYVEDEEDVRLIVPELL	274
E. coli Ppx	EVLMEM-----GEKD--G-IITPERLEKLVKEVLRHRNFASLSLPLGSEERKTVFVPGLA	276
A. otitis Ppx	EVYQHEDYPLAGIH--GYSMDQAGLDQVFRFTAETSFKLSDLDLSSDRDRIIPATL	278
: : . : . : . : . : . : *		

Anexos

	Hdc domain >>	
Lm. reuteri Ppx1	VTARTVRLIQPAGLYVTDISTMDGISHGIVDNPK--TRQINEMIRTAADNISSRYGVD	326
L. acidophilus ppx1	SIKQFISLLHSKNIYITDMSVVTGLLMQEKGGKPN--YD---RDIVMTSAQNMASTRYLDV	325
Cl. aceticum Ppx	LLKVFDMTSSPQIYTPLVNLEDGIVADLVQKLIQRRKQEFLLHDIYTLVRSLAKRYHYD	337
Lc. paracasei Ppx1	LVYRLVETLNSQSIWISDLKAI DGIEVNAHEGGFKLGFDPNEEIVISANNLAERYQVD	332
Lv. brevis Ppx1	LIKKLLTVVHAEKHLVNLNVLDTTQAEIAGYHXYHFE--NQILASADDLARRYRVE	334
Lp. plantarum Ppx1	LINELLQLTNAEKIWLGNVTVDGLIIQEAIKLGYKKNYFN--DQIVTAAKNIADRYNVE	332
E. coli Ppx	ILCGVFDALAI RELRLSDGALREGVLYEMEGFRHQD----V--RSRTASSLANQYHID	329
A. otitis Ppx	VFLEGFKMGATAFVSSYGI REGLII EYINQLPHYPSLHFT--QQOTVYRMAKQYRMM	336
	. : * :	
Lm. reuteri Ppx1	SAHRDF---VTRFSLQLFDQLRPIHRLGQHE--RLLLEIASRIDDIGNFINQRGHRHSA	381
L. acidophilus ppx1	MHHVIA---VRKFFALHIFDRLRNVHLLSKRS--RKLELAATVDIGSFPVNLQSRYEQSA	380
Cl. aceticum Ppx	ENHANE---VMDKSLCLFDGSKRLHGLGEE--RFLQLATIIHVDVGKFINIQHYNHSY	392
Lc. paracasei Ppx1	EAHMQA---TRTVLQLFDRLRKLHGMGKRE--RLLLEVAATVSDIGSYETHKHHAHNS	387
Lv. brevis Ppx1	PNHMNL---VRRFALHLFDQLKPLHLLTARD--RLLLQVAIVHDI GGFDTHQHYLHSD	389
Lp. plantarum Ppx1	PKHRDL---VTRKFSLHLFDQLKPLHLLGKRE--RLLLQVAIVHDI VGSYDHPHYLHSD	387
E. coli Ppx	SEQARR---VLDTTMQMYEQWREQQPKLAHPQLEALLRWAAMHEVGLNINHSGLHRRSA	386
A. otitis Ppx	DLPASQRMNMSRLLDVLADFDLLHPSALD--VEFAHFGAALYLYLGVIEDKAESQHTF	393
	: : : : . : : * : : : :	
Lm. reuteri Ppx1	YIMEANPLIGLSDKDNRIIAEVARYHSA---ESPDISQAHYRHLDDIEMPVAKLAAIL	437
L. acidophilus ppx1	EILDANKLIGLSDRDNVSEICRYQTIDDDHSPNIGGHYRHLAADIQLEVAKLSAIL	440
Cl. aceticum Ppx	DIIMASNIMGISQQQLEIIANVAKYHST---LTPKISHENFNRLSHKDRVVIKLVSI	448
Lc. paracasei Ppx1	YIIKASEIMGLNDEVTMVATITRFHSS---ITPQSDLNKFPMTSTENRVLVAKLSAIL	443
Lv. brevis Ppx1	YVLKQSEMLGLSTETQIIAASRYHST---RTPAEDLAHFRLDSEKRLVVAKLSAIL	445
Lp. plantarum Ppx1	YILQATELMGLTDEKRMVALISRYHSA---QTPSKDIRHFGLQVEQRLLVSKLSAIL	443
E. coli Ppx	YILQNSDLPGFNQEQQLMMATLVRYHRK---AIKLLDLPRTFLFKKKQF--LPLIQLL	439
A. otitis Ppx	YLISNTNLKGFTHKDRVKLALIASYKKN---SLFHQY-----	427
	: : . : * : . : : : : :	
Lm. reuteri Ppx1	RLVDALDDSRQLKISSIRLKLVGDSRLIIKAIANDDLVLEKWSFSKKSQFLFKD-----	490
L. acidophilus ppx1	RIATALDASHRQKIKKIVLSLTKENVLVRAKTNADITLERWSFKKRVKLFED-----	493
Cl. aceticum Ppx	RIADALDRSHQKIKTIEVKL-QENKMIKASTVEEILLEWTFEAKSFFQE-----	500
Lc. paracasei Ppx1	RVADSLDASHRQKIQQLRVSV-KPNEVLLTARADDDIELEERWTLARGKGFSE-----	495
Lv. brevis Ppx1	RIADALDDAHQQTIQRISVSV-RPNKVIITVFSDDLSLIRWAFNYKADFFAD-----	497
Lp. plantarum Ppx1	RIADALDDGRKQIKIKISVSI-RNPRVITCFADDDLPLENWFVAQKAEFFKE-----	495
E. coli Ppx	RLGVLLNNRQATTTPTTLITIDD-----SHWTLRFPFDWFSQNALVL--	483
A. otitis Ppx	-----TKSTSDWFSQDELDML	444
	. * :	
Lm. reuteri Ppx1	-----VYGIEPVLTERS DH-----	504
L. acidophilus ppx1	-----VFGIQVILKQEGMNRQ-----	509
Cl. aceticum Ppx	-----VFGITPILNIKREISC-----	516
Lc. paracasei Ppx1	-----VFGLELGLKGRNLL-----	509
Lv. brevis Ppx1	-----VFGLPVVKQRRLHK-----	512
Lp. plantarum Ppx1	-----VFGLPVVKLRGVR-----	509
E. coli Ppx	-----LDLEKEQYEWGVAGWRLKIEESTP-----EIA	512
A. otitis Ppx	CLGSLAKFAEALNDSHVNTVENIDLEKEKEYSLTWTYKGNIAERYRAEKQRNHLERVI	504
	. : . :	
Lm. reuteri Ppx1	-----	504
L. acidophilus ppx1	-----	509
Cl. aceticum Ppx	-----	516
Lc. paracasei Ppx1	-----	509
Lv. brevis Ppx1	-----	512
Lp. plantarum Ppx1	-----	509
E. coli Ppx	A-----	513
A. otitis Ppx	GDKVDIHFEAONDO	519

Anexos

Anexo 4

La presente tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas.

Corrales D, Alcántara C, Clemente MJ, Vélez D, Devesa V, Monedero V, Zúñiga M. Phosphate Uptake and Its Relation to Arsenic Toxicity in *Lactobacilli*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(9):5017.

Corrales, D., Alcántara, C., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2024). Ppx1 putative exopolyphosphatase is essential for polyphosphate accumulation in *Lacticaseibacillus paracasei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(5).

Los resultados de esta tesis han sido presentados en las siguientes conferencias y congresos.

Presentación póster

Phosphate Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Its Implications in Functionality. 9th PhD Students Symposium IATA- CSIC. 28/10/2022. Valencia, España.

Síntesis de polifosfato en *Lacticaseibacillus paracasei*. Jornada Científica 60 aniversario de la SEBBM (1963-2023). 02/06/2023 Valencia, España.

Papel de las enzimas Ppx en la síntesis de polifosfato en *Lacticaseibacillus paracasei*. IX Congreso Nacional de Microbiología Industria y Biotecnología Microbiana. Sociedad Española de Microbiología. 10-12/06/2024, Madrid.

Presentación oral

Contribución de los genes de exopolifosfatasa *ppx1* y *ppx2* a la acumulación de polifosfato en *Lacticaseibacillus paracasei*. 16a Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas RedBAL 2023. 12/05/2023. Madrid, España.

Exploring the regulation of polyphosphate synthesis and utilization in *Lacticaseibacillus paracasei* BL23. Xth International PhD Student Symposium IATA- CSIC. 20/10/2023. Valencia, España.