

Química y vida en ambientes de salinidad extrema

Oscar Millet

Resumen: Las arqueas halófilas del género de halobacteriales afloran en ambientes de alta salinidad, evitando el choque osmótico al aumentar la concentración de sal en el citoplasma celular (hasta 3-6 M). Con el fin de permanecer plegadas y funcionales a una fuerza iónica tan elevada, las proteínas constitutivas de las arqueas halófilas han evolucionado hacia una composición de aminoácidos atípica. Este es un rasgo universal y las halófilas contienen las proteínas con carácter más ácido de todos los seres vivos.

Palabras clave: Extremófilos, arqueas halófilas, estabilidad de proteínas, actividad enzimática, efecto de Hofmeister.

Abstract: Halophilic archaea (halobacteria) thrive in hypersaline environments, avoiding osmotic shock by increasing the ion concentration of their cytoplasm by up to 3-6 M. To remain folded and active at this high intracellular ionic strength, their constitutive proteins have evolved towards a biased amino acid composition compared to their mesophilic counterparts. This is a universal evolutionary trait and halophilic proteins are amongst the most acidic proteins naturally found.

Keywords: Extremophiles, Halophilic archaea, Protein stability, Enzyme activity, Hofmeister effect.

Vida extrema

La vida se abre camino. Esta afirmación no ha perdido vigencia a pesar de quedar inmortalizada en una famosa película de Hollywood. La experiencia nos demuestra que siempre que se han dado las mínimas condiciones necesarias para que la vida exista, ésta acaba apareciendo. La enorme capacidad de adaptación de la vida a su entorno natural queda especialmente reflejada en los organismos extremófilos, que se definen como el conjunto de microorganismos que habitan en condiciones extremas. Estos seres unicelulares se caracterizan por vivir en entornos muy diferentes a los que pueblan la mayoría de los seres vivos, como ambientes de elevada temperatura o alta acidez.

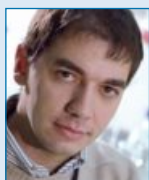
Los microorganismos halófilos (del griego *halos*-sal y *filos*-amante de) son aquellos que habitan en ambientes de muy elevada salinidad, distinguiéndose entre aquellos que toleran la sal pero que pueden sobrevivir en entornos no salinos (halotolerantes) y los que requieren de sal para vivir (halófilos estrictos).¹ Benjamin Elazari Volcani describió por primera vez la presencia de arqueobacterias en muestras de agua del Mar Muerto en 1936,² en una época en que se consideraba un dogma la ausencia de vida en ambientes de tan elevada fuerza iónica. Desde entonces se ha visto que no sólo las arqueas halófilas sino también bacterias e incluso algunos



Figura 1. Las arqueas halófilas sobreviven en ambientes de salinidad extrema como el de la figura (salar de Uyuni, Bolivia). Foto: Luca Galuzzi.

organismos eucariotas (p. ej. el alga *Dunaliella salina*) pueden sobrevivir en este ambiente tan hostil.

Una célula “convencional” (donde aquí “convencional” se refiere a mesófila) no puede sobrevivir en un entorno salino porque sufriría un choque osmótico debido a la gran diferencia de concentraciones de iones entre el citoplasma y el exterior. Este es el principio biofísico que explica el éxito del uso de la sal en la conservación de algunos alimentos. Así pues, ¿como es posible que los organismos halófilos se hayan adaptado al entorno? Esencialmente se han descrito dos mecanismos. Por una parte muchos halófilos consumen energía para mantener la sal fuera del citoplasma y evitar que sus proteínas constituyentes se desnaturalicen y/o agreguen.³ Para conseguirlo acumulan sustancias osmoprotectoras en el citoplasma, típicamente osmolitos neutros o zwitteriónicos como la betaína, todo tipo de oligosacáridos, algunos aminoácidos y sus derivados. Este es un costoso mecanismo que los organismos más sencillos no han podido desarrollar. El segundo mecanismo es el que han conseguido las arqueas halófilas del género de halobacteriales, que eliminan el gradiente con el entorno de una manera mucho más sencilla, dejando entrar iones para igualar la osmolaridad citoplasmática con la del medio extracelular.⁴ Los halobacteriales prefieren aumentar la fuerza iónica del citoplasma con potasio porque coordina menos moléculas de agua que el sodio.⁵ El mecanismo mediante el cual las proteínas cons-



Oscar Millet

Unidad de Biología Estructural. CICbioGUNE
Parque Tecnológico de Vizcaya, Ed. 800.
C-e: omillet@cicbiogune.es

Recibido: 26/06/2011. Aceptado: 28/07/2011.

tituyentes de los organismos halobacteriales consiguen estar correctamente plegadas y funcionales en condiciones de tan elevada osmolaridad constituye una cuestión fascinante a la vez que no del todo conocida. Los últimos avances en este campo se discuten a continuación.

Química después de todo...

La determinación de la secuencia completa de los genomas de diferentes organismos halófilos y su posterior comparación con los homólogos mesófilos ha permitido establecer las bases moleculares de la adaptación halofílica.⁶ A nivel de genoma, las arqueas halófilas se caracterizan por un gran contenido en bases guanina y citosina (en promedio más del 65%). Esto puede estar relacionado con el elevado contenido de residuos ácidos, si bien también se ha asociado a una falta de secuencias de inserción, que son ricas en adenina y timina. Más interesante es el análisis a nivel de proteoma, que ha revelado una huella característica en la composición aminoacídica de las proteínas pertenecientes a los organismos haloarqueales (Figura 2).⁷ En concreto se han observado las siguientes características: i) un enorme incremento en residuos con carga negativa (glutamato y, muy especialmente, aspartato). Esto hace que las proteínas pertenecientes a estos organismos se sitúen entre las más ácidas de todo el proteoma. Este aumento va acompañado de una baja frecuencia de aminoácidos cargados positivamente, en particular del residuo lisina; ii) una prevalencia de residuos de cadena corta frente a residuos muy hidrofóbicos. Esta estrategia ha sido usada por la hidrofolato reductasa de *Haloferax volcanii*, que requiere grandes cantidades de sal para su correcto plegamiento;⁸ iii) una mayor flexibilidad asociada a las proteínas halófilas probablemente derivada del hecho de que tengan un menor contenido de aminoácidos de cadena larga.

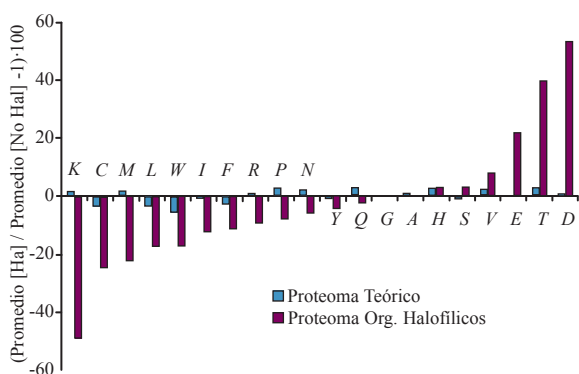


Figura 2. Frecuencia de los aminoácidos (D, en porcentaje) para un proteoma perteneciente a los organismos halófilos (azul) frente a su equivalente en los organismos mesófilos (morado). $D < 0$ implica una menor frecuencia que en una distribución aleatoria de los aminoácidos.

En los últimos años se han clonado y caracterizado un número creciente de proteínas pertenecientes a organismos halófilos.^{9,10} La determinación de la estructura tridimensional de un número reducido de proteínas halófilas ha permitido constatar la elevada similitud estructural con sus homólogos mesófilos, observándose cambios exclusivamente en la superficie de la proteína.¹¹⁻¹⁴ Este resultado no es sorprendente y

pone de manifiesto la especial importancia que tiene la interfase proteína-solvente en el mecanismo de adaptación halofílica.

Así, el mecanismo de adaptación se traslada a una composición química característica de sus proteínas constituyentes. Entender las bases termodinámicas y la química subyacente en el mecanismo de la interacción entre estos aminoácidos y el medio salino sin duda constituye un interesante problema en biología moderna.

Hacia el mecanismo de adaptación halofílica

Existen varias teorías para explicar el mecanismo de adaptación de las arqueas halófilas a nivel molecular. Una teoría primigenia atribuyó al catión un efecto estabilizante para contrarrestar la repulsión electrostática debida a la presencia de tantas cargas negativas en la secuencia.¹ Si bien la racionalización es irrefutable, esta teoría es muy incompleta, siendo totalmente incapaz de explicar la estabilización adicional que se produce a concentraciones molares de sal, cuando el efecto electrostático del contra-ión ya está completamente compensado.

Una segunda teoría se basa en el autodenominado “modelo halofílico” y postula la existencia de una serie de interacciones específicas (si bien débiles) entre los iones de potasio y los grupos carboxilo.¹⁵⁻¹⁷ La estequiometría de dicha interacción sería de aproximadamente 1:3-4; tres o cuatro grupos carboxilo forman un cálize que acogería a un ión potasio. Este modelo permite explicar una gran cantidad de resultados experimentales incluyendo la prevalencia natural por el ión potasio. Sin embargo, las estructuras de alta resolución obtenidas no han mostrado una presencia adicional de iones en la superficie de la proteína.

En nuestro laboratorio hemos investigado las bases termodinámicas de la adaptación hipersalina.¹⁸ Para ello se han escogido tres proteínas que presentan desplegamiento reversible tanto térmico como frente a agentes químicos reversibles y que se ajustan a un modelo de dos estados: el dominio 1A de la Ligasa N de *Haloferax volcanii* (*Hv* 1ALigN), su homólogo de *E. coli* (*Ec* 1ALigN) y el dominio de interacción a IgG de la proteína L de *Peptostreptococcus magnus* (ProtL). La proteína *Hv* 1ALigN muestra la composición de aminoácidos característica de las proteínas halófilas y es estructuralmente homóloga a *Ec* 1ALigN. ProtL es mesófila y tiene la particularidad de que su estabilidad termodinámica no se ve afectada por la presencia de sal (NaCl o KCl) en el medio.

La estrategia diseñada ha consistido en modificar la superficie de las tres proteínas mediante mutagénesis dirigida para posteriormente medir los efectos de la sal en la estabilidad de las proteínas mutantes. Fundamentalmente, se ha considerado evaluar dos hipótesis diferentes: i) las mutaciones Asp → Asn y Glu → Gln y viceversa, que alteran la carga de la proteína sin provocar cambios significativos en la longitud de la cadena y ii) las mutaciones Asp → Glu y Asn → Gln y viceversa, que modifican la fracción hidrofóbica de la cadena (en un metileno cada vez) sin alterar la carga total de la proteína. En la Figura 3 se muestran los valores de la energía libre de la proteína en presencia de elevadas concentraciones de sal (3,2 M de NaCl o KCl), para los mutantes introducidos y para los tres sistemas bajo consideración. En el rango del experimento, una alteración del número de cargas no parece introducir efectos

importantes en la estabilidad de la proteína. Sin embargo, la composición hidrofóbica de las cadenas laterales parece ser un parámetro crítico a la hora de entender el fenómeno de haloadaptación, tal y como se aprecia en la Figura 3.

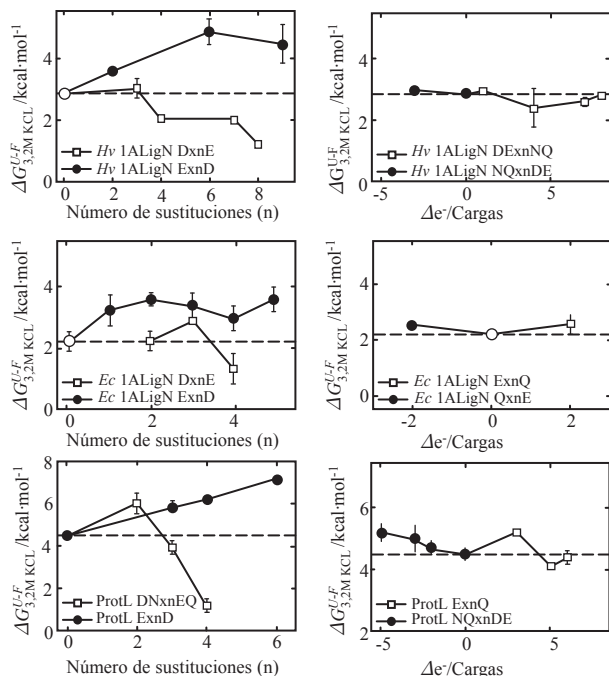


Figura 3. Contribución de la hidrofobicidad de la cadena lateral (paneles de la izquierda) y de la carga electrostática (paneles de la derecha) a la estabilidad proteica. Cada efecto se ha amplificado mediante la progresiva introducción de mutaciones (hasta un número total igual a n).

El análisis termodinámico se ha completado con una caracterización estructural de algunos de los mutantes. La elucidación estructural por RMN en solución de los mutantes Kx6E y Kx5Q de la ProtL (que tienen mutadas seis y cinco lisinas a glutamato y glutamina respectivamente) ha permitido determinar el cambio en el área accesible al disolvente introducido para cada mutación en esta proteína. En la Figura 4 se observa cómo los datos de área solvatable obtenidos a partir de las estructuras (abscisas) muestran una magnífica correlación con las energías libres de desplegamiento (ordenadas). Así, los mutantes más halofílicos son aquellos que reducen más su área expuesta al disolvente y viceversa. Las medidas de estabilidad de los diferentes mutantes *en ausencia de sal* (valores en gris en la Figura 4) proporcionan una valiosa información complementaria. A la izquierda del gráfico se encuentran las proteínas mesófilas o aquellas que presentan una gran estabilidad en ausencia de sal y muy poca estabilización inducida por el cosoluto. En el otro extremo se encuentran los halófilos estrictos: aquellas proteínas que se encuentran en estado desplegado en ausencia de sal ($\Delta G_{U-F} < 0$) pero que a su vez son las que presentan una mayor estabilización inducida por el ión. El gráfico demuestra que no hay solución de continuidad entre las dos situaciones extremas.

Un modelo para una mejor comprensión del mecanismo de adaptación de las proteínas a medios ricos en sal emerge del conjunto de datos recabados.¹⁸ La reducción del

número total de contactos entre la superficie de la proteína y el disolvente es beneficioso para la estabilización de la misma. Esto puede entenderse fácilmente en el contexto de que los iones presentes en la solución compiten con la proteína para hidratarse. Dicho de otra manera, la concentración del agua disminuye y, por consiguiente, su actividad química también. Resta por establecer si esta reducción de contactos va acompañada de una optimización de las interacciones ya existentes. En este sentido, es evidente que el proceso adaptativo se produce en la capa de hidratación de la proteína y una caracterización detallada de la misma permitirá entender mejor el mecanismo de haloadaptación.

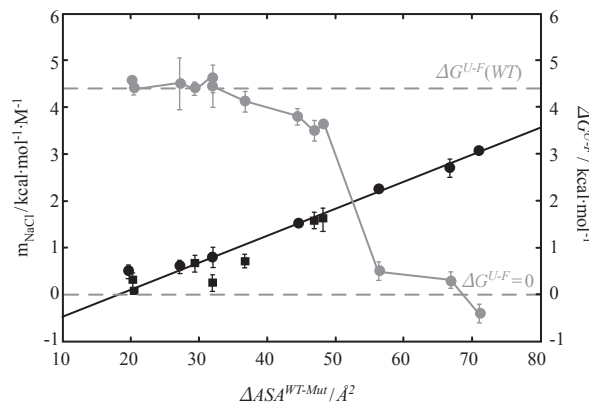


Figura 4. Cambio de área accesible al disolvente frente a estabilidad termodinámica en ausencia de sal (gris) e inducida por NaCl (negro). Cada punto corresponde a una mutación en ProtL, del tipo K→Q (cuadrados) o K→E (círculos)

¿Activas y estables o activas porque son estables?

Estudios biofísicos basados en una gran cantidad de ejemplos han demostrado que la sal (NaCl o KCl) siempre incrementa la estabilidad de las proteínas que presentan la composición de aminoácidos característica de los organismos halobacteriales.⁴ Esta variación monotónica de la estabilidad termodinámica contrasta con el complejo efecto que los cationes sodio o potasio tienen en la actividad catalítica de los enzimas halofílicos. Algunos de estos enzimas como la β -galactosidasa de *Haloferox alicantei* se activan con la sal.¹⁹ Sin embargo, otros disminuyen su actividad enzimática a concentraciones crecientes de sal. Quizás el caso más espectacular lo constituye la catalasa de *Halobacterium salinarium* que cataliza dos reacciones enzimáticas (reacción catalasa y reacción peroxidasa) con actividades catalíticas que presentan comportamientos dispares frente a la concentración de KCl.²⁰ Se ha descrito que la actividad de los enzimas halófilos se puede modular con otros iones además de los encontrados en la naturaleza,¹⁴ pero el mecanismo mediante el cual estos cosolutos afectan a la actividad catalítica no está bien entendido.

En nuestro laboratorio del CICbioGUNE hemos investigado este efecto utilizando la ligasa N de *Haloferox volcanii* (*Hv* LigN) como modelo de estudio. *Hv* LigN es un paradigma para estudiar el efecto de las sales en la actividad enzimática puesto que requiere KCl para ser activo y su acti-

vidad se incrementa con la concentración de esta sal hasta una concentración de 3,2 M.²¹ Por el contrario, en presencia de NaCl el enzima es prácticamente inactivo a cualquier concentración. *Hv LigN* es una ligasa dependiente de NAD⁺ que une fragmentos de ADN durante los procesos celulares de replicamiento y reparación. Estudios estructurales por cristalografía de rayos X²² han revelado que la proteína sufre un importante cambio conformacional en el transcurso de la reacción: la adenilación (unión covalente al cofactor NAD⁺) implica un cierre de dos dominios, con una reducción de la superficie accesible al disolvente de más de 300 Å².

Para intentar comprender el efecto de las diferentes sales, se han obtenido muestras purificadas de la forma apo (también denominada aquí forma deadenilada) y de la forma adenilada del enzima. Seguidamente se ha caracterizado su estabilidad termodinámica mediante desnaturalización química en ausencia de sal. Dicho proceso es reversible si bien no se puede ajustar a un modelo de dos estados. Ajustando los datos a un modelo que invoca a un intermedio de reacción, se puede estimar el cambio total de energía libre entre las formas plegada y desplegada, que se ha usado como descriptor de la estabilidad del sistema. Tal y como se aprecia en la Figura 5, la forma deadenilada es más estable que la forma adenilada proporcionando una explicación de porqué la reacción no ocurre en ausencia de sal. En los enzimas mesófilos como la Ligasa N de *Thermus stocoductus*, el proceso de adenilación estabiliza a la proteína y la reacción ocurre espontáneamente.²³

En presencia de KCl, ambas isoformas se ven estabilizadas proporcionalmente a la concentración molar de sal introducida (ver Figura 5). Sin embargo, la forma adenilada presenta una mayor pendiente de estabilización que la forma deadenilada. Para explicarlo se invoca al modelo estructural:

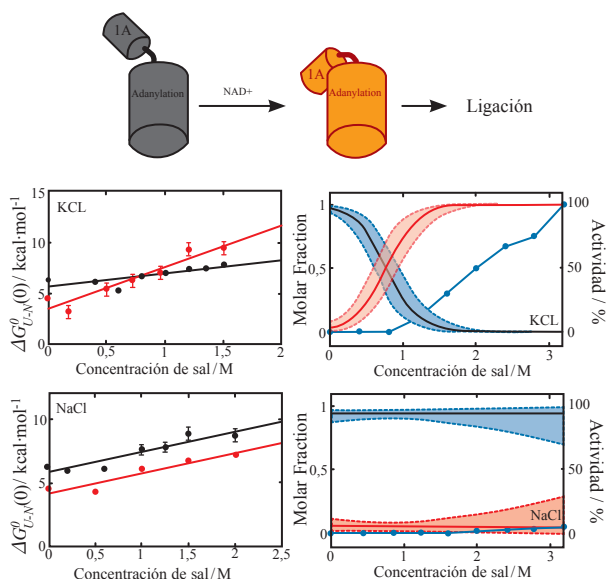


Figura 5. La reacción de ligación requiere de un paso previo de adenilación que conlleva un cambio conformacional. Los paneles de la izquierda muestran la estabilidad de las formas adenilada (rojo) y deadenilada (negro) en función de la concentración de sal (KCl o NaCl). Las poblaciones del equilibrio entre las dos isoformas se representan en el panel de la derecha en función de la concentración de cosoluto. Los valores en azul corresponden a la actividad ligasa del enzima.

la forma adenilada es más estable en presencia de KCl porque presenta una menor superficie accesible al disolvente, asimismo consistente con el modelo de adaptación halofílica propuesto en nuestro laboratorio.¹⁸ La diferente respuesta de las dos isoformas permite que, a una determinada concentración de sal las rectas se crucen y la forma adenilada pase a ser más estable que la forma apo. A juzgar por los datos de actividad (círculos azules en la Figura 5), la estabilización termodinámica coincide bien con el proceso de activación inducido por la sal: a una concentración superior a 0,8 M KCl la forma adenilada pasa a ser la más estable a la vez que el enzima empieza a ser activo.

El mismo diseño experimental se ha probado en presencia de cloruro sódico (Figura 5, paneles inferiores). Este cosoluto presenta unas pendientes de estabilización menores y con valores para las dos isoformas (adenilada y deadenilada) mucho más similares. Así, en presencia de NaCl, la forma apo siempre es más estable que la forma deadenilada y la reacción no ocurre espontáneamente a ninguna concentración, consistente con los datos de actividad catalítica.

En conclusión, el estudio con *Hv LigN* demuestra que los mecanismos de actuación de la sal en la estabilidad de la conformación plegada de la proteína y en la actividad enzimática son equivalentes. La atípica composición de aminoácidos que conforma los genomas de las arqueas halófilas está evolutivamente diseñada para estabilizar la conformación plegada de las proteínas. En aquellos mecanismos enzimáticos en los que se produzcan cambios conformacionales en la coordenada de reacción, es esperable que haya un efecto indirecto de la sal, según el mecanismo descrito anteriormente.

A grandes dosis de sal... ¡siempre Hofmeister!

En 1888 el químico alemán Franz Hofmeister ordenó una serie de sales inorgánicas en función de su capacidad para precipitar la clara de huevo de gallina.²⁴ “Desde entonces una gran cantidad de procesos de todo tipo, desde la influencia de las sales en la medida del pH hasta la cantidad de espuma del agua del mar, siguen las series de Hofmeister.”²⁵ Existen toda una serie de indicios experimentales que sugieren una íntima relación entre el mecanismo de adaptación halofílica y el efecto de Hofmeister. Más concretamente: i) los efectos de estabilización se producen a concentraciones muy elevadas de sal, lejos de los efectos de interacción carga-dipolo del tipo Debye-Hückel; ii) la estabilidad termodinámica tiene una dependencia lineal con la concentración *molar* (y no *molal*) de sal; iii) tanto el catión como el anión contribuyen activamente al fenómeno de estabilización.

En nuestro laboratorio hemos investigado esta putativa relación, utilizando dos sistemas de estudio: *Hv LigN* (una proteína halófila natural) y ProtL Kx7E (una proteína halófila estricta de diseño).²⁶ En ambos casos hemos encontrado que la estabilización inducida por la sal es dependiente del ión, siguiendo la serie de Hofmeister y con una contribución cuantitativa mayor por parte del anión que del catión. Así pues, cabe concluir que la adaptación de las proteínas a medios hipersalinos está íntimamente relacionada con el efecto de Hofmeister, consistente con un mecanismo *no específico* de interacción proteína-cosoluto.

De un extremo al otro

Es interesante ver hasta que punto existe un paralelismo (o tal vez un antagonismo) entre las proteínas pertenecientes a organismos termófilos y halófilos. En ambos casos sus secuencias han estado moduladas por la evolución para adaptarse a sus respectivos entornos. Al contrario que las proteínas pertenecientes a organismos halófilos, las proteínas hipertermófilas tienden a contener residuos con carga positiva (típicamente argininas) y tienden a tener una mayor rigidez conformacional que sus homólogas mesófilas. Sin embargo, no parece que exista un mecanismo unificado de adaptación hipertermófila. Cierto es que es necesario que se produzca una disminución en ΔC_p (la capacidad calorífica asociada al proceso de desplegamiento) para que se produzca un aumento de la temperatura de fusión de la proteína. Sin embargo, para conseguirlo existen numerosos mecanismos como la formación de puentes salinos en la superficie de la proteína, la rigidificación del núcleo hidrofóbico o sutiles cambios en el empaquetamiento del mismo. Esta diversidad de mecanismos en las proteínas termófilas contrasta con la homogeneidad mecánica que todas las proteínas halófilas parecen compartir en su adaptación a los medios salinos.

Y todo esto, ¿para qué?

El interés por los organismos halófilos transgrede la mera curiosidad científica y, si bien no está tan desarrollado como otros grupos de extremófilos, existe un cierto número de aplicaciones industriales.²⁷ Quizás el mayor éxito de la biotecnología con halófilas corresponde a la producción de β -caroteno a partir del alga *Dunaliella*.²⁸ El β -caroteno está muy valorado como antioxidante y el alga produce grandes cantidades de 9-*cis*- β -caroteno, considerado como un mejor extintor del oxígeno singulete que la forma pura *trans*, la única que se puede obtener industrialmente por la vía sintética.

Aunque fuéramos ignorantes de ello, durante siglos los organismos halófilos han estado indirectamente involucrados en el proceso industrial de producción de sal en las salinas.²⁹ Los β -carotenoides que segrega la bacteria halófila *Salinibacter ruber* son los responsables últimos del color rojizo que adopta la salmuera justo antes de cristalizar. La presencia de este extremófilo es beneficiosa puesto que los pigmentos carotenoides que segrega absorben luz, calientan el agua y aceleran el proceso de evaporación. Se ha especulado incluso que las arqueas halófilas pueden estar directamente relacionadas con el proceso de cristalización en sí. Al margen de la producción industrial, la composición de microorganismos de la sal afecta al sabor y a la calidad de la comida. En los países asiáticos es muy común fermentar alimentos con salmuera durante largos períodos de tiempo (por ejemplo en la preparación de *jeotgal* en Corea o el *fugunoko nukazuke* en Japón). Las proteasas de las arqueas halófilas presentes en la sal toman parte en este proceso de fermentación, contribuyendo al aroma de la salsa.³⁰

Otras aplicaciones a destacar serían la producción de membrana púrpura altamente rica en bacteriorodopsina,³¹ que se obtiene de *Halobacterium salinarium*. Recientemente se ha descrito una aplicación de dicha membrana como medio orientador para reintroducir las constantes dipolares en medios acuosos.

A nivel de proteínas, la aplicación industrial de enzimas en la industria biotecnológica es más bien limitada. Esto se debe en parte a la baja solubilidad del oxígeno en medios salinos, que ralentiza el crecimiento del microorganismo. Además, la elevada corrosión del medio que obliga a la construcción de reactores hechos de aleaciones especiales, con el consiguiente aumento del coste del mismo. Sin embargo, algunos enzimas como la amilasa de *Haloarcula sp.*, que funciona óptimamente a 4,3 M de sal y a 50 °C, también son estables en benceno, tolueno y cloroformo³² siendo muy atractiva para su uso industrial como biocatalizador.

Finalmente cabe destacar que existen muchas aplicaciones patentadas que hacen uso de sistemas halofílicos (tanto a nivel de organismo como de sus proteínas constituyentes). Muchas de ellas son ideas viables que tan sólo requieren de iniciativas emprendedoras para poderse materializar.

Conclusiones

La naturaleza ha encontrado un mecanismo sencillo (e inespecífico) para dar solución a un problema aparentemente complejo como es la colonización de los entornos hipersalinos. Pocas veces una aproximación reduccionista del método científico permite extraer tanta información a nivel del mecanismo de un problema biológico. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por resolver como son la caracterización de la capa de hidratación de las proteínas halofílicas, el estudio de las interacciones proteína-ácido nucleico a tan elevada fuerza iónica o la comprensión de las particularidades del metabolismo de estos organismos.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que han tomado parte en este proyecto de investigación: Xavier Tadeo, Gabriel Ortega, Blanca López-Méndez y Ana Laín. Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación proporcionada por el MICINN (CTQ2009-10353).

Bibliografía

1. J. K. Lanyi, *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 272–290.
2. B. Elazari-Volcani, *Nature* **1936**, *138*, 467–467.
3. J. A. Leigh, S. V. Albers, H. Atomi, T. Allers, *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 577–608.
4. D. Madern, C. Ebel y G. Zaccari, *Extremophiles* **2000**, *4*, 91–98.
5. T. Arakawa, S. N. Timasheff, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5912–5923.
6. S. Paul, S. K. Bag, S. Das, E. T. Harvill, C. Dutta, *Genome Biol.* **2008**, *9*, R70.
7. M. Mevarech, F. Frolow, L. M. Gloss, *Biophys. Chem.* **2000**, *86*, 155–164.
8. D. B. Wright, D. D. Banks, J. R. Lohman, J. L. Hilsenbeck, L. M. Gloss, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 327–344.
9. M. Lenassi, A. Plemenitas, *Curr. Genet.* **2007**, *51*, 393–405.
10. J. Esclapez, C. Pire, V. Bautista, R. M. Martínez-Espinosa, J. Ferrer, M. J. Bonete, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 837–842.
11. K. L. Britton, P. J. Baker, M. Fisher, S. Ruzhnikov, D. J. Gilmour, M. J. Bonete, J. Ferrer, C. Pire, J. Esclapez, D. W. Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2006**, *103*, 4846–4851.
12. B. Bieger, L. O. Essen, D. Oesterhelt, *Structure* **2003**, *11*, 375–385.

13. O. Dym, M. Mevarech, J. L. Sussman, *Science* **1995**, 267, 1344–1346.
14. S. B. Richard, D. Madern, E. Garcin, G. Zaccai, *Biochemistry* **2000**, 39, 992–1000.
15. C. Ebel, L. Costenaro, M. Pascu, P. Faou, B. Kernel, F. Proust-De Martin, G. Zaccai, *Biochemistry* **2002**, 41, 13234–13244.
16. M. Tehei, G. Zaccai, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1724, 404–410.
17. G. Zaccai, F. Cendrin, Y. Haik, N. Borochoy, N., H. Eisenberg, *J. Mol. Biol.* **1989**, 208, 491–500.
18. X. Tadeo, B. Lopez-Mendez, T. Trigueros, A. Lain, D. Castano, O. Millet, *PLoS Biol.* **2009**, 7, e1000257.
19. M. L. Holmes, R. K. Scopes, R. L. Moritz, R. J. Simpson, C. Englert, F. Pfeifer, M. L. Dyall-Smith, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1337, 276–286.
20. N. J. Brown-Peterson, M. L. Salin, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 4197–4202.
21. A. Zhao, F. C. Gray, S. A. MacNeill, *Mol. Microbiol.* **2006**, 59, 743–752.
22. K. S. Gajiwala y C. Pinko, *Structure* **2004**, 12, 1449–1459.
23. D. Georgette, V. Blaise, F. Bouillenne, B. Damien, S. H. Thorbjarnardottir, E. Depiereux, C. Gerday, V. N. Uversky, G. Feller, *Biophys. J.* **2004**, 86, 1089–1104.
24. F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, 24, 247–260.
25. M. G. Cacace, E. M. Landau, J. J. Ramsden, *Q. Rev. Biophys.* **1997**, 30, 241–277.
26. X. Tadeo, B. Lopez-Mendez, D. Castano, T. Trigueros, O. Millet, *Biophys. J.* **2009**, 97, 2595–2603.
27. A. Oren, *Environ. Technol.* **2011**, 31, 825–834.
28. R. Raja, S. Hemaiswarya, R. Rengasamy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 74, 517–523.
29. B. J. Javor, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 28, 42–47.
30. S. Namwong, S. Tanasupawat, W. Visessanguan, T. Kudo, T. Itoh, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, 57, 2199–2203.
31. D. Oesterhelt, C. Brauchle, N. Q. Hampp, *Rev. Biophys.* **1991**, 24, 425–478.
32. J. Eichler, *Biotechnol. Adv.* **2001**, 19, 261–278.

ChemPubSoc Europe

● 16 societies ● 11 journals ● 1 network



Impact Factor: 5.476



Impact Factor: 2.909



Impact Factor: 3.206



Impact Factor: 3.345



Impact Factor: 3.945



Impact Factor: 3.306



Impact Factor: 3.339



Impact Factor: 6.325



New!



New!

E-magazine for chemists



www.ChemistryViews.org

- High Impact Factor journals
- Short publication times
- Excellent authors
- Top editorial services
- Supported by 73,000 society members

Closely associated with



Impact Factor: 12.730



ChemPubSoc Europe

PS11-36067_BU