(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 443 021**

(51) Int. CI.:

C12N 9/14 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08805511 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2142644**

(54) Título: **Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas y sus utilizaciones**

(30) Prioridad:

27.04.2007 FR 0703104

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LORRAINE (50.0%)
34 Cours Léopold CS 25233
54052 Nancy Cedex, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (50.0%)

(72) Inventor/es:

CHABRIERE, ERIC y
ELIAS, MICKAEL

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas y sus utilizaciones.

La presente descripción tiene por objeto unas fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas mutadas, y sus utilizaciones como bio-depuradores en el marco de la descontaminación de las superficies de los materiales, de la piel o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organosfoforados, o en el marco de la preparación de prendas, guantes, cartuchos, captadores de organofosforados, o en el marco de la preparación de medicamentos utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una contaminación externa o de una intoxicación interna por ingestión o inhalación por unos compuestos organofosforados, o en el marco de la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados, así como las secuencias nucleotídicas que codifican para estas PTE hipertermófilas mutadas y su utilización en el marco de la preparación de bacterias que expresan estas PTE, en particular en su superficie.

ORGANOFOSFORADOS

Los organofosforados (OP) son unas moléculas muy tóxicas, que componen algunos agentes químicos de guerra y pesticidas. Algunos de estos compuestos, como el paraoxón o el paratión se utilizan por su poder insecticida. En efecto, son fáciles de fabricar y están ampliamente extendidos en los cultivos de los países en vías de desarrollo. Desafortunadamente, estas fumigaciones masivas son responsables de muchísimas intoxicaciones en el mundo (200000 fallecimientos por año según la OMS).

Los OP son, para la mayoría de los productos, inestables ya que se hidrolizan rápidamente. No persisten por lo tanto en el medio ambiente en su forma tóxica. Por el contrario, ciertos productos desarrollados por el ejército son mucho más estables y peligrosos, como el sarín, el somán, el tabún o el VX. Estos agentes químicos de guerra interesan actualmente cada vez más a los terroristas. El sarín en particular ha sido utilizado durante atentados perpetrados por la secta Aum, en 1994 en Matsumoto y en 1995 en el metro de Tokyo. Frente a estas amenazas cada vez mayores, el estudio y sobre todo el desarrollo de medios efectivos para la descontaminación están más que nunca de actualidad.

Los organofosforados actúan por absorción percutánea y por inhalación. Son unos líquidos muy frecuentemente incoloros e inodoros. La intoxicación por uno de estos agentes se manifiesta rápidamente (de menos de 1 minuto a 60 minutos) por unos síntomas característicos y extremadamente graves (hasta la muerte del sujeto intoxicado). Estas moléculas, una vez ingeridas en el organismo humano, desempeñan el papel de neurotóxico. Atacan a una enzima muy importante para el buen funcionamiento del sistema nervioso: la acetilcolinesterasa. Esta enzima es esencial en la transmisión del mensaje nervioso. En efecto, durante el paso del influjo de neurona a neurona, la información eléctrica se transforma en mensaje químico en la hendidura sináptica. Las moléculas así liberadas se denominan neurotransmisor (por ejemplo: la acetilcolina). Una vez liberada en la hendidura, la acetilcolina se fija mayoritariamente sobre los receptores de la neurona post-sináptica con el fin de asegurar la continuidad del mensaje nervioso. Las moléculas fijadas y no fijadas deben después ser re-captadas o degradadas, permitiendo así la regulación de la intensidad y de la duración del influjo. El papel de las acetilcolinesterasas es por lo tanto asegurar la interrupción del mensaje nervioso, degradando la acetilcolina en la hendidura sináptica.

Los OP reaccionan rápidamente con la serina del sitio activo de las acetilcolinesterasas, lo cual forma una fosfoenzima inactiva. El intermedio covalente así formado, la enzima ha perdido cualquier actividad. Estos compuestos constituyen por lo tanto unos inhibidores irreversibles de estas enzimas. La acetilcolina ya no se degrada entonces en la hendidura sináptica y se acumula.

Para prevenir estos peligros, están previstos unos protocolos de prevención y de descontaminación. El material, hoy día, se descontamina con la ayuda de sosa (NaOH) muy concentrada. Se han concebido unos trajes de protección y unas máscaras para evitar cualquier contacto con estos agentes. En caso de intoxicación humana, es imposible, por supuesto, un tratamiento con sosa. La víctima se descontamina simplemente con la ayuda de una solución de hipoclorita (lejía) y se lava abundantemente con agua y jabón. Unos guantes de Foulon permiten también absorber el líquido sobre la piel de la víctima. Para los casos de inhalación (percutánea o no) de neurotóxicos, existe un pre-tratamiento con pirostigmina, que puede ser tomado en tabletas. Esta molécula bloquea reversiblemente las acetilcolinesterasas e impide que los OP se fijen en las mismas. La vida del individuo está así preservada. Por otra parte, existe también un tratamiento sintomático de urgencia en forma de jeringas auto-inyectantes que contienen atropina (anticolinérgico), diazepam (anticonvulsivo) y pralidoxima (reactivador de las acetilcolinesterasas inhibidas). La inyección, para ser eficaz, se debe llevar a cabo sin embargo inmediatamente después de la intoxicación. Esto no impide no obstante la aparición de secuelas incapacitantes.

Aunque desde hace veinte años se han llevado a cabo unos progresos en la profilaxis con las técnicas citadas anteriormente, los tratamientos de estas intoxicaciones y las protecciones existentes siguen siendo sin embargo insatisfactorios. Todas las pistas farmacológicas exploradas parecen desafortunadamente conducir a un fracaso. Sin embargo, la aparición del concepto de depurador biocatalítico o "bioscavenger" ha reanimado la esperanza de un arsenal terapéutico más efectivo. En efecto, es particularmente interesante la idea de utilizar unas enzimas capaces

de atrapar y/o degradar los OP sobre la piel y en la sangre antes de que alcancen sus objetivos biológicos neuromusculares y centrales.

La butirilcolinesterasa (BuChe) humana es una enzima parecida a la acetilcolinesterasa cuyo papel fisiológico no está claramente establecido. A pesar de ello, representa una gran esperanza ya que atrapa en la vía sanguínea los organofosforados antes de que alcancen sus objetivos (Raveh *et al*., 1993). Además, la enzima natural inyectada al ser humano es particularmente estable, con una vida media de 11 días. Sin embargo, este atrapador natural está en una cantidad demasiado baja en la sangre para protegernos naturalmente de los peligros de los OP. Actúa realmente como fijador estequiométrico de los OP: una enzima puede neutralizar sólo una molécula. Un cálculo rápido permite mostrar que se necesitan cantidades enormes de enzima para obtener un tratamiento eficaz. Los medios a utilizar parecen entonces desproporcionados, y corresponderían a una dosis de 200 mg de proteína por inyección y por soldado. Sin embargo, y a falta de algo mejor, la BuChe representa un proyecto concreto, especialmente para la armada americana que, a finales de 2006, propuso poner un millón de dosis a disposición para sus soldados. La producción de la enzima está asegurada por ingeniería genética gracias a cabras transgénicas. La necesidad de dicha cantidad de proteína resulta sin embargo muy caro, y a pesar de los medios utilizados, esta empresa constituye un reto tecnológico principal. Existen algunas variantes de BuChe que tienen una actividad OPhidrolásica pero su catálisis es muy lenta en comparación con unas enzimas capaces de hidrolizar naturalmente los OP.

La paraoxonasa humana (HPON1) es una OPhidrolasa que presenta numerosas ventajas. Su papel protector contra la intoxicación OP se ha establecido en el ratón. Además, su origen humano debería evitar que las inyecciones múltiples de los protocolos terapéuticos induzcan una respuesta inmune. HPON1 es una proteína del plasma asociada principalmente a los HDL. La estructura tridimensional de la enzima natural no está resuelta, sólo la estructura de una quimera entre PON1 humano, de ratón, de rata y de conejo (Harel *et al*., 2004). Sin embargo, esta estructura no ha permitido obtener unos mutantes más activos. Además, por ahora es imposible una utilización farmacológica. En efecto, todas las tentativas para obtener una gran cantidad de paraoxonasa humana activada han fracasado por razones técnicas.

Se han aislado otras OP-hidrolasas prometedoras. Se trata de enzimas de la familia de las fosfotriesterasas (PTE). Estas enzimas constituyen verdaderos depuradores catalíticos descubiertos en las bacterias del suelo: en particular *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium sp*. (Munnecke, 1976) para el gen opd, y *Agrobacterium radiobacter* para el gen opdA (Jackson *et al*., 2005). Las PTE son unas enzimas extremadamente prometedoras para el desarrollo de un bioscavenger de agentes neurotóxicos. Pero estas enzimas poseen también unos intereses fundamentales: en efecto, la(s) implicacione(s) biológica(s) de estas últimas continúa(n) siendo perfectamente desconocida(s). Además, el mecanismo catalítico de estas enzimas extremadamente eficaz posee algunas zonas oscuras.

Las PTE son las enzimas más activas conocidas que degradan los OP. Sus estudios podrían permitir realizar unos tratamientos para unas descontaminaciones terapéuticas (cutáneas y oftalmológicas) que sustituirían ventajosamente el único medio eficaz actual, que es la sosa. Por supuesto, esta última no se puede utilizar en seres vivos. Por otra parte, las PTE serían también eficaces para descontaminar suelos contaminados por los pesticidas. Se podrían utilizar también para detectar contaminaciones con OP. Así, unos proyectos intentan fijar químicamente estas proteínas a un soporte y detectar la catálisis eventual por diversos medios como la detección de señales eléctricas o por espectrofotometría. Otra ventaja importante, las PTE son capaces de hidrolizar un amplio espectro de OP, como el paratión, el paraoxón, el somán, el sarín y el más tóxico de todos, el VX.

Las hipótesis que se refieren al origen de esta actividad OP-hidrolasa en las bacterias son múltiples y controvertidas, incluso aunque parezca más probable que esta actividad se derive de una proximidad estructural de su sustrato natural con estos venenos. Además, el papel fisiológico de estas enzimas sigue siendo desconocido (Aubert *et al*., 2004). Existen varios genes conocidos que codifican para unas PTE mesófilas. Un primer gel (*opd*) se ha aislado simultáneamente de *P. diminuta* y *de Flavobacterium sp*., y codifica una proteína de 365 aminoácidos. Esta proteína posee un péptido señal de 29 residuos que permite su direccionamiento en el espacio periplásmico. Otro gen conocido (*opda*), aislado de *A. radiobacter* (Jackson *et al*., 2005) codifica una proteína de 362 aminoácidos que poseen un péptido señal de 33 residuos. Estas dos proteínas comparten el 90% de identidad de secuencia. Aunque estas PTE mesófilas son muy activas frente a OP, resultan sin embargo caras de producir, y poco estables.

Recientemente, se ha aislado y purificado una nueva proteína de esta familia (Merone *et al*., 2005). Esta metaloenzima de 35,5 kDa posee el 31% de identidad de secuencia con la PTE de *P. diminuta*, se ha aislado de *archae Sulfolobus solfataricus*. Este organismo vive en condiciones extremas (87-93^{o}C y pH 3,5-5). Estas últimas confieren a esta proteína unas propiedades de termoestabilidad excepcionales. Es una enzima hipertermófila cuya actividad máxima se sitúa a aproximadamente 95^{o}C, y es claramente menos activa frente al paraoxón que la PTE de *P. diminuta*. Otra PTE hipertermófila se ha aislado de *Sulfolobus acidocaldarius* (Porzio *et al*., 2007). Las PTE hipertemófilas son menos activas frente a OP que las PTE mesófilas, pero presentan sin embargo la ventaja de ser muy estables y baratas de producir.

INFECCIONES BACTERIANAS

Las infecciones bacterianas constituyen una de las causas principales de patologías humanas. Algunas de estas

infecciones pueden ser contraídas en el hospital y constituyen un problema principal de salud pública. En Francia, según los diferentes estudios realizados, aproximadamente del 5 al 10% de las personas hospitalizadas son víctimas durante su estancia en el hospital, es decir 600000 a 1000000 pacientes por año. Sobreañadiéndose a las patologías inicialmente responsables de la hospitalización, estas infecciones agravan el pronóstico vital de los pacientes (aproximadamente 6000 fallecimientos por año, décima causa de fallecimiento en Francia). A esta realidad, se añade un sobrecoste financiero por la prolongación de los tiempos de estancia en el hospital y por la utilización de tratamientos costosos. Estos problemas están también amplificados por la aparición de un número creciente de resistencias a los antibióticos. Se ha desarrollado un cierto número de estrategias para adquirir nuevas herramientas contra estas resistencias. Una de las pistas más prometedoras consiste en perturbar las comunicaciones entre bacterias. En efecto, a pesar de que las bacterias son unos organismos unicelulares, son capaces de comunicarse entre sí y responder así colectivamente a un cambio medioambiental. Estos mecanismos de comunicación, denominados "quorum sensing" (QS), permiten la sincronización y las modulaciones de la expresión de ciertos genes (Federle y Bassler, 2003; Fuqua y Greenberg, 2002; Whitehead *et al*., 2001). Esta comunicación está modulada por pequeñas moléculas "señal" capaces de difundirse libremente a través de las membranas de las células y de regular los perfiles de expresión de los genes. Por otra parte, el fenómeno de QS no está limitado a las procariotas, ya que algunos patógenos eucariotas unicelulares de algas utilizan también el QS para coordinar ciertas funciones biológicas, como la virulencia (Oh *et al*., 2001).

De todas las señales utilizadas para el QS, las acilhomoserina lactonas (AHL) parecen ser las más extendidas (en particular en las bacterias gram-negativas) y son las más estudiadas.

Su implicación está demostrada en numerosas funciones biológicas importantes, como la simbiosis, la conjugación, la producción de antibióticos, la esporulación, la virulencia y la formación de biopelícula (Fuqua y Greenberg, 2002; Whitehead *et al*., 2001; Zhang, 2003).

La concentración de estas moléculas "señal" es muy importante y es regulada, en parte por unas enzimas capaces de degradar estos compuestos. Se encuentran en particular unas AHL acilasas y AHL lactonasas, que son capaces de degradar estas lactonas, como AiiA, procedente de *Bacillus thuringiensis* (Dong *et al*., 2002). Para luchar contra las infecciones bacterianas, la idea de perturbar el quorum sensing es una pista extremadamente prometedora (Rasmussen y Givskov, 2006). En efecto, dado que los patógenos mutantes para el QS no expresan más genes de virulencia y se vuelven no virulentos (Passador *et al*., 1993; Pirhonen *et al*., 1993), parece por lo tanto posible controlar las infecciones bacterianas atenuando el QS de los patógenos.

Así, la expresión de una enzima que atenúa el QS: una enzima de "quorum quenching" (QQ), ya sea una AHL lactonasa o una AHL acilasa, en los patógenos de planta o de humano como *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas aeruginosa*, reduce de manera importante su virulencia (Dong *et al*., 2000; Lin *et al*., 2003; Reimmann *et al*., 2002). Además, las plantas transgénicas que expresan una QQ lactonasa son efectivamente resistentes a las infecciones de patógenos (Dong *et al*., 2001).

Recientemente, la proteína SsoPox, procedente de *archae hyperthermophille Sulfolobus solfataricus* se ha clonado y caracterizado por su actividad fosfotriesterasa (Merone *et al*., 2005). Esta proteína es hipertermoestable con una vida media de desnaturalización de aproximadamente 4 horas y de 90 a 95 y 100°C, respectivamente. Esto permite una purificación muy eficaz y de bajo coste de la proteína recombinante calentando los lisados celulares, y precipitando así las proteínas del hospedante (*Escherichia coli*). En 2006, se demostró que SsoPox posee una gran actividad AHL lactonasa (Afriat *et al*., 2006).

La presente invención tiene esencialmente como objetivo proporcionar nuevas PTE que presentan la ventaja de ser al mismo tiempo:

- más activas frente a OP que las PTE hipertermófilas salvajes mencionadas anteriormente,
- más estables y menos caras de producir que las PTE mesófilas salvajes mencionadas anteriormente.

La invención tiene asimismo como objetivo proporcionar nuevos compuestos bio-depuradores utilizables en el marco de la descontaminación de las superficies de los materiales, de la piel o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o en el marco de la preparación de medicamentos utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una contaminación externa o de una intoxicación interna por ingestión o inhalación de unos compuestos organofosforados, o en el marco de la descontaminación de las aguas contaminadas por compuestos organofosforados.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unos kits para la descontaminación de las superficies de los materiales, de la piel, o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o para la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados, o para la destrucción de las existencias de neurotóxicos.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un captador de estos compuestos organofosforados, que presenta la ventaja de ser extremadamente sensible gracias a las capacidades mencionadas anteriormente de las

nuevas PTE.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unos materiales impregnados de nuevas PTE que presentan las ventajas mencionadas anteriormente, en forma líquida o sólida, tales como guantes, ropa diversa (en particular inmovilización de tejidos para trajes de protecciones químicas), toallitas húmedas, espumas pulverizables.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unas composiciones farmacéuticas, en particular en forma inyectable o de pomadas, que comprenden las nuevas PTE que presentan las ventajas mencionadas anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unos cartuchos de descontaminación externa, en cuyo interior están injertadas nuevas PTE, en particular para descontaminar la sangre de una persona intoxicada por los organofosforados.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar unas bacterias transformadas con la ayuda de secuencias nucleotídicas que codifican para estas nuevas PTE y expresando estas últimas en su citoplasma o en su superficie, siendo dichas bacterias así transformadas susceptibles de ser utilizadas a su vez en el marco de la descontaminación de los organofosforados.

La invención tiene como objetivo unas fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa derivada de PTE hipertermófilas que responden a la secuencia consenso SEC ID n^{o} 1, y que comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
- sustitución de la arginina R en la posición 224,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID n^{o} 1, por cualquier otro aminoácido natural o no, poseyendo dichas fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas mutadas una actividad lactonasa que posee una actividad superior a la de las fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas no mutadas, de las cuales se derivan.

Las PTE hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa de la invención mencionadas anteriormente tienen la ventaja de ser termoestables, es decir, de ser unas proteínas capaces de conservar su actividad enzimática a temperaturas de hasta 95^{o}C (Merone *et al*., 2005). La actividad enzimática de las PTE hipertermófilas mutadas de la invención mencionadas anteriormente corresponde en particular a la actividad de hidrólisis de los OP, tal como se mide según el método descrito anteriormente (Merone *et al*., 2005). Esta termoestabilidad les confiere la ventaja de ser baratas de producir, por un lado porque son estables en los disolventes orgánicos, lo cual les permite acomodarse mejor a los procedimientos industriales, y, por otro lado, porque son muy baratas de purificar mediante la técnica de calentamiento de los lisados celulares de las células productoras de estas PTE, tal como *E. coli*; se obtiene así un gran rendimiento y una buena pureza en una etapa.

Las PTE hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa de la invención mencionadas anteriormente tienen también la ventaja de ser más activas en el marco de la hidrólisis de los OP (en particular según el método mencionado anteriormente), que las PTE hipertermófilas salvajes de las cuales se derivan. Las PTE hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente tienen también la ventaja de ser más activas en el marco del "quorum quenching" que las PTE hipertermófilas salvajes de las cuales se derivan, es decir en el marco de la resistencia a las infecciones de patógenos.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n^{o} 3, o de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID n^{o} 5, perteneciendo dichas secuencias SEC ID n^{o} 3 y SEC ID n 5, a la secuencia consenso SEC ID n^{o} 1, faltando en la SEC ID n^{o} 3 el aminoácido en la posición 2 de la SEC ID n^{o} 1.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
- sustitución de la arginina R en la posición 224,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID n^{o} 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una

actividad lactonasa mencionadas anteriormente, caracterizadas porque comprenden también una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28,
- sustitución de la prolina P en la posición 68,
- sustitución de la treonina T en la posición 69,
- sustitución de la leucina L en la posición 73,
- sustitución del aspartato D en la posición 142,
- sustitución de la glicina G en la posición 226,
- sustitución de la leucina L en la posición 227,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
- sustitución del triptófano W en la posición 264,
- sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID n° 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28,
- sustitución de la leucina L en la posición 73,
- sustitución del aspartato D en la posición 142,
- sustitución de la glicina G en la posición 226,
- sustitución de la leucina L en la posición 227,

de la SEC ID n° 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la prolina P en la posición 68,
- sustitución de la treonina T en la posición 69,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
- sustitución del triptófano W en la posición 264,
- sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID n° 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de las PTE hipertermófilas que responden a la secuencia consenso SEC ID n° 1, caracterizadas porque comprenden una por lo menos de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 224 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
- sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
- sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, y que comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 97,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 99,
- sustitución de la arginina R en la posición 223,
- sustitución de la cisteína C en la posición 258,

de la SEC ID n° 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, y que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 97,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 99,
- sustitución de La arginina R en la posición 223,
- sustitución de la cisteína C en la posición 258,

de la SEC ID n° 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, caracterizadas porque comprenden también una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 27,
- sustitución de la prolina P en la posición 67,
- sustitución de la treonina T en la posición 68,
- sustitución de la leucina L en la posición 72,
- sustitución del aspartato D en la posición 141,
- sustitución de la glicina G en la posición 225,
- sustitución de la leucina L en la posición 226,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 229,
- sustitución del triptófano W en la posición 263,
- sustitución del triptófano W en la posición 278,

de la SEC ID n° 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 27,
- sustitución de la leucina L en la posición 72,
- sustitución del aspartato D en la posición 141,
- sustitución de la glicina G en la posición 225,
- sustitución de la leucina L en la posición 226,

de la SEC ID n° 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la prolina P en la posición 67,
- sustitución de la treonina T en la posición 68,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 229,
- sustitución del triptófano W en la posición 263,
- sustitución del triptófano W en la posición 278,

de la SEC ID n° 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 3, caracterizadas porque comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 97 por un triptófano W,

- sustitución de la tirosina Y en la posición 99 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 223 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 258 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 27 por una alanina A,
- sustitución de la prolina P en la posición 67 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 68 por una serina S,
- sustitución de la leucina L en la posición 72 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 141 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 225 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 226 por una histidina H,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 229 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 263 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 278 por una isoleucina I.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3, caracterizadas porque corresponden a las secuencias siguientes:

la SEC ID nº 7 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3 que comprende las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 97 por un triptófano W,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 99 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 223 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 258 por una leucina L,

la SEC ID nº 9 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 7 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 27 por una alanina A,
- sustitución de la leucina L en la posición 72 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 141 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 225 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 226 por una histidina H,

la SEC ID nº 11 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 9 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la prolina P en la posición 67 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 68 por una serina S,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 229 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 263 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 278 por una isoleucina I.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3, caracterizadas porque comprenden por lo menos una mutación que corresponde a uno por lo menos de los aminoácidos de las parejas de aminoácidos siguientes, cuyas posiciones en SEC ID nº 3 se indican a continuación, por otro aminoácido natural o no: 2R/314S, 14K/12E, 26R/75D, 26R/42E, 33R/42E, 33R/45E, 55R/52E, 55R/285E, 74R/121D, 81K/42E, 81K/43D, 84K/80E, 109R/113E, 123K/162E, 147K/148D, 151K/148D, 154R/150E, 154R/187E, 154R/188E, 161K/188E, 183R/150E, 183R/187E, 183R/180E, 210K/245D, 215K/214D, 223R/256D, 223R/202D, 234K/204D, 235R/202D, 241R/245D, 245D/244K, 250K/249D, 277R/286D, 292K/298E, 310K/307E.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, y que comprenden una por lo menos de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
- sustitución de la arginina R en la posición 224,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
- sustitución de La arginina R en la posición 224,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, caracterizadas porque comprenden también una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28,
- sustitución de la prolina P en la posición 68,
- sustitución de la treonina T en la posición 69,
- sustitución de la leucina L en la posición 73,
- sustitución del aspartato D en la posición 142,
- sustitución de la glicina G en la posición 226,
- sustitución de la leucina L en la posición 227,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
- sustitución del triptófano W en la posición 264,
- sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28,
- sustitución de la leucina L en la posición 73,
- sustitución del aspartato D en la posición 142,
- sustitución de la glicina G en la posición 226,
- sustitución de la leucina L en la posición 227,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la prolina P en la posición 68,
- sustitución de la treonina T en la posición 69,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
- sustitución del triptófano W en la posición 264,
- sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

La invención se refiere más particularmente a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, caracterizadas porque comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 224 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
- sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
- sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID n° 5, caracterizadas porque corresponden a las secuencias siguientes:

la SEC ID n° 13 que corresponde a la secuencia SEC ID n° 5 que comprende las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 224 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

la SEC ID n° 15 que corresponde a la secuencia SEC ID n° 13 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
- sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,

la SEC ID n° 17 que corresponde a la secuencia SEC ID n° 15 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

- sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

La invención tiene más particularmente por objeto las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente, en las que por lo menos uno de los aminoácidos implicados en los puentes salinos está modificado por sustitución o deleción, de tal manera que la temperatura de activación de dichas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa sea disminuida con respecto a la temperatura de activación de las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa en las que los aminoácidos implicados en los puentes salinos no están modificados.

En un modo de realización ventajoso de la invención, los aminoácidos implicados en los puentes salinos mencionados anteriormente pueden ser sustituidos por una secuencia de por lo menos dos aminoácidos. Se trata entonces de una adición.

Se entiende en la invención que el término "sustitución" corresponde a la sustitución de un aminoácido por otro. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir que el aminoácido sustituido es reemplazado por un aminoácido de igual estructura o de igual propiedad fisicoquímica (aminoácidos polares, hidrófobos, ácidos, básicos, etc.) de tal manera que la estructura tridimensional de la proteína se mantenga sin cambios o, por el contrario, no conservadora. Asimismo, las sustituciones definidas según la invención se refieren a unos aminoácidos naturales, o unos aminoácidos artificiales. Así, los aminoácidos implicados en los puentes salinos pueden ser sustituidos por un aminoácido natural o un aminoácido artificial.

Se entiende asimismo en la invención que la "deleción" corresponde a la extracción de un aminoácido, de tal manera que la secuencia proteica que haya sufrido dicha deleción es más corta que la secuencia que no ha sufrido dicha deleción.

El estudio de la estructura tridimensional de las PTE hipertermófilas ha permitido poner en evidencia los aminoácidos implicados en los puentes salinos. Estos aminoácidos importantes están cargados y tienen una

distancia de interacción inferior a 5,5 Å. Si la proteína, aunque posea unas mutaciones en el sitio activo, citadas anteriormente, no posee una actividad suficiente comparada con PTE mesófila, es posible mutar los aminoácidos implicados en los puentes salinos. Estas mutaciones tienen por efecto romper las interacciones y hacer la proteína más flexible.

Los datos cristalográficos han permitido mostrar 25 interacciones de una distancia de menos de 4 Å, 6 interacciones de distancias comprendidas entre 4 Å y 5 Å, y 4 interacciones de distancias comprendidas entre 5 Å y 5,5 Å. Las interacciones mencionadas anteriormente implican 2 aminoácidos. Así, en total, 52 aminoácidos están implicados en los puentes salinos.

Los aminoácidos implicados en estas interacciones, así como la distancia de la interacción de dichos aminoácidos están indicados en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: interacción implicada en los puentes salinos de la proteína SsoPox

D<4 Å			4 Å<D<5 Å			5 Å <D<5,5 Å		
2R	↔	314S-COOH	33R	↔	42E	145R	↔	187E
14K	↔	12E	81K	↔	42E	183R	↔	150E
26R	↔	75D	84K	↔	80E	215R	↔	214D
26R	↔	42E	147K	↔	148D	244K	↔	245D
33R	↔	45E	161K	↔	188E			
55R	↔	52E	310K	↔	307E			
55R	↔	285E						
74R	↔	121D						
81K	↔	43D						
109R	↔	113E						
123K	↔	162E						
151K	↔	148D						
154R	↔	150E						
154R	↔	188E						
183R	↔	187E						
183R	↔	180E						
210K	↔	245D						
223R	↔	256D						
223R	↔	202D						
234K	↔	204D						
235R	↔	202D						
241R	↔	245D						
250K	↔	249D						
277R	↔	286D						
292K	↔	298E						

En un modo de realización ventajoso de la invención, en las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente de Sso, uno por lo menos de los aminoácidos de las posiciones siguientes 2, 12, 14, 26, 33, 42, 43, 45, 52, 55, 74, 75, 80, 81, 84, 109, 113, 121, 123, 145, 147, 148, 150, 151, 154, 161, 162, 180, 183, 187, 188, 202, 204, 210, 214, 215, 223, 234, 235, 241, 244, 245, 249, 250, 256, 277, 285, 286, 292, 298, 307 y 310 está modificado. La posición de los aminoácidos anteriores se define con respecto al primer aminoácido de la proteína SsoPox.

En un modo de realización ventajoso de la invención, en las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente de Sac, uno por lo menos de los aminoácidos de las posiciones siguientes 3, 13, 15, 27, 34, 43, 44, 46, 53, 56, 75, 76, 81, 82, 85, 110, 114, 122, 124, 146, 148, 149, 151, 152, 155, 162, 163, 181, 184, 188, 189, 203, 205, 211, 215, 216, 224, 235, 236, 242, 245, 246, 250, 251, 257, 278, 286, 287, 293, 299, 308 y 311 está modificado. La posición de los aminoácidos anteriores se define con respecto a al primer aminoácido de la proteína SacPox.

La invención se refiere también a las secuencias nucleotídicas que codifican para las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente.

La invención tiene asimismo por objeto los vectores, en particular plásmidos, que contienen unas secuencias nucleotídicas que codifican para las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido anteriormente.

La invención se refiere asimismo a las células hospedantes, en particular las bacterias, transformadas con la ayuda

de un vector tal como se ha definido anteriormente, de manera que su genoma contenga unas secuencias nucleotídicas que codifican para las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, poseyendo dichas PTE hipertermófilas mutadas una actividad lactonasa producidas en el citoplasma de las células hospedantes, o segregadas en su superficie.

La invención se refiere asimismo a las células hospedantes, en particular bacterias, acopladas a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, o que presentan unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, injertadas en su superficie.

La invención se refiere asimismo a los organismos transgénicos, en particular mamíferos, transformados con la ayuda de un vector tal como se ha definido anteriormente, siendo dichos organismos transgénicos resistentes a los patógenos.

La invención tiene también por objeto la utilización de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, o de células hospedantes transformadas mencionadas anteriormente, como bio-depuradores en el marco de la descontaminación de las superficies de los materiales, de la piel o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o de bacterias o en el marco de la preparación de medicamentos (o bio-medicamentos) utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una contaminación externa o de una intoxicación interna por ingestión o inhalación por unos compuestos organofosforados, o en el marco de la preparación de medicamentos utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una infección bacteriana, o en el marco de la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados, o en el marco de la destrucción de almacenes de neurotóxicos.

La invención tiene asimismo por objeto unos materiales impregnados de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, en forma líquida o sólida, tales como guantes, ropa diversa (en particular inmovilización de tejidos para trajes de protecciones químicas), toallitas húmedas, espumas pulverizables.

La invención se refiere asimismo a unos kits para la descontaminación de las superficies de los materiales, de la piel o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o para la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados, caracterizados porque comprenden unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido anteriormente (llegado el caso en forma liofilizada), o unos materiales impregnados de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa mencionadas anteriormente.

La invención tiene también por objeto unos captadores de los compuestos organofosforados antes mencionados, que presentan la ventaja de ser extremadamente sensibles gracias a las capacidades descritas anteriormente de las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente.

La invención se refiere asimismo a unos cartuchos de descontaminación externa, en cuyo interior están injertadas unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente según la invención, y utilizables en particular para descontaminar la sangre de una persona intoxicada por los organofosforados.

La invención se refiere asimismo a unas composiciones farmacéuticas caracterizadas porque comprenden unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como las definidas anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención tiene también por objeto unas composiciones farmacéuticas tales como se han definido anteriormente, caracterizadas porque se presentan en forma administrable por vía inyectable, en particular en solución o envasadas o pegiladas, o por vía tópica, en particular en forma PEGilada o encapsidada o en forma de pomada, aerosol o toallita húmeda.

La invención se refiere asimismo a la utilización de materiales impregnados mencionados anteriormente, o de cartuchos de descontaminación externos definidos anteriormente, como antiséptico para la descontaminación de la infección bacteriana de superficie.

La invención se refiere asimismo a la utilización de la composición farmacéutica definida anteriormente, para el tratamiento de las infecciones bacterianas, en particular en la sangre.

La invención se ilustrará mejor con la ayuda de la descripción detallada siguiente de la fosfotriesterasa de *Sulfolobus solfataricus*, y de las mutaciones efectuadas en esta última en el marco de la preparación de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa, tales como se han definido anteriormente según la invención.

Los organofosforados (OP) son unas moléculas muy tóxicas, que componen ciertos agentes químicos de guerra y unos pesticidas. Estos productos representan hoy en día un grave problema de salud pública (intoxicaciones, contaminaciones de los suelos, contaminaciones de las aguas). Por desgracia, las soluciones actualmente disponibles no son satisfactorias. Sin embargo, las biotecnologías constituyen una alternativa extremadamente prometedora. En efecto, ciertas enzimas utilizables como "bioscavenger" son capaces de destruir con una gran eficacia un amplio espectro de estos venenos.

I) Estudio estructural de la fosfotriesterasa de *Sulfolobus solfataricus*

Esta enzima, procedente de una *archae*, posee la característica de ser hipertermófila. Su estudio permite profundizar en los conocimientos sobre las proteínas termoestables. Esta proteína, capaz de hidrolizar los OP, es un candidato potencial para las descontaminaciones medioambientales y cutáneas. Este trabajo sirve por lo tanto de base para obtener, por bio-ingeniería, unas enzimas activas y termoestables. Esta última característica permite una producción importante a bajo coste. La proteína recombinante, producida por un organismo mesófilo tal como *Escherichia coli*, puede ser purificada eficazmente en una etapa. Los lisados celulares se calientan, lo cual provoca la precipitación de las proteínas mesófilas del hospedante. Sólo permanece soluble la proteína hipertermoestable.

Asimismo, los trabajos han permitido demostrar que SsoPox es una lactonasa natural con una actividad de promiscuidad fosfotriesterasa (Elias *et al*., 2007b).

Gracias a su actividad de "quorum quenching", su facilidad de producción de bajo coste, y su gran estabilidad, que le hace compatible con las restricciones de los procesos industriales, SsoPox es un candidato prometedor para luchar contra las infecciones bacterianas utilizando la vía de quorum quenching.

A) Material y métodos

1. CRISTALIZACIÓN

La clonación, la expresión y la purificación de la PTE hipertermófila de *S. Solfataricus* en *E. coli* están descritas por Merone *et al.* (2005). La enzima se concentró a 5,8 $mg \cdot ml^{-1}$. Los ensayos de cristalización se han realizado utilizando el método de difusión de vapor de gota colgante. Se mezclaron unos volúmenes iguales, que van de 1 a 2 µl de solución proteica y de la solución del depósito. Las gotas resultantes se equilibraron contra una solución depósito que contiene del 15 al 18% (masa/volumen) de polietilenglicol (PEG) 8000 en tampón Tris-HCl pH 8. Después de una semana a 4°C aparecen unos cristales muy finos.

2. RECOGIDA DE LOS DATOS

Los cristales se han transferido en primer lugar a una solución crioprotectora compuesta de la solución del depósito y del 25 % (volumen/volumen) de glicerol. Cada cristal se congeló después instantáneamente en nitrógeno líquido. Los datos de difracción con rayos X se recogieron a 100°K en la línea FIP BM 30 del sincrotón de Grenoble. (ESRF, Grenoble, Francia). Para estas recogidas, se ha utilizado un detector MarCCD (165mm). Se ha registrado un conjunto de datos a 2,6 Å de resolución.

3. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA

Los datos de difracción se han integrado y puesto a escala gracias a los programas XDS2000 y al paquete de software CCP4 (Collaborative Computational Project). La primera sustitución molecular se ha realizado con PHASER utilizando un modelo polialanina deducido de la estructura de la PTE de *P. diminuta* (Código PDB: 1DPM). Se han encontrado dos moléculas de proteínas en la unidad asimétrica. El sitio activo constituido por dos iones metálicos era claramente visible. El mapa de densidad electrónica se mejoró utilizando un procedimiento de aplanado del disolvente y el promediado por simetría no cristalográfica de las dos moléculas gracias al software DM. La construcción manual del modelo se ha realizado utilizando el programa COOT. Algunas cadenas laterales han podido ser colocadas y se tuvieron que retirar algunos bucles implicados en la interfaz del dímero. Se ha realizado una nueva sustitución molecular utilizando MOLREP, fijando las dos primeras soluciones encontradas y utilizando el modelo así mejorado. Se encontraron dos soluciones suplementarias, para dar un total de cuatro moléculas en la unidad asimétrica (R = 46%, Rfree = 51%). El modelo de estructura se ha construido después manualmente y por afinidad mediante sucesiones de ciclos de los softwares COOT y REFMAC.

B) Resultados

1. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

La PTE de *S. solfataricus* cristaliza en PEG y los datos de difracción se han recogido con el sincrotrón (ESRF, Grenoble, Francia). La estructura de esta proteína ha sido determinada mediante el método de la sustitución molecular (véase Material y Métodos), y afinada a 2,6 Å de resolución a un factor R de 21,8%, un Rfree de 28% y

una buena geometría. La cadena principal es totalmente visible en el mapa de densidad, para los dos homodímeros de la unidad asimétrica, a pesar de una resolución media.

La estructura de esta PTE hipertermófila es tal que la molécula es aproximadamente globular con unas dimensiones de aproximadamente 40 Å x 54 Å x 46 Å. Su topología es muy similar a las dos PTE mesófilas cuyas estructuras ya son conocidas. La primera procede de *P. diminuta* (Vanhooke *et al.*, 1994; código pdb: 1DPM) y la segunda procede de *A. radiobacter* (Jackson *et al.*, 2005; código pdb: 2D2J). Esta estructura hipertermoestable puede ser descrita como un barril $(\beta/\alpha)_8$ deformado, también denominado barril TIM. Consiste en 8 hebras β paralelas que forman el barril flanqueado por 11 hélices α. La superposición de estas tres estructuras resueltas da unas desviaciones medias (RMS) para la posición de los carbonos α entre la PTE de *S. solfataricus* y la de *P. diminuta* (sobre 268 átomos) y entre la PTE de *S. solfataricus* y la de *A. radiobacter* (sobre 271 átomos) de 1,05 Å y 1,11 Å, respectivamente.

Existen algunas diferencias principales, a saber dos acortamientos de la estructura de la PTE de *S. solfataricus* comparada con las estructuras de las PTE mesófilas. La primera está localizada en la entrada del sitio activo y consiste en la deleción de un bucle de 15 residuos. Otro acortamiento se refiere a los dos extremos de la cadena polipeptídica. En efecto, existen 6 y 2 residuos menos en el extremo C-terminal, 2 y 4 residuos menos en N-terminal, con respecto a las PTE de *P. diminuta* y de *A. radiobacter*, respectivamente. Otra modificación se refiere a la presencia, en la estructura de la PTE de *S. solfataricus*, de bucles suplementarios implicados en la dimerización.

2. INTERFAZ DEL DÍMERO

Al igual que las PTE mesófilas (Benning *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2005), la PTE de *S. solfataricus* se cristaliza en el homodímero. Para las dos PTE mesófilas, el área de contacto entre los monómeros es de aproximadamente 1350 Å, con el 62,5% de contactos hidrofóbicos, y se cuentan aproximadamente 25 enlaces hidrógeno en la interfaz. En la estructura de la PTE de *S. solfataricus*, los bucles suplementarios implicados en la formación del dímero aumentan la superficie de contacto. Los dos monómeros parecen así interpenetrarse. En efecto, el área de contacto es de 1720 Å. A pesar de este aumento, la cantidad de enlaces hidrógeno en la interfaz es del mismo orden (aproximadamente 20). De hecho, este aumento de la superficie de contacto se debe esencialmente a unos contactos hidrófobos suplementarios. Así, los contactos hidrófobos en la interfaz representan el 68% de los contactos totales en este dímero.

Además, la conformación del dímero no es idéntica a la de las PTE mesófilas. Existe un movimiento evidente de la posición relativa del segundo monómero que podría haber sido causado por los bucles suplementarios implicados en la dimerización.

Otro punto interesante se refiere a la accesibilidad global al disolvente de la proteína. Todas estas PTE: la de *P. diminuta*, de *A. radiobacter* y de *S. solfataricus*, tienen aproximadamente la misma accesibilidad al disolvente en lo que se refiere a los monómeros (13076,1 $Å^2$, 12828,7 $Å^2$, 13039,4 $Å^2$, respectivamente), y aproximadamente el mismo volumen (42464,2 $Å^3$, 44313,2 $Å^3$, 43429,9 $Å^3$ respectivamente). Por el contrario, el dímero hipertermostable es más pequeño (86950 $Å^3$) que los dímeros mesófilos (88800 $Å^3$).

3. POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

Los análisis del potencial electrostático con Swiss-PdbViewer revelan que la PTE de *S. solfataricus* es una proteína muy cargada. En efecto, la estructura muestra 39 Asp y Glu, 37 Lys y Arg que son tantas cargas localizadas en la superficie de la proteína. Este número tan elevado de residuos cargados es la causa de la presencia de numerosos grupos de cargas. Una cara está principalmente cargada negativamente, la otra más bien positivamente. Esta distribución particular de las cargas debe conferir a la proteína un momento dipolar muy fuerte. Además, las fronteras entre los dos monómeros están uniformemente cargadas negativamente. Esto es muy sorprendente, ya que unas cargas no complementarias tendrían más bien tendencia a aumentar la energía de repulsión entre los dos monómeros. Una sola región de la proteína está poco cargada. Se trata de una bolsa hidrófoba, que corresponde al sitio activo. Esta última está rodeada de cargas negativas.

4. ENLACES IÓNICOS

Con el fin de compensar las energías de acoplamiento inducidas por este gran número de cargas y el fuerte momento dipolar, la mitad de estos residuos cargados de superficie está implicada en unos puentes salinos. La PTE de *S. solfataricus* cuenta con 25 puentes salinos por monómero para comparar con las 15 unidades para las PTE mesófilas. La mayoría de estos puentes salinos está uniformemente localizada en la superficie de la proteína. Como se describe para otras proteínas hipertermófilas, este gran número de puentes salinos forma unas redes complejas de cargas en la superficie de la proteína.

5. DESCRIPCIÓN DEL SITIO ACTIVO

Como las PTE mesófilas, el sitio activo de la PTE de *S. solfataricus* consiste en un centro bimetálico, localizado en C-terminal del barril β. Esos dos cationes metálicos se puentean mediante la molécula de agua catalítica, y mediante

un residuo modificado, una lisina carboxilada. La enzima utiliza una lisina carboxilada en lugar de un glutamato probablemente porque el par de electrones transportados por el nitrógeno puede estar deslocalizado, y así permitir que cada uno de los oxígenos lleve una carga negativa, y compensar así las cuatro cargas formales positivas de los dos metales. Para su coordinación, están implicadas también cuatro histidinas, así como un ácido aspártico (Aps 256) y otra molécula de agua. El metal más profundo (denominado α) adopta una geometría de bipirámide trigonal, coordinada por His 22, His 24, Asp 256, Lys 137 y la molécula de agua puente. El metal más expuesto al disolvente (denominado β) adopta una geometría de bipirámide trigonal distorsionada, con ligandos His 170, His 199, Lys 137, la molécula de agua puente y otra molécula de agua. La molécula de agua puente está equidistante de los dos metales, con una distancia de aproximadamente 2 Å, y está en unión hidrógena con Asp 256 (2,68 Å). En la PTE de *S. solfataricus*, el centro metálico, las cuatro histidinas, el aspartato y la lisina carboxilada se conservan y están bien superpuestos con las otras estructuras conocidas de PTE. La comparación estructural con las dos PTE mesófilas ha llevado a la identificación del sitio de fijación de los fosfotriésteres según el sitio descrito (Chen-Goodspeed *et al*., 2001). La naturaleza química de las cadenas laterales en la cavidad está globalmente sin alterar con respecto a las PTE mesófilas, lo cual conduce probablemente a una fijación similar de los fosfotriésteres en el sitio activo de la PTE de *S. solfataricus*.

Aunque el repliegue sea globalmente similar a las PTE mesófilas, el sitio activo de la PTE de *S. solfataricus* es mucho más estrecho, a causa de una ligera modificación del esqueleto peptídico y de la presencia de dos tirosinas (Tyr 97 y Tyr 99). Además, en la entrada del sitio activo, un bucle de nueve residuos crea un túnel hidrófobo, que está conectado al sitio activo. Esto no se ha descrito en las estructuras de las PTE mesófilas.

C) Conclusión

1. TERMOESTABILIDAD

La PTE de *S. solfataricus* es una enzima extremadamente estable. En efecto, es activa frente al paraoxón hasta temperaturas muy elevadas. Merone *et al*., (2005), por otra parte, no han encontrado su actividad máxima por razones técnicas, pero hasta 95°C, la actividad continua aumentando. El estudio estructural de esta proteína muestra algunos indicios que permiten explicar el mecanismo de esta extraordinaria termoestabilidad.

1.1 EL ACORTAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

La estructura de la PTE de *S. solfataricus* muestra la deleción de un gran bucle con respecto a las PTE mesófilas (véanse los resultados). Esto es un caso clásico, ya que los bucles de las proteínas termoestables son muy a menudo más cortos que los de sus homólogos mesófilos (Vieille C., 1996), lo cual permite estabilizar el estado nativo, o desfavorecer el estado desnaturalizado. En esta estructura termoestable, los dos extremos de la cadena están acortados y más anclados al núcleo de la proteína. Además, con el fin de reforzar este núcleo compacto, estos dos extremos están en interacción iónica entre el ácido carboxílico terminal (Ser 314) y la cadena lateral de Arg 2. Se puede también señalar que dos residuos prolinas (Pro 4 y Pro 309) rigidizan un poco más estos extremos. Este tipo de estabilización mutua entre el N-terminal y el C-terminal está considerado como un factor que aumenta la rigidez global de las proteínas, y se ha descrito también en la fosforibosil antranilato isomerasa de *T. maritima*. De hecho, la reducción de la flexibilidad de los bucles y de los extremos del esqueleto peptídico por su estabilización a través de un puente salino, o bien su acortamiento o su deleción, contribuye al aumento global de la estabilidad de la proteína.

1.2 ASOCIACIÓN EN DÍMERO

Los bucles suplementarios implicados en el dímero termoestable tienen consecuencias. La primera se refiere al ensamblaje de los monómeros. En efecto, la conformación de este dímero es diferente de la conformación del dímero clásico TIM. Un hecho similar se ha descrito ya para el dímero TIM de Ttx (Walden *et al*. 2004).

Otra consecuencia directa consiste en el aumento de la superficie de contacto entre los dos monómeros, y conduce a un valor extremo para los complejos permanentes (Lo Conte L. *et al*., 1999) (véanse los resultados). El refuerzo de esta interacción confirma que la dimerización es un medio importante de termoestabilización (Vieille *et al*., 2001). La hidrofobicidad extrema de esta superficie de contacto (Lo Conte L. *et al*., 1999) debe ser un importante factor de estabilización, ya que los contactos hidrófobos son más favorables a alta temperatura.

Estos bucles suplementarios implicados en el dímero inducen también a una modificación del volumen del dímero. En efecto, los monómeros de esta proteína hipertermoestable poseen aproximadamente el mismo volumen que los monómeros de las PTE mesófilas. Por el contrario, su dímero es mucho más pequeño. Esto es coherente con el hecho de que la minimización de la relación superficie/volumen, como es el caso para esta proteína, puede aumentar la estabilidad de las proteínas simultáneamente, reduciendo la energía inducida por las superficies desfavorables, y aumentar al mismo tiempo las interacciones atractivas internas (Sterner y Liebl, 2001).

El refuerzo observado de este dímero es coherente con la preferencia de las proteínas hipertermoestables para organizarse en oligómeros. Esto también se ha descrito para proteínas TIM (Walden *et al*., 2004).

1.3 COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS

La secuencia de esta proteína hipertermoestable muestra una composición en aminoácidos diferente de la de las PTE mesófilas (Merone *et al*., 2005). De hecho, en esta proteína de *S. solfataricus*, existe una disminución del contenido en aminoácidos polares no cargados como Gln, Asn, Thr y Ser. En efecto, 50 (el 15,9% de los residuos totales) de entre los que están presentes en la PTE termoestable, mientras que hay 65 y 60 (el 18,3% y el 19,7% de los residuos totales) en las secuencias de las PTE de *P. diminuta* y de *A. radiobacter*, respectivamente. Esta diferencia es un valor típico entre unas proteínas hipertermófilas y mesófilas (Sterner y Libl, 2001). Los residuos Gln y Asn están sujetos a la desaminación, que puede ser catalizada por los residuos Thr y Ser (Wright, 1991). Esto significa que Gln y Asn son unos eslabones débiles en la estructura proteica, a causa de su tendencia a la desaminación, que puede conducir a la escisión de la cadena, particularmente a temperaturas que se acercan o que superan los 90°C. Parece probable que estos eslabones estén protegidos o eliminados en estas proteínas termoestables. Por término medio, la neutralización de estos puntos débiles conduce a una reducción global del número de estos residuos en las secuencias hipertermoestables, como lo muestran los análisis estadísticos (Szilagyi y Zavodszky, 2000).

Por otra parte, la secuencia de la PTE de *S. solfataricus* muestra un aumento del contenido en aminoácidos cargados. Contiene 77 (el 24,5% de los residuos totales) residuos cargados Asp, Glu, Lys o Arg, mientras que las dos PTE mesófilas contienen 69 (aproximadamente el 21% de los residuos totales). La estructura tridimensional muestra que la mayor parte de estos residuos cargados está localizado en la superficie de la proteína, lo cual corresponde a las observaciones anteriores (Szilagyi y Zavodszky, 2000) sobre las proteínas hipertermoestables. Estas descripciones reflejan las grandes diferencias entre las proporciones de los residuos cargados y las de los residuos no cargados en este tipo de proteínas, como ya se había deducido por las comparaciones de genoma completo de organismos hipertermófilos y mesófilos (Fukuchi y Nishikawa, 2001).

1.4 INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS

Los análisis del número total de enlaces hidrógeno utilizando HBPLUS no han mostrado diferencias significativas entre las PTE mesófilas y la proteína hipertermoestable. Por el contrario, la diferencia de estabilidad entre estas proteínas se debe seguramente parcialmente al gran número de puentes salinos observados para la PTE de *S. solfataricus*, comparado con las proteínas mesófilas. Los puentes salinos se describen como elementos dominantes en las estructuras de proteínas hipertermófilas, ya que contribuyen a la estabilidad termodinámica de las proteínas (Sterner y Liebl, 2001). Así, paralelamente al aumento de la termoestabilidad de las proteínas, estos puentes salinos tienden a organizarse en redes de cargas, que se encuentran generalmente en la superficie de la proteína (Vieille C., 1996), como se observa en esta estructura. Un alto nivel de cooperación entre los enlaces iónicos parece más eficaz para la termoestabilidad que una suma de pares de iones aislados.

La presencia de este gran número de puentes salinos y su organización en redes parece insuficiente para explicar por sí misma la increíble termoestabilidad de la PTE de *S. solfataricus*. En efecto, el aumento del número de puentes salinos entre los TIM hipertermófilos y sus homólogos mesófilos se ha descrito solamente para el TIM bacteriano de *Thermotoga maritima*. Esta estrategia no es aparentemente la única para alcanzar la termoestabilidad, dado que todos los TIM de archae descritos anteriormente no han explotado los enlaces iónicos como un medio de termoestabilización. La PTE de *S. solfataricus* es, según le consta al solicitante, el primer TIM de archae que posee un número significativamente más importante de puentes salinos que sus homólogos mesófilos.

Las proteínas se adaptan a condiciones extremas conservando su estado funcional, que se caracteriza por un balance sutil entre estabilidad y flexibilidad. Dado que este balance está basado en algunos enlaces hidrógenos, puentes salinos, interacciones hidrófobas o acortamiento de bucles, la termoestabilización se alcanza evidentemente con una acumulación de numerosas y sutiles mejoras en diferentes sitios de la proteína (Jaenicke, R. 1996). Se ha propuesto asimismo que, a temperatura ambiente, las enzimas termoestables se muestren menos flexibles que sus homólogas mesófilas; en cambio, a su temperatura óptima de actividad, las dos enzimas muestran una flexibilidad equivalente.

La estructura cristalográfica de la PTE de *S. solfataricus* muestra que su rigidez incrementada está causada por un cierto número de diferencias estructurales precisas con sus homólogas mesófilas. Los determinantes posibles de su termoestabilidad son las deleciones y las estabilizaciones de regiones flexibles; la compactación y el refuerzo del dímero; y un número incrementado de pares de iones que están en parte organizados en redes de cargas.

2. SITIO ACTIVO

2.1. IMPLICACIÓN BIOLÓGICA

Se han aislado y caracterizado varias OP-hidrolasas. La más conocida de ellas es la PTE, que se aisló originalmente de las bacterias del suelo. El sustrato natural de estas enzimas sigue siendo, sin embargo, desconocido. Como la síntesis del más eficaz de sus sustratos determinados hasta ahora, a saber el paraoxón, se ha descrito por primera vez en 1950, existen algunas controversias en cuanto al origen de esta actividad. En efecto, esto podría ser una

actividad que se debe a una proximidad estructural de sustrato, o estas enzimas podrían haber evolucionado específicamente contra estas moléculas en este corto periodo de tiempo.

En lo referente a la PTE de *S. solfataricus*, parece poco probable que esta proteína haya evolucionado específicamente para hidrolizar estos insecticidas, ya que estas moléculas están muy poco presentes en el biotopo de esta archae. Además, su entorno (aproximadamente a 90°C) conduciría a una degradación espontánea extremadamente rápida de estos compuestos termolábiles.

La estructura de esta enzima pone también en evidencia un túnel hidrófobo que comunica con el sitio activo. Este túnel, más bien estrecho, podría ser un índice para unos sustratos fisiológicos tales como las *N-acil L*-homoserina lactonas. Este hecho sería por otra parte coherente con el descubrimiento de este gen en medio de un grupo de lipasas (Merone *et al*., 2005). La presencia de este tipo de túnel hidrófobo es clásico para este tipo de sustrato y ya se ha descrito (Musayev *et al*., 2005). A pesar de las tres prolinas, el bucle de nueve residuos al principio del túnel parece más flexible que el resto de la proteína, con un factor de agitación térmico medio de 48 $Å^2$. Esto sugiere que este bucle es suficientemente flexible para una adaptación a la fijación de un sustrato, y suficientemente rígido para el buen posicionamiento de este último.

La estructura tridimensional revela asimismo la presencia en la cavidad del sitio activo de un residuo cisteína. Esto es interesante, ya que este tipo de residuo es, con Met, Asn y Gln, considerado como un aminoácido termolábil para las proteínas hipertermófilas. Generalmente, hay una disminución drástica de su número en estas proteínas (Sterner y Liebl, 2001), como se ha descrito para Asn y Gln en este estudio. Cys 258 es muy accesible al disolvente. La estructura cristalina no muestra activación particular de este residuo. Sin embargo, el conocimiento de la reactividad de esta cisteína aportaría un elemento interesante para el establecimiento del papel fisiológico de esta enzima.

2.2 NUEVO MECANISMO PROPUESTO

Basado en el mecanismo sugerido por Aubert *et al*. (2004), se propone para esta nueva PTE hipertemófila un nuevo mecanismo para la PTE hipertermófila activada, que no hace intervenir la transferencia de protón descrito anteriormente.

El centro bi-metálico se utiliza para activar el sustrato para un ataque nucleófilo polarizando el enlace fósforo-oxígeno. El oxígeno de fósforo se fija sobre el metal β, lo cual aumenta el carácter electrófilo del centro de fósforo y facilita el ataque nucleófilo del ion hidróxido. De hecho, la fijación del oxígeno transportado por el fósforo sobre el metal β podría haber aumentado la reactividad de la molécula de agua debilitando la interacción de esta última sobre el metal β.

Cuando el sustrato se compleja a este centro bi-metálico, el ion hidroxilo ataca el centro de fósforo por medio de un mecanismo de tipo SN2, que conlleva la formación de un intermedio pentavalente que une los dos metales. La carga negativa que se desarrolla sobre el oxígeno del fósforo está estabilizada por la interacción con los metales, particularmente el metal β. El par de electrones de este oxígeno se pliega sobre el enlace fósforo-oxígeno, permitiendo la salida del grupo saliente. El producto fosforado que une los dos metales se evacúa del sitio activo por una nueva molécula de agua del disolvente. Por su pKa, esta molécula fosforada está desprotonada por el disolvente. Aubert *et al*. (2004) sugieren la existencia de una transferencia de protón en el mecanismo de la PTE de *P. diminuta*. Brevemente, en este mecanismo, Asp 301 está previsto para tomar el protón del intermedio pentavalente. Después, el protón se evacúa del sitio activo con la ayuda de His 254 t Asp 233. No se cree que esto se pudiera producir para la PTE de *S. solfataricus*, ya que el residuo que corresponde a la His 254 es una arginina. Esta arginina interactúa con Asp 256 a través de su Nε, lo cual hace más difícil una eventual transferencia del protón en el mecanismo de la PTE de *S. solfataricus*.

Este nuevo mecanismo es, de hecho, general para todas las PTE caracterizadas. Algunos índices contradicen en efecto el mecanismo de Aubert *et al*. La PTE de *A. radiobacter* es una enzima muy activa y posee también una arginina en esta posición. Además, unos trabajos de mutagénesis realizados sobre la PTE de *P. diminuta* confirman la presente hipótesis. Las mutaciones H254R y H254G no muestran ningún efecto drástico sobre los parámetros catalíticos de la enzima (Grimsley *et al*., 2005; Hill *et al*., 2003).

Se pueden señalar también otras incoherencias. En la PTE de *P. diminuta*, la Asp 301 está en estrecha interacción con el metal α. Esto implica, para consideraciones electrostáticas, que este residuo cargado negativamente no debe ser protonado. Además, los dos nitrógenos del imidazol de His 254 están en enlaces hidrógenos con unos residuos cargados negativamente (Asp 301 y Asp 233). Esto debe tener como efecto aumentar el pKa de esta histidina, lo cual favorece la forma imidazolio, y sugiere que este residuo no está en el mejor entorno para realizar la catálisis ácido/base propuesta en esta transferencia de protón.

En conclusión, el análisis de esta estructura ha permitido encontrar unos elementos que explican la increíble termoestabilidad de esta enzima. Además, el análisis de esta estructura así como un importante trabajo bibliográfico ha permitido proponer un nuevo mecanismo general de acción para el conjunto de las PTE.

Por último, todos estos análisis permiten conducir al rápido desarrollo de biocatalizadores según el protocolo descrito a continuación.

II) Procedimiento de preparación de fosfotriestarasas hipertemófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la invención, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolubus solfataricus* que corresponde a la SEC ID n° 3.

Con el fin de preparar el gen sintético *Ssopox* de 945 pares de bases (pb) codificando *Ssopox* para las fosfotriesterasas hipertemófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la invención, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolubus solfataricus* que corresponde a la SEC ID n° 3 y que comprenden una por lo menos de las cuatro mutaciones siguientes:

- sustitución de la tirosina Y en la posición 97 por un triptófano W,
- sustitución de la tirosina Y en la posición 99 por una fenilalanina F,
- sustitución de la arginina R en la posición 223 por una histidina H,
- sustitución de la cisteína C en la posición 258 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

- sustitución de la valina V en la posición 27 por una alanina A,
- sustitución de la prolina P en la posición 67 por una valina V,
- sustitución de la treonina T en la posición 68 por una serina S,
- sustitución de la leucina L en la posición 72 por una isoleucina I,
- sustitución del aspartato D en la posición 141 por una treonina T,
- sustitución de la glicina G en la posición 225 por una prolina P,
- sustitución de la leucina L en la posición 226 por una histidina H,
- sustitución de la fenilalanina F en la posición 229 por una serina S,
- sustitución del triptófano W en la posición 263 por una alanina A,
- sustitución del triptófano W en la posición 278 por una isoleucina I,

se han utilizado 14 oligonucleótidos (7 sentidos y 7 anti-sentido). El tamaño de los oligonucleótidos sería de aproximadamente 90 pb, y cada cebador solapa al siguiente por una región solapante de 27 pb. Las secuencias oligonucleotídicas en cuestión en el sentido 5'-3' son las siguientes:

1for:*GATATACATATG*AGAATACCATTAGTTGGGAAAGATTCAATAGAATCTAAGGA CATAGGATTTACGCTAATTCATGAACATTTAAGAGcTTTTA GCGAAGCG (SEC ID NO: 18)

*2rev:*AACCTCATTTACAGCGTTTCTGAACTCCTCATCTTCGTTATATAGATGGGCCA TTGTTGTCTGACCGCTTCGCTAAAAGCTCTTAAATGTTC (SEC ID NO: 19)

*3for:*GAGTTCAGAAACGCTGTAAATGAGGTTAAAAGGGCAATGCAATTTGGAGTA AAGACTATAGTAGATgtCtCTGTAATGGGAaTtGGTAGGGAC (SEC ID NO: 20)

*4rev:*CGTCCCCGCAACTAAATTTATCCCGGTAGCCTTAACCACTTTTTCCATAAATC TGATGTCCCTACCAATTCCCATTACAGAGACATCTACTAT (SEC ID NO: 21)

*5for:*ACCGGGATAAATTTAGTTGCGGGGACGGGGATTTggATATtTATCGACTTACC TTTCTATTTCTTAAATAGGTCAATTGATGAGATAGCTGAC (SEC ID NO: 22)

*6rev:*TATCTTTACGAAGCCAGCTTTATTGAGAGTACCTTGTATTCCCTCTTTTATAT CATGAATAAACAAGTCAGCTATCTCATCAATTGACCTATT (SEC ID NO: 23)

*7for:*CTCAATAAAGCTGGCTTCGTAAAGATAGCTGCAacTGAACCTGGGATCACAA AGGATGTGGAGAAGGTAATAAGGGCTGCTGCCATAGCAAAC (SEC ID NO: 24)

*8rev:*TTGCTGTTCTAATCCGGTGTTATTGTGAGCGTTAGAGTGGGTAATTATTGGTA CTTTAGTCTCTTTGTTTGCTATGGCAGCAGCCCTTATTAC (SEC ID NO: 25)

*9for:*CACAATAACACCGGATTAGAACAGCAAAGAATATTGACTGAAGAAGGTGTT GATCCAGGGAAAATATTAATAGGTCATTTAGGTGATACAGAT (SEC ID NO: 26)

*10rev:*AggAaAatgATCTAATCCAATAAAGGATCCCTTATCTGCTATCTTCTTTATGTA ATCTATATTATCTGTATCACCTAAATGACCTATTAA (SEC ID NO: 27)

*11for:*TCCTTTATTGGATTAGATcatTtTccTcatGATTTATcCCTACCTGTTGATAAGAG AAATGAAACGACCTTAAGACTAATCAAAGATGGTTATTCAGAT (SEC ID NO: 28)

*12rev:*tttatattctggttttgcagttccagcgtcGAatgtgcataAataatcgtgagagatcattatcttatctgaataaccatctttgatt agtct (SEC ID NO: 29)

*13for:*gctGGAACTGCAAAACCAGAATATAAACCTAAGCTTGCTCCAAGAattAGTAT AACTCTAATATTTGAGGATACGATACCGTTCTTAAAGAGA (SEC ID NO: 30)

*14rev:*CAACCC*GAATTC*TTAGCTGAAGAACTTTTTCGGATTTTCCTTAAATATTGTA GCTATAACCTCTTCATTCATTCACTCCATTTCTCTTTAAGAACGGTATCGTATCCTC (SEC ID NO: 31)

Los nucleótidos seleccionados para efectuar las mutaciones en la proteína están indicados en negrita y las regiones solapantes están subrayadas. Los oligonucleótidos **1for** y **14rev** también se han construido con el fin de insertar los sitios de restricción *Nde*I y *EcoR*I respectivamente a las secuencias N-terminal y C-terminal del gen.

Los oligonucleótidos se han purificado por electroforesis sobre gel de acrilamida (10%) según el método descrito en Sambrook (Sambrook J. y Russell D. W. 2001 "Molecular Cloning: a laboratory manual").

El método de reconstrucción del gen comprende esencialmente 4 etapas. En la primera etapa, se mezclan unos pares sucesivos de oligonucleótidos (por ejemplo 1for con 2rev) (a una concentración final de 200 nM) en un tubo PCR con un tampón polimerasa 1X DeepVent (NEB), 6 mM $MgSO_4$, 200 uM dNTP y 1U de polimerasa DeepVent, y se colocan en un equipo de ciclo térmico con el fin de obtener unos fragmentos de aproximadamente 160 pb (ciclo: 10 min a 95°C, 1 min a 68°C, 10 min a 72°C). Los fragmentos obtenidos se mezclan (a una concentración de 20 nM), y después son digeridos por la DnaseI (0,0013U; 30 s-1,5 min a temperatura ambiente. La reacción DnaseI se detiene mediante inactivación térmica a 95°C durante 10 minutos. La tercera etapa, o etapa de ensamblaje, es una PCR (1 min 95°C, 30 s 50°C, 30 s 72°C, 55 veces) con el fin de combinar los fragmentos obtenidos después de la digestión por la DnaseI y reconstruir el gen *Ssopox* entero, sin adición de oligos externos.

En la última etapa, o etapa de amplificación, se añaden los oligonucleótidos externos (5' sentido y 3' anti-sentido *ssopox*; Merone *et al*., 2005) a la mezcla, a una concentración final de 1 µM, con el fin de amplificar el gen entero (ciclo PCR: 1 min a 95°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C).

Un fragmento de aproximadamente 950 pb es detectable por el paso de un alícuota sobre gel de agarosa 1%. El ADN se purifica y se clona en un plásmido para secuenciación.

Bibliografía

AFRIAT, L., ROODVELDT, C., MANCO, G. & TAWFIK, D.S. (2006). The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. Biochemistry 45, 1367OE-13686.

AUBERT SD., LI Y., RAUSHEL FM. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. Biochemistry. 2004, 43: 5707-15.

BENNING MM., KUO JM., RAUSHEL FM., HOLDEN HM. Three-dimensional structure of phosphotriesterase: an enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. Biochemistry. 1994, 33: 15001-7.

BENNING MM., KUO JM., RAUSHEL FM., HOLDEN HM. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. Biochemistry. 1995, 34: 7973-8.

BENNING MM., SHIM H., RAUSHEL FM., HOLDEN HM. High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from Pseudomonas diminuta. Biochemistry. 2001, 40: 2712-22

CHEN-GOODSPEED M, SOGORB MA., WU F, HONG SB & RAUSHEL FM. Structural déterminants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. Biochemistry, 2001, 40, 1325-31

DONG, Y.H., GUSTI, A.R., ZHANG, Q., XU, J.L. & ZHANG, L.H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homo serine lactonases from Bacillus species. Appl Environ Microbiol68, 1754-1759.

DONG, Y.H., WANG, L.H., XU, J.L., ZHANG, H.B., ZHANG, X.F. & ZHANG, L.H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homo serine lactonase. Nature 411,813-817.

DONG, Y.H., XU, J.L., LI, X.Z. & ZHANG, L.H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of Erwinia carotovora. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 3526-3531.

ELIAS, M., DUPUY, J., MERONE, L., LECOMTE, C., ROSSI, M., MASSON, P., MANCO, G. & CHABRIERE, E. (2007a). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the hyperthermophilic Sulfolobus solfataricus phosphotriesterase. Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun 63, 553-555.

ELIAS, M., DUPUY, J., MERONE, L., MANDRICH, L., PORZIO, E., MONIOT, S., ROCHU, D., LECOMTE, C., ROSSI, M., MASSON, P., ET AL. (2007b). Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. submitted.

FEDERLE, M.J. & BASSLER, B.L. (2003). Interspecies communication in bacteria. The Journal of clinical investigation 112, 1291-1299.

FUKUCHI S., NISHIKAWA K. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. J. Mol. Biol. 2001, 309: 835-43.

FUQUA, C. & GREENBERG, E.P. (2002). Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. Nature reviews 3,685-695.

GRIMSLEY JK., CALAMINI B., WILD JR., MESECAR AD. Structural and mutational studies of organophosphorus hydrolase reveal a cryptic and functional allosteric-binding site. Arch Biochem Biophys. 2005,442:169-79.

HAREL M., AHARONI A., GAIDUKOV L., BRUMSHTEIN B., KHERSONSKY O., MEGED R., DVIR H., RAVELLI RB., McCARTHY A., TOKER L., SILMAN I., SUSSMAN JL. & TAWFIK DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat. Struct. Mol. Biol. 2004, 11:412-9.

HILL CM., LI WS., THODEN JB., HOLDEN HM., RAUSHEL FM. Enhanced degradation of chemical warfare agents through molecular engineering of the phosphotriesterase active site. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125 : 8990-1.

JACKSON CJ., CARR PD., KIM HK., LIU JW., HERRALD P., MITIC N., SCHENK G., SMITH CA, OLLIS DL. Anomalous scattering analysis of Agrobacterium radiobacter phosphotriesterase: the prominent role of iron in the heterobinuclear active site. Biochem. J. 2006 May 11

JACKSON CJ., LIU JW., COOTE ML., OLLIS DL. The effects of substrate orientation on the mechanism of a phosphotriesterase. Org. Biomol. Chem. 2005, 3: 4343-50.

JAENICKE R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Thermotoga maritima: strategies of protein stabilization. FEMS Microbiol Rev. 1996, 18: 215-24.

LIN, Y.H., XL1, J.L., HU, J., WANG, L.H., ONG, S.L., LEADBETTER, J.R. & ZHANG, L.H. Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and pote nt class of quorum-quenching enzymes. Molecular microbiology 47, 849-860 (2003).

LO CONTE L., CHOTHIA C., JANIN J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. J. Mol. Biol. 1999,285: 2177-98.

MERONE L., MANDRICH L., ROSSI M., MANCO G. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon Sulfolobus solfataricus: cloning, overexpression and properties. Extremophiles. 2005, 9: 297-305.

MERONE, L., MANDRICH, L., ROSSI, M. & MANCO, G. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon Sulfolobus solfataricus: cloning, overexpression and properties. Extremophiles 9(2005), 297-305.

MUNNECKE DM. Enzymatic hydrolysis of organophosphate insecticides, a possible pesticide disposal method. Appl. Environ. Microbiol. 1976, 32:7-13.

MUSAYEV F., SACHDEVA S., SCARSDALE JN., REYNOLDS KA., WRIGHT HT. Crystal structure of a substrate complex of Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) with lauroyl-coenzyme A. J. Mol. Biol. 2005, 346: 1313-21.

OH, K.B., MIYAZAWA, H., NAITO, T. & MATSUOKA, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in Candida albicans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 4664-4668.

PASSADOR, L., COOK, J.M., GAMBEILO, M.J., RUST, L. & IGLEWSKI, RH. Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication. Science (New York, N.Y) 260, 1127-1130 (1993).

PIRHONEN, M., FLEGO, D., HEIKINHEIMO, R. & PAL VA, E.T. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen Erwinia carotovora. The EMBO journal 12 (1993), 2467-2476.

PORZIO E. MERONE L. MANDRICH L. ROSSI M. MANCO G. A new phosphotriesterase from Sulfolobus acidocaldarius and its comparison with the homologue from Sulfolobus solfataricus. Biochimie.2007

RASMUSSEN, T.B. & GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int J Med Microbiol 296, 149-161 (2006).

RAVEH L., GRUNWALD J., MARCUS D., PAPIER Y., COHEN E., ASHANI Y. Human butyrylcholinesterase as a général prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. Biochem. Pharmacol., 1993, 45:2465-74

REIMMANN, C., GINET, N., MICHEL, L., KEEL, C., MICHAUX, P., KRISHNAPILLAI, V., ZALA, M., HEURLIER, K., TRIANDAFILLU, K., HARMS, H., ET AL. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in Pseudomonas aeruginosa PAO1. Microbiology (Reading, England) 148, 923-932 (2002).

SAMPLES CR., HOWARD T., RAUSHEL FM., DeROSE VJ. Protonation of the binuclear metal center within the active site of phosphotriesterase. Biochemistry. 2005, 44 :11005-13.

STERNER R, LIEBL W. Thermophilic adaptation of proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2001, 36:39-106.

SZILAGYI A., ZAVODSZKY P. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. Structure. 2000, 8: 493-504.

VANHOOKE JL., BENNING MM., RAUSHEL FM., HOLDEN HM. Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. Biochemistry. 1996 ; 35 :6020-5.

VIEILLE C. & ZEIKUS GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol Mol Biol Rev. 2001, 65 :1-43.

VIEILLE C., BURDETTE DS., ZEIKUS JG. Thermozymes. Biotechnol Annu Rev. 1996, 2 :1-83.

WALDEN H. TAYLOR GL., LORENTZEN E., POHL E., LILIE H., SCHRAMM A., KNURA T., STUBBE K., TJADEN B., HENSELR. Structure and function of a regulated archael triosephosphate isomerase adapted to high temperature. J. Mol. Biol. 2004, 342: 861-75.

WHITEHEAD, N.A., BARNARD, A.M., SLATER, H., SIMPSON, N.J. & SALMOND, A.P. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS microbiology reviews 25, 365-404 (2001).

WRIGHT HT. Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. Protein Eng. 1991, 4 : 283-94.

ZHANG, L.H. Quorum quenching and proactive host defense. Trends in plant science 8, 238-244 (2003).

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITE HENRI POINCARRE-NANCY 1
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Chabrière, Eric
Helias, Mikaël

<120> Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas y sus utilizaciones

<130> WOB 07 BG NAN FOLO

<160> 31

<170> Patentin versión 3.5

<210> 1
<211> 315
<212> PRT
<213> *Sulfobacillus sp.*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> T o blank

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> K o R

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> C10)..(10)
<223> G o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> E o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> S o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> P o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> G o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> E o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> M o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> P o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Y o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> L o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> K o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56)..(56)
<223> T o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> I o A

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)
<223> S o Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Y o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80)..(80)
<223> S o M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(86)
<223> E o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91)..(91)
<223> V o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (92)..(92)
<223> I o v

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(94)
<223> A o G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (97)..(97)
<223> L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(99)
<223> T o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (101)..(101)
<223> T o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106):.(106)
<223> F o Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (108)..(108)
<223> N o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(109)
<223> G o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(112)

<223> L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (113)..(113)
<223> E o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> E o D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> L o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (125)..(125)
<223> K o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (131)..(131)
<223> N o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (133)..(133)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (137)..(137)
<223> I o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (138)..(138)
<223> K o X

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (139)..(139)
<223> V o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (148)..(148)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (152)..(152)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (153)..(153)
<223> A o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (161)..(161)
<223> Q o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (165)..(165)
<223> N o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (177)..(177)
<223> G o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (187)..(187)
<223> M o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (195)..(195)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (196)..(196)
<223> V o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (207)..(207)
<223> V o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (220)..(220)
<223> V o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (233)..(233)
<223> I o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (239)..(239)
<223> V o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (240)..(240)
<223> L o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (242)..(242)
<223> K o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (249)..(249)
<223> L o S

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (251)..(251)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (254)..(254)
<223> V o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (256)..(256)
<223> Q o H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (266)..(266)
<223> I o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (278)..(278)
<223> K o R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (281)..(281)
<223> M o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (282)..(282)
<223> S o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (286)..(286)
<223> T o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (288)..(288)
<223> V o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (291)..(291)
<223> S o F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (292)..(292)
<223> I o L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (295)..(295)
<223> A o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (298)..(298)
<223> T o N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (299)..(299)
<223> D o E

<220>

<221> MISCL.FEATURE
<222> (301)..(301)
<223> Q o V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (302)..(302)
<223> L o I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (303)..(303)
<223> H o A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (304)..(304)
<223> V o T

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (307)..(307)
<223> V o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (308)..(308)
<223> K o E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (311)..(311)
<223> A o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (312)..(312)
<223> R o K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (313)..(313)
<223> L o F

<400> 1

```
Met Xaa Xaa Ile Pro Leu Val Gly Lys Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                  10                  15

Xaa Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Xaa
```

```
            20                  25                  30

Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Xaa Xaa
        35                  40                  45

Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Xaa Xaa Met Xaa Xaa Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Xaa
65                  70                  75                  80

Glu Lys Val Val Lys Xaa Thr Gly Ile Asn Xaa Xaa Ala Xaa Thr Gly
                85                  90                  95

Xaa Tyr Xaa Tyr Xaa Asp Leu Pro Phe Xaa Phe Xaa Xaa Arg Ser Xaa
            100                 105                 110

Xaa Glu Ile Ala Xaa Leu Xaa Ile His Asp Ile Lys Xaa Gly Ile Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Xaa Asn Xaa Ala Gly Phe Xaa Xaa Xaa Ala Ala Asp Glu Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Thr Xaa Asp Val Glu Xaa Xaa Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

Xaa Lys Glu Thr Xaa Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

Xaa Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Xaa Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

Pro Gly Xaa Xaa Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Xaa Asp
        195                 200                 205

Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Xaa Gly Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Tyr Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Xaa Asp Lys Arg Asn Glu Xaa Xaa
225                 230                 235                 240

Leu Xaa Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Xaa Asp Xaa Ile Met Xaa Ser Xaa
                245                 250                 255

Asp Tyr Cys Cys Thr Ile Asp Trp Gly Xaa Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Leu Ala Pro Xaa Trp Ser Xaa Xaa Leu Ile Phe Xaa Asp Xaa
        275                 280                 285

Ile Pro Xaa Xaa Lys Arg Xaa Gly Val Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa
    290                 295                 300

Ile Phe Xaa Xaa Asn Pro Xaa Xaa Xaa Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 2
<211> 942
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(942)

<400> 2

```
atg aga ata cca tta gtt ggg aaa gat tca ata gaa tct aag gac ata          48
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

gga ttt acg cta att cat gaa cat tta aga gtt ttt agc gaa gcg gcc          96
Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

aga caa caa tgg ccc cat cta tat aac gaa gat gag gag ttc aga aac         144
Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

gct gta aat gag gtt aaa agg gca atg caa ttt gga gta aag act ata         192
Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

gta gat ccc act gta atg gga ttg ggt agg gac atc aga ttt atg gaa         240
Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

aaa gtg gtt aag gct acc ggg ata aat tta gtt gcg ggg acg ggg att         288
Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

tac ata tat atc gac tta cct ttc tat ttc tta aat agg tca att gat         336
Tyr Ile Tyr Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

gag ata gct gac ttg ttt att cat gat ata aaa gag gga ata caa ggt         384
Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

act ctc aat aaa gct ggc ttc gta aag ata gct gca gat gaa cct ggg         432
Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Asp Glu Pro Gly
    130                 135                 140

atc aca aag gat gtg gag aag gta ata agg gct gct gcc ata gca aac         480
Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

aaa gag act aaa gta cca ata att acc cac tct aac gct cac aat aac         528
Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

acc gga tta gaa cag caa aga ata ttg act gaa gaa ggt gtt gat cca         576
Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

ggg aaa ata tta ata ggt cat tta ggt gat aca gat aat ata gat tac         624
Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

ata aag aag ata gca gat aag gga tcc ttt att gga tta gat aga tat         672
Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp Arg Tyr
    210                 215                 220

ggt tta gat tta ttc cta cct gtt gat aag aga aat gaa acg acc tta         720
Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

aga cta atc aaa gat ggt tat tca gat aag ata atg atc tct cac gat         768
Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

tat tgt tgc aca atc gac tgg gga act gca aaa cca gaa tat aaa cct         816
Tyr Cys Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

aag ctt gct cca aga tgg agt ata act cta ata ttt gag gat acg ata         864
Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

ccg ttc tta aag aga aat gga gtg aat gaa gag gtt ata gct aca ata         912
Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

ttt aag gaa aat ccg aaa aag ttc ttc agc                                 942
Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 3

<211> 314

<212> PRT

<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 3

```
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

Tyr Ile Tyr Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Asp Glu Pro Gly
    130                 135                 140

Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp Arg Tyr
    210                 215                 220

Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

Tyr Cys Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 4
<211> 945
<212> ADN
<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(945)

<400> 4

```
atg aca aaa att cct ctt gta gga aaa ggt gaa ata tca cct gga gaa          48
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

atg ggt ttt act tta ata cat gag cat tta agg gtc ttc agt gaa cca          96
Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

gtt aga tat caa tgg cca cat ctt tat aat gaa gat gag gag tta aaa         144
Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

aat gca gta aat gaa gta aag aca ata atg tca tat ggt gtt aag acc         192
Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

atc gtg gat ccc act gtc atg ggt tta ggg aga gac att aga ttc agt         240
Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

gag aag gtc gtg aaa gaa aca ggt ata aat gtg att gca gca acg ggg         288
Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

ttg tat act tac act gat tta cct ttc ttc ttc aat gga aga tca ttg         336
Leu Tyr Thr Tyr Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

gaa gag att gca gaa tta tta ata cat gat ata aaa aag gga ata caa         384
Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

ggg aca aat aat aga gca ggc ttc att aag gtt gca gca gat gag cca         432
Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Asp Glu Pro
    130                 135                 140

ggt ata acg agg gat gta gag agg gca ata agg gca gct gct ata gct         480
Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

cag aag gag act aac gta ccc ata ata aca cat tca aat gct cat aac         528
Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

ggg aca ggt ctt gag caa caa agg att cta atg gag gag ggt gta gac         576
Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

cca ggg aga gtg cta ata ggt cac ttg ggg gac act gat aac gtg gat         624
Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

tac ata aag aag ata gcc gat aaa ggc tcg ttt gta ggt cta gat aga         672
Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp Arg
    210                 215                 220

tac ggt cta gat cta ttc tta cct ata gat aaa agg aac gag gtg ttg         720
Tyr Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

ttg aaa tta att aaa gat gga tac ttg gac agg att atg gtg tca caa         768
Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

gat tac tgt tgc aca att gac tgg ggg ata gca aag ccg gag tac aaa         816
Asp Tyr Cys Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

cct aaa cta gct cca aaa tgg agt atg agt tta ata ttt aca gac gtt         864
Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

ata ccc tca att aag aga gca gga gta act gat gag cag ttg cat gta         912
Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

atc ttc gta aag aat cca gct aga cta ttt agt                             945
Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 5

<211> 315

<212> PRT

<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<400> 5

```
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Leu Tyr Thr Tyr Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Asp Glu Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp Arg
    210                 215                 220

Tyr Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

Asp Tyr Cys Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 6
<211> 942
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(942)

<400> 6

```
atg aga ata cca tta gtt ggg aaa gat tca ata gaa tct aag gac ata          48
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

gga ttt acg cta att cat gaa cat tta aga gtt ttt agc gaa gcg gcc          96
Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

aga caa caa tgg ccc cat cta tat aac gaa gat gag gag ttc aga aac         144
Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

gct gta aat gag gtt aaa agg gca atg caa ttt gga gta aag act ata         192
Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

gta gat ccc act gta atg gga ttg ggt agg gac atc aga ttt atg gaa         240
Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

aaa gtg gtt aag gct acc ggg ata aat tta gtt gcg ggg acg ggg att         288
Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

tgg ata ttc atc gac tta cct ttc tat ttc tta aat agg tca att gat         336
Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

gag ata gct gac ttg ttt att cat gat ata aaa gag gga ata caa ggt         384
Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

act ctc aat aaa gct ggc ttc gta aag ata gct gca gat gaa cct ggg         432
Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Asp Glu Pro Gly
    130                 135                 140

atc aca aag gat gtg gag aag gta ata agg gct gct gcc ata gca aac         480
Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

aaa gag act aaa gta cca ata att acc cac tct aac gct cac aat aac         528
Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

acc gga tta gaa cag caa aga ata ttg act gaa gaa ggt gtt gat cca         576
Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

ggg aaa ata tta ata ggt cat tta ggt gat aca gat aat ata gat tac         624
Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

ata aag aag ata gca gat aag gga tcc ttt att gga tta gat cat tat         672
Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

ggt tta gat tta ttc cta cct gtt gat aag aga aat gaa acg acc tta         720
Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

aga cta atc aaa gat ggt tat tca gat aag ata atg atc tct cac gat         768
Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

tat tta tgc aca atc gac tgg gga act gca aaa cca gaa tat aaa cct         816
Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

aag ctt gct cca aga tgg agt ata act cta ata ttt gag gat acg ata         864
Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

ccg ttc tta aag aga aat gga gtg aat gaa gag gtt ata gct aca ata         912
Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

ttt aag gaa aat ccg aaa aag ttc ttc agc                                 942
Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 7

<211> 314

<212> PRT

<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 7

```
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Asp Glu Pro Gly
    130                 135                 140

Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 8
<211> 942
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(942)

<400> 8

```
atg aga ata cca tta gtt ggg aaa gat tca ata gaa tct aag gac ata          48
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

gga ttt acg cta att cat gaa cat tta aga gca ttt agc gaa gcg gcc          96
Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

aga caa caa tgg ccc cat cta tat aac gaa gat gag gag ttc aga aac         144
Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

gct gta aat gag gtt aaa agg gca atg caa ttt gga gta aag act ata         192
Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

gta gat ccc act gta atg gga ata ggt agg gac atc aga ttt atg gaa         240
Val Asp Pro Thr Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

aaa gtg gtt aag gct acc ggg ata aat tta gtt gcg ggg acg ggg att         288
Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

tgg ata ttc atc gac tta cct ttc tat ttc tta aat agg tca att gat         336
Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

gag ata gct gac ttg ttt att cat gat ata aaa gag gga ata caa ggt         384
Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

act ctc aat aaa gct ggc ttc gta aag ata gct gca aca gaa cct ggg         432
Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Thr Glu Pro Gly
    130                 135                 140

atc aca aag gat gtg gag aag gta ata agg gct gct gcc ata gca aac         480
Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

aaa gag act aaa gta cca ata att acc cac tct aac gct cac aat aac         528
Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

acc gga tta gaa cag caa aga ata ttg act gaa gaa ggt gtt gat cca         576
Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

ggg aaa ata tta ata ggt cat tta ggt gat aca gat aat ata gat tac         624
Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

ata aag aag ata gca gat aag gga tcc ttt att gga tta gat cat tat         672
Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

ccg cat gat tta ttc cta cct gtt gat aag aga aat gaa acg acc tta         720
Pro His Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

aga cta atc aaa gat ggt tat tca gat aag ata atg atc tct cac gat         768
Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

tat tta tgc aca atc gac tgg gga act gca aaa cca gaa tat aaa cct         816
Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

aag ctt gct cca aga tgg agt ata act cta ata ttt gag gat acg ata         864
Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

ccg ttc tta aag aga aat gga gtg aat gaa gag gtt ata gct aca ata         912
Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

ttt aag gaa aat ccg aaa aag ttc ttc agc                                 942
Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 9
<211> 314
<212> PRT
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 9

```
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                  10                  15

Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

Val Asp Pro Thr Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Thr Glu Pro Gly
    130                 135                 140

Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

Pro His Asp Leu Phe Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

Lys Leu Ala Pro Arg Trp Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 10
<211> 942
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(942)

<400> 10

```
atg aga ata cca tta gtt ggg aaa gat tca ata gaa tct aag gac ata          48
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                   10                  15

gga ttt acg cta att cat gaa cat tta aga gca ttt agc gaa gcg gcc          96
Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30

aga caa caa tgg ccc cat cta tat aac gaa gat gag gag ttc aga aac         144
Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

gct gta aat gag gtt aaa agg gca atg caa ttt gga gta aag act ata         192
Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

gta gat gtt agc gta atg gga ata ggt agg gac atc aga ttt atg gaa         240
Val Asp Val Ser Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

aaa gtg gtt aag gct acc ggg ata aat tta gtt gcg ggg acg ggg att         288
Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

tgg ata ttc atc gac tta cct ttc tat ttc tta aat agg tca att gat         336
Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

gag ata gct gac ttg ttt att cat gat ata aaa gag gga ata caa ggt         384
Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

act ctc aat aaa gct ggc ttc gta aag ata gct gca aca gaa cct ggg         432
Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Thr Glu Pro Gly
    130                 135                 140

atc aca aag gat gtg gag aag gta ata agg gct gct gcc ata gca aac         480
Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

aaa gag act aaa gta cca ata att acc cac tct aac gct cac aat aac         528
Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

acc gga tta gaa cag caa aga ata ttg act gaa gaa ggt gtt gat cca         576
Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

ggg aaa ata tta ata ggt cat tta ggt gat aca gat aat ata gat tac         624
Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

ata aag aag ata gca gat aag gga tcc ttt att gga tta gat cat tat         672
Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

ccg cat gat tta tca cta cct gtt gat aag aga aat gaa acg acc tta         720
Pro His Asp Leu Ser Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

aga cta atc aaa gat ggt tat tca gat aag ata atg atc tct cac gat         768
Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

tat tta tgc aca atc gac gca gga act gca aaa cca gaa tat aaa cct         816
Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Ala Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

aag ctt gct cca aga atc agt ata act cta ata ttt gag gat acg ata         864
Lys Leu Ala Pro Arg Ile Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

ccg ttc tta aag aga aat gga gtg aat gaa gag gtt ata gct aca ata         912
Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

ttt aag gaa aat ccg aaa aag ttc ttc agc                                 942
Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 11
<211> 314
<212> PRT
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 11

```
Met Arg Ile Pro Leu Val Gly Lys Asp Ser Ile Glu Ser Lys Asp Ile
1               5                   10                  15

Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Ala Ala
            20                  25                  30
```

```
Arg Gln Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Phe Arg Asn
        35                  40                  45

Ala Val Asn Glu Val Lys Arg Ala Met Gln Phe Gly Val Lys Thr Ile
    50                  55                  60

Val Asp Val Ser Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Met Glu
65                  70                  75                  80

Lys Val Val Lys Ala Thr Gly Ile Asn Leu Val Ala Gly Thr Gly Ile
                85                  90                  95

Trp Ile Phe Ile Asp Leu Pro Phe Tyr Phe Leu Asn Arg Ser Ile Asp
            100                 105                 110

Glu Ile Ala Asp Leu Phe Ile His Asp Ile Lys Glu Gly Ile Gln Gly
        115                 120                 125

Thr Leu Asn Lys Ala Gly Phe Val Lys Ile Ala Ala Thr Glu Pro Gly
    130                 135                 140

Ile Thr Lys Asp Val Glu Lys Val Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala Asn
145                 150                 155                 160

Lys Glu Thr Lys Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn Asn
                165                 170                 175

Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Thr Glu Glu Gly Val Asp Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Ile Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Ile Asp Tyr
        195                 200                 205

Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Ile Gly Leu Asp His Tyr
    210                 215                 220

Pro His Asp Leu Ser Leu Pro Val Asp Lys Arg Asn Glu Thr Thr Leu
225                 230                 235                 240

Arg Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Ser Asp Lys Ile Met Ile Ser His Asp
                245                 250                 255

Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Ala Gly Thr Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Pro
            260                 265                 270

Lys Leu Ala Pro Arg Ile Ser Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asp Thr Ile
        275                 280                 285

Pro Phe Leu Lys Arg Asn Gly Val Asn Glu Glu Val Ile Ala Thr Ile
    290                 295                 300

Phe Lys Glu Asn Pro Lys Lys Phe Phe Ser
305                 310
```

<210> 12
<211> 945
<212> ADN
<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(945)

<400> 12

```
atg aca aaa att cct ctt gta gga aaa ggt gaa ata tca cct gga gaa        48
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

atg ggt ttt act tta ata cat gag cat tta agg gtc ttc agt gaa cca        96
Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

gtt aga tat caa tgg cca cat ctt tat aat gaa gat gag gag tta aaa       144
Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

aat gca gta aat gaa gta aag aca ata atg tca tat ggt gtt aag acc       192
Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

atc gtg gat ccc act gtc atg ggt tta ggg aga gac att aga ttc agt       240
Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

gag aag gtc gtg aaa gaa aca ggt ata aat gtg att gca gca acg ggg       288
Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

ttg tgg act ttt act gat tta cct ttc ttc ttc aat gga aga tca ttg       336
Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

gaa gag att gca gaa tta tta ata cat gat ata aaa aag gga ata caa       384
Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

ggg aca aat aat aga gca ggc ttc att aag gtt gca gca gat gag cca       432
Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Asp Glu Pro
    130                 135                 140

ggt ata acg agg gat gta gag agg gca ata agg gca gct gct ata gct       480
Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

cag aag gag act aac gta ccc ata ata aca cat tca aat gct cat aac       528
Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

ggg aca ggt ctt gag caa caa agg att cta atg gag gag ggt gta gac       576
Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

cca ggg aga gtg cta ata ggt cac ttg ggg gac act gat aac gtg gat       624
Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

tac ata aag aag ata gcc gat aaa ggc tcg ttt gta ggt cta gat cat       672
Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

tac ggt cta gat cta ttc tta cct ata gat aaa agg aac gag gtg ttg       720
Tyr Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

ttg aaa tta att aaa gat gga tac ttg gac agg att atg gtg tca caa       768
Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

gat tac tta tgc aca att gac tgg ggg ata gca aag ccg gag tac aaa       816
Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

cct aaa cta gct cca aaa tgg agt atg agt tta ata ttt aca gac gtt       864
Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

ata ccc tca att aag aga gca gga gta act gat gag cag ttg cat gta       912
Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

atc ttc gta aag aat cca gct aga cta ttt agt                           945
Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 13

<211> 315

<212> PRT

<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<400> 13

```
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Val Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Leu Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Asp Glu Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

Tyr Gly Leu Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 14
<211> 945
<212> ADN
<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(945)

<400> 14

```
atg aca aaa att cct ctt gta gga aaa ggt gaa ata tca cct gga gaa          48
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

atg ggt ttt act tta ata cat gag cat tta agg gca ttc agt gaa cca          96
Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

gtt aga tat caa tgg cca cat ctt tat aat gaa gat gag gag tta aaa         144
Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

aat gca gta aat gaa gta aag aca ata atg tca tat ggt gtt aag acc         192
Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

atc gtg gat ccc act gtc atg ggt atc ggg aga gac att aga ttc agt         240
Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

gag aag gtc gtg aaa gaa aca ggt ata aat gtg att gca gca acg ggg         288
Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

ttg tgg act ttt act gat tta cct ttc ttc ttc aat gga aga tca ttg         336
Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

gaa gag att gca gaa tta tta ata cat gat ata aaa aag gga ata caa         384
Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

ggg aca aat aat aga gca ggc ttc att aag gtt gca gca aca gag cca         432
Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Thr Glu Pro
    130                 135                 140

ggt ata acg agg gat gta gag agg gca ata agg gca gct gct ata gct         480
Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

cag aag gag act aac gta ccc ata ata aca cat tca aat gct cat aac         528
Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

ggg aca ggt ctt gag caa caa agg att cta atg gag gag ggt gta gac         576
Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

cca ggg aga gtg cta ata ggt cac ttg ggg gac act gat aac gtg gat         624
Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

tac ata aag aag ata gcc gat aaa ggc tcg ttt gta ggt cta gat cat         672
Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

tac cca cat gat cta ttc tta cct ata gat aaa agg aac gag gtg ttg         720
Tyr Pro His Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

ttg aaa tta att aaa gat gga tac ttg gac agg att atg gtg tca caa         768
Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

gat tac tta tgc aca att gac tgg ggg ata gca aag ccg gag tac aaa         816
Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

cct aaa cta gct cca aaa tgg agt atg agt tta ata ttt aca gac gtt         864
Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

ata ccc tca att aag aga gca gga gta act gat gag cag ttg cat gta         912
Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

atc ttc gta aag aat cca gct aga cta ttt agt                             945
Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 15

<211> 315

<212> PRT

<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<400> 15

```
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

Ile Val Asp Pro Thr Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Thr Glu Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

Tyr Pro His Asp Leu Phe Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255
 Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Trp Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

 Pro Lys Leu Ala Pro Lys Trp Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

 Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

 Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 16
<211> 945
<212> ADN
<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(945)

<400> 16

```
atg aca aaa att cct ctt gta gga aaa ggt gaa ata tca cct gga gaa          48
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

atg ggt ttt act tta ata cat gag cat tta agg gca ttc agt gaa cca          96
Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

gtt aga tat caa tgg cca cat ctt tat aat gaa gat gag gag tta aaa         144
Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

aat gca gta aat gaa gta aag aca ata atg tca tat ggt gtt aag acc         192
Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

atc gtg gat gta tca gtc atg ggt atc ggg aga gac att aga ttc agt         240
Ile Val Asp Val Ser Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

gag aag gtc gtg aaa gaa aca ggt ata aat gtg att gca gca acg ggg         288
Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

ttg tgg act ttt act gat tta cct ttc ttc ttc aat gga aga tca ttg         336
Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

gaa gag att gca gaa tta tta ata cat gat ata aaa aag gga ata caa         384
Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

ggg aca aat aat aga gca ggc ttc att aag gtt gca gca aca gag cca         432
Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Thr Glu Pro
    130                 135                 140

ggt ata acg agg gat gta gag agg gca ata agg gca gct gct ata gct         480
Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

cag aag gag act aac gta ccc ata ata aca cat tca aat gct cat aac         528
Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

ggg aca ggt ctt gag caa caa agg att cta atg gag gag ggt gta gac         576
Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

cca ggg aga gtg cta ata ggt cac ttg ggg gac act gat aac gtg gat         624
Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

tac ata aag aag ata gcc gat aaa ggc tcg ttt gta ggt cta gat cat         672
Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

tac cca cat gat cta tca tta cct ata gat aaa agg aac gag gtg ttg         720
Tyr Pro His Asp Leu Ser Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

ttg aaa tta att aaa gat gga tac ttg gac agg att atg gtg tca caa         768
Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

gat tac tta tgc aca att gac gca ggg ata gca aag ccg gag tac aaa         816
Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Ala Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

cct aaa cta gct cca aaa att agt atg agt tta ata ttt aca gac gtt         864
Pro Lys Leu Ala Pro Lys Ile Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

ata ccc tca att aag aga gca gga gta act gat gag cag ttg cat gta         912
Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

atc ttc gta aag aat cca gct aga cta ttt agt                             945
Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 17

<211> 315

<212> PRT

<213> *Sulfolobus acidocaldarius*

<400> 17

```
Met Thr Lys Ile Pro Leu Val Gly Lys Gly Glu Ile Ser Pro Gly Glu
1               5                  10                  15

Met Gly Phe Thr Leu Ile His Glu His Leu Arg Ala Phe Ser Glu Pro
            20                  25                  30

Val Arg Tyr Gln Trp Pro His Leu Tyr Asn Glu Asp Glu Glu Leu Lys
        35                  40                  45

Asn Ala Val Asn Glu Val Lys Thr Ile Met Ser Tyr Gly Val Lys Thr
    50                  55                  60

Ile Val Asp Val Ser Val Met Gly Ile Gly Arg Asp Ile Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80

Glu Lys Val Val Lys Glu Thr Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala Thr Gly
                85                  90                  95

Leu Trp Thr Phe Thr Asp Leu Pro Phe Phe Phe Asn Gly Arg Ser Leu
            100                 105                 110

Glu Glu Ile Ala Glu Leu Leu Ile His Asp Ile Lys Lys Gly Ile Gln
        115                 120                 125

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Gly Phe Ile Lys Val Ala Ala Thr Glu Pro
    130                 135                 140

Gly Ile Thr Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Arg Ala Ala Ala Ile Ala
145                 150                 155                 160

Gln Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ile Thr His Ser Asn Ala His Asn
                165                 170                 175

Gly Thr Gly Leu Glu Gln Gln Arg Ile Leu Met Glu Glu Gly Val Asp
            180                 185                 190

Pro Gly Arg Val Leu Ile Gly His Leu Gly Asp Thr Asp Asn Val Asp
        195                 200                 205

Tyr Ile Lys Lys Ile Ala Asp Lys Gly Ser Phe Val Gly Leu Asp His
    210                 215                 220

Tyr Pro His Asp Leu Ser Leu Pro Ile Asp Lys Arg Asn Glu Val Leu
225                 230                 235                 240

Leu Lys Leu Ile Lys Asp Gly Tyr Leu Asp Arg Ile Met Val Ser Gln
                245                 250                 255

Asp Tyr Leu Cys Thr Ile Asp Ala Gly Ile Ala Lys Pro Glu Tyr Lys
            260                 265                 270

Pro Lys Leu Ala Pro Lys Ile Ser Met Ser Leu Ile Phe Thr Asp Val
        275                 280                 285

Ile Pro Ser Ile Lys Arg Ala Gly Val Thr Asp Glu Gln Leu His Val
    290                 295                 300

Ile Phe Val Lys Asn Pro Ala Arg Leu Phe Ser
305                 310                 315
```

<210> 18
<211> 102
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 18
gatatacata tgagaatacc attagttggg aaagattcaa tagaatctaa ggacatagga 60
tttacgctaa ttcatgaaca tttaagagct tttagcgaag cg 102

<210> 19
<211> 92
<212> ADN
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 19
aacctcattt acagcgtttc tgaactcctc atcttcgtta tatagatggg ccattgttgt 60
ctgaccgctt cgctaaaagc tcttaaatgt tc 92

<210> 20
<211> 93
<212> ADN
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 20
gagttcagaa acgctgtaaa tgaggttaaa agggcaatgc aatttggagt aaagactata 60
gtagatgtct ctgtaatggg aattggtagg gac 93

<210> 21
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 21
cgtccccgca actaaattta tcccggtagc cttaaccact ttttccataa atctgatgtc 60
cctaccaatt cccattacag agacatctac tat 93

<210> 22
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 22
accgggataa atttagttgc ggggacgggg atttggatat ttatcgactt acctttctat 60
ttcttaaata ggtcaattga tgagatagct gac 93

<210> 23
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 23
tatctttacg aagccagctt tattgagagt accttgtatt ccctctttta tatcatgaat 60
aaacaagtca gctatctcat caattgacct att 93

<210> 24
<211> 93
<212> ADN
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 24
ctcaataaag ctggcttcgt aaagatagct gcaactgaac ctgggatcac aaaggatgtg 60
gagaaggtaa taagggctgc tgccatagca aac 93

<210> 25
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 25
ttgctgttct aatccggtgt tattgtgagc gttagagtgg gtaattattg gtactttagt 60
ctctttgttt gctatggcag cagcccttat tac 93

<210> 26
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 26
cacaataaca ccggattaga acagcaaaga atattgactg aagaaggtgt tgatccaggg 60
aaaatattaa taggtcattt aggtgataca gat 93

<210> 27
<211> 90
<212> ADN
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 27
aggaaaatga tctaatccaa taaaggatcc cttatctgct atcttcttta tgtaatctat 60
attatctgta tcacctaaat gacctattaa 90

<210> 28
<211> 99
<212> ADN
<213> *sulfolobus solfataricus*

<400> 28
tcctttattg gattagatca ttttcctcat gatttatccc tacctgttga taagagaaat 60
gaaacgacct taagactaat caaagatggt tattcagat 99

<210> 29
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 29
tttatattct ggttttgcag ttccagcgtc gaatgtgcat aaataatcgt gagagatcat 60
tatcttatct gaataaccat ctttgattag tct 93

<210> 30
<211> 93
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*
gctggaactg caaaaccaga atataaacct aagcttgctc caagaattag tataactcta 60
atatttgagg atacgatacc gttcttaaag aga 93

<210> 31
<211> 109
<212> ADN
<213> *Sulfolobus solfataricus*

<400> 31
caacccgaat tcttagctga agaacttttt cggattttcc ttaaatattg tagctataac 60
ctcttcattc attcactcca tttctcttta agaacggtat cgtatcctc 109

REIVINDICACIONES

1. Fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa derivadas de las PTE hipertermófilas que responden a la secuencia consenso SEC ID nº 1, y que comprenden una por lo menos de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
sustitución de la arginina R en la posición 224,
sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID nº 1 por cualquier otro aminoácido natural o no,

poseyendo dichas fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas mutadas una actividad lactonasa cuya actividad es superior a la de las fosfotriesterasas (PTE) hipertermófilas no mutadas de las cuales se derivan.

2. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 1, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3, o de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, perteneciendo dichas secuencias SEC ID nº 3 y SEC ID nº 5 a la secuencia consenso SEC ID nº 1, faltando en la SEC ID nº 3 el aminoácido en posición 2 en la SEC ID nº 1.

3. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 1 o 2, que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
sustitución de la arginina R en la posición 224,
sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID nº 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

4. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque comprenden asimismo una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28,
sustitución de la prolina P en la posición 68,
sustitución de la treonina T en la posición 69,
sustitución de la leucina L en la posición 73,
sustitución del aspartato D en la posición 142,
sustitución de la glicina G en la posición 226,
sustitución de la leucina L en la posición 227,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
sustitución del triptófano W en la posición 264,
sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

5. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28,
sustitución de la leucina L en la posición 73,
sustitución del aspartato D en la posición 142,
sustitución de la glicina G en la posición 226,
sustitución de la leucina L en la posición 227,

de la SEC ID nº 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

6. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la prolina P en la posición 68,
sustitución de la treonina T en la posición 69,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
sustitución del triptófano W en la posición 264,

sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 1 por cualquier otro aminoácido natural o no.

7. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 4, derivadas de las PTE hipertermófilas que responden a la secuencia consenso SEC ID nº 1, caracterizadas porque comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
sustitución de La arginina R en la posición 224 por una histidina H,
sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

8. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 7, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3, y que comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 97,
sustitución de la tirosina Y en la posición 99,
sustitución de la arginina R en la posición 223,
sustitución de la cisteína C en la posición 258,

de la SEC ID nº 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

9. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 8, que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 97,
sustitución de la tirosina Y en la posición 99,
sustitución de la arginina R en la posición 223,
sustitución de la cisteína C en la posición 258,

de la SEC ID nº 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

10. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 8 o 9, caracterizadas porque comprenden asimismo una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 27,
sustitución de la prolina P en la posición 67,
sustitución de la treonina T en la posición 68,
sustitución de la leucina L en la posición 72,
sustitución del aspartato D en la posición 141,
sustitución de la glicina G en la posición 225,
sustitución de la leucina L en la posición 226,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 229,
sustitución del triptófano W en la posición 263,
sustitución del triptófano W en la posición 278,

de la SEC ID nº 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

11. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 27,
sustitución de la leucina L en la posición 72,
sustitución del aspartato D en la posición 141,
sustitución de la glicina G en la posición 225,
sustitución de la leucina L en la posición 226,

de SEC ID nº 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

12. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la prolina P en la posición 67,
sustitución de la treonina T en la posición 68,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 229,
sustitución del triptófano W en la posición 263,
sustitución del triptófano W en la posición 278,

de la SEC ID nº 3 por cualquier otro aminoácido natural o no.

13. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizadas porque comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 97 por un triptófano W,
sustitución de la tirosina Y en la posición 99 por una fenilalanina F,
sustitución de la arginina R en la posición 223 por una histidina H,
sustitución de la cisteína C en la posición 258 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 27 por una alanina A,
sustitución de la prolina P en la posición 67 por una valina V,
sustitución de la treonina T en la posición 68 por una serina S,
sustitución de la leucina L en la posición 72 por una isoleucina I,
sustitución del aspartato D en la posición 141 por una treonina T,
sustitución de la glicina G en la posición 225 por una prolina P,
sustitución de la leucina L en la posición 226 por una histidina H,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 229 por una serina S,
sustitución del triptófano W en la posición 263 por una alanina A,
sustitución del triptófano W en la posición 278 por una isoleucina I.

14. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 8 a 13, caracterizadas porque corresponden a las secuencias siguientes:

SEC ID nº 7 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 3 que comprende las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 97 por un triptófano W,
sustitución de la tirosina Y en la posición 99 por una fenilalanina F,
sustitución de la arginina R en la posición 223 por una histidina H,
sustitución de la cisteína C en la posición 258 por una leucina L,

SEC ID nº 9 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 7 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 27 por una alanina A,
sustitución de la leucina L en la posición 72 por una isoleucina I,
sustitución del aspartato D en la posición 141 por una treonina T,
sustitución de la glicina G en la posición 225 por una prolina P,
sustitución de la leucina L en la posición 226 por una histidina H,

SEC ID nº 11 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 9 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la prolina P en la posición 67 por una valina V,
sustitución de la treonina T en la posición 68 por una serina S,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 229 por una serina S,
sustitución del triptófano W en la posición 263 por una alanina A,

sustitución del triptófano W en la posición 278 por una isoleucina I.

15. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 8 a 14, caracterizadas porque comprenden por lo menos una mutación que corresponde a la sustitución de por lo menos uno de los aminoácidos de los pares de aminoácidos siguientes, cuyas posiciones en la SEC ID nº 3 están indicadas a continuación por otro aminoácido natural o no: 2R/314S, 14K/12E, 26R/75D, 26R/42E, 33R/42E, 33R/45E, 55R/52E, 55R/285E, 74R/121D, 81K/42E, 81K/43D, 84K/80E, 109R/113E, 123K/162E, 147K/148D, 151K/148D, 154R/150E, 154R/187E, 154R/188E, 161K/188E, 183R/150E, 183R/187E, 183R/180E, 210K/245D, 215K/214D, 223R/256D, 223R/202D, 234K/204D, 235R/202D, 241R/245D, 245D/244K, 250K/249D, 277R/286D, 292K/298E, 310K/307E.

16. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 7, derivadas de la PTE hipertermófila de *Sulfolobus acidocaldarius* que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5, y que comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
sustitución de la arginina R en la posición 224,
sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

17. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 16, que comprenden por lo menos las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100,
sustitución de la arginina R en la posición 224,
sustitución de la cisteína C en la posición 259,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

18. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 16 o 17, caracterizadas porque comprenden asimismo una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28,
sustitución de la prolina P en la posición 68,
sustitución de la treonina T en la posición 69,
sustitución de la leucina L en la posición 73,
sustitución del aspartato D en la posición 142,
sustitución de la glicina G en la posición 226,
sustitución de la leucina L en la posición 227,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
sustitución del triptófano W en la posición 264,
sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

19. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 16 a 18, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28,
sustitución de la leucina L en la posición 73,
sustitución del aspartato D en la posición 142,
sustitución de la glicina G en la posición 226,
sustitución de la leucina L en la posición 227,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

20. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizadas porque comprenden las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la prolina P en la posición 68,
sustitución de la treonina T en la posición 69,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230,
sustitución del triptófano W en la posición 264,

sustitución del triptófano W en la posición 279,

de la SEC ID nº 5 por cualquier otro aminoácido natural o no.

21. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizadas porque comprenden por lo menos una de las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
sustitución de la arginina R en la posición 224 por una histidina H,
sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

y, llegado el caso, una por lo menos de las mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

22. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 16 a 21, caracterizadas porque corresponden a las secuencias siguientes:

SEC ID nº 13 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 5 que comprende las cuatro mutaciones siguientes:

sustitución de la tirosina Y en la posición 98 por un triptófano W,
sustitución de la tirosina Y en la posición 100 por una fenilalanina F,
sustitución de la arginina R en la posición 224 por una histidina H,
sustitución de la cisteína C en la posición 259 por una leucina L,

SEC ID nº 15 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 13 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la valina V en la posición 28 por una alanina A,
sustitución de la leucina L en la posición 73 por una isoleucina I,
sustitución del aspartato D en la posición 142 por una treonina T,
sustitución de la glicina G en la posición 226 por una prolina P,
sustitución de la leucina L en la posición 227 por una histidina H,

SEC ID nº 17 que corresponde a la secuencia SEC ID nº 15 que comprende además las cinco mutaciones siguientes:

sustitución de la prolina P en la posición 68 por una valina V,
sustitución de la treonina T en la posición 69 por una serina S,
sustitución de la fenilalanina F en la posición 230 por una serina S,
sustitución del triptófano W en la posición 264 por una alanina A,
sustitución del triptófano W en la posición 279 por una isoleucina I.

23. Fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en las que por lo menos uno de los aminoácidos implicados en los puentes salinos está mutado por adición, sustitución o deleción de tal manera que la temperatura de activación de dichas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa disminuya con respecto a la temperatura de activación de las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa en las que los aminoácidos implicados en los puentes salinos no están mutados.

24. Secuencias nucleotídicas que codifican para las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23.

25. Vectores, en particular plásmidos, que contienen unas secuencias nucleotídicas que codifican para las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en la reivindicación 24.

26. Células hospedantes, en particular, bacterias, transformadas con la ayuda de un vector tal como se define en la reivindicación 25, con la condición de que las células hospedantes no sean unas células cepas embrionarias humanas.

27. Células hospedantes, en particular bacterias, acopladas a las fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23, o que presentan unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23, injertadas en su superficie, con la condición de que las células hospedantes no sean unas células cepas embrionarias humanas.

28. Organismos transgénicos, en particular mamíferos, transformados con la ayuda de un vector tal como se ha definido en la reivindicación 25, siendo dichos organismos transgénicos resistentes a los patógenos, con la condición de que los organismos transgénicos no sean seres humanos.

29. Utilización de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 23, o de células hospedantes según la reivindicación 26 o 27,

como bio-depuradores en el marco de la descontaminación de las superficies de los materiales, contaminados por unos compuestos organofosforados, o bacterias,

o para la preparación de medicamentos en el marco de la descontaminación de la piel, o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o bacterias, o en el marco de la preparación de medicamentos utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una contaminación externa o de una intoxicación interna por ingestión o inhalación de compuestos organofosforados,

o en el marco de la preparación de medicamentos utilizables en el marco de la prevención o del tratamiento de una infección bacteriana,

o en el marco de la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados

o en el marco de la destrucción de los almacenes de neurotóxicos.

30. Materiales impregnados de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 23, en forma líquida o sólida, tales como guantes, ropa diversa, toallitas húmedas, espumas pulverizables.

31. Kits para la descontaminación de las superficies de materiales, de la piel, o de las mucosas, contaminados por unos compuestos organofosforados, o para la descontaminación de las aguas contaminadas por unos compuestos organofosforados, caracterizados porque comprenden unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23, o unos materiales impregnados de fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según la reivindicación 29.

32. Captadores de los compuestos organofosforados que comprenden unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23.

33. Cartuchos de descontaminación externa, en cuyo interior están injertadas unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa tales como se han definido en una de las reivindicaciones 1 a 23.

34. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende unas fosfotriesterasas hipertermófilas mutadas que poseen una actividad lactonasa según una de las reivindicaciones 1 a 23, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35. Composición farmacéutica según la reivindicación 34, caracterizada porque se presenta en una forma administrable por vía inyectable, en particular en solución o encapsidadas o pegiladas, o por vía tópica, en particular en forma de pomada, aerosol o toallita húmeda.

36. Utilización de materiales impregnados según la reivindicación 29, o de cartuchos de descontaminación externas según la reivindicación 32, para la preparación de medicamentos antisépticos para la descontaminación de la infección bacteriana de superficie.

37. Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 33 o 34, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de las infecciones bacterianas, en particular en la sangre.