



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Tesis de Doctorado

**Caracterización funcional de acil-lípido desaturasas de
Bacillus sp. Determinantes estructurales de la
especificidad de sustrato y dadores electrónicos**

Presentada por Lic. Lorena Chazarreta Cifré

Rosario, Argentina

2016

*Caracterización funcional de acil-lípido
desaturasas de Bacillus sp. Determinantes
estructurales de la especificidad de sustrato y
dadores electrónicos*

Lorena Chazarreta Cifré
Licenciada en Biotecnología
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Microbiología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario IBR-CONICET, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 1 de marzo de 2016, bajo la dirección de la Dra. Silvia Altabe.

Nombres y firmas del Director y de los integrantes del Jurado de Tesis:

Dra. Silvia Altabe. Directora.....
Dr. Mauricio G. Martín. Miembro del Jurado.....
Dra. Angeles Zorreguieta. Miembro del Jurado.....
Dra. María F. Drincovich. Miembro del Jurado.....
Defendida:



...a iñakí y arantza

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Altabe por dirigirme en este trabajo de Tesis. Gracias por compartir su experiencia, por sus consejos y predisposición para discutir resultados y experimentos, por ayudarme en todo lo que necesitaba. Gracias por ser mucho más que mi directora.

Al Dr. Diego de Mendoza, por aceptarme en su excelente grupo de investigación, por contribuir a mi formación científica y por compartir su experiencia.

A todos los investigadores del laboratorio, Cecilia, Daniela, Larisa y Gustavo por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A mis compañeros y amigos del lab: a los “viejos”, Mariano, Vero, Geor, Naka, Mariana, Euge, Naty, Diego, Emi, Pupi y muy especialmente a Lupo que además de trabajar juntas me acompaña en la tarea más hermosa. Y a los “nuevos”, Caro, Agos, Dani, Fede, Lala, Pili, Celi, Tonga, Paula, por traer risas y diversión a las horas de trabajo.

A toda la gente de administración del IBR, Marta, Elba, Santi C, Felipe, Noe, Santi G, Ciro, Lelia, Melisa, Cecilia y Jimena por estar siempre dispuestos a ayudar y agilizar todos los trámites.

A todo el personal de técnico del IBR, Alejandro, Luciano, Mónica, Vivi, Ine, Lilo, Clau y Sil, sin quienes no podríamos realizar nuestro trabajo.

A todos los integrantes del Área Biología, por haberme permitido ejercer mi otra gran pasión, la docencia y por haberme dado la posibilidad de conocer tanta gente estupenda.

A los amigos que me regaló la Facultad: Pao, Meli, Nico, Pablito, Germán, Sofi, Yiya y Dani. Algunos desperdigados por el mundo pero con el sentimiento tan a flor de piel como siempre. So y Yiya gracias por haber sido los pilares de mi carrera y seguir siendo las amigas que son. Dani gracias por darme la segunda oportunidad, sos una persona hermosa, te adoro!

A mis amigas de siempre, Clau y Ana. Clau, siempre estás, gracias! Negra no hace falta que te diga que sos la hermana que pude elegir, te quiero con el alma!

A la banda de “las chichis”, gracias chicas por tantas alegrías compartidas!

A mi familia!! Ushi, Ale, Wal, Marce, Naty, Chiari, Jose, Ryta, Mechi, Angie, Eli y la heredada de mi marido. A todos mis tíos, primos y sobrinos! Cada uno con sus cosas hacen de mi vida algo genial!

A mi hermana Maira, la pediatra de la familia, porque es lo más, lo más dispuesto, lo más alegre, lo más cariñoso, lo más brillante, lo más lento! Gracias además por estar siempre que te necesitan los chicos.

A mi papá y a mi mamá porque sin ellos no hubiera llegado ni a mitad de camino. Les debo todo. Gordo sos incondicional, te amo. Y gracias a mi ángel por guiarme siempre.

A mi esposo, Rubén. Sos ese compañero que se elige para toda la vida. Gracias por llenármela de amor y alegría. Gracias por tenerme la paciencia que me tenés. Pero gracias sobre todo por darme la familia que me diste. Son lo más importante de mi vida. Vos y esos dos personajes que Dios nos mandó en una prueba de fuego, Arantza e Iñaki, prueba que día a día vamos superando juntos. Y en ese camino, lleno de alegrías y sustos vamos descubriendo lo más maravilloso de la vida que es el amor hacia los hijos.

A Iñaki y Arantza por llegar para cambiar mi vida para siempre. Mi mundo gira en torno a ustedes. Nunca pierdan esa sonrisa que me ilumina el alma!

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

PUBLICACIONES

- Chazarreta-Cifre, L.; Martiarena, L.; de Mendoza, D. and Altabe, S. (2011). “Role of Ferredoxin and Flavodoxins in *Bacillus subtilis* Fatty Acid Desaturation”. *Journal of Bacteriology*. 193(16):4043-8.
- Chazarreta-Cifré, L., Alemany, M., de Mendoza, D. and Altabe, S (2013). “Exploring the Unsaturated Fatty Acids Biosynthesis in *Bacillus cereus* ATCC 14579: Functional Characterization of Novel Acyl-Lipid Desaturases”. *Applied and environmental microbiology*. 79(20):6271-9.

REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2013. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* acyl lipid desaturase mutants. IX Congreso Argentino de Microbiología General.
- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2012. Isolation and characterization of an acyl lipid desaturase mutant of *Bacillus cereus* ATCC 14579. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.
- **Chazarreta Cifré L., Martiarena L., de Mendoza D., Altabe S.** 2011. Rol de la ferredoxina y flavodoxinas en la desaturación de ácidos grasos en *Bacillus subtilis*. V Jornada de Ciencia y Tecnología.
- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2011. Functional characterization of *Bacillus cereus* acyl-lipid desaturases. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.
- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2010. Regulation of unsaturated fatty acids biosynthesis by growth temperature in *Bacillus*. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.

- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2008. Electron donors for the Δ^5 -acyl-lipid desaturase in *Bacillus subtilis*?. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.
- **Chazarreta Cifré L., de Mendoza D., Altabe S.** 2008. Caracterización del sistema dador de electrones de la Δ^5 acil-lípido desaturasa de *B. subtilis*. Jornadas de lípidos.

Índice

INDICE	i
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
1 – Las membranas biológicas: estructura y función	5
1.1 – Fluidez de las membranas y adaptación a bajas temperaturas	6
1.2 – Síntesis de ácidos grasos	7
1.2.1 – Síntesis de ácidos grasos ramificados	8
1.2.2 – Síntesis de ácidos grasos insaturados	9
1.3 – Las desaturasas	12
1.3.1 – Clasificación de las desaturasas	13
1.3.2 – Dadores de electrones	15
1.3.3 – Regioselectividad de las desaturasas	16
1.3.4 – Mecanismo propuesto de desaturación	17
2 – Desaturasas bacterianas	18
2.1 – Desaturasas de cianobacterias	18
2.2 – Desaturasas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.3 – Desaturasas de micobacterias	20
2.4 – Desaturasas del género <i>Bacillus</i>	21
2.4.1 – La desaturasa de <i>Bacillus subtilis</i>	23
2.4.1.1 – La vía Des de <i>Bacillus subtilis</i>	25
3 – <i>Bacillus licheniformis</i>	27
4 – Grupo <i>Bacillus cereus</i>	28
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y METODOS	33
1 – Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos	33
1.1 – Cepas bacterianas	33
1.2 – Plásmidos	34
1.3 – Oligonucleótidos	36
2 – Medios y condiciones de cultivo	37
3 – Curvas de crecimiento	40
4 – Técnicas de biología molecular	41
4.1 – Extracción de Ácidos Nucleicos	41

4.1.1 – Extracción de ADN cromosomal	41
4.1.2 – Obtención de ADN plasmídico	41
4.1.3 – Obtención de ARN total	41
4.2 – Reacción en cadena de la ADN polimerasa	42
4.3 – Electroforesis en geles de agarosa	42
4.4 – Tratamiento con enzimas de restricción, fragmento Klenow y ligación de ADN	43
4.5 – Secuenciación de nucleótidos	43
4.6 – Transformación de células competentes	43
4.6.1 – Transformación de <i>B. subtilis</i>	43
4.6.2 – Transformación de <i>E. coli</i>	44
4.6.3 – Transformación de <i>B. cereus</i>	44
5 – Construcción de plásmidos y cepas de <i>B. subtilis</i>	45
5.1 – Fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i>	45
5.2 – Construcción de las cepas de <i>B. subtilis</i> que expresan las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	46
5.3 – Construcción de cepas deficientes en los dadores de electrones	47
5.4 – Construcción de las cepas LSC16, LSC17 y LSC18 de <i>B. subtilis</i>	47
6 – Construcción de plásmidos y cepas de <i>B. cereus</i>	48
6.1 – Interrupción de los genes que codifican las desaturasas	48
6.2 – Complementación de las cepas mutantes	50
7 – Ensayos de actividad enzimática	51
7.1 – Determinación de actividad β -galactosidasa en <i>B. subtilis</i>	51
7.2 – Ensayo de actividad α -amilasa	51
8 – Análisis de lípidos	52
8.1 – Crecimiento y marcación de cultivos con precursores radioactivos	52
8.2 – Extracción de lípidos	53
8.3 – Preparación de metil ésteres de ácidos grasos	53
8.4 – Preparación de aductos dimetildisulfuro	53
8.5 – Separación de fracciones lipídicas	54
8.5.1 – Cromatografía en capa delgada (TLC)	54
8.5.2 – Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	54

9 – Identificación del sitio de inicio de la transcripción por medio de 5' RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)	54
10 – Cuantificación de ARNm mediante qRT-PCR en tiempo real	56
RESULTADOS	58
CAPITULO I: Caracterización funcional de las desaturasas del género <i>Bacillus</i>.	58
1.1 – Caracterización de cepas del género <i>Bacillus</i>	59
1.1.1 – Determinación de las condiciones de cultivo de las cepas del género <i>Bacillus</i>	59
1.1.2 – Síntesis de ácidos grasos en las cepas del género <i>Bacillus</i>	62
1.1.2.1 – Marcación de ácidos grasos con precursores radioactivos	62
1.1.2.2 – Análisis por GC-MS de los MEAGs en cepas de <i>Bacillus</i>	63
1.2 – Biosíntesis de ácidos grasos en <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i> y su relación con la temperatura de crecimiento	69
1.3 – Caracterización de las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	73
1.3.1 – Identificación de genes putativos de acil lípido desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	73
1.3.2 – Clonado y caracterización de los genes de las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	75
1.4 – Determinación de los sustratos de las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B.</i> <i>licheniformis</i>	79
1.5 – Estudio del sistema de transporte de electrones de las desaturasas de <i>B.</i> <i>cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	82
Discusión Capítulo I	87
CAPITULO II: Estudio de la esencialidad de los genes de las desaturasas de <i>Bacillus cereus</i>.	92
2.1 – Construcción de cepas mutantes de <i>B. cereus</i> en los genes <i>desA</i> y <i>desB</i>	92
2.2 – Caracterización fenotípica de la cepa LCER2983 en diferentes condiciones de cultivo	94
2.2.1 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER2983 en diferentes condiciones de cultivo	94
2.2.2 – Síntesis de ácidos grasos en la cepa LCER2983	95
2.3 – Caracterización fenotípica de la cepa LCER0400 en diferentes condiciones	97

de cultivo	
2.3.1 - Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio rico y medio mínimo	97
2.3.2 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con oleato	98
2.3.3 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con aminoácidos	98
2.3.3.1 – Síntesis de ácidos grasos en la cepa LCER0400 cultivada con isoleucina	103
2.3.4 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con oleato y aminoácidos	105
2.3.4.1 - Síntesis de ácidos grasos en la cepas LCER0400 y LCER2904 cultivadas con oleato y aminoácidos	106
2.4 – Complementación de las cepas mutantes	108
Discusión Capítulo II	112
CAPITULO III: Control termal de la expresión de los genes de las desaturasas de <i>Bacillus cereus</i> y <i>Bacillus licheniformis</i>.	116
3.1 – Caracterización de la síntesis de ácidos grasos insaturados en cepas de <i>B. subtilis</i> que expresan las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	116
3.2 – Determinación del sitio de iniciación de la transcripción de los genes <i>desA</i> , <i>desB</i> y <i>desL</i>	119
3.3 – Control por temperatura de la expresión de los genes <i>des</i>	122
3.3.1 – Estudio de la expresión de las desaturasas de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i> en cepas de <i>B. subtilis</i>	122
3.3.2 – Análisis de los niveles del ARNm de los genes <i>des</i> durante la adaptación al frío en <i>B. cereus</i> Y <i>B. licheniformis</i>	130
3.3.2.1 – Análisis de los transcritos de los genes <i>des</i> en cepas salvajes de <i>B. cereus</i> y <i>B. licheniformis</i>	131
3.3.2.2 – Análisis de los transcritos de los genes <i>des</i> en cepas mutantes de <i>B. cereus</i>	133
Discusión Capítulo III	136
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFIA	143

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AA: aminoácido(s).

Ap: casete de resistencia a ampicilina.

ACP: proteína transportadora de acilos.

ADN: ácido dexosirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AG: ácido(s) graso(s).

AGI: ácido(s) graso(s) insaturado(s).

AGPI: ácido(s) graso(s) poliinsaturado(s).

AGR: ácido(s) graso(s) ramificado(s).

AGS: ácido(s) graso(s) saturado(s).

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ATB: antibiótico(s).

°C: grados centígrados.

Cm: casete de resistencia a cloranfenicol.

Da: Dalton.

DMDS: Dimetil disulfuro.

DO: densidad óptica.

Er: casete de resistencia a eritromicina.

Fd: ferredoxina.

FL: fosfolípido(s).

Fld: flavodoxina(s).

GC-MS: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

h: hora(s).

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

Kan: casete de resistencia a kanamicina.

kV: kilovoltio(S).

LB: medio Luria-Bertani.

Ln: casete de resistencia a lincomicina.

MEAG: metil ésteres de ácidos grasos.

min: minuto(s).

μl: microlitro(s).

ml: mililitro(s).

MLS: macrólidos.

MM: medio mínimo.

MM-MIV: medio mínimo suplementado con los aminoácidos metionina, isoleucina y valina.

mseg: milisegundo(s).

nt: nucleótido(s).

pb: pares de bases.

PBS: solución reguladora de pH que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

rbs: sitio de unión del ribosoma.

Rif: Rifampicina.

rpm: revoluciones por minuto.

RT: transcripción reversa.

seg: segundo(s).

Sp: casete de resistencia a espectinomicina.

TE: solución tampón 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA.

TLC: cromatografía en capa delgada.

UM: unidades Miller.

Xil: xilosa.

Uso de palabras en idiomas extranjeros:

de novo: de nuevo, o de cero, o de base. Se utiliza para describir la síntesis de algo utilizando sus componentes básicos.

in silico: hecho por computadora o por medio de simulación computacional.

in vitro: realización de experimentos fuera del organismo vivo.

in vivo: realización de experimentos dentro del organismo vivo.

“Front-end”: tipo de desaturasa que introduce el doble enlace entre uno preexistente y el extremo carboxilo terminal del sustrato.

Lipid Raft: balsas lipídicas.

Resumen

RESUMEN

Los ácidos grasos insaturados (AGI) son componentes esenciales de la membrana celular. Los organismos vivos, en particular los poiquiloterms, responden a una disminución en la temperatura aumentando la proporción de AGI. Este fenómeno ha sido designado con el nombre de adaptación homeoviscosa ¹.

Los AGI son sintetizados por desaturasas, un tipo especial de oxigenasas que tienen la capacidad de remover dos hidrógenos de una cadena hidrocarbonada, especialmente de cadenas de ácidos grasos (AG), catalizando la formación de un doble enlace en el sustrato en forma altamente estéreo-, regio- y quimio- selectiva ². Hasta el momento, no se conocen las bases moleculares que expliquen este grado de sofisticación de estas enzimas. La gran mayoría de las desaturasas se encuentran unidas a membrana, lo que dificulta la obtención de grandes cantidades en forma activa, y por consiguiente el entendimiento de las propiedades particulares de su actividad enzimática. El estudio de desaturasas bacterianas con actividades diferentes, sobre sustratos similares, y estructura primaria similar presenta una oportunidad única para llevar a cabo estudios sobre la relación estructura-función de estas enzimas.

En bacterias Gram positivas la única desaturasa de AG caracterizada es la $\Delta 5$ desaturasa de *Bacillus subtilis* ³. El análisis de la composición lipídica de cepas de *B. subtilis* reveló que esta bacteria sintetiza exclusivamente AGI con el doble enlace en la posición 5 y los estudios complementarios realizados revelaron que esta bacteria posee una única acil lípido desaturasa denominada Des que cataliza la introducción de dobles enlaces en la posición 5 con distintos sustratos, no mostrando preferencia por la longitud de cadena ³. Esta desaturasa se induce a bajas temperaturas y su expresión se encuentra regulada por un sistema de dos componentes, DesK-DesR (DesK/R) ⁴.

Estudios realizados por Fulco ⁵ demostraron que algunas especies de bacilos sintetizaban AGI con el doble enlace en la posición 5, mientras que en otras se encontró un espectro de isómeros de dobles enlaces centrados alrededor de la posición 9 y sobre AG de distinta longitud de cadena ⁶. En *Bacillus licheniformis* 9259 se observaron tanto AGI en la posición 5 como en la posición 10, y se propuso que al menos dos desaturasas distintas estaban involucradas ⁷. Otros grupos observaron que *Bacillus cereus* sintetiza AGI $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 5,10$ ⁸. Esta diversidad de actividades hacen del género *Bacillus* una fuente natural de desaturasas que podría ser utilizada para comprender los mecanismos moleculares que gobiernan la especificidad de sustrato. Además, la gran cantidad y diversidad de AGI

sintetizados por estos organismos los convierten en excelentes modelos para comprender la funcionalidad de las desaturasas y estudiar los mecanismos que regulan su expresión.

Los resultados presentados en este Trabajo de Tesis permitieron contribuir al conocimiento de la función y regulación de las desaturasas de *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis* ATCC 14580.

Se comprobó que *B. licheniformis* posee una única acil lípido desaturasa, DesL que tiene actividad $\Delta 5$. Cuando cultivos de esta bacteria se transfieren de 37°C a 25°C la cantidad de AGI aumenta 2 veces, de 3% a 6%, lo cual sugirió que la expresión o actividad de esta enzima se encuentra regulada por la temperatura de crecimiento. Posteriormente se pudo demostrar que la expresión del gen *desL* se encuentra regulada por un mecanismo similar al descrito previamente en nuestro laboratorio para *B. subtilis*, en el que estaría involucrado un sistema de dos componentes similar a DesK/R.

Se determinó que *B. cereus* posee dos desaturasas denominadas DesA y DesB. Ambas proteínas son acil lípido desaturasas con actividad $\Delta 5$ y $\Delta 10$, respectivamente. Estas dos enzimas son las responsables de sintetizar la gran cantidad de AGI que produce *B. cereus* tanto a 37°C (27%) como a 25°C (45%). Este aumento en la síntesis de AGI al disminuir la temperatura de crecimiento se debería a un incremento en la expresión del gen *desA* y a un aumento en la actividad de DesB, ya que el gen *desB* se expresaría de manera constitutiva.

Estudios fisiológicos realizados con mutantes obtenidas en el gen *desA*, mostraron que esta desaturasa no es esencial para el crecimiento bacteriano en ninguna condición ensayada. Por otro lado la ausencia de DesB inhibe completamente el crecimiento de *B. cereus* en medio mínimo (MM). Este defecto no pudo ser corregido por el agregado de AGI exógenos en este medio debido a que el suplemento en este medio fue insuficiente para corregir la deficiencia de AGI o a los efectos líticos que produce el agregado externo de los mismos al medio de cultivo. La recuperación del crecimiento se logró luego del agregado de aminoácidos (AA) precursores de ácidos grasos ramificados (AGR) al medio de cultivo, o de AA no precursores más AGI exógenos. Esto estaría sugiriendo que es necesaria una combinación de AGR y AGI que provean fluidez a la membrana para permitir el crecimiento. En este sentido se pudo determinar que el agregado de precursores de los AGR, en particular la isoleucina, rescata el crecimiento en forma parcial. Los AGR presentan bajos puntos de fusión al igual que los AGI y permiten fluidificar la membrana en ausencia de los mismos. Esta la primera vez que se describe la esencialidad de una desaturasa para el crecimiento bacteriano en estas condiciones.

Resumen

Finalmente, todos los resultados obtenidos en esta Tesis han contribuido a la caracterización de desaturasas del género *Bacillus* con el fin de comenzar a comprender las bases moleculares que gobiernan el proceso de desaturación. Además la identificación de genes homólogos a *desB*, esencial para el crecimiento de *B. cereus*, en otras especies Gram positivas, incluyendo otros patógenos humanos, indica que la información sobre esta proteína descrita en este trabajo podría ser utilizada para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos.

Introducción

INTRODUCCIÓN

Durante décadas, las bacterias han sido apreciadas como sistemas modelo para el estudio de los principios básicos de la biología molecular. Gran parte de los conocimientos sobre replicación, transcripción, traducción y reparación del ADN en eucariotas, proviene de analogías con versiones de estos procesos estudiados en bacterias. Pero debido al pequeño tamaño de estos organismos y la ausencia aparente de organelas rodeadas de membranas, se ha supuesto por muchos años que las bacterias son estructuras estáticas y homogéneas, difiriendo profundamente del desarrollo y organización de las células eucariotas. Es por esto que históricamente, las bacterias no fueron consideradas como modelos válidos para el estudio de la biología celular eucariota.

Esta perspectiva tradicional cambió significativamente en los últimos años debido a los grandes avances en la comprensión de la biología celular bacteriana. El estudio de diferentes especies ha demostrado que las bacterias son, en realidad, células muy dinámicas y con un elevado grado de ordenamiento. Las células bacterianas son capaces de polarizarse, diferenciarse a distintos tipos celulares, y comunicarse con células vecinas mediante moléculas señal para coordinar acciones multicelulares ⁹.

Cada célula se encuentra rodeada por una membrana plasmática formada por una bicapa lipídica que separa el citoplasma del medio extracelular. Esta estructura supramolecular, además de actuar como una barrera de contención, le da forma a la célula, y la relaciona con el medio extracelular contribuyendo a la homeostasis celular. La principal característica de esta barrera es su permeabilidad selectiva, lo que permite mantener una composición citoplasmática distinta del medio extracelular al regular el tráfico de agua, iones, metabolitos, enzimas, etc.

La función de esta estructura se encuentra determinada en gran parte por su composición y grado de fluidez, y esto es especialmente importante en procariotas ya que la fluidez es necesaria para diversas funciones fisiológicas, entre las que se encuentran quimiotaxis, movilidad, síntesis de ADN, transporte de nutrientes, etc.

Como componentes hidrofóbicos claves de los lípidos de membrana, los AG cumplen un rol central en la formación y las propiedades de las membranas biológicas, además de participar en el metabolismo energético y en la transducción de señales. Asimismo, los AG o sus derivados están involucrados en una gran variedad de procesos celulares que incluyen exportación ¹⁰, activación, inactivación ¹¹ y modificación de proteínas ¹²; biogénesis de organelas en organismos eucariotas ¹³, control y regulación de la

Introducción

transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico ¹⁴ y en la diferenciación celular ¹⁵. Al ser biomoléculas tan importantes, es de esperar que las células desarrollen mecanismos que aseguren su disponibilidad, tanto a nivel de la incorporación como de la biosíntesis, con el fin de adaptarse a cambios en el crecimiento y demanda energética. Esto es especialmente crítico en el caso de bacterias de vida libre, como las bacterias del género *Bacillus* y muchas otras que habitan en el suelo, debido a los cambios constantes en su entorno ambiental.

1 – Las membranas biológicas: estructura y función.

La característica arquitectónica central de las membranas biológicas es una doble capa lipídica que rodea el citoplasma celular y constituye una barrera física al paso de moléculas polares e iones. Esta bicapa permite la regulación del intercambio de diferentes sustancias con el medio extracelular. Los lípidos que la componen son anfipáticos: un extremo de la molécula es hidrofóbico y el otro hidrofílico, y son justamente las interacciones de sus regiones hidrofóbicas e hidrofílicas entre sí, y de las regiones hidrofílicas con el agua, las que dirigen su empaquetamiento hacia la formación de bicapas membranosas. Otro componente esencial de las membranas biológicas son las proteínas, las cuales se encuentran embebidas en la bicapa lipídica.

En 1972 Singer y Nicolson ¹⁶ postularon un modelo molecular para explicar la estructura de las membranas celulares. Ellos formularon el llamado “modelo de mosaico fluido”. Según el mismo, la bicapa lipídica constituye un fluido bidimensional, un mosaico heterogéneo de moléculas de fosfolípidos (FL) y proteínas que tienen libertad de movimiento rotacional y lateral, y una distribución al azar en la membrana. Actualmente se sabe que la libertad de movimiento de las proteínas y los lípidos no es irrestricta, por lo cual se han postulado algunas modificaciones al modelo de Singer y Nicolson, principalmente a partir del descubrimiento de los “lipids rafts”, o en español, balsas lipídicas. Las balsas lipídicas son pequeños dominios de membrana (tienen unos pocos micrómetros cuadrados) heterogéneos, altamente dinámicos, ricos en esfingolípidos y colesterol, que suelen compartimentalizar procesos celulares ¹⁷. Las especies lipídicas de estos microdominios se encuentran más ordenadas que las que se hallan a su alrededor debido a la forma molecular, la distribución asimétrica y las propiedades físicas que poseen, las cuales favorecen dicho empaquetamiento ¹⁸. Por lo tanto, la evidencia experimental actual indica que las membranas biológicas están formadas por un mosaico

complejo de bicapa lipídica fluida (según el modelo de Singer y Nicolson) y de microdominios transitorios o balsas lipídicas, en el cual las proteínas pueden difundir pero con ciertas restricciones.

1.1 – Fluidez de las membranas y adaptación a bajas temperaturas.

La fluidez de las membranas se origina en las cadenas individuales de hidrocarburos de los AG de la bicapa. El grado de fluidez es sumamente importante para el correcto funcionamiento de la membrana y depende de la composición lipídica de la bicapa y de la temperatura medioambiental. Cambios en el orden de 1 °C pueden llevar a variaciones en la velocidad de reacciones biológicas del 10% ¹⁹, y fluctuaciones mayores en la temperatura pueden abolir procesos metabólicos llevando a una rápida muerte celular.

A temperaturas fisiológicas los FL de membrana se encuentran en un estado líquido-cristalino y la bicapa lipídica tiene la fluidez adecuada para una función celular normal. Sin embargo, cuando la temperatura ambiental desciende, el estado físico de los FL sufre un cambio reversible pasando del estado líquido-cristalino al estado de gel. Este cambio inducido por la temperatura se conoce como transición de fase. Como consecuencia, la membrana plasmática se torna rígida y su funcionalidad se ve comprometida. Sin embargo, todos los organismos poiquiloterms y los organismos superiores poseen mecanismos para poder modificar la composición de lípidos de las membranas en respuesta a los cambios de temperatura, de modo de mantener la fluidez apropiada para el correcto funcionamiento celular. Este fenómeno se conoce como adaptación homeoviscosa ¹ y ha sido ampliamente caracterizado. Las bacterias, las cuales carecen de colesterol, responden a una disminución en la temperatura medioambiental, y por ende en la fluidez de la membrana, generando cambios en los AG que forman los FL de sus membranas, de modo de disminuir la temperatura de transición de la fase gel a la líquido-cristalina. Estos cambios pueden ser: la disminución de la longitud de las cadenas de acilo, la ramificación de las cadenas hidrocarbonadas con grupos metilos para dar AGR o la introducción de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los AG, generando AGI. Los dos primeros mecanismos se producen durante la síntesis *de novo* de AG, mientras que el tercer sistema puede darse a nivel biosintético o por la modificación de las cadenas hidrocarbonadas de AG previamente sintetizados, lo cual depende de la vía de producción de AGI que el organismo posea.

La disminución de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas como mecanismo de adaptación a las bajas temperaturas, no ha sido estudiado en detalle hasta el momento; sólo se ha descrito en unos pocos organismos como *Micrococcus cryophilus*²⁰ y *Listeria monocytogenes*²¹.

1.2 – Síntesis de ácidos grasos.

En la naturaleza se encuentran dos tipos de sintetisas de AG (FAS), clasificadas de acuerdo a su estructura molecular. En las de tipo I, los sitios activos que catalizan el ciclo biosintético se encuentran en distintos dominios de proteínas multifuncionales grandes. Todos los dominios pueden estar en una proteína única, como ocurre en mamíferos y micobacterias, o divididos entre dos proteínas que interactúan, como sucede en hongos. En las FAS de tipo II en cambio, cada actividad enzimática se encuentra en una proteína monofuncional distinta. Este tipo de sintetisas se encuentra en bacterias y plantas. Al ser un proceso esencial para la vida, la inhibición selectiva y regulada de la síntesis de AG tiene efectos beneficiosos para la salud humana. El estudio de la síntesis de AG en bacterias se ha realizado principalmente en *Escherichia coli*, y las enzimas descritas en esta vía están altamente conservadas en la mayoría de las bacterias²².

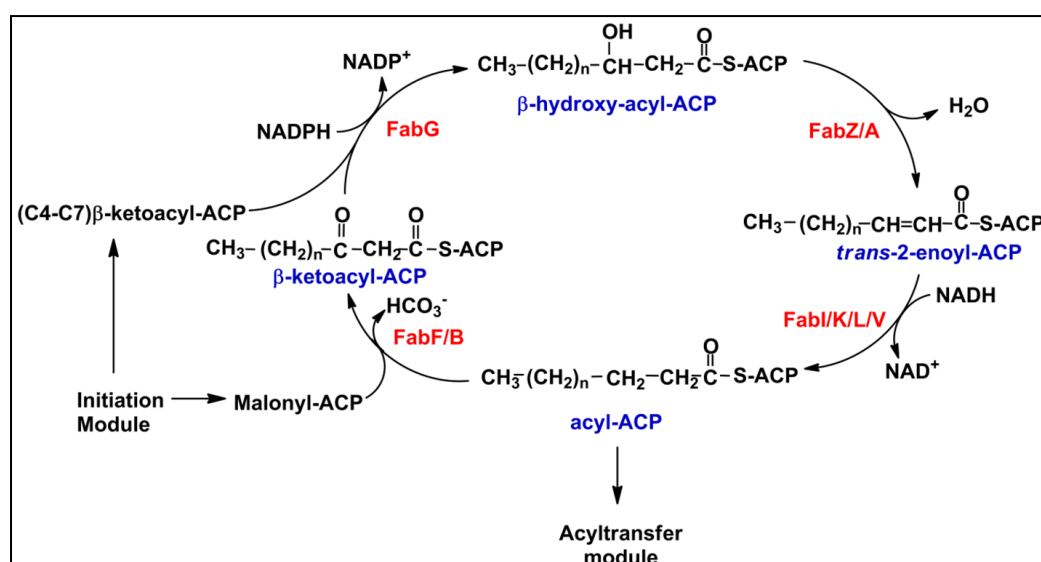


Figura 1. Ciclo de elongación en la biosíntesis de AG en *E. coli*. Las enzimas del ciclo de elongación trabajan en conjunto para recibir el β -cetoacil-ACP y el malonil-ACP del ciclo de iniciación y extender el AG en dos carbonos. La β -cetoacil-ACP reductasa (FabG) estaría presente en todas las bacterias. FabZ es una deshidrataza universal. FabA siempre está presente junto a FabB y también participa de la síntesis de AGI. Existen múltiples isoformas de la enoil-ACP reductasa (FabI/K/L/V) y algunos organismos expresan más de una isoforma. FabF es la enzima condensante. A FabB siempre se la encuentra con FabA y también participa de la síntesis de AGI. Adaptado de

23.

Introducción

Las enzimas condensantes I (FabB), II (FabF) y III (FabH, iniciadora) catalizan la condensación de malonil-ACP ya sea con el acetil-CoA o con la cadena creciente del acil-ACP para formar el β -cetoacil-ACP, el cual es luego reducido a 3-hidroxiacil-ACP (FabG). Este es luego deshidratado a 2-enoil-ACP (FabA y FabZ dehidrasas) y reducido nuevamente (FabI) para dar un acil-ACP con dos carbonos más que al inicio del ciclo (Figura 1). El proceso se alimenta con malonil-CoA, que es sintetizado a partir de acetil-CoA y bicarbonato, y posteriormente transesterificado a ACP. FabH cataliza la reacción inicial del ciclo; en cambio FabB y FabF, elongan AGS con una longitud de cadena de cuatro o más carbonos. La iniciación provee el sustrato para los ciclos de elongación y es la estructura de ese sustrato la que determina si el AG sintetizado será lineal o ramificado²³.

1.2.1 – Síntesis de ácidos grasos ramificados.

Muchos organismos Gram+, incluyendo bacilos, estafilococos y estreptomicas sintetizan una gran variedad de AGR. En algunas especies son incluso los lípidos mayoritarios. Los puntos de fusión de los AG anteiso son significativamente menores que los de la serie iso, los cuales, a su vez, son menores que los de los AG lineales de igual longitud. Por esta razón, en las especies que producen AG ramificados, una de las respuestas al estrés por frío es el aumento pronunciado de la proporción de los AG anteiso en sus lípidos de membrana, al mismo tiempo que se produce una disminución de los AG ramificados de la serie iso.

Algunos organismos poseen enzimas condensantes que utilizan preferentemente los acil-CoA de cadena ramificada isovaleril-CoA, isobutiril-CoA y 2-metilbutiril-CoA como sustratos, en lugar de acetil-CoA; los cuales al ingresar en el ciclo biosintético de AG dan origen a los AGR metil-iso (poseen un grupo metilo en el penúltimo carbono de la cadena de acilo) y metil-anteiso (poseen un grupo metilo en el antepenúltimo carbono de la cadena de acilo).

Los precursores de los AGR son los AA con cadenas laterales ramificadas valina, leucina e isoleucina que por desaminación producen los cetoácidos que se indican en la Figura 2²⁴. Luego, una decarboxilasa genera los acil-CoA ramificados de cadena corta que posteriormente serán utilizados como sustratos por la enzima condensante iniciadora FabHA/B durante la fase de iniciación de la síntesis de AG (Figura 2)²⁵.

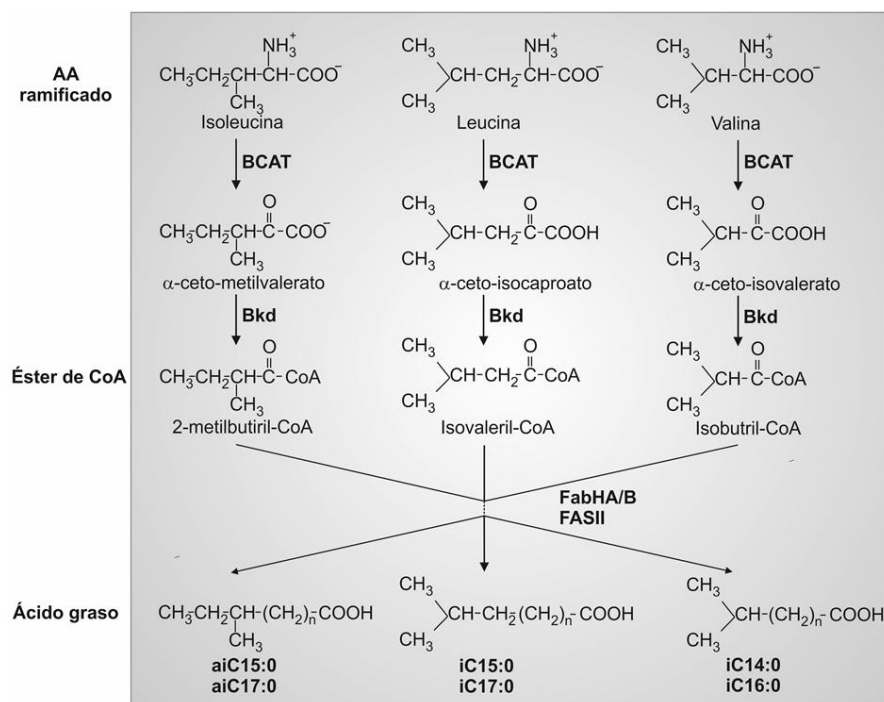


Figura 2. Inicio de la síntesis de AGR en *B. subtilis*. Los AA ramificados isoleucina, leucina y valina son convertidos a su correspondiente α -ceto-ácido por una transaminasa (BCAT), y luego decarboxilados por el complejo α -ceto-ácido deshidrogenasa (Bkd) para producir el precursor acil-CoA ramificado. Los ésteres de CoA ramificados son utilizados entonces, por FabHA/B como moléculas iniciadoras durante la primera reacción de condensación con malonil-CoA para dar, luego de la fase de elongación, los AGR correspondientes. Los respectivos AG obtenidos luego de la fase de elongación se indican al final de cada vía.

Se ha sugerido que la disminución de la relación iso/anteiso, observada al disminuir la temperatura medioambiental, podría deberse a una regulación por temperatura de la especificidad de sustrato de las enzimas condensantes del inicio del ciclo biosintético de AG, o bien a cambios en la cantidad de los sustratos disponibles para las enzimas iniciadoras al disminuir la temperatura²⁶. Sin embargo, éste mecanismo de control no ha sido profundizado.

1.2.2 – Síntesis de ácidos grasos insaturados.

Uno de los cambios más importantes, observados en la composición lipídica de los organismos poiquiloterms como respuesta al frío es la variación del grado de insaturación de los AG de los FL de membrana. A medida que la temperatura medioambiental decrece, la proporción de los AGI en los lípidos de membrana aumenta.

Los AGI poseen uno o más dobles enlaces, los cuales se encuentran predominantemente en la configuración *cis*. Estos dobles enlaces producen un quiebre en la estructura lineal de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual impide el empaquetamiento

Introducción

ordenado de los AG en las bicapas membranosas. Por lo tanto, disminuyen la temperatura de transición de la fase gel a la líquido-cristalina, aumentando la fluidez de las membranas.

Bloch y colaboradores determinaron que los AGI se sintetizan por dos vías diferentes; una ocurre en organismos aeróbicos y requiere oxígeno molecular, mientras que la otra vía se utiliza en condiciones anaerobias^{27,28}.

La vía anaerobia se encuentra presente en la mayoría de las bacterias Gram negativas y ha sido elucidada en detalle en *E. coli*, en donde se demostró que se necesitan sólo dos reacciones bioquímicas para producir AGI²⁹. La introducción de un doble enlace involucra la deshidratación del intermediario 3-hidroxydecanoil, de la síntesis de AG, para dar un doble enlace *cis*-3 que se conservará en los siguientes pasos de adición de dos átomos de carbono para generar los AGI de la membrana lipídica³⁰. El doble enlace es introducido por una 2,3-dehidrasa específica (FabA, Figura 3A), la cual introduce un doble enlace en el C-10 del intermediario β -hidroxi-decanoil-ACP, generando en primer lugar el isómero *trans*-2,3 y a continuación el *cis*-3,4-insaturado por isomerización. El primero de ellos continúa con el ciclo de elongación dando origen a productos saturados, mientras que el segundo es sustrato de la enzima β -cetoacil-ACP sintasa I (FabB, Figura 3A) condensándolo con malonil-CoA. FabB se requiere para elongar el *cis*-3-decenoil-ACP producido por FabA y su actividad es el factor principal que regula el contenido de AGI, ya que la proporción de AGI está determinada por la competencia entre el uso del *cis*-3-decenoil-ACP por parte de FabB y el uso del *trans*-2-decenoil-ACP por parte de una enoil reductasa, FabI³¹. Estas dos proteínas, involucradas en la vía de biosíntesis de AG tipo II, dirigen la formación de los principales AGI hallados en esta bacteria: 16:1 Δ 9 y 18:1 Δ 11 (*cis*-vaccénico). Se ha demostrado que la regulación de la fluidez de membrana en *E. coli* está controlada por la actividad de FabF, la β -cetoacil-ACP sintasa II, la misma aumenta a bajas temperaturas llevando a un incremento del *cis*-vaccénico en los FL de membrana³². Esta enzima se encuentra presente a todas las temperaturas pero es más activa a temperaturas de crecimiento menores³³. El 16:1-ACP no es buen sustrato de FabB y FabF controla su elongación a 18:1-ACP. A bajas temperaturas FabF promueve la formación del AGI 18:1 Δ 11, mientras que a mayores temperaturas la actividad de FabF disminuye comparada con la de FabB y la síntesis de 18:1 Δ 11 se reduce^{33,34}. Sin embargo, la vía descrita en *E. coli* no se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias que sintetizan AGI y se ha determinado que sólo las alfa y gamma proteobacterias codifican las enzimas de esta vía^{35,36}.

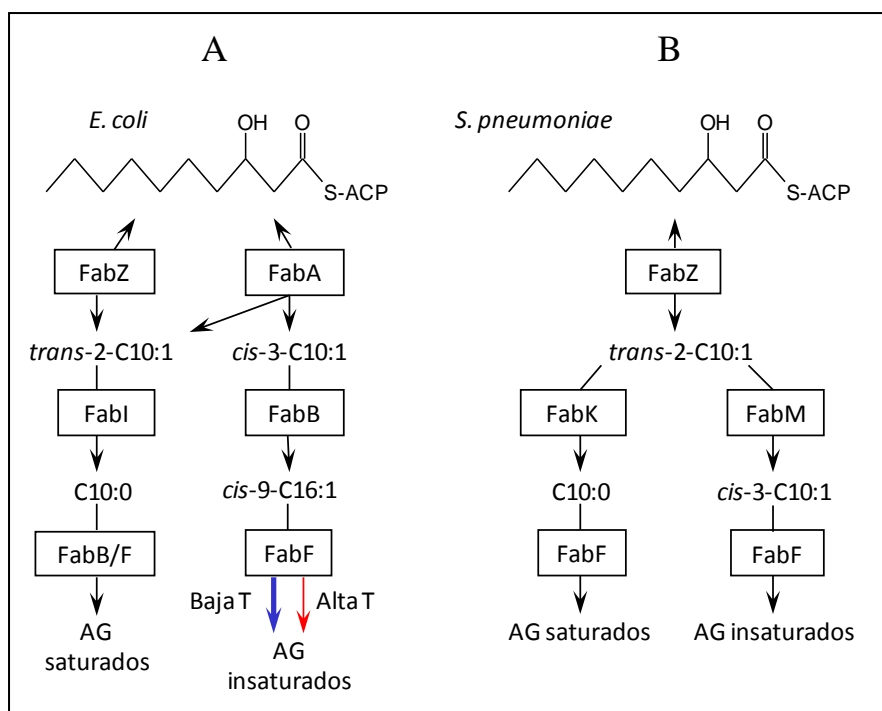


Figura 3. Biosíntesis de AGI en *E. coli* (A) y *S. pneumoniae* (B).

Recientemente se ha elucidado otro mecanismo anaeróbico de síntesis de AGI en *Streptococcus pneumoniae*, que al igual que otras bacterias Gram positivas, no posee en su genoma los genes homólogos a *fabA* y *fabB*. *S. pneumoniae* posee solamente la dehidratasa FabZ, y al carecer de las enzimas FabA y FabB, debe emplear un mecanismo distinto para la formación de AGI. En estos microorganismos se identificó una enzima denominada FabM (*trans*-2-*cis*-3-enoil-ACP isomerasa) la cual cataliza la isomerización del intermediario *trans*-2,3 a nivel del C-10, generando el *cis*-3,4 insaturado³⁷. FabM (Figura 3B) compite por el sustrato con la enzima FabK (enoil-ACP-reductasa) y de esta manera es capaz de producir la divergencia de la síntesis de AGS a AGI. Ambas reacciones producen intermediarios que a continuación son elongados tanto hacia AGS como insaturados por la única enzima condensante que posee *S. pneumoniae*, FabF³⁶. La proporción de AGI está controlada por FabT que es un represor transcripcional que regula la expresión de *fabK* pero no la de *fabM*³⁸. FabT reprime la transcripción de *fabK* permitiendo que actúe FabM lo cual conlleva a un aumento en la proporción de AGI. La relación de este mecanismo con la temperatura aún no ha sido completamente dilucidada.

El segundo mecanismo de síntesis de AGI caracterizado es dependiente de oxígeno, surgió en la evolución varios billones de años atrás gracias al advenimiento de un medio ambiente aeróbico y se lo encuentra tanto en cianobacterias, hongos y bacilos, como en organismos eucariotas superiores. Este sistema utiliza las enzimas llamadas desaturasas, las

Introducción

cuales catalizan la introducción de un doble enlace en una cadena de AG completamente sintetizada. Esto implica la eliminación de hidrógenos de los grupos metilenos de las cadenas de acilo, un proceso que demanda grandes cantidades de energía ^{7,39}. Sin embargo, dado que le permite al organismo modificar rápidamente sus AG preexistentes frente a cambios abruptos en el medio, ha representado una clara ventaja evolutiva permitiéndoles adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones.

1.3 – Las desaturasas.

Las desaturasas son un tipo especial de oxigenasas que tienen la capacidad de remover dos hidrógenos de una cadena hidrocarbonada, especialmente de cadenas de AG, catalizando la formación de un doble enlace en el sustrato. A diferencia de las oxigenasas comunes que transfieren el oxígeno al sustrato, las desaturasas usan el oxígeno molecular activado para eliminar los hidrógenos del sustrato para crear el doble enlace carbono/carbono y una molécula de agua ^{2,40,41}. Todas estas enzimas poseen hierro no hemínico, utilizan equivalentes de reducción que obtienen de una cadena de transporte de electrones y son capaces de introducir dobles enlaces en las cadenas de AG en forma altamente estereo-, regio- y quimio- selectiva ². Como se mencionó, están presentes en diversos organismos incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales, y son una de las principales encargadas del mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas. Forman parte de un gran grupo de enzimas capaces de activar el oxígeno molecular y utilizarlo como reactivo para una subsecuente modificación de enlaces C-H de sustratos muy diversos ⁴². La reacción de desaturación consiste en la remoción de dos átomos de hidrógeno formando un doble enlace *cis* en la cadena hidrocarbonada de un AG. No existe introducción del oxígeno en el producto, sino que el mismo es reducido completamente a agua, como puede verse en la Figura 4.

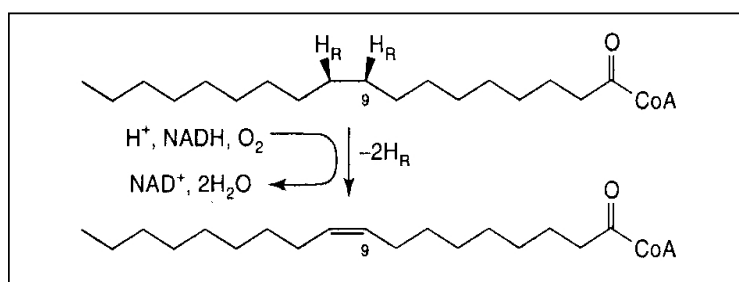


Figura 4. Reacción de desaturación (Adaptado de ⁴¹).

1.3.1 – Clasificación de las desaturasas.

Las desaturasas son un grupo complejo de enzimas que pueden clasificarse de diferentes maneras: dependiendo de su solubilidad, el dador electrónico que utilizan, su localización subcelular, la regioselectividad de la reacción y el tipo de esterificación del AG utilizado como sustrato ⁴².

De acuerdo a su solubilidad, las desaturasas se clasifican en dos grupos no relacionados evolutivamente: las desaturasas solubles o acil ACP desaturasas (por ejemplo, la $\Delta 9$ estearoil ACP desaturasa de castor ⁴³), y las desaturasas integrales de membrana, siendo las más estudiadas la $\Delta 9$ desaturasa, Ole1, de levaduras ⁴⁴ y la $\Delta 5$ desaturasa, Des, de *B. subtilis* ⁴⁵. Se sabe que los AG libres no son desaturados sino que deben estar esterificados a una proteína transportadora de acilos (ACP), en el caso de las desaturasas solubles, o a la coenzima A (CoA) o a lípidos para el caso de las desaturasas unidas a membranas.

Las acil-ACP desaturasas son proteínas solubles localizadas en los plástidos de las plantas. Estas enzimas catalizan la introducción de dobles enlaces *cis* en cadenas de acilos unidas a ACP ², generalmente en posición 9 relativo al extremo carboxilo de los AG ($\Delta 9$); aunque se han descrito actividades $\Delta 6$ y $\Delta 4$. El análisis de la estructura cristalina de la $\Delta 9$ -18:0-ACP desaturasa de *Ricinus communis* (Ricino) demuestra que la misma tiene un centro activo di-hierro, y que los residuos de AA involucrados en unir el complejo di-hierro forman dos motivos característicos, D/EXXH, altamente conservados donde se uniría el sustrato lipídico ⁴⁶.

Las desaturasas de membrana están más ampliamente distribuidas en la naturaleza. Estas proteínas pertenecen a una gran familia de enzimas funcionalmente diversas que incluyen alcano hidroxilasas, xileno monooxigenasas, caroteno cetolasas y esterol y esfingolípido hidroxilasas ². Actualmente se conoce la secuencia nucleotídica de una gran cantidad de genes, de distintos organismos (cianobacterias, levaduras, hongos, plantas y animales) que codifican para desaturasas integrales de membrana. La secuencia de AA deducida que corresponde a estos genes mostró que son proteínas altamente hidrofóbicas, y que ninguna de ellas posee el motivo consenso que une hierro encontrado en las desaturasas solubles. En base a las diferencias en la especificidad de sustrato, estas enzimas fueron subdivididas en dos grupos: acil-CoA desaturasas y acil-lípido desaturasas ². Ambos tipos de desaturasas presentan una estructura cuaternaria dimérica ⁴⁷.

Introducción

La información estructural sobre las desaturasas unidas a membrana es muy escasa debido a las dificultades técnicas para obtener grandes cantidades de estas enzimas purificadas. Por lo tanto, el progreso en cuanto a la comprensión de las características estructurales se encuentra retrasado con respecto al de las desaturasas solubles. El modelo aceptado actualmente fue propuesto por Stucky ⁴⁴, basado en los perfiles de hidrofobicidad de las secuencias aminoacídicas de la $\Delta 9$ estearoil-CoA desaturasa de rata y levaduras (Figura 5). El mismo propone que dos largas regiones hidrofóbicas de 50 residuos de AA atraviesan la membrana dos veces cada una, quedando la región interna de la proteína ubicada del lado citosólico de la membrana. Además, se sabe que estas proteínas presentan un consenso para el sitio activo diferente al encontrado en las desaturasas solubles, con un motivo tripartito de ocho histidinas, $HX_{(3-4)}H$, $HX_{(2-3)}HH$, $HX_{(2-3)}HH$, que se encuentran en posiciones conservadas de la secuencia de AA. Trabajos posteriores sobre el modelo postulado indican que los ocho residuos de histidina estarían ubicados en dominios hidrofílicos citosólicos: cinco de ellos se encontrarían en la región citoplasmática rodeados de los dos dominios transmembrana y estarían involucrados en la unión de los átomos de hierro necesarios para la catálisis ⁴⁸.

Se ha observado mediante estudios de mutagénesis sitio dirigida que la sustitución de cualquiera de los residuos conservados de histidina por otro AA conduce a la pérdida de actividad enzimática. Esto se debe probablemente a la incapacidad de unir hierro en el sitio activo de las enzimas mutantes ⁴⁰.

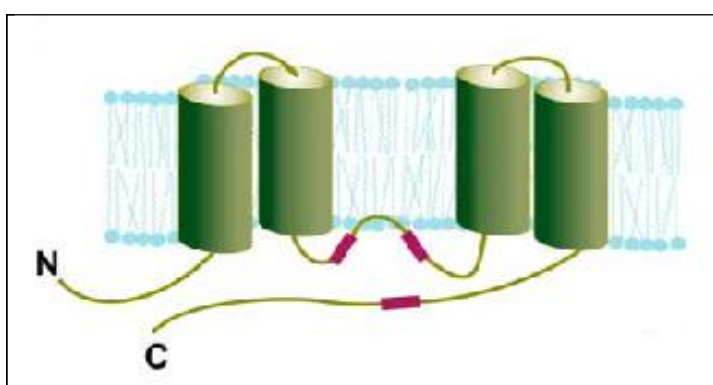


Figura 5. Modelo topológico propuesto para la estearoil-CoA desaturasa de rata. Los cilindros verdes indican los segmentos transmembrana. La localización de las secuencias conservadas que poseen los residuos de histidina esenciales para la actividad enzimática se representan con rectángulos rosa (Adaptado de ⁴⁹).

El cambio del motivo característico de las desaturasas solubles al de las desaturasas integrales de membrana no posee una explicación funcional. Esta situación estaría representando una evolución convergente de dos proteínas no relacionadas que se han convertido en desaturasas mediante la captación de dos átomos de hierro y la combinación de los mismos de diferentes maneras para generar el ensamblaje férrico requerido para la catálisis ⁴².

1.3.2 – Dadores de electrones.

Como se mencionó anteriormente, para la reacción de desaturación se requieren, además de hierro y oxígeno molecular, dos equivalentes de reducción para la formación de cada doble enlace, los cuales son aportados por cadenas transportadoras de electrones. Se conocen dos sistemas de transporte de electrones que proveen estos equivalentes de reducción. Uno está presente en plástidos de plantas y en bacterias, y el otro en el retículo endoplasmático (RE, Figura 6). Estos sistemas son específicos del compartimiento subcelular (plástidos o RE) y no de la clase de desaturasa (soluble o integral de membrana). Los pares de electrones, que provienen del NADPH o NADH, son transferidos simultáneamente a una flavoproteína, la cual actúa cediéndolos de a uno por vez, a una proteína transportadora. Luego, esta proteína los transfiere a la desaturasa, también secuencialmente, para efectuar la incorporación del doble enlace en el sustrato. Dependiendo del sistema dador de electrones para la reacción de desaturación, estas enzimas se clasifican en ²:

- desaturasas dependientes de ferredoxina (Fd) / Fd NADP oxidoreductasa (FNR). Son las desaturasas de plástidos (tanto para las desaturasas solubles como para las de membrana) y de bacterias;
- desaturasas dependientes de *citb5* / *citb5* oxidoreductasa. Son las desaturasas de RE de plantas y las acil CoA o acil lípido desaturasas de animales y hongos.

Para las desaturasas bacterianas o de plástidos, probablemente, la fuente de equivalentes de reducción es el NADPH, la flavoproteína es la Fd NADP oxidoreductasa y el transportador de electrones es la proteína Fd. En el RE, los equivalentes de reducción provienen del NADH, la flavoproteína es la citocromo *b5* (*citb5*) reductasa, y el transportador de electrones es la hemoproteína *citb5* ^{2,42}.

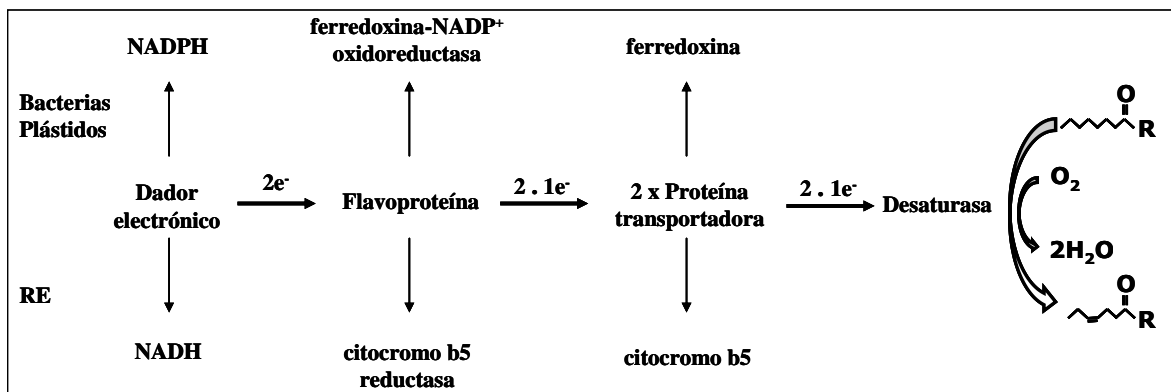


Figura 6. Esquema de las cadenas de transporte de electrones. En la parte superior se detalla la vía propuesta para las desaturasas de bacterias y plástidos. En la parte inferior se muestra la vía propuesta para las desaturasas de retículo endoplasmático.

1.3.3 – Regioselectividad de las desaturasas.

Las desaturasas, además de diferenciarse en los aspectos hasta aquí nombrados, suelen poseer distinta regioselectividad. La regioselectividad de una desaturasa se refiere a la habilidad para localizar la posición donde será introducido el doble enlace. Se conocen tres clases de regioselectividad para las desaturasas que estarían reflejando diferencias en la posición del sitio activo y en las características del bolsillo de unión del sustrato asociadas al reconocimiento del mismo. En la Figura 7 se esquematizan estos tres tipos de regioselectividad.

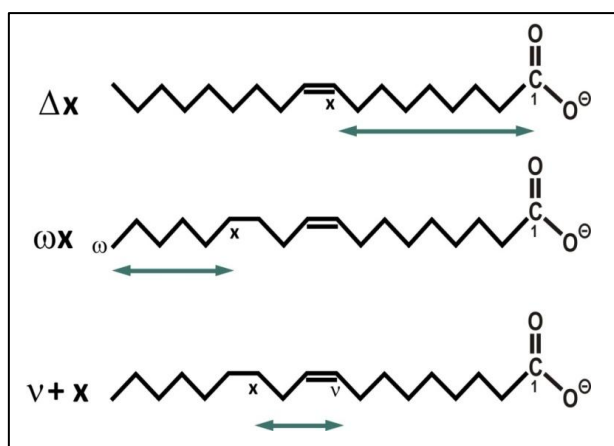


Figura 7. Regioselectividad de las desaturasas. Las flechas verdes indican la región del AG que reconocería la enzima en los distintos

En contraste a las acil ACP desaturasas solubles, en las cuales la regioselectividad está determinada en relación al carboxilo terminal del AG⁵⁰, las desaturasas de membrana

tienen al menos tres modos distintos para insertar el doble enlace como se detalla en la Figura 7⁵¹⁻⁵³:

- desaturasas ΔX : introducen el doble enlace a X carbonos contando a partir del extremo carboxilo terminal;
- desaturasas ωX : posicionan el doble enlace a X carbonos contando a partir del extremo metilo terminal;
- desaturasas $\nu+X$: insertan un doble enlace a una distancia de X carbonos de un doble enlace ya existente.

La $\Delta 9$ estearoil CoA desaturasa introduce el doble enlace contando a partir del extremo carboxilo terminal de manera similar a como lo hacen las acil ACP desaturasas solubles. Las acil lípido desaturasas $\omega 6$ ($\Delta 12$) y las $\omega 3$ ($\Delta 15$) requieren sustratos con dobles enlaces preexistentes. En particular, la desaturasa $\omega 6$ prefiere AGI $\Delta 9$ mientras que la desaturasa $\omega 3$ prefiere AGI $\Delta 9,12$ ⁴². Las desaturasas “front-end” introducen el doble enlace entre uno preexistente y el extremo carboxilo terminal. Estas desaturasas participan en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y todas poseen un dominio *citb5* fusionado al extremo N-terminal que actúa como proteína transportadora de electrones^{53,54}. La única excepción a estas desaturasas es la $\Delta 6$ desaturasa de cianobacterias que usa, al menos *in vitro*, Fd como dador de electrones⁴⁰.

1.2.4 – Mecanismo propuesto de desaturación.

En el mecanismo propuesto, basado en la evidencia experimental disponible, se debe vencer la energía de enlace del grupo metileno, uno de los más estables en la naturaleza (98 kcal/mol). Este proceso, lento, estaría mediado por un oxidante di-férrico, el cual se generaría utilizando los dos equivalentes de reducción y el oxígeno molecular requeridos en la reacción. Los átomos de hierro del oxidante se encuentran coordinados a residuos de ácido glutámico e histidina, en las desaturasas solubles, y solamente a residuos de histidina en las desaturasas integrales de membrana, los cuales forman parte de los correspondientes sitios activos. La activación del oxidante se inicia por la reducción del mismo mediante dos electrones para producir la forma reducida di-férrica. Luego, el oxígeno molecular se une al centro férrico resultando en la forma peroxo. La ruptura del enlace oxígeno-oxígeno da lugar al intermediario oxidante responsable de la eliminación de los dos hidrógenos (Figura 8A). Este intermediario oxidaría en forma secuencial los

carbonos del enlace para generar así la insaturación. En el proceso se elimina, además, una molécula de agua (Figura 8B) ².

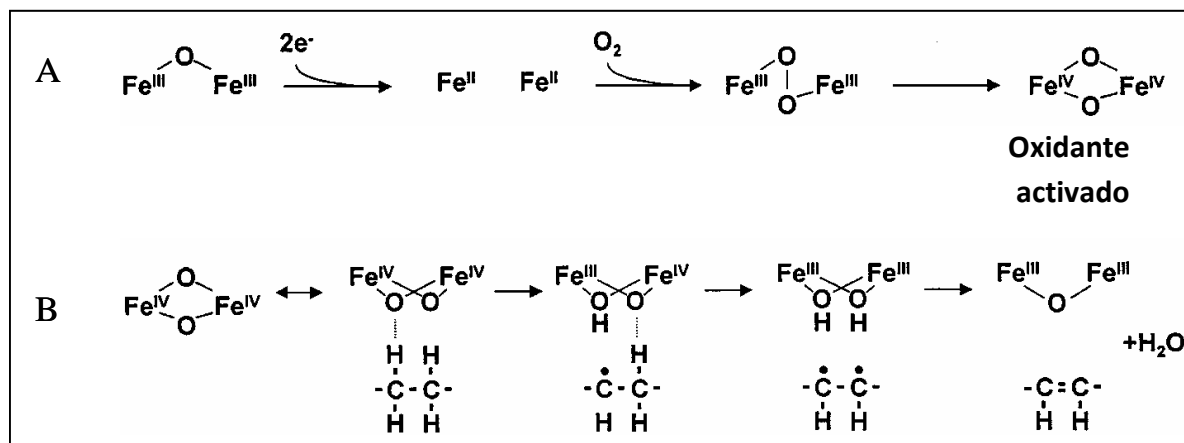


Figura 8. Mecanismo de acción propuesto para las desaturasas. (A) Vía de activación del oxígeno. (B) Ruta de desaturación de los AG (Adaptado de ²).

2 – Desaturasas bacterianas.

Un análisis exhaustivo de los genomas bacterianos mostraron la existencia de muchos marcos abiertos de lectura que presentan similitud significativa con desaturasas conocidas ⁴². A continuación se presenta información acerca de las desaturasas cuya función ha sido demostrada experimentalmente.

2.1 – Desaturasas de cianobacterias.

Las cianobacterias son un grupo versátil de bacterias capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica de manera similar a las plantas. Comprenden más de 1600 especies con varias morfologías y pueden sobrevivir en ambientes muy hostiles ⁵⁵. Los AGI y los AGPI juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana celular especialmente bajo condiciones de estrés térmico, limitación de energía, crecimiento y fotosíntesis ⁵⁶⁻⁶⁰. Todas las desaturasas de cianobacterias conocidas hasta el momento son acil lípido desaturasas y tienen una especificidad muy rigurosa con respecto a la posición en donde introducen el doble enlace y a la posición *sn* del glicerol en la cual se esterifican los AG. Las desaturasas de cianobacterias se estudiaron principalmente en *Synechocystis sp.* PCC6803, en donde se encontraron cuatro desaturasas, DesA, DesB, DesC y DesD que catalizan la desaturación en las posiciones $\Delta 12$, $\omega 3$, $\Delta 9$ y $\Delta 6$ de AG de 18 átomos de C ubicados en la posición *sn*-1, respectivamente ⁶¹⁻⁶⁵. El orden en el que estas cuatro desaturasas actúan también es muy estricto: el primer doble enlace lo

Introducción

introduce la $\Delta 9$ desaturasa en el ácido esteárico. Las $\Delta 12$ y $\Delta 6$ desaturasas introducen el doble enlace en AG mono o diinsaturados que ya contengan un doble enlace en la posición $\Delta 9$ ⁶⁶. La $\omega 3$ desaturasa introduce el doble enlace en AG que contengan un doble enlace en la posición $\Delta 12$ ⁶⁶. La expresión de los genes *desB* y *desD* está regulada por un sistema similar al sistema DesK/R de *B. subtilis*. En este sistema participa una histidina quinasa Hik33 que es la encargada de percibir los cambios en la fluidez de la membrana y, por medio de una segunda histidina quinasa, Hik19, fosforila al regulador de respuesta Rer1. Finalmente Rer1 activa la transcripción del gen *desB*. En el caso del gen *desD* el regulador de respuesta sería otra proteína diferente a Rer1⁶⁷.

A diferencia de *Synechocystis*, la cianobacterias del género *Synechococcus* sólo tienen una $\Delta 9$ desaturasa y sintetizan AG monoinsaturados exclusivamente.

Se ha determinado la importancia de estos genes *des* en cianobacterias mediante la observación de que mutantes en los mismos son más sensibles al frío, exhiben foto-inhibición de la fotosíntesis y crecimiento más lento a bajas temperaturas respecto a las de tipo salvaje. Además, existen evidencias de que la insaturación de AG es esencial para la tolerancia al estrés salino. La baja temperatura se correlaciona con un aumento en la desaturación de los AG de los lípidos de membrana de cianobacterias, ligado a una activación en la expresión de las desaturasas⁶⁸.

2.2 – Desaturasas de *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es un patógeno humano oportunista Gram negativo que causa infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos⁶⁹. Las membranas de *P. aeruginosa* contienen grandes cantidades de AGI lineales, siendo el *cis*-vaccénico la especie principal⁷⁰. Se ha demostrado que existen tres vías de síntesis de AGI diferentes en *P. aeruginosa* dependiendo de la disponibilidad de oxígeno. En condiciones anaerobias las proteínas FabAB de la vía biosintética tipo II se encargan de la síntesis de AGI como ocurre en *E. coli*. En condiciones aerobias, además de la vía mediada por FabAB, *P. aeruginosa* emplea dos desaturasas dependientes de oxígeno, DesA y DesB, las cuales introducen dobles enlaces *cis* en AG preexistentes⁷⁰. DesA y DesB tienen especificidades diferentes y suplementan la vía de síntesis de AGI anaerobia. DesA es una $\Delta 9$ acil-lípido desaturasa que utiliza tanto los FL sintetizados de *novo* o los sintetizados a partir de AGS exógenos DesB también es una $\Delta 9$ desaturasa pero utiliza como sustrato acil-CoA formados a partir de AGS exógenos, principalmente estearato y palmitato, generando AGI

Introducción

18:1 $\Delta 9$ y 16:1 $\Delta 9$, respectivamente ⁷⁰. El gen *desB* se encuentra ubicado en un operón junto con *desC* que codifica para una oxidoreductasa y se estipula que participaría de la cadena de transporte de electrones hacia DesB ⁷⁰. Estos tres mecanismos proveen a la célula la propiedad de cambiar rápidamente las propiedades físicas de la membrana para adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales. La expresión de DesA se induce por bajas concentraciones de oxígeno pero el mecanismo por el cual se regula es desconocido ⁷⁰. La expresión de DesB es regulada por un regulador transcripcional DesT que sensa los niveles de acil-CoA en la célula ⁷¹. Esta regulación es importante para el crecimiento de *Pseudomonas* en ambientes donde los AG están presentes y pueden ser tomados como fuente de carbono ⁷²; esta desaturasa permite a las células sustituir la síntesis de AGI incorporando los AG ambientales, evitando así el uso intensivo de energía y al mismo tiempo, manteniendo la homeostasis de membrana. Se demostró que la proteína DesB es necesaria para la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que mutantes en el gen *desB* presentan una marcada disminución en la síntesis de enzimas proteolíticas, deficiencia en la motilidad y reducción de la virulencia en el modelo de infección *Caenorhabditis elegans* ⁷³. Por otro lado, se determinó que la doble mutante en los genes *desA* y *desB* crece normalmente en condiciones aerobias indicando que FabAB es la vía principal de síntesis de AGI ⁷⁴.

2.3 – Desaturasas de micobacterias.

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno humano que causa millones de muertes por año. Todas las micobacterias tienen una envoltura celular rica en lípidos principalmente ácidos micólicos ⁷⁵. Estos lípidos son AGR hidroxilados con un gran número de átomos de carbono (entre 60-90). Pueden contener diversos grupos funcionales: metoxi, ceto, epoxi, anillos de ciclopropano y AGI. Los ácidos micólicos juegan un papel importante en la permeabilidad de la pared celular, la virulencia y la resistencia a los ácidos, características de *M. tuberculosis* ^{76,77}. Muchas de las drogas utilizadas para el tratamiento de esta bacteria inhiben la síntesis de ácidos micólicos. Sin embargo, los mecanismos exactos de la síntesis de estos AG no están completamente dilucidados. Se necesitan AGI con insaturaciones en posiciones específicas como sustratos, lo cual sugiere que la desaturación sería una etapa esencial para la biosíntesis de ácidos micólicos ^{76,77}. El genoma de *M. tuberculosis* presenta tres genes con homología a desaturasas de AG conocidas ⁷⁸. Los tres genes que codifican para putativas desaturasas en *M. tuberculosis*

H37Rv, *desA1*, *desA2* y *desA3* se clonaron y expresaron en *Mycobacterium bovis* BCG. De esta manera se determinó que DesA3 es una $\Delta 9$ desaturasa de membrana responsable de la síntesis de ácido oleico⁷⁹, componente esencial de los FL y triacilglicéridos. DesA3 sería un análogo funcional de la estearoil-CoA desaturasa de mamíferos, que tiene roles muy importantes en la fisiología de las células de mamífero^{80,81}. Además, DesA3 es uno de los 200 genes requeridos para la supervivencia del patógeno en el interior del granuloma de infección que encierra a los bacilos en estado latente⁸². Por otro lado, DesA1 y DesA2 son acil-ACP desaturasas solubles^{78,83}. DesA2 es esencial para la viabilidad de las micobacterias patógenas⁸⁴. Sin embargo, se desconoce el rol de estas enzimas.

2.4 – Desaturasas del género *Bacillus*.

El género *Bacillus* está formado por un gran número de especies de bacterias Gram positivas, aerobias, formadoras de endo-esporas y habitantes del suelo o de material vegetal en descomposición. El hecho de que su nicho natural sea el suelo, hace que la bacteria esté sometida a continuos cambios en su entorno lo que le ha hecho desarrollar diferentes estrategias para responder a ellos. Algunas de estas estrategias son: la capacidad de moverse para buscar nuevas fuentes de nutrientes⁸⁵, la capacidad de entrar en un estado de competencia natural para incorporar ADN exógeno e integrarlo en su genoma mediante recombinación homóloga⁸⁶, o la capacidad de desarrollar canibalismo, mecanismo de supervivencia durante el cual algunas bacterias de la población son capaces de provocar la lisis de bacterias de su misma especie y así poder hacer uso de los nutrientes que liberan^{87,88}.

Un número importante de especies de *Bacillus* poseen su genoma secuenciado, lo cual facilita la búsqueda de genes anotados como desaturasas en sus secuencias genómicas a través de las bases de datos. Además, existe una gran cantidad de información sobre la $\Delta 5$ acil lípido desaturasa de *B. subtilis*, como se describe más adelante, obtenida en nuestro laboratorio, muy valiosa a la hora de utilizar esta enzima como modelo para el estudio de nuevas desaturasas de membrana.

Con respecto a la composición lipídica de estas especies bacterianas, se sabe que la mayoría tiene una predominancia de AGR de entre 12 y 17 átomos de carbono de longitud, y que con excepción de dos grupos, el llamado grupo *cereus* (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* y *Bacillus cytotoxicus*) y los psicrófilos (*Bacillus insolitus*, *Bacillus*

Introducción

psychrophilus y *Bacillus globisporus*), producen poca cantidad de AGI y no sintetizan AGPI ⁸.

El primero en investigar la biosíntesis de AGI en diferentes especies del género *Bacillus* fue A. J. Fulco ⁵. Sus estudios demostraron que ciertas especies eran capaces de sintetizar AGI si las células bacterianas se cultivaban a baja temperatura medioambiental. Junto a sus colaboradores analizó la biosíntesis de AGI detectando el porcentaje de desaturación de distintos sustratos, ya sean saturados marcados radiactivamente, suministrados exógenamente; o saturados endógenos de las células. Por medio de estos métodos dilucidó dos sistemas diferentes de desaturación. En las especies de *Bacillus megaterium* KM, *B. megaterium* 14581, *B. subtilis* 6051, *Bacillus pumilus* 7061, *Bacillus licheniformis* 9945 y *Bacillus alvei* 6348 encontró un único sistema de desaturación, el cual convertía [1-¹⁴C]-palmitato en ácido $\Delta 5$ hexadecanóico únicamente. En cambio, en las especies *B. licheniformis* 8480, *B. licheniformis* 9259, *Bacillus macerans* 8509, *Bacillus stearothermophilus* 12977 y *Bacillus brevis* 9999 (actualmente reclasificado como *Aneurinibacillus migulanus*) se identificó un segundo sistema de desaturación, el cual dio como resultado la generación del doble enlace alrededor de la posición 9 ⁵. *B. licheniformis* 9259 fue la única cepa en donde se encontraron AG con el doble enlace en la posición $\Delta 5$ y en la posición $\Delta 10$. Estos dos sistemas fueron luego diferenciados por la manera en que respondían a los cambios en la temperatura del medio, analizándose principalmente aquellos presentes en las cepas *B. licheniformis* 9259 y *B. megaterium* 14581.

En estos estudios se encontró que *B. licheniformis* 9259 es capaz de producir AG monoinsaturados $\Delta 10$ a 37°C y a 20°C, y que sintetiza además, monoinsaturados $\Delta 5$ y di-insaturados $\Delta 5,10$, pero sólo a 20°C. La evidencia derivada de sus experimentos, en los cuales se realizó una incubación previa del cultivo con diferentes sustratos a 20°C, sugirió que el sistema de desaturación $\Delta 5$ estaría siendo inducido por la disminución de la temperatura. Por lo tanto concluyeron que el sistema que genera el doble enlace en la posición 10 se encontraba activo tanto a altas como a bajas temperaturas, mientras que el sistema responsable de la inserción de la doble ligadura $\Delta 5$ era activo sólo a bajas temperaturas. La operación simultánea de las dos actividades desaturadoras a 20°C sería la responsable de la síntesis de los AG di-insaturados $\Delta 5,10$ ⁸⁹.

Además de Fulco, en la década del '70, T. Kaneda también centró sus investigaciones en el estudio de la composición lipídica del grupo *cereus* y de los psicrófilos del género *Bacillus*. Mediante sus experimentos observó que la cepa *B. cereus*

Introducción

PRLB-108 es bastante inusual dentro del grupo, ya que produce una alta proporción de AGI, además de los AGR. Cuando las células se cultivaban a 37°C los principales AG detectados eran los saturados y un bajo porcentaje de AGI, todos con el doble enlace en configuración $\Delta 10$. En cambio, cuando se sometía a las células al crecimiento a temperaturas bajas entre los 32°C y 21°C, se veía un aumento de la proporción de los AGI $\Delta 10$, como la aparición de un nuevo isómero, el $\Delta 5$. Este grupo de trabajo propuso que *B. cereus* podría tener dos sistemas de desaturación diferentes. Uno responsable de la generación de los dobles enlaces en la posición 10, el cual vería aumentada su actividad al disminuir la temperatura de crecimiento; y otro sistema que produciría AGI $\Delta 5$ sólo cuando es inducido por una disminución en la temperatura ⁸.

Fulco y Kaneda fueron los primeros en apreciar lo sorprendente de que aún cepas muy similares de bacilos pueden producir isómeros del ácido hexadecanóico diferentes. Basado en estas observaciones y en el alto grado de homología de secuencias de estas bacterias, es que se planteó que la caracterización funcional de las distintas desaturasas presentes en cepas del género *Bacillus* (con actividades diferentes y un alto grado de similitud a nivel de secuencia primaria) constituye una oportunidad para el entendimiento de las bases moleculares que rigen el reconocimiento de la longitud de cadena y la posición final de la introducción de los dobles enlaces (regioselectividad) en los AG. El género *Bacillus* resulta entonces indicado como fuente de desaturasas parálogas para un estudio de estructura-función comparativo.

2.4.1 – La desaturasa de *Bacillus subtilis*.

Nuestro grupo de trabajo se ha focalizado en el estudio de la biosíntesis y función de los lípidos de membrana en *Bacillus spp.* desde 1990. Se ha demostrado, mediante diversos experimentos bioquímicos y genéticos, que *B. subtilis* posee una única acil lípido desaturasa codificada por el gen *des* ^{45,90}. Esta enzima cataliza la introducción de un doble enlace en la posición $\Delta 5$ de un gran número de AGS ³. La mutante obtenida en el gen *des* demostró que el mismo no es esencial para el crecimiento de *B. subtilis* a ninguna temperatura. La esta proteína codificada por dicho gen se designó $\Delta 5$ -Des. $\Delta 5$ -Des posee baja identidad de secuencia con las desaturasas de membrana de cianobacterias y plantas ⁴⁵. Posee las tres cajas de histidina características de unión al hierro que forman el sitio activo de la enzima ⁴⁵ y una cuarta caja hacia el extremo carboxilo terminal, ausente en otras desaturasas, pero esencial para la catálisis ⁹¹. La secuencia de AA presenta varias

Introducción

regiones hidrofóbicas y el perfil de hidropatía es similar a los perfiles de desaturasas de cianobacterias y plantas. Mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida y construcción de proteínas de fusión se determinó que la topología de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis* no concuerda con el modelo estructural aceptado para desaturasas de membrana ⁴⁴ y predicho para esta desaturasa mediante análisis de hidropatía. De esta manera, surgió un nuevo modelo para describir la topología de esta enzima, en el cual aparecen dos dominios transmembrana adicionales (Figura 9). Este modelo fue validado mediante experimentos de marcación con biotina de determinados residuos, que permite identificar segmentos externos de las proteínas integrales de membrana ⁹¹. Así, se determinó que esta desaturasa posee seis dominios transmembrana y un dominio asociado que estarían involucrados en el mantenimiento del sitio activo del lado citoplasmático de la membrana cercano a los sustratos ⁹¹ (Figura 9). Por otro lado, mediante ensayos de mutagénesis sitio dirigida se determinó que las histidinas conservadas (His-80, His-116 y His-274) son esenciales para la catálisis, ya que el cambio de las mismas por alanina eliminó completamente la actividad desaturasa *in vivo* ⁹¹.

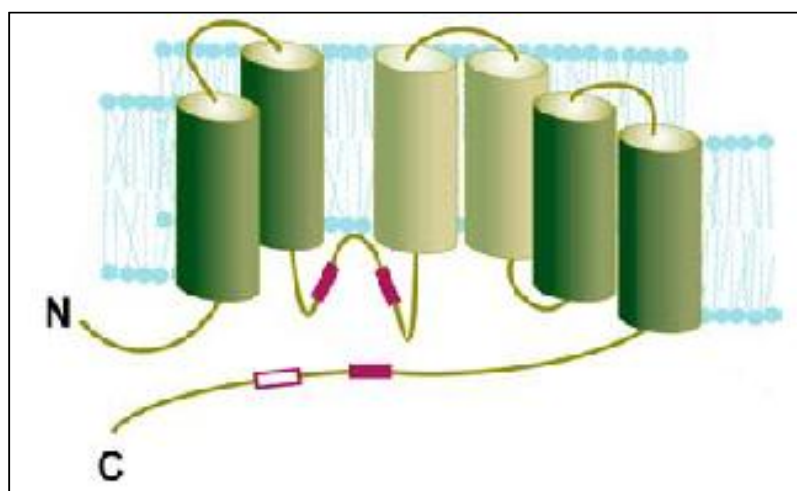


Figura 9. Modelo topológico de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis*. Los cilindros en verde claro indican los dominios transmembrana adicionales no presentes en el modelo de la desaturasa de rata. Los rectángulos rosa representan las regiones conservadas ricas en histidina esenciales para la actividad enzimática. El rectángulo blanco representa el cuarto segmento rico en histidina (Adaptado de ⁴⁹).

Otro aspecto importante estudiado en nuestro laboratorio fue la identificación de las proteínas dadoras de electrones que, como se mencionó anteriormente, son necesarias para la introducción del doble enlace. Durante estos estudios identificamos en el genoma de *B. subtilis* tres proteínas que podrían actuar como transportadoras: una Fd codificada por el

gen *fer*⁹² y dos flavodoxinas (Fld) presentes en el operón *ykuNOP*⁹³. En estudios de mutagénesis de los correspondientes genes realizados durante el desarrollo de mi trabajo final de grado se determinó que las tres proteínas están involucradas en el transporte de electrones hacia la $\Delta 5$ -Des⁹⁴. Mutantes en el gen *fer* o en el operón *ykuNOP* presentan una disminución del 30% en la desaturación del ácido palmítico comprado con la cepa salvaje. En la cepa doble mutante la síntesis de AGI está completamente abolida. Nuestros resultados establecieron que la Fd y las dos Fld pueden funcionar como dadores de electrones fisiológicos en el proceso de desaturación. Si bien se sabe que las Fld participan en numerosos procesos redox, ésta fue la primera vez que se determinó que las mismas pueden actuar como proteínas transportadoras de electrones hacia una desaturasa y en conjunto con la Fd permitir la biosíntesis de AGI en *B. subtilis*⁹⁴.

2.4.1.1 – La vía Des de *Bacillus subtilis*.

En bacterias, el mecanismo de adaptación al frío mejor caracterizado hasta el momento es el circuito Des de la bacteria Gram positiva *B. subtilis*⁹⁵. *B. subtilis* responde a las disminuciones en la temperatura de crecimiento usando una doble estrategia para restaurar la fluidez de membrana. Por un lado, existe una respuesta a largo plazo que aumenta la proporción de AGR saturados y por otro hay una inducción rápida de la desaturasa $\Delta 5$ -Des que introduce un doble enlace en las cadenas acilo de los FL preexistentes^{3,4,45,96}. Esta adaptación requiere la participación de un sistema de dos componentes canónico que involucra una histidina quinasa, DesK y un regulador de respuesta, DesR⁴. Este mecanismo de transducción de señales, llamado vía Des, aumenta la expresión del gen *des*, que codifica para la proteína $\Delta 5$ -Des, en respuesta a una disminución en la temperatura de crecimiento⁹⁵. La proteína DesK de *B. subtilis* contiene cinco segmentos transmembrana que definen el dominio sensor⁹⁷ y una cola citoplasmática C-terminal larga que posee el dominio quinasa, DesKC. Estudios genéticos, fisiológicos y bioquímicos demostraron que DesK es una enzima bifuncional, que posee actividad quinasa y fosfatasa y que puede adoptar diferentes estados de señalización dependiendo de los cambios en la fluidez de la membrana^{4,98-100}. El estado quinasa dominante de DesK predomina cuando hay un aumento en la proporción de lípidos de membrana ordenados. Como consecuencia de la precepción de este estímulo DesK se autofosforila en el residuo de histidina His188 y, a continuación, el grupo fosforilo es transferido al regulador de respuesta citoplasmático, DesR que se fosforila en el residuo de

Introducción

aspartato Asp54⁹⁸. DesR fosforilado (DesR-P) se une de manera cooperativa y jerárquica a dos sitios de unión a DesR-P en el ADN, adyacentes y no idénticos. Esto genera un desplazamiento hacia la formación de un tetrámero activo de DesR¹⁰¹ y al consiguiente reclutamiento de la ARN polimerasa al promotor de *des* lo cual activa la transcripción de dicho gen, como se demostró *in vitro*¹⁰¹. Finalmente, se expresa la proteína $\Delta 5$ -Des la cual desatura las cadenas acilo de los FL de membrana. Los AGI generados disminuyen la temperatura de transición de fase de los FL favoreciendo el estado fosfatasa de DesK lo cual resulta en la hidrólisis de DesR-P. El regulador desfosforilado no puede unirse al promotor *des* y, por lo tanto, finaliza la transcripción de este gen (Figura 10).

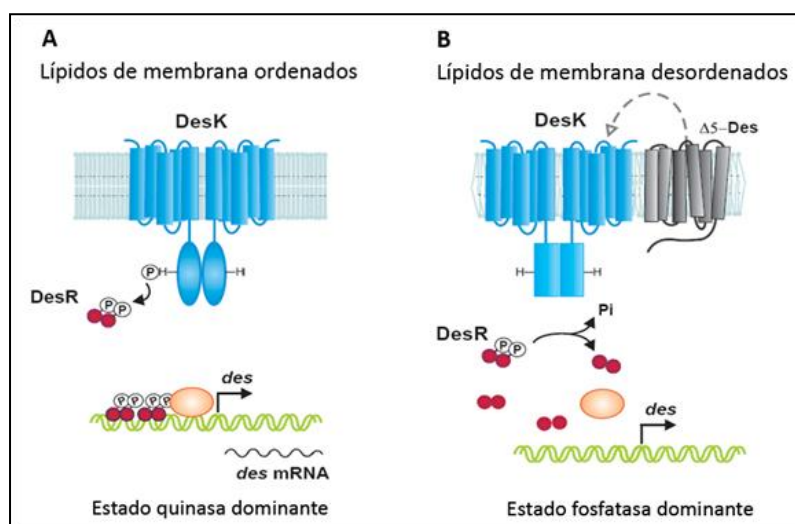


Figura 10. Modelo para el mecanismo regulador de la expresión de *des*. A) Cuando se reduce la fluidez de la membrana, ya sea por una disminución en la temperatura o de la proporción de AGR se induce la actividad quínasa de DesK. La unión cooperativa de DesR-P permite la interacción con la ARN polimerasa, resultando en la activación de la transcripción de *des* que conduce a la síntesis de Des. B) Des introduce dobles enlaces en las cadenas de acilo de los FL de membrana. Estos AGI recién sintetizados provocan un incremento en la fluidez de la membrana, favoreciendo la actividad fosfatasa de DesK. La concomitante defosforilación de DesR resulta en una disminución de la transcripción del gen *des*.

Diferentes experimentos aportaron evidencias de que es la fluidez de membrana y no la temperatura de crecimiento el factor que controla la transcripción del gen *des*¹⁰². En estos experimentos se modificó la proporción de AGR en la membrana de *B. subtilis* variando la cantidad de los AA precursores de los mismos¹⁰³. La disminución del AA isoleucina, precursor de los AGR de la serie anteiso, en el medio de cultivo reduce significativamente la cantidad de AGR anteiso en la membrana celular¹⁰⁴, resultando en un aumento de la proporción de lípidos ordenados. El crecimiento de *B. subtilis* en ausencia

Introducción

de isoleucina resultó en la activación de la transcripción del gen *des* en condiciones isotérmicas utilizando el circuito DesK/R¹⁰³. Por lo tanto, un aumento en el orden de los lípidos de membrana debido a una reducción de los AGR derivados de la isoleucina a temperatura constante, o una disminución en la temperatura de crecimiento a composición lipídica constante, pueden ser percibidos por DesK, dando como resultado la inducción en la síntesis de AGI.

La tasa de crecimiento a bajas temperaturas en MM de *B. subtilis* mutante en el gen *des* es mucho menor que para la cepa salvaje¹⁰⁵. Sin embargo, este fenotipo se revierte cuando se agrega el AA isoleucina al medio de cultivo. Esto se debe a que este AA es precursor de los AGR de la serie anteiso como se mencionó anteriormente y los mismos tienen propiedades biofísicas similares a los AGI¹⁰³. Así, ante el agregado de isoleucina al medio, se estaría restaurando la correcta fluidez de membrana aún en ausencia de Des. Estos resultados significaron un aporte muy importante ya que caracterizaron al sistema Des como un detector de la fluidez de la membrana y no sólo un sensor de la temperatura de crecimiento¹⁰³.

Por otro lado, se ha determinado que *B. subtilis* puede crecer en anaerobiosis utilizando como aceptor final de electrones nitrato o nitrito. En condiciones anaerobias, la expresión del gen *des* también se activa a través del sistema DesK/R cuando disminuye la temperatura de crecimiento¹⁰⁶. Sin embargo, en estas condiciones no hay desaturación de los AG debido al estricto requerimiento de oxígeno por parte de estas enzimas. Por lo tanto, en condiciones anaerobias, la adaptación a bajas temperaturas está mediada exclusivamente por un aumento en la cantidad de AGR de la serie anteiso que permiten alcanzar niveles de fluidez similares a los hallados en condiciones aerobias¹⁰⁶. Si las células expuestas a bajas temperaturas en condiciones anaerobias se transfieren a condiciones aerobias, disminuye la expresión del gen *des*, ya que al sintetizarse AGI en los FL de la membrana, aumenta la fluidez y DesK adopta su conformación fosfatasa dominante, apagando la expresión de *des*.

3 – *Bacillus licheniformis*.

B. licheniformis es una bacteria Gram positiva, saprófita, comúnmente hallada en el suelo. *B. licheniformis* pertenece al grupo de *B. subtilis* (grupo II) del género *Bacillus*¹⁰⁷. Es un organismo productor y secretor de numerosas enzimas hidrolíticas, lo cual le permite degradar y crecer sobre una gran variedad de sustratos. Además tiene un metabolismo

Introducción

aerobio facultativo ampliando así los nichos que puede habitar. Es un organismo mesófilo y su temperatura óptima de crecimiento ronda los 30°C, aunque puede sobrevivir a altas temperaturas. La temperatura óptima para la secreción de enzimas es 37°C. La capacidad de secretar grandes cantidades de proteínas así como el hecho de que es una bacteria considerada segura desde el punto de vista de la salud humana ¹⁰⁸, han convertido a esta bacteria en un organismo atractivo para diversas aplicaciones biotecnológicas. Se ha utilizado a *B. licheniformis* en procesos fermentativos, por ejemplo en la producción de ATB y diferentes enzimas como proteasas y amilasas ¹⁰⁹. Las proteasas han sido utilizadas en la industria de los detergentes y los cueros y las amilasas en la industria textil y del papel. Algunas cepas aisladas de *B. licheniformis* pueden mitigar el efecto nocivo de los hongos en cultivos de maíz, hierbas y otros cultivos vegetales ¹¹⁰.

Dada la gran importancia de esta bacteria a nivel industrial y su cercanía a *B. subtilis*, en el año 2004 se secuenció completamente el genoma de la misma ¹¹⁰. La comparación con el genoma de *B. subtilis* reveló que son un 84,6 % idénticos a nivel de secuencia de nucleótidos y presentan una gran similitud en la organización de los genes. Sin embargo, existen regiones locales únicas en cada genoma, lo cual explicaría la habilidad de *B. licheniformis* para crecer en muchos sustratos diferentes y colonizar un amplio rango de nichos ecológicos.

El grupo *B. subtilis* - *B. licheniformis* incluye varias especies que son utilizadas para producir enzimas industriales, antibióticos (ATB) y químicos. La disponibilidad del genoma de *B. licheniformis* permitió realizar una comparación de las vías metabólicas y regulatorias con las de *B. subtilis*, lo cual derivó en el mejoramiento de cepas industriales.

Si bien *B. licheniformis* es considerada una bacteria no patógena, existen informes que la han implicado en como agente causal del envenenamiento por comida. En algunos casos aislados, se vio que algunas cepas específicas producían una toxina similar a la toxina emética sintetizada por *B. cereus* ¹¹¹.

4 – Grupo *Bacillus cereus*.

El grupo “*Bacillus cereus sensu lato*” está formado por bacterias Gram positivas que habitan principalmente el suelo, aunque pueden prosperar en diversos hábitats ¹¹². Se las puede encontrar asociadas a vegetales o como parte de la flora intestinal de animales, presentando diversas relaciones ecológicas. Tienen la capacidad de resistir condiciones

Introducción

severas debido a que pueden formar endo-esporas, estructuras especializadas resistentes al calor, deshidratación y otros tipos de estrés.

El grupo “*Bacillus cereus sensu lato*” ha sido dividido en siete “termotipos” en base a diferencias bien definidas en las temperaturas de crecimiento, virulencia, nichos ecológicos y datos moleculares (Tabla I). Estos siete grupos comprenden especies psicotolerantes (tolerante al frío), mesófilas y termotolerantes (tolerantes al calor).

TABLA I. Grupos genéticos de *Bacillus cereus sensu lato*.

Grupo	Especies	Asociado a intoxicaciones alimentarias	T	Resistencia de las esporas	Observaciones
I	<i>B. pseudomycooides</i>	NO	10-40°C	Desconocida	Mesófilas
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	SI	7-40°C	Mediana	25% mesófilas 75% psicotolerantes
III	<i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III, <i>B. anthracis</i>	SI	15-45°C	Alta	Mesófilas
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	SI	10-45°C	Mediana	Mesófilas
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	SI	8-40°C	Mediana	Mesófilas
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i>	NO	5-37°C	Baja	Psicotolerantes
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	SI	20-50°C	Alta	Termotolerantes

La tabla I presenta las principales características de los siete grupos de *B. cereus sensu lato*. Adaptado de ^{113,114}.

B. cereus sensu stricto (*B. cereus*) es la bacteria modelo del grupo y abarca cuatro termotipos, entre psicotolerantes y mesófilas ¹¹³. Las otras especies del grupo son: *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* y *B. cytotoxicus*. *B. thuringiensis* es un patógeno de insectos y se lo asocia esporádicamente a cuadros gastrointestinales en humanos. *B. anthracis* es el agente causante del ántrax, asociado a cuadros cutáneos, pulmonares y gastrointestinales. Las especies *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* y la psicotolerante *B. weihenstephanensis*, son organismos ubicuos y comunes del suelo y su patogenicidad no está totalmente esclarecida ¹¹³. *B. mycooides* y *B. pseudomycooides* se diferencian de *B. cereus sensu stricto* por la forma de las colonias y la composición de AG ¹¹⁵, mientras que *B. weihenstephanensis* se caracteriza por su habilidad de crecer a temperaturas menores de 7°C pero no a 43°C ¹¹⁶. *B. cytotoxicus* es la única

Introducción

especie termotolerante del grupo y es un patógeno que causa enfermedades transmitidas por los alimentos ¹¹⁷.

Las cepas de *B. cereus sensu stricto* se encuentran frecuentemente en alimentos causando deterioro y enfermedades transmitidas por los mismos. Sus esporas, altamente adhesivas, provocan que se propague a todo tipo de alimentos. Produce una gama de factores de virulencia que pueden causar enfermedades en los seres humanos, aunque en la mayoría de los casos eméticos o diarreicos la sintomatología es leve y de corta duración. Sin embargo, en algunas ocasiones puede producir tanto cuadros intestinales como infecciones severas fundamentalmente asociadas a las toxinas eméticas ^{115,118}. Cuando tiene acceso a los tejidos de mamíferos, se trata de un patógeno oportunista que puede causar severas infecciones locales o sistémicas, como oftalmitis y septicemias, entre otras. ^{112,115}. Existen cepas de *B. cereus* de variada toxicidad y otras utilizadas como probióticos en humanos ¹¹⁹ o como simbiosis en plantas ¹²⁰. La mayoría de los brotes de intoxicación por alimentos han sido causados por las cepas mesófilas ¹¹³ que pueden crecer a temperaturas tan bajas como 10°C. Esta característica permite inicialmente la presencia de bajos niveles de *B. cereus* en los alimentos que puede aumentar en condiciones sub óptimas de refrigeración. El origen de los alimentos y la temperatura aplicada durante el procesamiento y almacenamiento de los mismos tiene un efecto selectivo diferencial sobre las cepas bacterianas del grupo, fuertemente relacionado con sus características térmicas específicas mencionadas anteriormente. Esto sugiere que las cepas han ido adaptándose paulatinamente para crecer en ambientes más fríos. El conocimiento de los mecanismos por los cuales *B. cereus* es capaz de crecer a bajas temperaturas podría contribuir a controlar la multiplicación bacteriana en alimentos refrigerados y prevenir brotes de intoxicación alimentaria.

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los organismos poiquilotermos, un mecanismo de adaptación rápida a los cambios de temperatura es la síntesis de AGI. Los AGI son sintetizados por desaturasas que introducen dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los AG, por lo que estas enzimas juegan un papel importante durante el proceso de adaptación a bajas temperaturas de crecimiento. En un estudio bioinformático realizado en nuestro laboratorio sobre los genomas de 250 aislamientos de *B. cereus*, se halló un número variable de genes que codifican para acil lípido desaturasas putativas y otros con homología a acil ACP desaturasas. Esto convierte al grupo *B. cereus* en un modelo extremadamente atractivo para estudiar los mecanismos moleculares de la reacción

Introducción

que estas enzimas catalizan y otros aspectos relevantes que afectan la actividad de las mismas.

Dado que las acil lípido desaturasas se encuentran unidas a membrana, los progresos en el entendimiento de su estructura y función están retrasados con respecto a su contrapartida de desaturasas solubles, debido en parte a la dificultad para obtener cantidades suficientes de proteína homogénea y activa para los estudios *in vitro*, así como para su cristalización. El clonado y caracterización funcional de las desaturasas permitirá establecer una correlación entre la estructura primaria y la actividad que catalizan. Además estas desaturasas constituyen una oportunidad para el entendimiento de la base molecular del reconocimiento de la longitud de la cadena y la posición final de los dobles enlaces (regioselectividad) en los AG. Los resultados que se obtengan de estos estudios podrían contribuir al diseño de desaturasas capaces de producir nuevos isómeros de AG monoinsaturados, útiles para la industria.

En este trabajo de Tesis se realizó la caracterización funcional de las desaturasas presentes en cepas de *B. cereus* y *B. licheniformis* y se comenzó a establecer el rol de las desaturasas en la adaptación a bajas temperaturas. La caracterización de nuevas desaturasas permitirá profundizar el conocimiento que se tiene sobre ellas, establecer la relación entre estructura y función entre enzimas con diferente especificidad y regioselectividad que permitan ir comprendiendo las bases moleculares de estas diferencias en las actividades enzimáticas y las relaciones entre estructura y función tan difíciles de determinar en proteínas de membrana.

Por otro lado, determinar de qué manera se sintetizan los AGI y el rol de las desaturasas, podría conducir a establecer roles inesperados de estos AG en la fisiología de la membrana, la síntesis de factores de virulencia y su excreción y establecer el rol de los mismos en los mecanismos de infección.

Una comprensión global de los mecanismos bioquímicos de estas enzimas podría contribuir al diseño racional de la funcionalidad deseada para aplicaciones que van desde la ingeniería de semillas oleaginosas a la terapéutica y puede ser un esfuerzo útil para optimizar la producción de AG inusuales en organismos de producción.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Durante este trabajo de Tesis se propone identificar y caracterizar las desaturasas presentes en bacterias del género *Bacillus* con el objetivo de determinar las bases moleculares de la especificidad de sustrato y la regioselectividad (habilidad para reconocer el número de átomos de C y localizar la posición donde será introducido el doble enlace) de las mismas. Se estudiarán además otros aspectos relevantes que afectan la actividad enzimática como los componentes del sistema de dadores de electrones y el efecto de la temperatura sobre la síntesis de AGI. Finalmente se analizará la esencialidad de las desaturasas para el crecimiento bacteriano y el impacto de la mutación de los genes que codifican las desaturasas sobre la síntesis de AGI.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Caracterizar funcionalmente a las desaturasas del género *Bacillus*.
- 2) Identificar la naturaleza de los sustratos de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.
- 3) Identificar y caracterizar el sistema dador de electrones de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.
- 4) Evaluar la esencialidad de la desaturasas para el crecimiento de *B. cereus*. Estudiar el impacto de las mutaciones en los genes *des* sobre la síntesis de AGI.
- 5) Determinar el efecto del agregado de ATB sobre la transcripción y traducción de los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* frente al cambio de temperatura.
- 6) Determinar los sitios de inicio de la transcripción de los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.
- 7) Dilucidar los mecanismos de regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* con la temperatura.
- 8) Analizar la influencia de los AG y del sistema DesK/R de *B. subtilis* sobre la expresión de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.
- 9) Analizar los niveles de ARNm de los genes *des* en las cepas salvajes y mutantes durante la adaptación al frío.

Materialles y Métodos

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1 – Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos.

1.1 – Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla II.

Tabla II. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>		
JH642	<i>trpC2; pheA1</i>	121
LC5	JH642 <i>des::Kan^r</i>	3
LC81	JH642 <i>desKR::Kan^r</i>	Cibulsky, comunicación personal
LSC204	JH642 <i>des::Sp^r; desKR::Kan^r</i>	Este trabajo
LSC116	LC5 <i>amyE::pJM116; Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC2983	LC5 <i>amyE::PdesA; Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC0400	LC5 <i>amyE::PdesB; Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC2106	LC5 <i>amyE::PdesL; Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC2692	LC5 <i>amyE::PdesX; Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
MA2983	LC5 <i>amyE::Pxyl-desA; Kan^r Sp^r</i>	Mariana Alemany Trabajo de Tesina
MA0400	LC5 <i>amyE::Pxyl-desB; Kan^r Sp^r</i>	Mariana Alemany Trabajo de Tesina
MA2106	LC5 <i>amyE::Pxyl-desL; Kan^r Sp^r</i>	Mariana Alemany Trabajo de Tesina
MA2692	LC5 <i>amyE::Pxyl-BL02692; Kan^r Sp^r</i>	Mariana Alemany Trabajo de Tesina
L43	JH642 <i>fer::Kan^r</i>	94
LSC28	L43 <i>ykuNOP::Pspac-ykuNOP PykuNOP-lacZ Kan^r Erm^r Lm^r</i>	94
LSA43	L43 <i>des::Sp^r Kan^r</i>	Este trabajo
LSA28	LSC28 <i>des::Sp^r Kan^r Erm^r Lm^r</i>	Este trabajo
LSA4383	LSA43 <i>amyE::PdesA Sp^r Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSA4300	LSA43 <i>amyE::PdesB Sp^r Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSA4321	LSA43 <i>amyE::PdesL Sp^r Kan^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSA2883	LSA28 <i>amyE::PdesA Sp^r Kan^r Er^r Lm^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSA2800	LSA28 <i>amyE::PdesB Sp^r Kan^r Er^r Lm^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSA2821	LSA28 <i>amyE::PdesL Sp^r Kan^r Er^r Lm^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC16	MA2983 <i>plsC::Pspac-plsC, Kan^r Sp^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC17	MA0400 <i>plsC::Pspac-plsC, Kan^r Sp^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC18	MA2106 <i>plsC::Pspac-plsC, Kan^r Sp^r Cm^r</i>	Este trabajo
LSC77	LC5 <i>amyE::PdesA-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC60	LC5 <i>amyE::PdesB-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC81	LC5 <i>amyE::PdesL-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC78	JH642 <i>amyE::PdesA-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC61	JH642 <i>amyE::PdesB-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC82	JH642 <i>amyE::PdesL-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC79	LSC204 <i>amyE::PdesA-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo
LSC62	LSC204 <i>amyE::PdesB-lacZ; Cm^r</i>	Este trabajo

Materiales y métodos

LSC83	LSC204 <i>amyE::PdesL-lacZ</i> ; Cm ^r	Este trabajo
<i>Bacillus cereus</i>		
ATCC 14579	Silvestre	122
LCER2983	<i>B. cereus desA::Sp^r</i>	Este trabajo
LCER0400	<i>B. cereus desB::Kan^r</i>	Este trabajo
LCER2904	<i>B. cereus desA::Sp^r desB::Kan^r</i>	Este trabajo
LCER2983C	<i>B. cereus</i> LCER2983; pHT2983, Er ^r	Este trabajo
LCER0400C	<i>B. cereus</i> LCER0400; pHT0400, Cm ^r	Este trabajo
<i>Bacillus licheniformis</i>		
ATCC 14580	Silvestre	110
<i>Aneurinibacillus migulanus</i>		
NRS-1137T	Silvestre	5
<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>		
NRS-1589	Silvestre	123
<i>Brevibacillus brevis</i>		
ATCC 8246	Silvestre	123
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		
ATCC 842	Silvestre	124
<i>Lysinobacillus sphaericus</i>		
WHO 1883	Silvestre	BGSC
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> D M115) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Colección lab.
C600	<i>F tonA21 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 glnV44 rfbC1 fhuA1 λ</i>	Colección lab.

Amp: ampicilina; Cm: cloranfenicol; Kan: kanamicina; Sp: espectinomycinina; Er: eritromicina; Ln: lincomicina

Las cepas de interés fueron congeladas a -80°C en tubos crioviales al 20% de glicerol estéril a partir de un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB.

1.2 – Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis se listan en la tabla II

Tabla III. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pCR-Blunt II-TOPO	vector para el clonado y secuenciación de productos de PCR	Invitrogen
pGEMT-easy	vector para el clonado y secuenciación de productos de PCR	Promega

Materiales y métodos

pDesSp	<i>B. subtilis des::Sp^f</i> clonado en pBluescript	Cecilia Mansilla, comunicación personal
pJM114	Vector de integración; Kan ^r	Cita Perego
pJM134	Vector de integración; Sp ^f	Cita Perego
pJM116	Vector para generar fusiones transcripcionales al gen reportero <i>lacZ</i> . Al transformar <i>B. subtilis</i> se integra en el locus <i>amyE</i> ; resistencias Amp, MLS	125
pSG1154	Vector para crear fusiones traduccionales al extremo N terminal de la proteína fluorescente verde. Al transformar <i>B. subtilis</i> se integra en el locus <i>amyE</i> ; resistencias Amp, Spc	126
pDH88	Vector integrativo de <i>B. subtilis</i> , Cm ^r	127
pORI-Cm	Vector para generar deleciones génicas, Cm ^r	128
pHT315	Vector replicativo en bacterias Gram positivas. Er ^r	129
pLP6	<i>Pspac::plsC</i> clonado en pDH88, Cm ^r	130
pLC2983	pCR-Blunt II-TOPO conteniendo un fragmento de 1479 pb correspondiente al gen <i>desA B. cereus</i> y a la región corriente arriba del mismo.	Este trabajo
pLC0400	pCR-Blunt II-TOPO conteniendo un fragmento de 1433 pb correspondiente al gen <i>desB B. cereus</i> y a la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pLC2106	pCR-Blunt II-TOPO conteniendo un fragmento de 1398 pb correspondiente al gen <i>desL B.licheniformis</i> y a la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pLC2692	pCR-Blunt II-TOPO conteniendo un fragmento de 1242 pb correspondiente al gen <i>desX B.licheniformis</i> y a la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pJM2983	pJM116 conteniendo un fragmento de 1479 pb, correspondientes al gen <i>desA B. cereus</i> más 435 pb de la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pJM0400	pJM116 conteniendo un fragmento de 1433 pb, correspondientes al gen <i>desB B. cereus</i> más 324 pb de la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pJM2106	pJM116 conteniendo un fragmento de 1398 pb, correspondientes al gen <i>desL</i> de <i>B. licheniformis</i> más 323 pb de la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pJM2692	pJM116 conteniendo un fragmento de 1242 pb correspondientes al gen <i>desX</i> de <i>B.licheniformis</i> más 180 pb de la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pLC77	pGEMT-easy conteniendo un fragmento de 352 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desA</i> de <i>B. cereus</i>	Este trabajo
pLC60	pGEMT-easy conteniendo un fragmento de 376 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desB</i> de <i>B. cereus</i>	Este trabajo
pLC81	pGEMT-easy conteniendo un fragmento de 336 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desL</i> de <i>B. licheniformis</i>	Este trabajo
pJM77	pJM116 conteniendo un fragmento de 352 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desA</i> de <i>B. cereus</i>	Este trabajo
pJM60	pJM116 conteniendo un fragmento de 376 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desB</i> de <i>B. cereus</i>	Este trabajo
pJM81	pJM116 conteniendo un fragmento de 336 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>desL</i> de <i>B.licheniformis</i>	Este trabajo
pLC100	pGEMT-easy conteniendo un fragmento de 628 pb correspondiente	Este trabajo

Materiales y métodos

	al extremo 5' del gen <i>desA</i> unido a un fragmento de 583 pb correspondiente al extremo 3' del mismo	
pLC101	pGEMT-easy conteniendo un fragmento de 615 pb correspondiente al extremo 5' del gen <i>desB</i> unido a un fragmento de 555 pb correspondiente al extremo 3' del mismo	Este trabajo
pLC102	pLC100 conteniendo un casete de resistencia a Sp entre los fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen <i>desA</i>	Este trabajo
pLC103	pLC101 conteniendo un casete de resistencia a Kan entre los fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen <i>desB</i>	Este trabajo
pORI-CmSp	pORI-Cm conteniendo las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen <i>desA</i> flanqueando un casete de resistencia a Sp	Este trabajo
pORI-CmKan	pORI-Cm conteniendo las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen <i>desB</i> flanqueando un casete de resistencia a Kan	Este trabajo
pHT2983	pHT315 conteniendo un fragmento de 1479 pb correspondiente al gen <i>desA</i> de <i>B. cereus</i> y a la región corriente arriba del mismo	Este trabajo
pHT0400	pHT315 conteniendo un fragmento de 1433 pb correspondiente al gen <i>desB</i> de <i>B. cereus</i> y a la región corriente arriba del mismo	Este trabajo

1.3 – Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo figuran en la tabla IV.

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia ^a	Restricción
12	GCTTTTTAGACATCTAAATGTAGGTA	-
13	AACAGTGAATTGGAGTTCGCTTGTTATA	-
41	ATTGGATCCTTTATTCTCCATTCGTG	BamHI
42	GAAAAGCTTCTTATCGTCAGGCG	HindIII
43	CATAGGGATCCAGGGAGAGAG	BamHI
44	ACTGCCTATTAGCATGCATTATG	SphI
53	CCGAATTCGCAATTATAGTTCAGATTTAC	EcoRI
55	TCATTGCAAGAATTCATTAATTTTTACTG	EcoRI
60	GAATTC AATCCTTATGGAATCTATACA	EcoRI
61	GAATTCAGCAATACATCAACAGCAT	EcoRI
77	GAATTCGTGCAGTGTGGCTTCATC	EcoRI
78	AAGCTTCTAAGGTCATTGTTCTAATTC	HindIII
80	AAGCTTGTGATACACGTGCTGCAT	HindIII
81	GAATTCCTCCATTCGTGACATATGAA	EcoRI
82	AAGCTTTGGTTTGTTCAGTCATAGTAAAG	HindIII
92	AATATGTGAAAGCGGCAGTG	-
93	CCCAAAGACGGAAACGTAGT	-
94	GCAACAAATCACCGCTTAAA	-
95	TTTTGTCATCGGCATCTCAT	-
96	CCTTATCTTCAATGGCAGCA	-
97	TTCCGTCTTGCTCCTTTTT	-
98	GTCAGCTCGTGTGTCGTGAGAT	-
99	CGGTCTTGCAGCTCTTTGTA	-
100	GGTCGCAAGACTGAAACTCA	-

Materiales y métodos

101	ATCTCACGACACGAGCTGAC	-
102	ACTGACAAACTTTTATAAGCAAGGTA	-
103	ACGATTGTGTTGATCAGTTGCCAAA	-
104	TTAATCCCGCCAATGCCACAAGC	-
105	GCCAGTCCACCAAATAAACGAGTA	-
106	CTAAAGTAAGGAGATAGGAGACATTGA	-
107	AGGCAAGAAACCACAGTCCGAAGA	-
108	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	-
109	<u>TCGGATCCAGAGGCAATTGTAGGG</u>	BamHI
110	ATT <u>CTCGAGGGTCATTGTTCTAATTCC</u>	XhoI
111	TCTCTCGAGGTGAAATCTGAACTATAATTG	XhoI
112	<u>GGATCCTGGGAAGTACATAACATTGA</u>	BamHI
113	TTGTATGGTATGCGGATCAAAGC	-
114	<u>GAATTCTATCACTTGTCAATTGTGGAAAC</u>	EcoRI
115	<u>CTCGAGCTCCTTCATCCTTTTGCT</u>	XhoI
116	GAAAAG <u>CTCGAGAAAAAAGTAAATCAGTAA</u>	XhoI
117	<u>GAATTCATCCGTTGTTGTTTTTCAC</u>	EcoRI
118	CAGCACCGATAATAGCAACTTTC	-
Sp5'out	AGATCCAAAAAGATAATCTCATG	-
Sp3'out	ATATTGAACAATTTTTGGGAAG	-

^aLa secuencia se indica desde la posición 5' a 3'. Las bases subrayadas corresponden al sitio de restricción presente en el oligonucleótido.

2 – Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Brevibacillus brevis*, *Aneurinibacillus migulanus*, *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Paenibacillus polymyxa*, *Lysinobacillus spahericus* y *B. licheniformis* se cultivaron a 37 °C (a excepción que se indique lo contrario) en medios líquidos con agitación o bien en medios sólidos. Para la obtención de estos últimos se adicionó agar al 1,5 % al respectivo medio líquido.

Medios de cultivo

Sales de Spizzen (SPI) 10X, su composición cada 100 ml es la siguiente ¹³¹:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	14 g
KH ₂ PO ₄	6 g
Na ₃ citrato.2H ₂ O	1 g

Medio mínimo (MM), cada 100 ml contiene:

SPI 10X	10 ml SPI 1X
Glucosa 50 %	1 ml

Materialles y métodos

FeCl ₂ .6H ₂ O 100 X	1 ml
Trazas minerales 100X	1 ml
MgSO ₄ 1M	100 µl

Suplementado con los AA requeridos para cada cepa en particular.

Trazas minerales, utilizadas para la preparación de medios mínimos. Contiene los siguientes compuestos por litro de solución:

MgCl ₂ .6H ₂ O	125 mg
CaCl ₂	5,5 mg
MgCl ₂ .4H ₂ O	1 mg
ZnCl ₂	1,7 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,43 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,6 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,6 mg

Luria Bertani (LB)

Triptona	10,0 g / l
Extracto de levadura	5,0 g / l
NaCl	5,0 g / l

Bacto Caldo de Soja Tríplica (TSB)

Digerido pancreático de caseína	17 g/l
Digerido papaínico de soja	3 g/l
Dextrosa	2,5 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Fosfato dipotásico	2,5 g/l

Medios de transformación de *B. subtilis*

GMI su composición es la siguiente:

Glucosa	0,5 % p/v
CAA	0,02 % p/v
Triptofano	0,05 mg/ml
Fenilalanina	0,05 mg/ml

Materiales y métodos

Extracto de levadura	0,01 % p/v
MgSO ₄	5 mM
Sales SPI 10X	c.s.p. 1X

GMI se compone de:

Glucosa	0,5 % p/v
CAA	0,02 % p/v
Triptofano	0,05 mg/ml
Fenilalanina	0,05 mg/ml
MgSO ₄	5 mM
CaCl ₂	0,04 mM
Sales SPI 10X	c.s.p. 1X

Medio de recuperación (SOC), su composición por litro es ¹³²:

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,186 g
MgCl ₂	0,95 g
Glucosa	3,6 g

Medios de transformación de *B. cereus*

Medio de electroporación, se compone de:

Sacarosa	250 mM
Hepes	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Glicerol	10%
H ₂ O	c.s.p.

Medio de recuperación, se compone de:

Sacarosa	250 mM
MgCl ₂	5 mM
MgSO ₄	5mM

Materiales y métodos

TBS

c.s.p.

Antibióticos, inductores y suplementos

Los suplementos e inductores se agregaron a los medios de cultivos correspondientes en las siguientes concentraciones:

Xilosa	0,1 %
Aminoácidos	0,01 %
IPTG	0,5 mM

Los ATB se agregaron a los medios de cultivos correspondientes en las concentraciones que se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Concentración de antibióticos empleadas.

ATB	<i>E. coli</i> (µg/ml)	<i>B. subtilis</i> (µg/ml)	<i>B. cereus</i> (µg/ml)
Ampicilina (Amp)	100	-	-
Cloranfenicol (Cm)	7,5	5	7,5
Kanamicina (Kan)	-	5	10
Espectinomicina (Sp)	-	100	100
Eritromicina (Er)	-	1	25
Lincomicina (Ln)	-	25	-

3 – CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las curvas de crecimiento se realizaron inoculando medio líquido a una DO a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1 con las correspondientes cepas bacterianas, a partir de colonias aisladas. El volumen de medio de cultivo en ningún caso superó la quinta parte del volumen del recipiente. Se utilizaron baños termostatzados a 25, 30, 37 o 42°C según se indique y agitación vigorosa. El crecimiento del cultivo fue monitoreado midiendo la DO del mismo a 600 o 525 nm, según se especifica en cada caso.

Las curvas realizadas para la determinación del fenotipo de crecimiento en medio líquido de *B. cereus*, *B. licheniformis*, *P. polymyxa*, *A. migulanus*, *A. aneurinilyticus*, *B. brevis* y *L. sphaericus* se realizaron a 37°C en diferentes medios, según se indica en cada caso, en microplaca utilizando el equipo automatizado Synergy[®], con agitación fuerte y continua, determinando la DO₆₀₀ cada 0,5 h. Se realizó un inóculo de modo de obtener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 a partir de un cultivo crecido toda la noche en el mismo medio en un baño termostatzado a 37°C con agitación.

Materiales y métodos

4 – Técnicas de biología molecular.

4.1 – Extracción de ácidos nucleicos.

4.1.1 – Extracción de ADN cromosomal.

La extracción de ADN de alto peso molecular de *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis* se realizó siguiendo dos técnicas diferentes. Por un lado el cultivo líquido de la cepa de interés se incubó con agitación a 37 °C durante 14 horas en LB. Las células se recolectaron por centrifugación (3000 rpm, 10 min, 4 °C), luego se lavaron 2 veces con PBS (pH 7.2-7.4) y resuspendieron en 10 ml del mismo. A continuación, se centrifugaron las células hasta obtener un sobrenadante (SN) límpido y el pellet se resuspendió en 500 µl de sacarosa 25% en TEN. Posteriormente se realizó un tratamiento con lisozima (5 mg/ml) durante 2 h a 37°C en baño de agua con agitación frecuente. A la preparación se le agregó proteinasa K (1 mg/ml) y se incubó 30 min adicionales a 37 °C, para luego agregarle Sarkosyl 10% en TENS e incubar 2h a 55°C. Luego se agregó NH₄Ac 2.5M y se dejó precipitando toda la noche en la heladera. Posteriormente el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío y se recuperó de la interface enroscándolo en una varilla de vidrio. Se lavó el ADN con EtOH 70% v/v y tras evaporar el EtOH se resuspendió en H₂O destilada y se dejó hidratando toda la noche.

Como método alternativo se utilizó el kit DNAzol (Life Technologies), siguiendo las especificaciones del proveedor.

4.1.2 – Obtención de ADN plasmídico.

El ADN plasmídico se obtuvo a partir de las cepas de *E. coli* de interés utilizando los reactivos Wizard[®] Plus SV Minipreps-DNA Purification System (Promega).

4.1.3 – Obtención de ARN total.

El ARN se obtuvo a partir de las cepas de *B. cereus* y *B. licheniformis* de interés utilizando los reactivos Quick-Zol (Kalium) y Direct-Zol (Zymo Research). Brevemente, cuando los cultivos alcanzaron la DO₆₀₀ indicada en cada caso, las células se recibieron en tubos falcon conteniendo metanol frío, se centrifugaron y se lavaron con tampón TE. Luego se resuspendieron en 750 µl de Quick-Zol. La disrupción de las células se realizó con Bioruptor en las siguientes condiciones: potencia: alta; tiempo total: 7,5 min; pulsos: 15 seg ON – 15 seg OFF. Luego se guardaron los tubos a -80°C durante toda la noche. Al

Materiales y métodos

día siguiente, para finalizar con la extracción, se siguieron las especificaciones del proveedor del kit Direct-Zol.

Para evaluar la calidad y cantidad del ARN obtenido se realizaron medidas de absorbancia a 230, 260 y 280 nm. A continuación se sembraron 3,5 µg de ARN en un gel de agarosa al 1% utilizando el sistema tipo submarino ¹³² para evaluar la integridad del ARN.

4.2 – Reacción en cadena de la ADN polimerasa.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el siguiente medio de reacción para un volumen final de 50 µl: tampón taq polimerasa 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,05 mM cada uno, oligonucleótidos 0,4 µM cada uno, 2,5 U de taq polimerasa o pfu polimerasa. Se utilizaron los termocicladores Gene Amp (Parkin-Elmer, Shelton, CT, EEUU) o My Cycler (BioRad, EEUU).

Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) a partir de colonia.

Las colonias de *E. coli* o *B. subtilis* de interés se picaron con un palillo de madera y se resuspendieron en 40 µl de agua destilada en tubos de propileno de 500 µl. Para romper las células, las mismas se mantuvieron a 98°C durante 8 min. Posteriormente se centrifugaron los tubos durante 10 min a 7000 rpm con el fin de separar los sedimentos celulares. Como molde para las reacciones de PCR se tomaron 5µl del sobrenadante de cada uno de los tubos. El volumen final de reacción fue de 25 µl.

El programa de PCR utilizado para los dos métodos de PCR antes descritos fue:

1) Desnaturalización: 4 min a 95°C

2) Amplificación:

30 ciclos de $\left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ min a } 94^{\circ}\text{C} \\ 1 \text{ min a } 52^{\circ}\text{C} \\ 1 \text{ min a } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$

3) Extensión final: 10 min a 72°C

4.3 – Electroforesis en geles de agarosa.

La separación, purificación e identificación de moléculas de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando el sistema tipo submarino ¹³². Se usaron concentraciones de agarosa de 0,6, 0,8, 1 y 3,5 % p/v en buffer TAE 0,5X (TAE 50X: Tris-acetato 2 M pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0) y Gel Green 1X para visualizar el

Materiales y métodos

ADN. Las muestras se sembraron en una proporción 9:1 con solución de siembra 10X para ADN (Azul de bromofenol 0,25 % p/v, Xilene cianol 0,25 % p/v, Glicerol 30 % v/v). La corrida se llevó a cabo en buffer TAE 1X, con una intensidad de corriente de 100 mA. Se utilizó 1 µg de ADN del fago λ digerido con Hind III o con Bst EII como marcador de tamaño molecular. La visualización de la fluorescencia se realizó con un transiluminador de luz azul (UVP modelo M-20, potencia 48W). La imagen se digitalizó con el equipo BIO-RAD Gel Doc 1000 y el programa Molecular Analyst 1.4.1 (BioRad)

Recuperación de los ácidos nucleicos.

Las bandas de interés de los geles de agarosa se cortaron usando un bisturí estéril. Cada porción recuperada se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se utilizó el kit comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit (Qiagen)* para recuperar los ácidos nucleicos.

4.4 – Tratamiento con enzimas de restricción, fragmento Klenow y ligación de ADN.

Para el tratamiento con enzimas de restricción, el tiempo, la temperatura y la solución de corte usados fueron los recomendados por los proveedores de las enzimas. Se utilizó una concentración de ADN de 0,02-0,04 µg/µl, una concentración de enzima de 0,1-0,2 U/µl. Los volúmenes de reacción fueron de 25 a 50 µl.

El rellenado de extremos 3' de fragmentos de ADN se llevó a cabo con el fragmento Klenow siguiendo las especificaciones del proveedor.

Las ligaciones de los vectores y fragmentos cortados con endonucleasas de restricción con extremos cohesivos se hicieron siguiendo las indicaciones del proveedor de la enzima ADN ligasa T4 (*Promega*). Las reacciones se hicieron a volumen final de 10 µl.

4.5 – Secuenciación de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos se determinaron en el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (Estados Unidos). El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqMan II (DNASTAR Inc.).

4.6 – Transformación de células competentes.

4.6.1 – Transformación de *B. subtilis*.

Bajo determinadas condiciones metabólicas, *B. subtilis* adquiere la capacidad de tomar ADN exógeno, es decir, un estado de competencia natural. Este estado se alcanza en una etapa determinada del crecimiento bacteriano, generalmente en fase logarítmica tardía

Materiales y métodos

y depende de las condiciones nutricionales y de aireación del medio de cultivo. Los métodos de transformación utilizados están diseñados de manera tal que el cultivo alcance este estado. Para transformar *B. subtilis* se siguió el método descrito por Dubnau¹³³. La cepa de interés se cultivó durante toda la noche en medio líquido LB, a 30°C, con agitación. Al día siguiente, con 50 µl de este cultivo, se inocularon 2,5 ml de medio GMI y se cultivaron durante 5 h a 37°C con agitación. Posteriormente se realizó una dilución 1/10, en un volumen final de 1 ml, en medio GMII y se adicionó el ADN. En caso de ser necesario, el ADN se linealizó con una enzima de restricción adecuada. El cultivo se mantuvo 1 h y media con agitación a 37°C y luego se sembró en medio sólido LB selectivo.

4.6.2 – Transformación de *E. coli*.

A diferencia de *B. subtilis*, *E. coli* no adopta un estado de competencia natural por lo que, para ser transformadas con ADN plasmídico, las células deben ser convertidas en células competentes. Para preparar células de *E. coli* DH5α en estado de competencia, se largó un cultivo en medio LB de las mismas. Al día siguiente se realizó una dilución hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,1$ en un volumen final de 100 ml. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} entre 0,4 y 0,6, el mismo se colocó en hielo durante 10 min. Luego se centrifugó a 4°C durante 10 min a 5000 rpm. El sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en 32 ml de buffer TE. Se realizó una incubación de 10 min en hielo y se volvió a centrifugar a 4°C durante 10 min a 6000 rpm. El SN se descartó y el pellet se resuspendió en 8 ml de buffer TE. Se incubó 10 min en hielo y se fraccionó en tubos de polipropileno con un volumen final de 300 µl. Las alícuotas se conservaron a -70°C para su posterior uso o bien se usaron inmediatamente. Las células competentes se transformaron con ADN plasmídico de la siguiente manera: se colocaron 100 µl de bacterias competentes en presencia del ADN, se incubaron 20 min en hielo, 1 min a 44°C y 20 min en hielo y luego se sembraron en medio sólido LB selectivo.

4.6.3 – Transformación de *B. cereus*.

Para transformar *B. cereus* se siguió el método descrito por Turgeon¹³⁴, al cual se le realizaron algunas modificaciones con el objetivo de mejorar la eficiencia de transformación. La cepa de interés se cultivó durante toda la noche en medio líquido TSB, a 30°C, con agitación. Al día siguiente, se inoculó medio líquido TSB nuevo a una $DO_{600} =$

Materiales y métodos

0,1. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 0,4$ se agregó sacarosa 250 mM y se incubó 1 h más a la misma temperatura. Luego se recolectaron las células por centrifugación (15 min a 6000 rpm) y el pellet se lavó 5 veces con medio de electroporación. Luego las células se resuspendieron en un volumen de medio de electroporación de manera que quedaron concentradas 150 veces con respecto al cultivo inicial. Para la transformación se utilizaron 100 μ l de células que se pusieron en cubeta de electroporación junto con el ADN y 100 μ l glicerol 10%. El programa empleado emite un pulso de 1,8 kV en un tiempo de 2,5 mseg. A continuación se agregó 1 ml de medio de recuperación, se incubó 4 h a 30°C y se sembró en medio sólido TSA con 7,5 μ g/ml de Cm y se incubó 48 h a 30°C.

5 – Construcción de plásmidos y cepas de *B. subtilis*.

5.1 – Fusiones transcripcionales al gen *lacZ*.

Para construir las cepas que poseen fusiones de los promotores de los genes de las desaturasas al gen reportero *lacZ* se utilizó el vector pJM116¹²⁵ que contiene el gen *spoVG-lacZ* carente de promotor entre dos fragmentos del gen de *B. subtilis*, *amyE*, y el gen *cat* que confiere resistencia al ATB Cm. Los vectores de integración pJM77, pJM60 y pJM81 se construyeron mediante el clonado de un fragmento de PCR de 352 pb de la región promotora del gen *desA* amplificado por PCR usando los oligonucleótidos 77 y 78; un fragmento de 376 pb correspondiente a la región promotora del gen *desB* amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos 60 y 80 y un fragmento de 336 pb de la región promotora del gen *desL* amplificado usando los oligonucleótidos 81 y 82 (Tabla IV), respectivamente, en el sitio de múltiple clonado del vector pJM116. El ADN molde para las reacciones de PCR fue ADN genómico de las cepas salvajes de *B. cereus* y *B. licheniformis*. Luego de su separación mediante electroforesis en gel de agarosa, cada fragmento fue ligado en el vector pGEM®T-easy obteniendo los plásmidos pLC77, pLC60 y pLC81 (Tabla III). Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* competentes y se sembraron en placas selectivas. Debido a que el vector posee los sitios de hibridación para los oligonucleótidos de los bacteriófagos T7 y SP6, se enviaron clones para su secuenciación y el análisis de las secuencias se realizó con el programa Seqman II (DNASar). Una vez que se comprobó la correcta secuencia de los clones, se extrajo el fragmento del vector pGEM®T-easy mediante digestión con las enzimas que corresponden en cada caso, para su subsiguiente ligación en el vector pJM116 previamente tratado con las mismas enzimas de restricción y con la enzima fosfatasa alcalina del fago T4. A

Materiales y métodos

continuación se transformó la cepa de *B. subtilis* JH642, obteniéndose las cepas LSC78, LSC61 y LSC82 (Tabla II). También se transformó la cepa LC5 de *B. subtilis* obteniéndose las cepas LSC77, LSC60 y LSC81 y finalmente, al transformar la cepa de *B. subtilis* LSC204, se obtuvieron las cepas LSC79, LSC62 y LSC83. La integración exitosa en el locus *amyE* por recombinación homóloga fue corroborada mediante la selección de bacterias resistentes a Cm; y fue confirmada mediante la aparición del fenotipo amilasa negativo en células sembradas en placas de LB agar conteniendo almidón soluble. Para la construcción de la cepa de *B. subtilis* LSC204 se transformó la cepa LC81 que tiene interrumpido el operón *desK-desR* por un casete de resistencia a Kan con el plásmido pDesSp que posee el gen *des* interrumpido por un casete de resistencia a Sp.

5.2 – Construcción de las cepas de *B. subtilis* que expresan las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Se amplificaron las secuencias de los genes *desA* y *desB* de *B. cereus* ATCC 14579 más la región corriente arriba de los mismos (1479 pb y 1433 pb, respectivamente), utilizando los oligonucleótidos 53 y 61 para el gen *desA* y 55 y 60 para el gen *desB* (Tabla IV). Además, se amplificaron las secuencias de los genes *desL* y *desX* de *B. licheniformis* ATCC 14580 más la región corriente arriba de los mismos (1398 pb y 1242 pb, respectivamente), utilizando los oligonucleótidos 41-42 y 43-44, respectivamente. (Tabla IV). Cada fragmento se purificó y clonó en el vector pCR-Blunt II-Topo (Invitrogen), obteniéndose los plásmidos pLC2983, pLC0400, pLC2106 y pLC2692 (Tabla III). Luego de corroborar la correcta secuencia de cada fragmento, los mismos se cortaron de los vectores con las correspondientes enzimas de restricción y se ligaron en el vector pJM116¹²⁵, digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos recombinantes pJM2983, pJM0400, pJM2106 y pJM2692, conteniendo los genes de las desaturasas bajo el control transcripcional de sus propios promotores, se usaron para transformar la cepa de *B. subtilis* LC5. Luego de llevar a cabo la selección en placas de LB con Kan 5 µl/ml y Cm 5 µl/ml, se aislaron las cepas recombinantes LSC2983, LSC0400, LSC2106 y LSC2692 (Tabla II). La correcta integración en el locus *amyE* de *B. subtilis* se confirmó por la aparición del fenotipo amilasa negativo en placas de LB-almidón.

Materiales y métodos

5.3 – Construcción de cepas deficientes en los dadores de electrones.

Para caracterizar los dadores de electrones de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* se usaron las cepas de *B. subtilis* L43, deficiente en Fd y la cepa LSC28, que no sintetiza Fd y expresa condicionalmente el operón *ykuNOP*⁹⁴. En primer lugar se transformaron las cepas L43 y LSC28 con el plásmido pDesSp de manera de interrumpir el gen *des* de *B. subtilis* generando las cepas LSA43 y LSA28, respectivamente (Tabla II). A continuación, se transformaron ambas cepas con los plásmidos que expresan los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* bajo sus propios promotores (plásmidos pJM2983, pJM0400 y pJM2106). Luego de seleccionar con Cm 5 µg/ml, se aislaron las cepas recombinantes LSA4383, LSA4300, LSA4321, LSA2883, LSA2800 y LSA2821 (Tabla II). La correcta integración en el locus *amyE* de *B. subtilis* se confirmó por la aparición del fenotipo amilasa negativo en placas de LB-almidón. Para inducir la expresión del operón *ykuNOP* se agregó IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) a una concentración final de 0,5 mM. Los experimentos con estas cepas se llevaron a cabo como se describió anteriormente⁹⁴.

5.4 – Construcción de las cepas LSC16, LSC17 y LSC18 de *B. subtilis*.

Para construir las cepas LSC16, LSC17 y LSC18 de *B. subtilis*, en primer lugar se transformaron las cepas MA2983, MA0400 y MA2106 que expresan condicionalmente los genes *desA*, *desB* y *desL* bajo el promotor *Pxil*, con el plásmido pLP6¹³⁰, derivado del vector pMUTIN, que posee el sitio de unión al ribosoma y la región 5' del gen *plsC* bajo el control transcripcional del promotor inducible *spac* (P_{spac}). Este plásmido se integra en el cromosoma de la bacteria mediante un simple evento de recombinación homóloga, generando las cepas LSC16, LSC17 y LSC18, respectivamente (Tabla II). Esta estrategia deriva en una expresión condicional del gen *plsC*; en ausencia de IPTG cesa la síntesis de FL pero continúa la síntesis y, por consiguiente, la acumulación de AG¹³⁰. Se expresaron las desaturasas adicionando xilosa (Xil) al medio de cultivo a una concentración final de 0,8% y el gen *plsC* se expresó mediante el agregado de IPTG al medio de cultivo a una concentración final de 0,5 mM.

Materiales y métodos

6 – Construcción de plásmidos y cepas de *B. cereus*.

6.1 – Interrupción de los genes que codifican las desaturasas.

Para generar la interrupción en el gen *desA* de *B. cereus*, se amplificaron por PCR un fragmento de 628 pb (conteniendo los primeros 14 pb del gen *desA* más 614 pb ubicados corriente arriba de dicho gen) con los oligonucleótidos 109 y 110 y un fragmento de 583 pb (conteniendo los últimos 26 pb del gen *desA* más los 557 pb ubicados corriente abajo de dicho gen), utilizando los oligonucleótidos 111 y 112. Los fragmentos se ligaron y clonaron en el vector pGEMT-easy, generando el plásmido pLC100 (Figura 11). De la misma manera, para interrumpir el gen *desB* de *B. cereus* se amplificaron por PCR un fragmento de 615 pb (conteniendo los primeros 14 pb del gen *desB* más 601 pb ubicados corriente arriba de dicho gen) con los oligonucleótidos 114 y 115 y un fragmento de 555 pb (conteniendo los últimos 29 pb del gen *desB* más los 526 pb ubicados corriente abajo de dicho gen), utilizando los oligonucleótidos 116 y 117. Ambos fragmentos se ligaron y clonaron en el vector pGEMT-easy, generando el plásmido pLC101. Luego de secuenciar y corroborar la correcta secuencia de los fragmentos ligados, se digirieron los plásmidos pLC100 y pLC101 con la enzima de restricción XhoI, la cual separa los fragmentos ligados entre sí. A continuación se rellenaron los extremos generados por el corte con el fragmento de Klenow para generar extremos romos. Por otro lado, se escindió del plásmido pJM134 el casete de resistencia a Sp utilizando la enzima de restricción EcoRV (Figura 11). El casete de resistencia a Kan del plásmido pJM114 se obtuvo cortando con las enzimas BamHI y HindIII. Los extremos 5' se rellenaron con la polimerasa Klenow. Los casetes de resistencias a Sp y Kan se clonaron en los plásmidos pLC100 y pLC101 generando los plásmidos pLC102 y pLC103, respectivamente. De dichos plásmidos se cortaron los fragmentos completos conteniendo las regiones corriente arriba y corriente debajo de cada flanqueando el correspondiente casete de resistencia con las enzima BamHI (pLC102) y corte parcial con EcoRI (pLC103), respectivamente. Los dos fragmentos se clonaron en el plásmido pORI-Cm cortado también con las mismas enzimas, generando los plásmidos pORI-CmSp y pORI-CmKan (Figura 11). Dichos plásmidos primero se amplificaron en la cepa de *E. coli* C600 y luego se utilizaron para transformar *B. cereus*. El protocolo de transformación utilizado se describió anteriormente (4.6.3 – Transformación de *B. cereus*).

Materiales y métodos

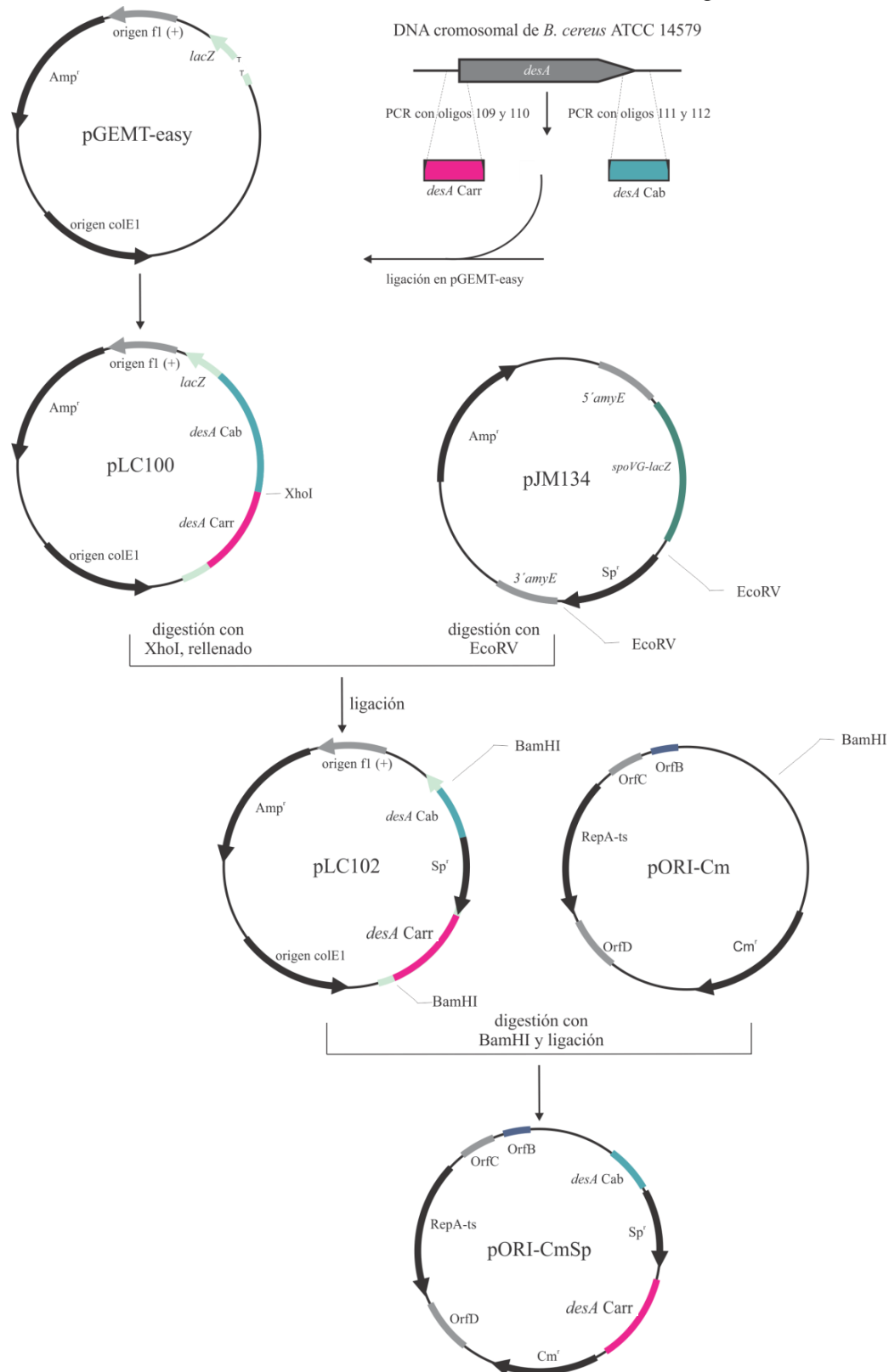


Figura 11. Esquema de la estrategia utilizada para la construcción del plásmido pORI-CmSp para la generación de la cepa LCER2983. Se construyó un plásmido para generar una mutante por interrupción en el gen *desA* de *B. cereus*. Éste se utilizó para transformar la cepa salvaje ATCC 14579. Carr: corriente arriba; Cab: corriente abajo.

Materiales y métodos

Luego de la transformación, células de las colonias obtenidas, se cultivaron en medio líquido TSB en presencia de Cm durante 4h a 30°C y después se pasaron a incubar durante toda la noche a 42°C. Esto hace que el vector se integre porque no se puede replicar, debido a que el origen de replicación que posee es termosensible y, por otro lado, no se pierde de la célula porque hay Cm en el medio de cultivo. Al día siguiente se diluyó 1/2000 veces el cultivo en TSB líquido fresco en ausencia de Cm, se reincubó 4h a 30°C y se dejó nuevamente toda la noche a 42°C. La incubación a 30°C hace que el vector integrado se escinda ya que puede volver a replicarse y a 42°C hace que se pierda de la célula ya que no hay Cm en el medio. Si se escinde por el lado opuesto al que se integró se llevará el gen de interés, el cual será interrumpido por la resistencia a Sp o Kan, generando la cepa mutante; en cambio, si se escinde por donde se integró, se llevará el gen de resistencia al ATB, volviendo a ser una cepa salvaje. Al día siguiente, se hicieron diluciones seriadas del cultivo en medio líquido TBS, se sembraron en medio sólido TSA y se incubaron durante toda la noche a 37°C. A continuación, las colonias obtenidas se repicaron, por la técnica de réplica en placas, en placas de medio sólido TSA conteniendo Sp o Kan (para *desA* o *desB*, respectivamente), Cm y sin ATB. Las cepas mutantes deben crecer en Sp o Kan y en placa sin ATB y no en Cm. Las placas se incubaron ON a 37°C. Finalmente se congelaron células provenientes de colonias que hubieran crecido en medio con Sp o Kan, dependiendo del vector utilizado en la transformación, y que no hubieran crecido con Cm.

De esta manera se obtuvieron las cepas de *B. cereus* LCER2983, mutante en el gen *desA* y LCER0400, mutante en el gen *desB*. A su vez se transformó la cepa LCER2983 con el plásmido pORI-CmKan obteniéndose la cepa de *B. cereus* doble mutante LCER2904.

A fin de corroborar las deleciones generadas se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleótidos Spc5'out o Spc3'out y el 113 para el gen *desA* y con los oligonucleótidos 12 ó 13 y el 118 para el gen *desB*.

6.2 – Complementación de las cepas mutantes.

Para complementar las cepas LCER2983 y LCER0400 se utilizó el vector replicativo pHT315¹²⁹ que posee un número de copias de 15 ± 5 por cromosoma y un casete de resistencia a Er. Para complementar la cepa LCER2983 se cortó del plásmido pJM2983 el fragmento correspondiente al gen *desA* y la región corriente arriba del mismo utilizando la enzima de restricción EcoRI y se clonó en el vector pHT315 cortado con la

Materiales y métodos

misma enzima, obteniéndose el plásmido pHT2983 (Tabla III). El mismo se amplificó en *E. coli* C600 y posteriormente se utilizó para transformar la cepa de *B. cereus* LCER2983, obteniéndose la cepa LCER2983C (Tabla II). En el caso de la cepa LCER0400 se cortó el fragmento correspondiente al gen *desB* y la región corriente arriba del mismo del plásmido pJM0400 con la enzima de restricción EcoRI y se clonó en el vector pHT315, obteniéndose el plásmido pHT0400, que fue amplificado en *E. coli* C600 y utilizado para transformar la cepa LCER0400 generándose la cepa LCER0400C (Tabla II).

7 – Ensayos de actividad enzimática.

7.1 – Determinación de actividad β -galactosidasa en *B. subtilis*.

Se cultivaron las cepas de *B. subtilis* que contienen la fusión al gen *lacZ* en MM en cada caso suplementado con los ATB correspondientes, durante toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente las células se utilizaron para inocular MM fresco suplementado con los ATB adecuados para lograr obtener una $DO_{600} = 0,1$. Las muestras para realizar las mediciones de actividad β -galactosidasa fueron tomadas a diferentes tiempos durante el crecimiento de las cepas. El ensayo de actividad β -galactosidasa se realizó según una adaptación del método descrito por Miller¹³⁵. Los precipitados bacterianos obtenidos en la toma de muestras fueron resuspendidos en determinados volúmenes de buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, $MgSO_4$ 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM). Se tomaron alícuotas, se colocaron en tubos eppendorf y se ajustó el volumen a 130 μ l con buffer Z. Se le agregaron 10 μ l de lisozima (2 mg/ml) y se incubó durante 5 min a 37°C. Luego se agregaron 10 μ l de Tritón X100 al 2% y 20 μ l de ONPG (4,5mg/ml). Los tubos se transfirieron a estufa a 30°C durante exactamente 15 min. La reacción se detuvo con 30 μ l de Na_2CO_3 1,2 M. Se determinó la DO a 420 nm. La actividad específica se expresó en unidades Miller (UM). La fórmula para el cálculo de las unidades Miller, adaptada de la fórmula original, es la que se indica a continuación:

$$UM = (DO_{420} \times 66,7) / (DO_{525} \times ml \text{ usados}).$$

Se realizaron tres experimentos independientes, en cada uno de los cuales se hicieron las determinaciones por triplicado.

7.2 – Ensayo de actividad α -amilasa.

El fenotipo *amy-* se detectó haciendo estrías de las cepas en estudio en placas de LB-agar conteniendo 1% p/v de almidón soluble. Después de 48 h de incubación, se

Materiales y métodos

colocaron 5 ml de reactivo de lugol (0,5% p/v I₂ y 1% p/v KI) sobre la superficie de la placa de Petri. Después de 1 min el colorante fue descartado y se observó la formación de halos transparentes alrededor de las colonias *amy+*, mientras que las colonias *amy-* no formaban el halo.

8 – Análisis de lípidos.

8.1 – Crecimiento y marcación de cultivos con precursores radioactivos.

Las cepas JH642, LC5, LSC2983, LSC0400, LSC2106, LSC2692, *B. cereus* ATCC 14579, *B. licheniformis* ATCC 14580, *A. aneurinilyticus*, *A. migulanus*, *B. brevis*, *P. polymyxa* y *L. sphaericus* fueron cultivadas en MM con los suplementos requeridos en cada caso durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se inoculó MM fresco a una DO₆₀₀ = 0,1 con las correspondientes cepas bacterianas y se continuó la incubación a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ = 0,4 se tomaron dos alícuotas de 2 ml cada una y se les agregó 0.2 µCi/ml de [¹⁴C]-palmitato (58 mCi/mM). Una de las alícuotas se siguió incubando a 37°C y la otra se transfirió a un baño a 25°C. Ambas fracciones se mantuvieron a dichas temperaturas durante 2 h y una vez que finalizó este lapso de tiempo se procedió a la extracción y separación de los lípidos.

Por otro lado, alícuotas de 2 ml de cultivos en MM de *A. migulanus* se marcaron con 1 µCi/ml de [¹⁴C]-acetato durante 2 h a 25°C para luego extraer y separar los lípidos.

Las cepas de *B. subtilis* LSC16, LSC17 y LSC18 se cultivaron durante toda la noche a 37°C en MM suplementado con 0,8% de Xil, 0,5 mM IPTG y los correspondientes ATB. Al día siguiente, las células se diluyeron a una DO₆₀₀ = 0,1 e incubaron en MM con Xil, con y sin IPTG. Cuando los cultivos sin inductor alcanzaron una DO₆₀₀ = 0,4-0,5 dejaron de crecer debido a la ausencia de PlsC. En este momento, tanto los cultivos con y sin inductor se marcaron con 1 µCi/ml de [¹⁴C]-acetato por 3 h a 37°C¹³⁰. Luego de la incubación, se extrajeron los lípidos por el método de Bligh y Dyer¹³⁶ y se analizaron en placas de Silica Gel (Analtech) utilizando la mezcla de solventes éter de petróleo/dietileter/ácido acético (70/30/2, vol/vol/vol) para separar los lípidos neutros. Las marcas correspondientes a los FL y AG libres se removió de las placas y se convirtieron dichos compuestos a metil ésteres de ácidos grasos (MEAG) adicionando 1,5 ml de metanol, 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e incubando 2 h a 80°C. Los MEAG se separaron en placas de Sílica Gel G (0,5 mm espesor, Analtech).

Materiales y métodos

Las cepas de *B. subtilis* LSA4383, LSA4300 y LSA4321 se cultivaron durante toda la noche a 37°C en MM suplementado con metionina, isoleucina y valina (MIV) de manera de evitar la fase de latencia prolongada observada en la cepa de *B. subtilis* L43⁹⁴. Al día siguiente las células se diluyeron 1:10 en MM-MIV fresco, se crecieron hasta la mitad de la fase exponencial y se marcaron con 0.2 µCi/ml de [¹⁴C]-palmitato (58 mCi/mM) a 25°C durante 2 h. Luego se extrajeron y separaron los lípidos marcados.

Las cepas de *B. subtilis* LSA2883, LSA2800 y LSA2821 se cultivaron durante toda la noche en MM-MIV suplementado con 0,5 mM IPTG. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces y se diluyeron 1:10 en MM-MIV fresco sin inductor. A tiempos determinados, se tomaron alícuotas de 2 ml y se marcaron con 0.2 µCi/ml de [¹⁴C]-palmitato (58 mCi/mM) a 25°C durante 2 h. Luego de 4 h de estar frenado el crecimiento debido a la ausencia del operón *ykuNOP* se agregó 0,5 mM IPTG. Las células se incubaron 2 h más y se marcaron alícuotas de 2 ml como se describió anteriormente⁹⁴. Los lípidos de todas las fracciones se extrajeron y separaron.

8.2 – Extracción de lípidos.

Para la extracción de los lípidos totales de todas las cepas utilizadas en este trabajo se siguió la técnica desarrollada por Bligh y Dyer¹³⁶.

8.3 – Preparación de metil ésteres de ácidos grasos.

El extracto lipídico obtenido mediante la técnica de Bligh y Dyer primero se secó por corriente de N₂ y la reacción de transesterificación se llevó a cabo mediante el agregado de 0,5 ml metóxido de sodio anhidro 0,5 M. Luego de 30 min a temperatura ambiente se agregó 1 ml de HCl 2N y se procedió a la extracción de los MEAG con el agregado de 2 ml de hexano.

8.4 – Producción de aductos dimetildisulfuro.

Para obtener los derivados dimetildisulfuro (DMDS), se preparó una mezcla de 3 ml de DMDS y 40 mg de I₂. De dicha mezcla se tomaron 300 µl y se agregaron a un tubo conteniendo los derivados MEAG de las muestras deseadas, previamente secados con una corriente de N₂. Se incubó durante 30 min a 35°C y luego se agregó 1 ml de la mezcla hexano – éter 1:1. A continuación se adicionó 1 ml de una solución de Na₂S₂O₃ al 10%

Materiales y métodos

p/v, se centrifugó para separar las fases y se recuperó el sobrenadante. Finalmente se secaron las muestras con una corriente de N₂.

8.5 – Separación de fracciones lipídicas.

8.5.1 – Cromatografía en capa delgada (TLC).

Los MEAG se separaron en las fracciones saturados e insaturados por cromatografía de capa delgada de sílica gel con nitrato de plata 20%, activada por calentamiento 1h a 80°C¹³⁷. La cromatografía se desarrolló a -20°C utilizando tolueno como solvente de corrida. La visualización de la radioactividad se llevó a cabo utilizando pantallas Typhoon 9200 PhosphorImager y se cuantificó con el programa ImageQuant (Versión 5.2).

8.5.2 – Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Para analizar la composición de AG de las cepas analizadas en este trabajo se cultivaron las células en MM a 37°C hasta fase exponencial, luego se transfirieron a un baño a 25°C y se recolectaron en fase estacionaria. Los AG se extrajeron por la técnica de Bligh y Dyer y derivatizaron como se describió anteriormente. El análisis de los MEAG se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases-espectrómetro de mesas Perkin Elmer Turbo, equipado con una columna de capilaridad (30 m por 0,25 mm de diámetro, Varian) de 100% dimetilpolisiloxano (PE-1, Perkin-Elmer). Se usó un flujo de helio de 1 ml/min y la temperatura de la columna se aumentó a razón de 4°C/min desde 140°C a 240°C. Los AG ramificados, lineales e insaturados usados como referencia se compraron en Sigma Chemical Co. La posición de los dobles enlaces también se determinó por GC-MS. Para ello los MEAG se convirtieron a aductos de dimetil disulfuro (DMDS) como se describió anteriormente y se separaron en la columna PE-1 con una rampa de temperatura de 4°C/min desde 140°C a 280°C. Para determinar los espectros se utilizó el modo de impacto de electrones de 70 Ev y los mismos se registraron como abundancia relativa en función de la relación m/z.

9 – Identificación del sitio de inicio de la transcripción por medio de 5' RACE (*rapid amplification of cDNA ends*).

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción de los genes *desA*, *desB* y *desL* se empleó ARN obtenido a partir de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis*

Materiales y métodos

ATCC 14580 y el reactivo GeneRacer kit (Invitrogen) siguiendo el protocolo de trabajo mostrado en la Figura 12. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo acorde a las especificaciones del fabricante. Inicialmente se procedió a tratar a una parte de las muestras con la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternero a fin de remover todos los grupos fosfatos presentes en el extremo 5' de los ARN (posiciones α , β y γ), para luego adicionar a estos mismos extremos el grupo fosfato α utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa y ATP como fuente dador del grupo fosfato. El siguiente paso de la reacción consistió en la ligación de un oligonucleótido de ARN al extremo 5' de los ARN mensajeros mediante la acción de la enzima ARN T4 ligasa. Luego se realizó una reacción de transcripción reversa empleando la enzima Superscript III (Invitrogen) y 0,5 μ g de un hexanucleótido de secuencia al azar (dN₆). Posteriormente, se amplificó por PCR el extremo 5' de cada gen empleando los oligonucleótidos 102, 104 y 106 (específicos para los genes *desA*, *desB* y *desL*, respectivamente) y GeneRacer5' (oligonucleótido 108 Tabla IV, complementario al fragmento de ARN empleado durante el paso inicial de la ligación) y el ADNc obtenido en el paso anterior como molde de la reacción. A continuación, sobre los productos obtenidos anteriormente se realiza una PCR anidada usando los oligonucleótidos 103, 105 y 107 (específicos para los genes *desA*, *desB* y *desL*, respectivamente) y GeneRacer5'. Los nuevos productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron 5 clones independientes. El primer nucleótido adyacente al fragmento de ARN utilizado durante la ligación fue considerado como el sitio de inicio de la transcripción del mensajero de los tres genes estudiados.

Materiales y métodos

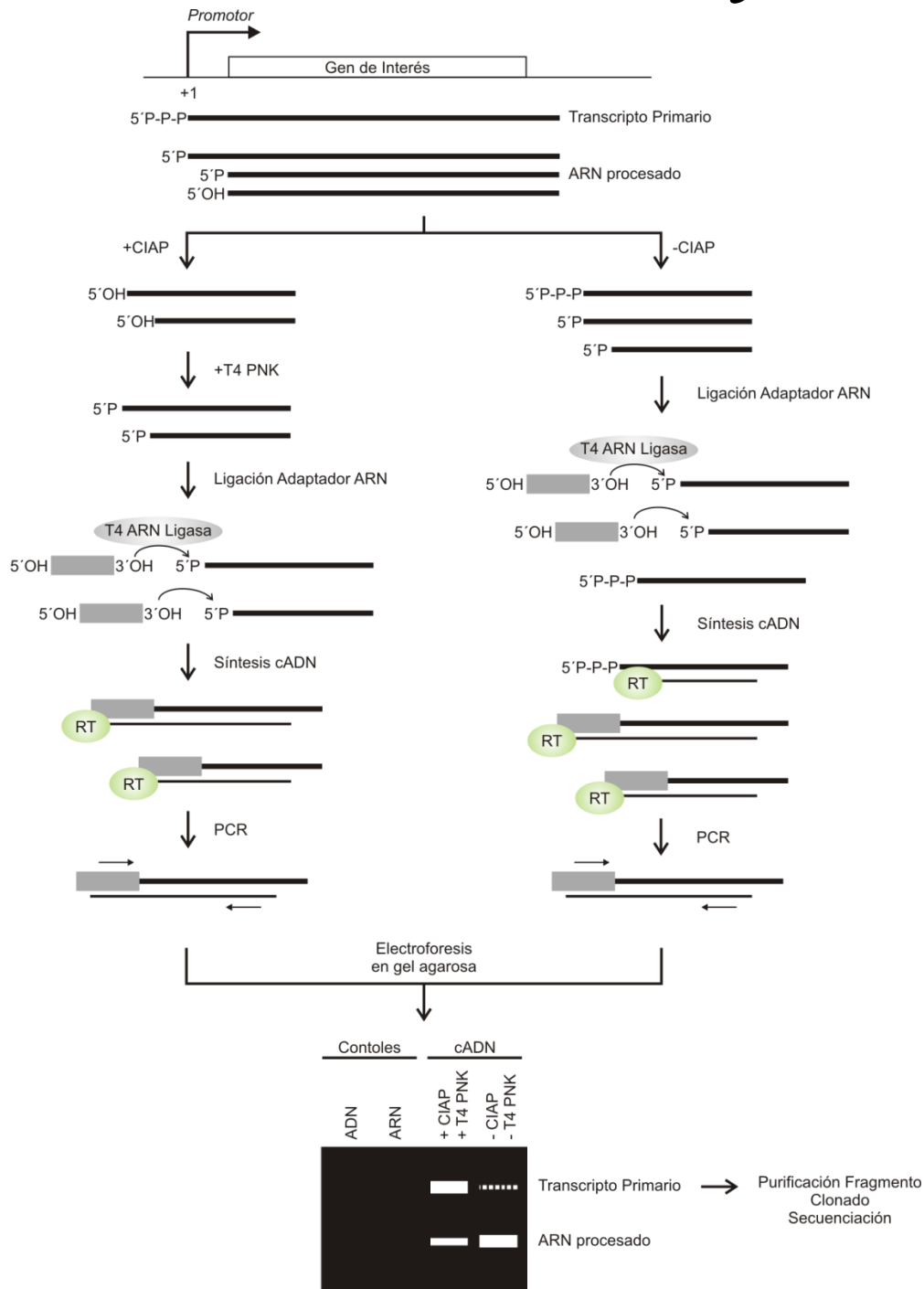


Figura 12. Esquema de la metodología utilizada para determinar el sitio de inicio de la transcripción por la técnica RLM-RACE. Las abreviaturas CIAP y T4 PNK se refieren a las enzimas Fosfatasa alcalina intestinal de ternero y T4 polinucleótido quinasa, respectivamente.

10 – Cuantificación de ARNm mediante qRT-PCR en tiempo real.

Para llevar a cabo la cuantificación de los ARNm de los genes *desA*, *desB* y *desL* en distintas condiciones, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen que fueron utilizados en reacciones de qRT-PCR en tiempo real. Inicialmente se midió la eficiencia de

Materiales y métodos

los mismos usando ADN genómico cuantificado de *B. cereus* y *B. licheniformis*. Por otro lado, se realizaron curvas de crecimiento en MM a 37°C inoculando medio fresco a una $DO_{600} = 0,1$ a partir de un cultivo crecido toda la noche de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579, LCER2983 y LCER0400 y de *B. licheniformis* ATCC 14580. Cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,4$ los mismos se dividieron en dos alícuotas, una se continuó incubando a 37°C y la otra se pasó a incubar a 25°C. Se tomaron muestras para extraer y cuantificar el ARNm a los 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 240 min luego de dividir los cultivos. Luego de realizar la extracción de ARN como se describió anteriormente se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa (RT) en un volumen final de 20 μ l con 2 μ g de ARN, 0,25 μ g de un hexanucleótido de secuencia al azar (dN_6) y 1 μ l de dNTPs 10 mM y 1 U de la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen). Se adicionó a la mezcla de reacción 0,1 μ moles de DTT y 40 U de RNAsin. Para la reacción de qPCR se utilizó el ADNc obtenido en la transcripción reversa como molde, una mezcla de reacción concentrada comercial la cual utiliza fluorocromo verde como colorante indicador (qPCR Mezcla Real, Biodynamics) y 50 pmoles de los oligonucleótidos específicos para cada gen: 92-93, 94-95 y 96-97 para los genes *desA*, *desB* y *desL*, respectivamente. Para la amplificación por qRT-PCR se utilizó el equipo Mastercycler[®] ep realplex de Eppendorf, siguiendo las condiciones de reacción: 95°C durante 2 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 59°C por 15 seg y 68°C por 20 seg. Los datos de qRT-PCR se presentan como la diferencia de expresión relativa de los genes *des* a 25°C con respecto a 37°C, usando el método de Pfaffl¹³⁸. Como gen normalizador se utilizó la subunidad pequeña del ribosoma 16S (oligonucleótidos 98-99 y 100-101 para *B. cereus* y *B. licheniformis*, respectivamente).

Resultados y Discusión

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS DESATURASAS DEL GÉNERO *Bacillus*.

RESULTADOS CAPÍTULO I

Las desaturasas son un tipo especial de oxigenasas que tienen la capacidad de remover dos hidrógenos de una cadena hidrocarbonada para formar un doble enlace. Esta reacción se lleva a cabo en forma altamente estereo-, regio- y quimio- selectiva ², aún cuando los sustratos se componen de cadenas de metileno esencialmente equivalentes que no presentan marcas distintivas en el sitio de desaturación.

Hasta el momento, las bases moleculares que explicarían las diferencias en la utilización de sustrato y la regioselectividad de las desaturasas no han sido aclaradas. Para la identificación de los determinantes de su especificidad se han realizado numerosos experimentos utilizando desaturasas solubles ¹³⁹. Los estudios realizados con enzimas quiméricas de distinta funcionalidad y la información obtenida de la estructura cristalográfica de algunas de ellas permitieron la identificación de residuos de AA, potenciales determinantes de la especificidad de sustrato ^{139,140} en desaturasas solubles. Sin embargo, la gran mayoría de las desaturasas se encuentran unidas a membrana, lo que dificulta la obtención de grandes cantidades en forma activa, lo cual conlleva a la carencia de datos estructurales y por consiguiente, a la falta de entendimiento de las propiedades particulares de su actividad enzimática. Dada la importancia de estas enzimas en la estructura y estabilidad celular y la química única del mecanismo de la reacción que catalizan, en nuestro grupo de trabajo existe un interés de larga data en la identificación de las bases del poder discriminatorio que poseen estas enzimas. En este trabajo de Tesis se propuso estudiar distintas desaturasas del género *Bacillus* con el objetivo de encontrar proteínas de distinta regioselectividad para comenzar a sentar las bases de la relación estructura y función de las mismas.

El género *Bacillus* consiste en una colección completa de bacterias saprofitas, capaces de esporular, ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Las bacterias de este género son capaces de resistir en ambientes extremos y pueden adaptarse a lo largo del día a las variaciones de temperatura. Uno de los mecanismos utilizados por estas bacterias para adaptarse a los cambios de temperatura es modificar la cantidad de AGI presentes en su membrana plasmática. Estos AGI en las bacterias del género *Bacillus*, son sintetizados por desaturasas. Varios grupos de investigación demostraron que diferentes especies del género *Bacillus* son capaces de sintetizar una variedad de AGI con los dobles enlaces en distintas posiciones, definiendo así a este género como una buena fuente de desaturasas con diversas características funcionales que puede ser utilizado para esclarecer las

diferencias en la actividad de las mismas mediante estudios genéticos, bioquímicos y comparativos.

1.1 – Caracterización de cepas del género *Bacillus*.

Para comenzar a desarrollar la hipótesis de trabajo se solicitaron una serie de bacterias de diferentes especies del género *Bacillus* al BGSC (del inglés “Bacillus Genetic Stock Center”). Las mismas son: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842 (*Bacillus polymyxa*), *Lysinobacillus sphaericus* WHO 1883 (*Bacillus sphaericus*), *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*), *Aneurinibacillus aneurinilyticus* NRS-1589 y *Brevibacillus brevis* ATCC 8246. Para la selección de las mismas se tuvo en cuenta que, según lo citado en la bibliografía, estas especies sintetizan diferentes AGI y por lo tanto, tendrían desaturasas con distintas actividades que servirían, mediante comparación de las mismas, para comenzar a establecer las bases de esas diferencias.

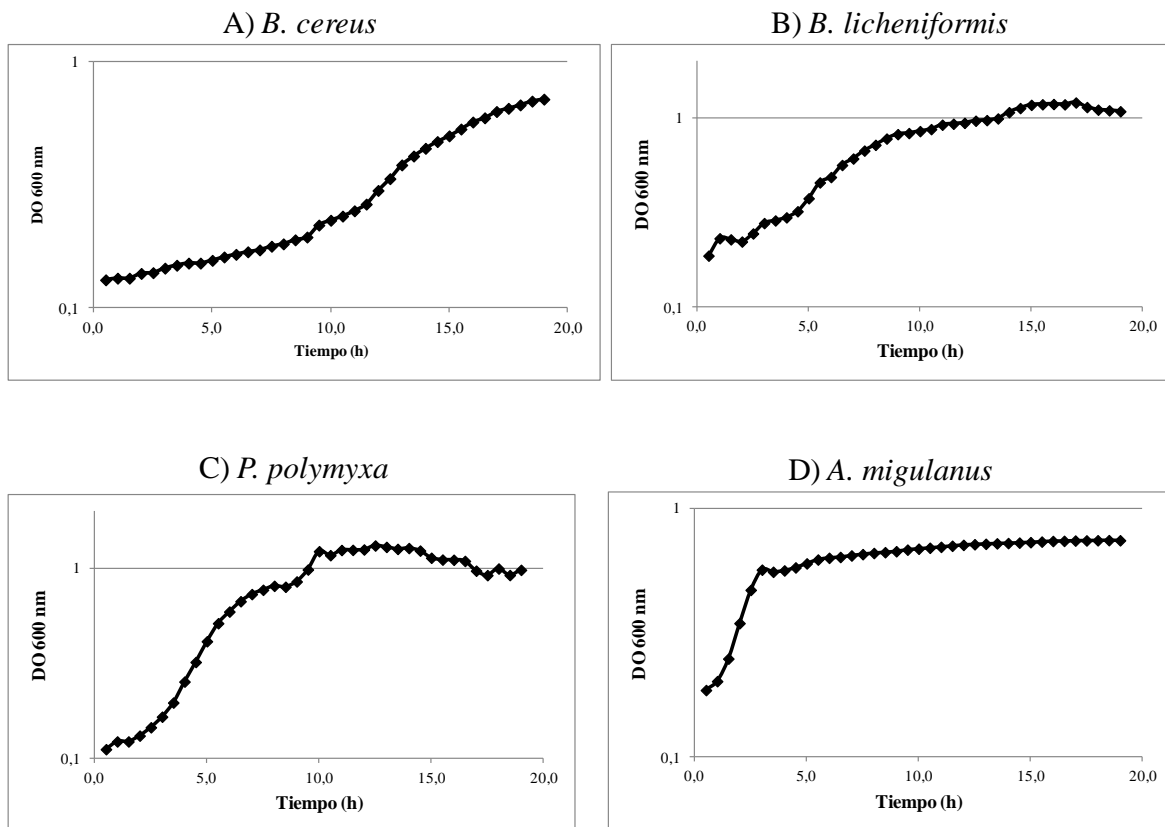
Antes de realizar los estudios fisiológicos correspondientes con cada una de las cepas mencionadas, se llevó a cabo en el laboratorio, la identificación genotípica de las mismas utilizando técnicas moleculares, en particular la amplificación de ADN bacteriano por PCR, específicamente la secuencia codificante del ARN ribosomal 16S, seguido del clonado y la secuenciación de los fragmentos obtenidos. Las secuencias amplificadas del ADN 16S fueron comparadas con las publicadas para estos microorganismos utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y todas ellas fueron coincidentes con lo esperado, confirmando el género y especie de cada una de las bacterias recibidas.

1.1.1 – Determinación de las condiciones de cultivo de las cepas del género *Bacillus*.

A continuación, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de cultivo de estas cepas, ya que para determinar correctamente la composición de AG es imprescindible llevar a cabo los experimentos en medios de cultivo definidos. El diseño de los medios de cultivo se realizó considerando los requerimientos nutricionales de cada cepa y en particular se analizó el crecimiento en MM debido a que este medio facilita el análisis de los AGI y además limita la síntesis de AGR ya que se conoce que estas especies sintetizan grandes cantidades de AGR y su síntesis aumenta en LB o en medios con AA como valina, leucina o isoleucina y afectan la síntesis de AGI como se ha determinado en *B. subtilis*¹⁰³. De esta manera, se analizó el crecimiento de cada cepa en MM líquido sin suplementar, suplementado con todos los AA, con todos los AA sin los precursores de los AGR o en

Resultados I

medio LB. Las curvas de crecimiento para cada bacteria fueron realizadas en microplacas y construidas mediante lectura de DO en forma automática realizadas en un lector de microplacas como se describió en Materiales y Métodos. Se determinó que las cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis* y *P. polymyxa* pueden crecer en MM sin suplementar (Figura 13), *A. migulanus* y *A. aneurinilyticus* crecen en MM suplementado con AA pero no es necesario que estén presentes en el medio los precursores de los AGR (Figura 13), *B. brevis* crece solamente en medio LB y *L. sphaericus* puede crecer en MM pero utilizando arginina en lugar de glucosa como fuente de carbono ¹⁴¹ (Figura 13). Además, *A. migulanus*, *A. aneurinilyticus* y *L. sphaericus* necesitan 1 µg/ml de tiamina y 1 µg/ml de biotina para crecer en MM.



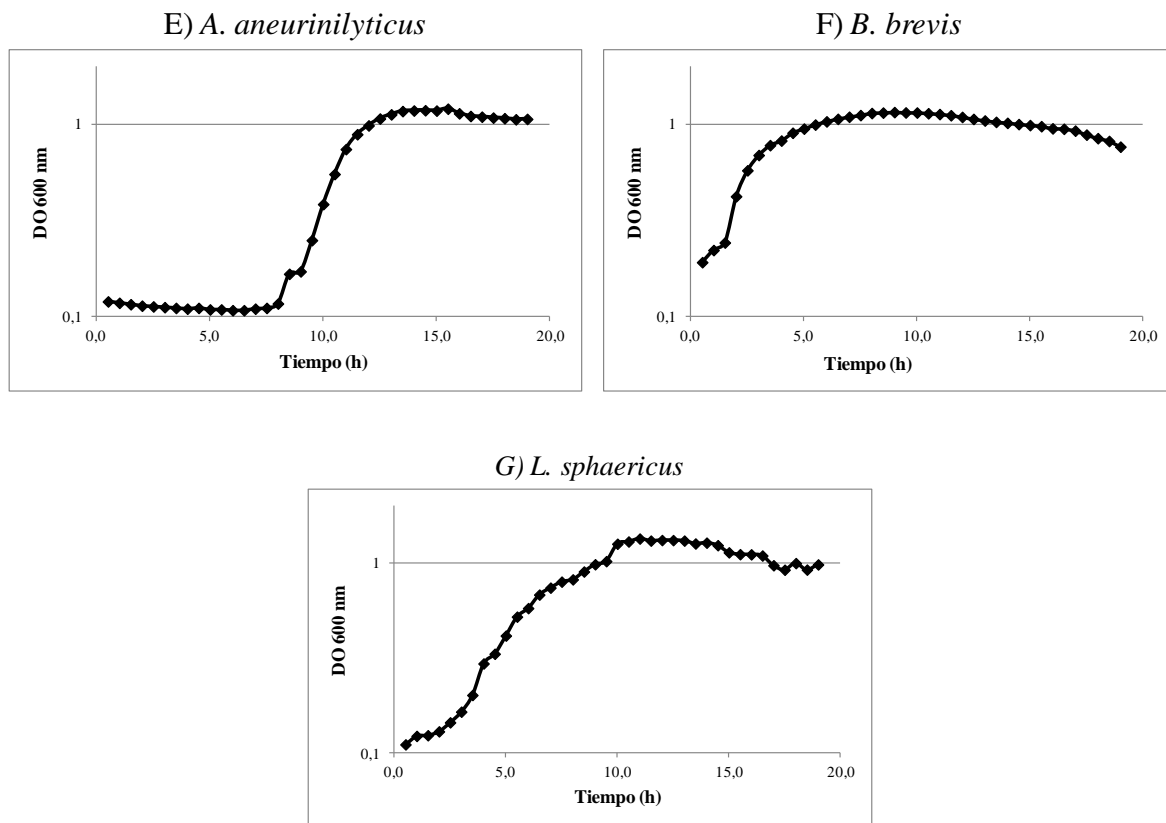


Figura 13. Crecimiento de las cepas de *Bacillus* sp. Las cepas de *Bacillus* sp. se cultivaron a 37°C en diferentes medios, según se indica en cada caso, en microplaca utilizando el equipo automatizado Synergy®, con agitación fuerte y continua, determinando la DO₆₀₀ cada 0,5 h. Se realizó un inóculo de modo de obtener una DO₆₀₀ inicial de 0,1 a partir de un cultivo crecido toda la noche en el mismo medio en un baño termostatzado a 37°C con agitación. A) *B. cereus* cultivada en MM; B) *B. licheniformis* cultivada en MM; C) *P. polymyxa* cultivada en MM; D) *A. migulanus* cultivada en MM suplementado con todos los AA exceptuando los precursores de los AGR y 1 µg/ml de tiamina y 1 µg/ml de biotina ; E) *A. aneurinilyticus* cultivada en MM suplementado con todos los AA exceptuando los precursores de los AGR y 1 µg/ml de tiamina y 1 µg/ml de biotina; F) *B. brevis* cultivada en LB; G) *L. sphaericus* cultivada en MM con arginina como fuente de carbono y 1 µg/ml de tiamina y 1 µg/ml de biotina.

En las curvas de la Figura 13 se puede observar que el crecimiento de *B. cereus* en MM es lento, presentando un tiempo de latencia de 5 h y un tiempo de generación de 4 h, comparado con los resultados obtenidos en medio rico (resultados no mostrados). Por otro lado *B. licheniformis* y *P. polymyxa* crecen más rápido en dicho medio con tiempos de latencia mucho más cortos y tiempos de generación de 2,5 y 1,5 h, respectivamente. *A. migulanus* y *A. aneurinilyticus* crecen en MM pero suplementado con AA, sin embargo la cinética de crecimiento es muy diferente entre ambas especies. *A. migulanus* tiene un tiempo de latencia muy corto, un tiempo de generación de 1 h y llega sólo a una DO₆₀₀ final de 0,75. *A. aneurinilyticus* presenta un tiempo de latencia de 8 h, el mismo tiempo de

Resultados I

generación de 1 h y alcanza mayores valores de DO final. *B. brevis* sólo crece en medio LB con un crecimiento rápido, en donde tanto el período de latencia como el tiempo de generación son de 1 h. Finalmente, *L. sphaericus* crece en MM con arginina como fuente de carbono presentando un período de latencia de 3 h y un tiempo de generación de 1,5 h.

1.1.2 – Síntesis de ácidos grasos en las cepas del genero *Bacillus*.

1.1.2.1 – Marcación de ácidos grasos con precursores radioactivos.

En primer lugar se comprobó la producción de AGI por parte de las cepas en estudio utilizando los medios de cultivos determinados en el inciso 1.1.1. Se cultivaron todas las cepas a 37°C, cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,4$ se dividieron en dos fracciones a las cuales se les agregó palmitato radioactivo. Una alícuota se continuó incubando a 37°C y la otra se transfirió a 25°C durante 2,5 h. Luego, se extrajeron y analizaron los AG mediante cromatografía de argentación como se describe en Materiales y Métodos. La técnica de TLC impregnada en nitrato de plata permite separar los AG totales en las fracciones AGS y AGI, debido a que la plata se intercala entre los dobles enlaces y retarda el movimiento de los AGI ¹³⁷. En la Figura 14 se muestra el contenido de AGS y AGI obtenido para cada cepa, luego de la marcación con palmitato radioactivo, separados por cromatografía en capa fina de argentación.

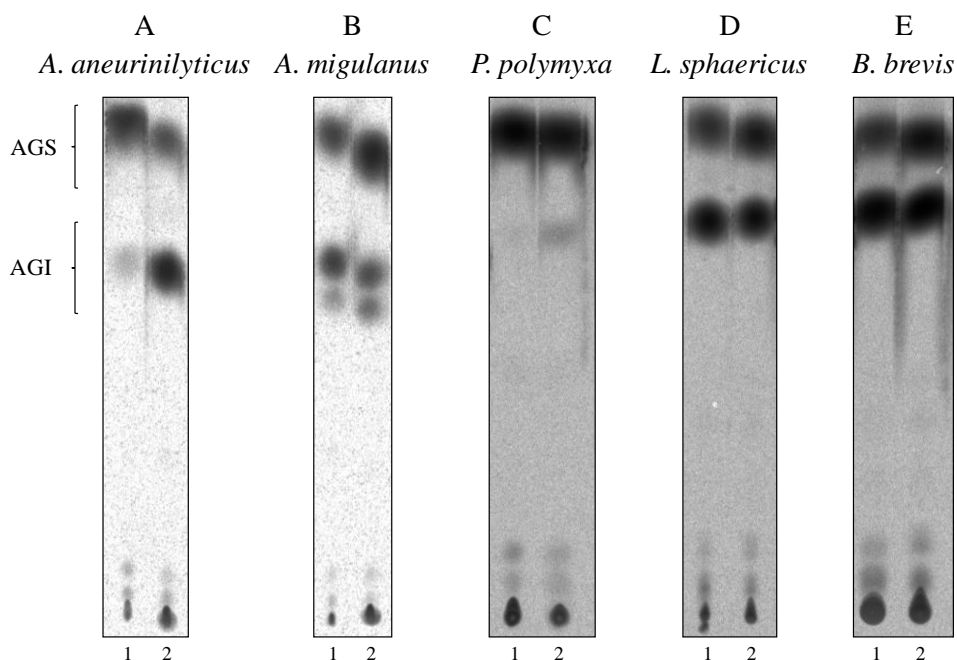


Figura 14. Cromatografía de argentación de AG de las cepas de *Bacillus* marcadas con [1-¹⁴C]-palmitato. Todas las cepas se crecieron en MM con los suplementos requeridos para cada cepa. A) *A. aneurinilyticus*. B) *A. migulanus*. C) *P. polymyxa*. D) *L. sphaericus*. E) *B. brevis*. Calle 1: crecimiento a 37°C; calle 2: crecimiento a 37°C seguido de 25°C.

Resultados I

La visualización de la radioactividad se cuantificó con el programa ImageQuant (Versión 5.2). En la Tabla VI se resumen los resultados obtenidos.

Tabla VI. Composición de ácidos grasos de cepas del género *Bacillus*.

Cepa	37°C		25°C	
	% AGS	% AGI	% AGS	% AGI
<i>A. aneurinilyticus</i>	89 ± 6	11 ± 6	29 ± 7	71 ± 7
<i>A. migulanus</i>	74 ± 5	26 ± 5	51 ± 7	49 ± 7
<i>P. polymyxa</i>	99 ± 1	1 ± 1	98 ± 1	2 ± 1
<i>L. sphaericus</i>	48 ± 6	52 ± 6	33 ± 5	67 ± 5
<i>B. brevis</i>	40 ± 7	60 ± 7	22 ± 6	78 ± 6

La tabla VI presenta los porcentajes de AGS y AGI de las cepas listadas crecidas a diferentes temperaturas determinados por TLC. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Como se observa en la Figura 14 y en la tabla VI, se produce mayor acumulación de AGI cuando los cultivos de *L. sphaericus*, *A. migulanus*, *A. aneurinilyticus* y *B. brevis* se transfieren a menores temperaturas de crecimiento. Esta observación es un indicio de que estas bacterias responden a un aumento en el orden de sus membranas, causado por la disminución de la temperatura del medio, aumentando la proporción de AGI en sus lípidos de membrana. Por otro lado, se observa que *P. polymyxa*, prácticamente no sintetiza AGI, por lo que esta bacteria estaría utilizando otro mecanismo de adaptación a los cambios térmicos a los cuales es sometida.

Si bien, mediante esta técnica analítica, es posible separar algunas especies de AGI por longitud de cadena y posición del doble enlace en condiciones muy controladas, en estos experimentos no se puede determinar la posición de los dobles enlaces de los AGI identificados. Debido a que con esta técnica no es posible obtener más información de los AG producidos por las cepas en estudio, se analizaron los perfiles lipídicos de las mismas mediante GC-MS como se describe a continuación.

1.1.2.2 – Análisis por GC-MS de los metil ésteres de ácidos grasos en cepas de *Bacillus*.

Para los experimentos de GC-MS, las bacterias se cultivaron en los medios definidos para cada especie a 37°C hasta una $DO_{600} = 1$ y se separaron en dos alícuotas, a una se la siguió incubando a la misma temperatura y a la otra se la transfirió a 25°C. Se prosiguió con dicha incubación hasta el día siguiente y luego se llevó a cabo la extracción

Resultados I

de los lípidos, derivatización y análisis por cromatografía gaseosa como se describe en Materiales y Métodos.

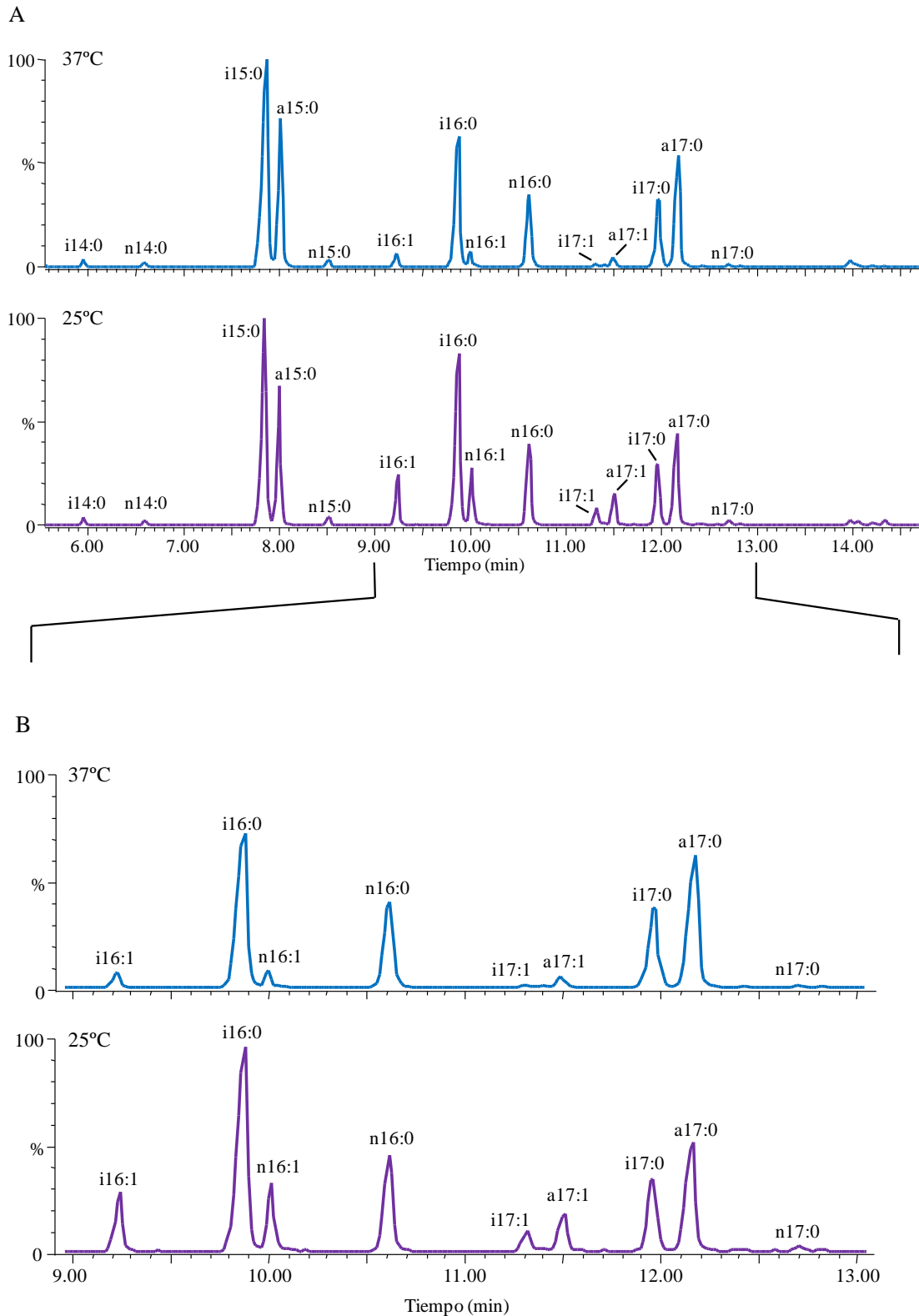


Figura 15. AG sintetizados por *L. sphaericus*. A) Cromatogramas completos de *L. sphaericus* obtenidos al cultivar dicha cepa a 37°C (celeste) y a 37°C seguido de 25°C (violeta). B) Ampliación de la región entre los 9 y los 13 min de elusión. Se indican en la figura los picos correspondientes a los AG mayoritarios. i, AGR-iso; a, AGR-anteiso; n, AG normal.

Resultados I

En la Figura 15 se muestran, a modo ilustrativo, los cromatogramas de MEAG obtenidos a partir de los cultivos de *L. sphaericus*. Los picos que se observan en los primeros 8,5 min de los cromatogramas corresponden a los AG de 14 y 15 carbonos de longitud. Entre los 9 y los 11 min eluyen los AG que poseen 16 carbonos de longitud, y más adelante los que poseen 17 y 18 carbonos (Figura 15A). En la misma figura se muestra también una ampliación de los cromatogramas correspondiente a la región entre los 9 y los 13 min de elusión, en la cual se pueden ver, con mayor detalle, los AGI producidos por esta cepa y evidenciar el aumento de los mismos cuando la temperatura de crecimiento disminuye (Figura 15B).

Con el análisis de los derivados MEAG por GC-MS puede extraerse una enorme cantidad de datos estructurales pero se encuentra limitada la información que puede obtenerse sobre la posición de los dobles enlaces de AG mono y di-insaturados. Uno de los métodos más utilizados para la localización de los dobles enlaces de los AG por medio de la espectrometría de masas involucra la adición de una molécula de DMDS al doble enlace de un AGI. Esta reacción requiere como catalizador al yodo y se realiza partiendo del derivado MEAG. El aducto así obtenido permite la identificación de la ubicación de la doble ligadura ya que al ingresar al espectrómetro de masas se fragmenta en la posición entre los átomos de carbono que originalmente poseían el doble enlace, produciendo dos iones importantes: uno que contiene el extremo metilo terminal de la molécula y otro con el extremo carboxilo de la misma. Para analizar los AGI de las diferentes cepas se obtuvieron los derivados DMDS de los MEAG previamente analizados.

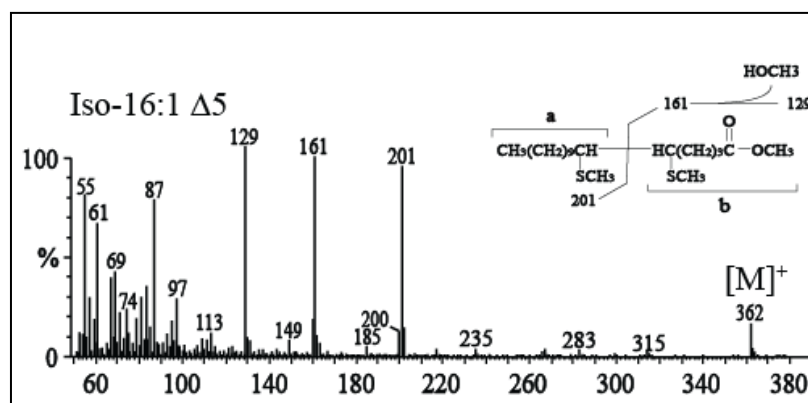


Figura 16. Estructura y perfil iónico del derivado DMDS de un MEAG 16:1 $\Delta 5$ obtenido por GC-MS. Están indicados con los corchetes a y b los fragmentos alifáticos obtenidos. $[M]^+$, ion molecular.

Resultados I

La Figura 16 muestra el perfil iónico de un aducto DMDS generado a partir del MEAG 16:1 Δ 5. En el recuadro se indican como “a” y “b” los iones mayoritarios que se forman luego de la ruptura de la molécula entre los carbonos metil-tio-sustituidos (CH_3S), los cuales se observan en el perfil iónico obtenido por espectrometría de masas a una $m/z = 201$ y 161 , respectivamente. La pérdida de metanol del ión generado a partir del extremo carboxilo de la molécula origina otro ión mayoritario cuya $m/z = 129$. Además, el ión molecular $[\text{M}]^+$ de este aducto también ayuda en la identificación del compuesto y se observa a una $m/z = 362$ en el perfil iónico. Por lo tanto, la presencia de los iones mayoritarios a $m/z = 161$ y $m/z = 201$ en un AGI 16:1 revelan que el doble enlace se encuentra en la posición 5.

En la Tabla VII se resumen los datos obtenidos por GC-MS de los MEAGs y los aductos generados a partir de ellos, de todas las cepas de *Bacillus* en estudio.

TABLA VII. Composición de ácidos grasos insaturados de diferentes cepas del género *Bacillus* a distintas temperaturas.

Cepa	% AGI		Posición del doble enlace ^a
	37°C	25°C	
<i>A. migulanus</i>	6 ± 1	11 ± 2	5, 7, 9, 11
<i>A. aneurinilyticus</i>	8 ± 2	17 ± 1	5
<i>B. brevis</i>	10 ± 1	17 ± 2	5
<i>L. sphaericus</i>	4 ± 1	15 ± 1	5
<i>P. polymyxa</i>	1 ± 1	1 ± 1	5

La Tabla VII presenta los porcentajes de AGI de las cepas listadas crecidas a diferentes temperaturas. En la última columna se indican las posiciones de los dobles enlaces en los AGI determinados mediante GC-MS de los aductos. ^aEl número que indica la posición del doble enlace es el primer C del mismo contando desde el extremo carboxilo terminal. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

El hecho de que en todos los experimentos se observe un aumento en la síntesis de AGI al disminuir la temperatura de crecimiento indicaría que en estas bacterias existen sistemas de desaturasas que responden a una disminución en la temperatura de crecimiento mediante la incorporación de dobles enlaces en las cadenas acilo de los FL de membrana de manera de contrarrestar el aumento en la rigidez de la misma que ocurre como resultado de dicho cambio en las condiciones de crecimiento. En el caso de *P. polymyxa* no se evidencia este incremento en la síntesis de AGI mediante la técnica de GC-MS y sólo se observa una muy pequeña diferencia en la TLC. Este resultado estaría indicando que esta bacteria no produce grandes cantidades de AGI ni a 37°C ni a 25°C y que podría adaptarse a las variaciones de temperatura de crecimiento activando otro mecanismo que contribuya

Resultados I

a desordenar los lípidos de la membrana celular. Efectivamente, al analizar la proporción de AGR de la serie anteiso en *P. polymyxa* se evidencia un aumento de los mismos cuando disminuye la temperatura del cultivo, mientras que la cantidad de AGR de la serie iso se mantiene constante. Es decir que, a diferencia del resto de los bacilos estudiados que no modifican la cantidad de AGR, esta bacteria mantiene una correcta fluidez de membrana a bajas temperaturas incrementando la cantidad de AGR anteiso de 25% a 25°C a 38% a 37°C.

Las diferencias observadas entre los valores de AGI presentados en las Tablas VI y VII se deben a que en los experimentos de marcación (Tabla VI) se estudia síntesis *de novo* de AGI mientras que en los de GC-MS (Tabla VII) se lleva a cabo la acumulación de los AG para su posterior cuantificación.

En las bacterias, los AGI son producidos por la vía de síntesis *de novo* anaerobia o por la desaturación oxidativa de los AG preexistentes catalizada por las desaturasas. Debido a que en los experimentos de GC-MS con *A. migulanus* se observaron varios AGI de diferente longitud y posición del doble enlace y teniendo en cuenta que en una misma bacteria es poco probable que existan tantas desaturasas con distintas especificidades se postula que en esta bacteria podrían concurrir varias formas de sintetizar los mismos como ocurre en *P. aeruginosa*, en donde están presentes las dos vías de síntesis de AGI, aerobia y anaerobia⁷⁰. La única forma de detectar la vía de síntesis anaerobia es marcando los AG con acetato radioactivo, que marca los AG sintetizados desde el principio por formación de acetyl CoA, en condiciones de anaerobiosis. Cuando se analizaron los lípidos mediante TLC de *A. migulanus* cultivado en presencia de acetato radioactivo se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 17.

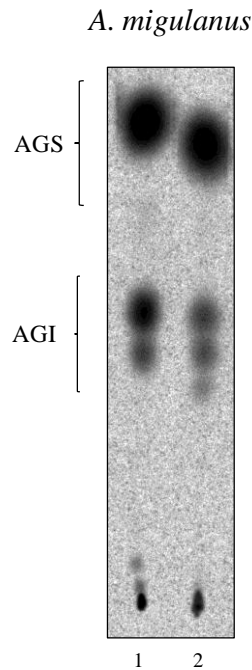


Figura 17. Cromatografía de argentación de AG de *A. migulanus* marcado con [1-¹⁴C]-acetato. *A. migulanus* se cultivó en MM con los suplementos requeridos y se marcó con acetato radioactivo. Calle 1: crecimiento a 25°C, aerobiosis; calle 2: crecimiento a 25°C, anaerobiosis.

Para *A. migulanus*, la marcación con palmitato en condiciones aeróbicas (Figura 14) revela la presencia de dos marcas que podrían corresponder a AGI con sus dobles enlaces en posiciones diferentes. Estos mismos AGI son observados en la Figura 17 cuando se marca con acetato radioactivo en aerobiosis. Estos AGI corresponden a la vía de síntesis aerobia llevada a cabo por desaturasas dada la condición del cultivo. Cuando se realizó la marcación en condiciones de anaerobiosis se evidenció la presencia de tres marcas en la región correspondiente a los AGI (Figura 17) que provienen de la síntesis de AGI anaerobia. Este resultado indicaría que en este organismo pueden coexistir la vía de síntesis de AGI anaerobia cuyos componentes principales son FabA y FabB como se describió en la Introducción y la vía aerobia con desaturasas dependientes de oxígeno. La existencia de esta vía será cotejada mediante el análisis del genoma que al momento de la realización de esta Tesis no se encontraba secuenciado.

En nuestro laboratorio se determinó, mediante experimentos de GC-MS, que en *B. licheniformis* se acumula un solo tipo de AGI con la insaturación en la posición 5 y que la cantidad de los mismos aumenta de 3% a 6% del total de AG cuando la temperatura de crecimiento disminuye de 37°C a 25°C. Asimismo, se concluyó que *B. cereus* sintetiza tres tipos de AGI, $\Delta 5$, $\Delta 10$ y diinsaturados $\Delta 5,10$. A su vez se observó que la proporción de los mismos aumentaba desde 27% a 45% cuando cultivos de esta cepa crecidos a 37°C eran

transferidos a 25°C. Reuniendo esta información con los resultados obtenidos en los experimentos descritos hasta aquí, se determinó que además de *B. cereus*, sólo *A. migulanus* presenta AGI con dobles enlaces en posiciones variadas, 5, 7, 9, y 11, por lo tanto, esta especie podría ser utilizada como fuente de desaturasas con poca variación genética para comparar con las presentes en *B. cereus* y comenzar a establecer los determinantes de esas diferencias en la regioselectividad de estas enzimas. Sin embargo, el genoma de esta bacteria se encontraba incompleto y no había sido liberado al momento de la realización de este trabajo de Tesis, por lo que no se pudo realizar un estudio *in silico* de las posibles desaturasas presentes en esta bacteria. Es por esto que se decidió enviar a secuenciar el genoma de *A. migulanus*. Para ello se extrajo ADN con las especificaciones que pedía el proveedor del servicio de secuenciación y se enviaron diferentes muestras al Servicio de Secuenciación del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR). Actualmente, se está procesando la información recibida y terminando de ensamblar el genoma de esta bacteria.

Hasta el momento se puede decir que el hecho de hallar nuevas desaturasas que presentan distinta regioselectividad y especificidad permitirá ampliar las posibilidades de dilucidar la relación estructura – función de estas enzimas y comenzar a dilucidar los mecanismos de adaptación a bajas temperaturas. Para ello se analizaron los genomas de las cepas que se encuentran secuenciados, en busca de genes que codifiquen desaturasas para clonarlos y caracterizarlos y estudiar funcionalmente sus productos génicos. Por lo tanto se estudió en primer lugar el proceso de desaturación en *B. cereus* y *B. licheniformis* cuyos genomas se encuentran completamente secuenciados y anotados en las bases de datos. Asimismo, estas bacterias son fuente de AGI $\Delta 5$ al igual que *B. subtilis* y $\Delta 10$, lo cual permitiría hacer un estudio comparativo entre las desaturasas presentes en estas bacterias y la desaturasa Des de *B. subtilis* ampliamente estudiada en nuestro laboratorio.

1.2 – Biosíntesis de ácidos grasos en *B. cereus* y *B. licheniformis* y su relación con la temperatura de crecimiento.

Se comenzó el estudio de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* haciendo un análisis detallado de los AG sintetizados por estas dos bacterias a diferentes temperaturas de crecimiento a partir de los experimentos de GC-MS. Este análisis indica que a 37°C *B. cereus* sintetiza AGR de la serie iso (AGR-i) con número par e impar de átomos carbonos (C12 a C17), AGR de la serie anteiso (AGR-a) con número impar de átomos carbonos (C15 y C17) y AG lineales con número par e impar de átomos de carbono

Resultados I

(C14 a C18) (Tabla VIII). Además de los mencionados AGS, se encontraron AGI de diferente longitud y patrón de ramificación. Como se describió anteriormente, se hallaron AGI con el doble enlace en la posición 5 y 10 y AG diinsaturados $\Delta 5,10$ de distinta longitud de cadena. Además se determinó que cuando las células se transferían de una temperatura de crecimiento de 37°C a 25°C, la proporción de AGI aumentaba de 27% a 45% (Tabla IX). Los mayores incrementos se observaron para los isómeros $\Delta 5$ que oscilan desde 2,7% a 8% y los isómeros $\Delta 5,10$ cuya cantidad se eleva desde 2% a 12% del total de AG. Sin embargo, el contenido de AGI $\Delta 10$ es elevado y no cambia significativamente al variar las condiciones de cultivo. No se puede descartar la posibilidad de que en realidad si esté ocurriendo un aumento de estos isómeros cuando disminuye la temperatura de crecimiento y que los mismos estén actuando como sustrato de una putativa $\Delta 5$ desaturasa que genere finalmente los AG diinsaturados. Por otro lado, se evidenció que la relación iso/anteiso de los AGR se altera luego de disminuir la temperatura, modificando su valor desde 9,6 a 5,0 (Tabla IX). Sin embargo, esta modificación del patrón de ramificación se debe a una disminución en la cantidad de AGR de la serie iso más que a un incremento de los isómeros anteiso que, normalmente, son los que aumentan en respuesta a disminuciones de temperatura de manera de fluidificar la membrana celular, como se ha visto para muchas cepas del género *Bacillus* sujetas a este estrés térmico^{24,104}. Esta observación sugiere que el mecanismo principal utilizado por *B. cereus* para incrementar el desorden en la membrana celular cuando se reduce la fluidez de la misma debido a que disminuye la temperatura de crecimiento es aumentar la proporción de AGI y no modificar la cantidad AGR anteiso en el medio estudiado.

Resultados I

Tabla VIII. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis* ATCC 14580.

AG	% AG			
	<i>B. cereus</i>		<i>B. licheniformis</i>	
	37°C	25°C	37°C	25°C
Iso-C _{12:0}	1,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	ND	ND
n-C _{12:0}	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	ND	ND
Iso-C _{13:0}	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	ND	ND
Anteiso-C _{13:0}	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	ND	ND
n-C _{13:0}	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	ND	ND
Iso-C _{14:0}	13,0 ± 1,0	10,0 ± 1,0	4,8 ± 0,4	13,5 ± 0,7
n-C _{14:0}	7,0 ± 1,0	13,1 ± 0,7	1,0 ± 0,1	4,2 ± 0,5
Iso-C _{15:0}	6,1 ± 0,5	6,0 ± 1,0	23 ± 1	11,9 ± 0,8
Anteiso-C _{15:0}	3,5 ± 0,3	5,0 ± 2,0	14,0 ± 0,7	15,1 ± 0,8
Iso-C _{15:1} Δ10	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,3	ND	ND
n-C _{15:0}	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Iso-C _{16:2}	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,3	ND	ND
Iso-C _{16:1} Δ5	1,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2
Iso-C _{16:1} Δ10	6,0 ± 0,1	4,0 ± 1,0	ND	ND
n-C _{16:2}	1,5 ± 0,3	10,4 ± 0,8	ND	ND
Iso-C _{16:0}	19,0 ± 1,0	4,8 ± 0,1	19,1 ± 0,9	18,5 ± 0,9
n-C _{16:1} Δ5	0,8 ± 0,3	2,6 ± 0,8	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
n-C _{16:1} Δ10	15,0 ± 2,0	18,4 ± 0,3	ND	ND
n-C _{16:0}	14,5 ± 0,6	7,0 ± 1,0	17 ± 1	23,0 ± 0,9
Iso-C _{17:1} Δ10	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	ND	ND
Anteiso-C _{17:1} Δ10	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	ND	ND
Iso-C _{17:0}	1,5 ± 0,4	2,4 ± 0,6	12,0 ± 0,6	3,0 ± 0,1
n-C _{17:1} Δ5	0,1 ± 0,4	0,2 ± 0,0	ND	ND
Anteiso-C _{17:0}	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,2	4,3 ± 0,1	3,0 ± 0,1
n-C _{17:1} Δ10	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	ND	ND
n-C _{17:0}	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Iso-C _{18:1} Δ5	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	ND	ND
Iso-C _{18:0}	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1
n-C _{18:1} Δ5	0,5 ± 0,1	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
n-C _{18:0}	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,4	ND	ND

Las células se cultivaron en MM a 37°C hasta fase exponencial y luego una alícuota se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos de las dos fracciones, se convirtieron a MEAG y los productos se identificaron mediante GC-MS. ND: no detectado. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Resultados I

Tabla IX. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis* ATCC 14580.

AG o relación	% AG			
	<i>B. cereus</i>		<i>B. licheniformis</i>	
	37°C	25°C	37°C	25°C
AGI Totales	27 ± 4	45 ± 4	3,2 ± 0,4	6,0 ± 0,5
AGI-Δ5	2,7 ± 0,9	8 ± 1	3,2 ± 0,4	6,0 ± 0,5
AGI-Δ10	22 ± 2	25 ± 2	ND	ND
AGI-Δ5,10	2,0 ± 0,9	12 ± 1	ND	ND
AGR Totales	57 ± 5	42 ± 7	78 ± 4	67 ± 4
AGR-Iso	52 ± 4	35 ± 5	60 ± 3	49 ± 3
AGR-Anteiso	5,4 ± 0,7	7 ± 2	18,3 ± 0,8	18,1 ± 0,9
Iso/Anteiso	9,6 ± 0,2	5,0 ± 0,4	3,28 ± 0,09	2,7 ± 0,1

En la Tabla IX se muestra la suma total de las especies detalladas en la Tabla VIII. ND: no detectado.

En el caso de *B. licheniformis* se vio que posee AGR-i con número par e impar de átomos carbonos (C14 a C17), AGR-a con número impar de átomos carbonos (C15 y C17) y AG lineales con número par e impar de átomos de carbono (C14 a C18) (Tabla VIII). También se hallaron únicamente AGI con el doble enlace en la posición 5 cuya proporción oscila de 3,2% a 6% cuando disminuye la temperatura de crecimiento (Tabla IX). Por otro lado, se evidenció que la relación iso/anteiso de los AGR se altera ligeramente y en este caso es, nuevamente, debido a una disminución en la cantidad de AGR de la serie iso más que a un incremento de los isómeros anteiso (Tabla IX). Por lo tanto, en *B. licheniformis* el mecanismo principal para fluidificar la membrana también sería aumentar la proporción de AGI más que de los isómeros ramificados de la serie anteiso en este medio de cultivo.

El análisis de la composición de AG de las dos bacterias tampoco revela un aumento en la cantidad de AG de cadena corta al disminuir la temperatura del medio, lo cual estaría sugiriendo que ambas cepas mantienen la correcta fluidez de membrana mediante el mecanismo de adaptación rápido llevado a cabo por las desaturasas encargadas de introducir los dobles enlaces en los AG preexistentes en los FL de la membrana plasmática.

Como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio se ha estudiado en profundidad el mecanismo que regula la expresión del gen *des* de *B. subtilis*. Esta regulación está controlada por un sistema de dos componentes formado por dos proteínas, DesK/R. Este sistema induce la expresión del gen *des* cuando la temperatura de crecimiento disminuye y la reprime a altas temperaturas. Teniendo esta información presente y viendo que tanto en *B. cereus* como en *B. licheniformis* hay variaciones en la cantidad de AGI cuando se modifican las condiciones de crecimiento, se analizó la

regulación de la síntesis de estos AG, tema que se desarrolla y discute en el capítulo III de este trabajo de Tesis.

1.3 – Caracterización de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

1.3.1 – Identificación de genes putativos de acil lípido desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Se realizó un análisis de los genomas de *B. cereus* y *B. licheniformis* mediante el programa de comparación de secuencias BLAST utilizando como polipéptido de comparación la secuencia de la desaturasa $\Delta 5$ de *B. subtilis* (Des), previamente caracterizada en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Porcentajes de identidad y similitud de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* con la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis*.

Organismo / Proteína	% Identidad	% Similitud
<i>B. subtilis</i> / (Des)	100	100
<i>B. cereus</i> / (BC2983)	66,2	77,6
<i>B. cereus</i> / (BC0400)	18,9	34,1
<i>B. licheniformis</i> / (BL02106)	91	94
<i>B. licheniformis</i> / (BL02692)	65	78

La tabla X muestra los resultados obtenidos al realizar un análisis con el programa BLAST entre Des de *B. subtilis* y las desaturasas anotadas en los genomas de *B. cereus* ATCC 14579 y de *B. licheniformis* ATCC 14580.

El análisis permitió hallar un marco abierto de lectura, BC2983, que codifica un polipéptido de 343 residuos aminoacídicos, con una masa molecular de 39805 Da y que se encontraba anotado como una posible $\Delta 5$ desaturasa de membrana. La comparación de la secuencia aminoacídica de BC2983 de *B. cereus* y Des de *B. subtilis* reveló que estos polipéptidos presentan un 66,2% de identidad y 77,6% de similitud (Tabla X). Se encontró un segundo gen, BC0400, identificado como una putativa desaturasa, descrita como tal en el sitio JCVI-CMR (Comprehensive Microbial Resources <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CMrHomePage.cgi>). La proteína codificada por este gen tiene 361 residuos aminoacídicos, con una masa molecular de 41950 Da y presenta 18,9% de identidad 34,1% de similitud con Des de *B. subtilis* (Tabla X) y 17,4% de identidad y 32,4% de similitud con BC2983 de *B. cereus*.

Se realizó el mismo análisis con el genoma de *B. licheniformis* en donde se encontraron dos marcos abiertos de lectura, BL02106 y BL02692, anotados como putativas

Resultados I

desaturasas. El primero codifica un polipéptido de 352 residuos aminoacídicos con una masa molecular de 40678 Da. Esta proteína presenta 91% de identidad y 94% de similitud con Des de *B. subtilis* (Tabla X). El segundo marco abierto de lectura, BL02692, codifica un polipéptido de 342 residuos aminoacídicos con una masa molecular de 39778 Da, que presenta 65% de identidad 78% de similitud con Des de *B. subtilis* (Tabla X) y 69% de identidad y 85% de similitud con BC2983 de *B. cereus*. Los tres motivos conservados de histidina de ambos son idénticos a los presentes en la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis*.

Además se realizó el apilamiento de los genes de las desaturasas y sus regiones génicas de aquellos cuyos productos génicos presentaron altos porcentajes de identidad y similitud con la de *B. subtilis* como se muestra en la Figura 18.

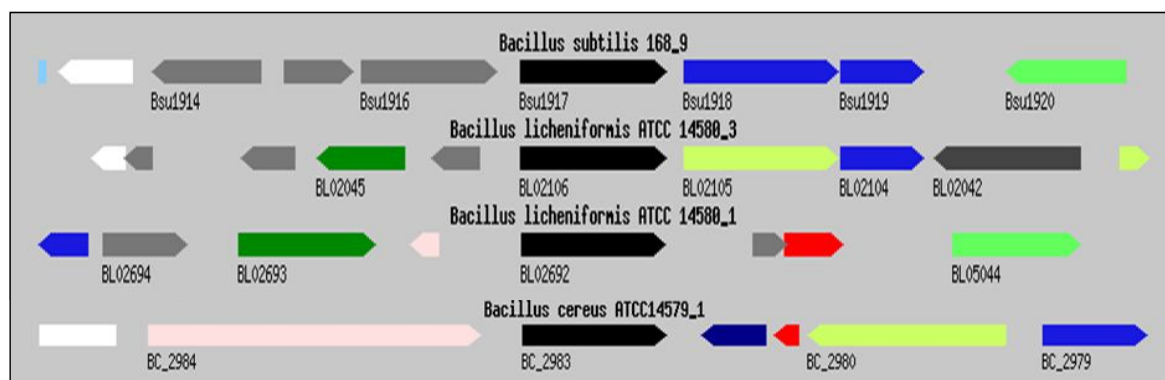


Figura 18. Organización genética de las desaturasas. En negro se muestra el gen que codifica para las desaturasas.

En la Figura 18 se puede ver que corriente abajo del gen BL02106 de *B. licheniformis* se encuentran dos genes homólogos a *desK* y *desR* de *B. subtilis*, presentando estos genes la misma organización que en *B. subtilis*. Los productos génicos de los mismos presentan porcentajes de identidad del 91,62% y 95,98%, a DesK y DesR, respectivamente, lo cual sugiere que estarían codificando para un sistema homólogo al de *B. subtilis*. Sin embargo, no se observa esta organización para los genes BL02692 de *B. licheniformis* y BC2983 de *B. cereus*.

Los perfiles de hidropatía de la secuencia primaria de los polipéptidos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> Server v. 2.0) son similares a todos las desaturasas de membrana conocidas. Poseen cuatro dominios transmembrana y tres motivos ricos en histidinas, apropiadamente espaciados, característicos de las desaturasas de membrana y esenciales para la catálisis. Los mismos conformarían el sitio activo de unión a Fe de dichas proteínas⁴⁸. Estos tres motivos conservados, I, II y III, primera, segunda y tercera caja de histidina (His) de BC2983 son 80, 100 y 100% idénticas a las de

Des y las de BC0400 presentan un 40, 50 y 60 % de identidad con respecto a Des. En la Figura 19 se muestra el modelo topológico propuesto para la proteína BC2983.

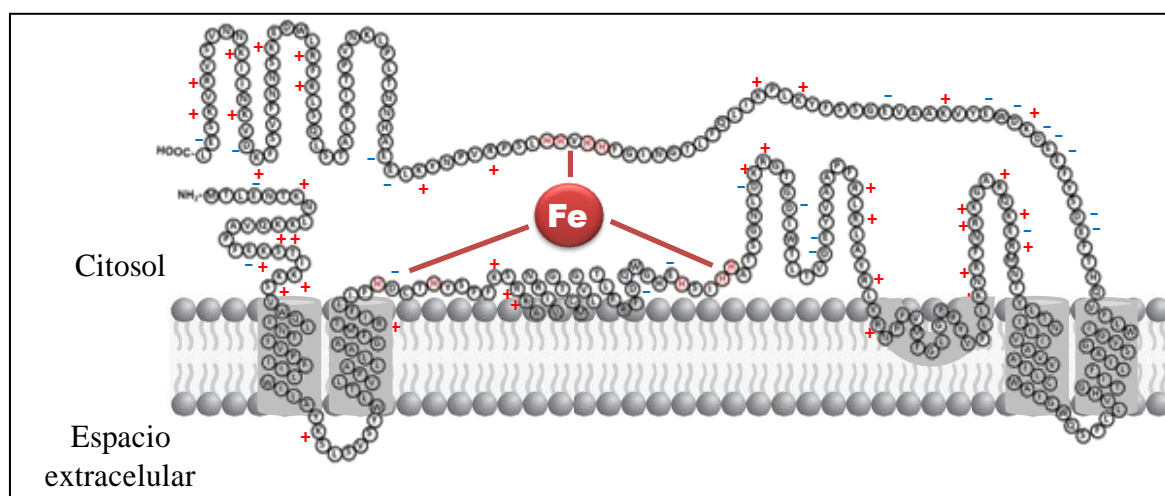


Figura 19. Modelo topológico del producto génico del gen BC2983. Los cilindros grises indican los segmentos transmembrana. La localización de las secuencias conservadas que poseen los residuos de histidina encargados de coordinar el átomo de hierro y esenciales para la actividad enzimática se representan en rojo. Realizado por Dr. Diego Sastre (Comunicación personal).

Como puede observarse en la Figura 19, el modelo topológico propuesto para la proteína BC2983 es diferente de los modelos propuestos tanto para la $\Delta 9$ estearoil-CoA desaturasa de rata y levaduras (Figura 5) como para la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis* (Figura 9). Esta desaturasa presenta además de los 4 dominios transmembrana característicos, un quinto dominio que se inserta en la bicapa de FL pero no termina de atravesarla completamente.

Las características halladas hasta el momento indican que los cuatro genes codificarían desaturasas de membrana.

1.3.2 – Clonado y caracterización funcional de los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Se llevó a cabo la caracterización funcional de los polipéptidos codificados por los genes identificados en el punto anterior utilizando la cepa LC5 de *B. subtilis*, la cual no sintetiza AGI ya que no posee la $\Delta 5$ desaturasa³. Para ello, los cuatro marcos abiertos de lectura que están anotados como putativas desaturasas, BC2983, BC0400, BL02106 y BL02692, se clonaron bajo el control del promotor *P_{xyI}* en el vector pSG1154, generando las cepas MA2983, MA0400, MA2106 y MA2692. El análisis por GC-MS de los AG extraídos de estas cepas reveló que las cepas MA2983 y MA2106 sintetizan AGI con el

Resultados I

doble enlace en la posición 5 y la cepa MA0400 produce AGI con el doble enlace en la posición 10. Sin embargo, no se encontraron AGI en la cepa MA2692 luego del agregado del inductor. La posición del doble enlace se confirmó mediante el análisis de los espectros de masa de los derivados DMDS (Mariana Alemany, trabajo de Tesina).

Para estudiar la expresión de estos genes a partir de sus propios promotores, se clonaron los marcos abiertos de lectura con las regiones 5' corriente arriba en el vector pJM116 que permite la integración ectópica de los mismos en el gen *amyE* de *B. subtilis*. Luego de transformar la cepa de *B. subtilis* LC5 con los vectores recombinantes se obtuvieron las cepas LSC2983, LCS0400, LSC2106 y LSC2692 como se describe en Materiales y Métodos y se muestra en la Figura 20. Asimismo se transformó la cepa LC5 con el vector vacío generando la cepa LSC116, utilizada como control.

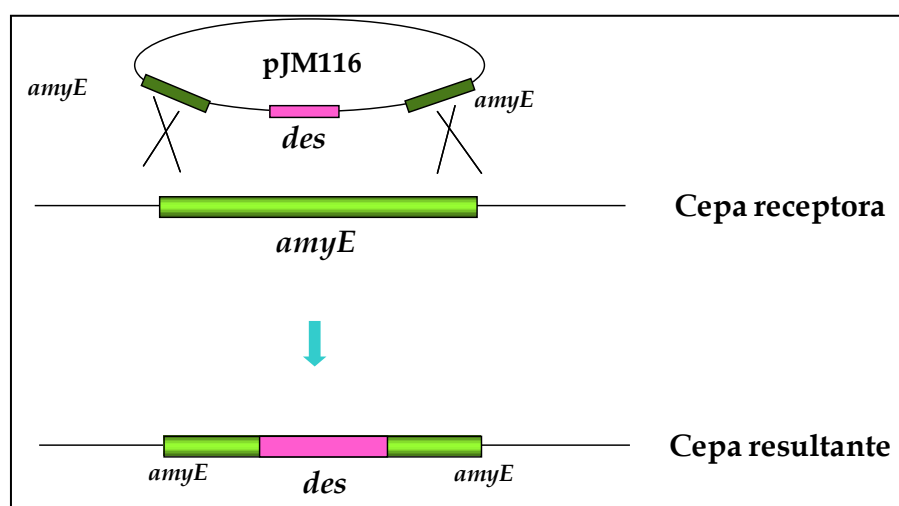


Figura 20. Esquema de la construcción de las cepas de *B. subtilis* LSC2983, LSC0400, LSC2106 y LSC2692. En la parte superior se representa la integración ectópica de los genes BC2983, BC0400, BL02106 y BL02692 en el locus *amyE* de *B. subtilis*. En la parte inferior se muestra el resultado de dicha integración donde queda cada uno de los genes *des* integrado en el cromosoma de la cepa de *B. subtilis* LC5.

En primer lugar se evaluó la funcionalidad de las construcciones obtenidas y para ello se ensayó la actividad desaturasa de cada enzima cultivando todas las cepas en MM a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,4$ se marcaron con 0.2 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{14}C]-palmitato (58 mCi/mM) y se siguieron incubando a 25°C durante 2h, luego de este tiempo, se extrajeron los lípidos, se derivatizaron y analizaron por cromatografía de argenticación. La cuantificación de los AG de la TLC se muestra en la tabla XI.

Resultados I

Tabla XI. Composición de ácidos grasos a 25°C de cepas *B. subtilis* que expresan los genes de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Cepa	% AGS	% AGI
LC5	100	ND
LSC116	100	ND
LSC2983	33 ± 3	67 ± 3
LSC0400	27 ± 2	73 ± 3
LSC2106	65,3 ± 0,4	34,7 ± 0,4
LSC2692	98 ± 1	2 ± 1

La tabla XI presenta los porcentajes de AG de las cepas listadas crecidas a 37°C y luego transferidas a 25°C. ND: no detectado. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

A su vez se prepararon lípidos de todas las cepas cultivadas a 37°C y a 37°C seguido de 25°C para estudiarlos por GC-MS como se describe en Materiales y Métodos. En estos experimentos la posición del doble enlace también se confirmó mediante el análisis de los espectros de masa de los derivados DMDS. En la Tabla XII se resumen los porcentajes de los AGI obtenidos en las cuatro cepas.

Tabla XII. Composición de ácidos grasos insaturados de cepas de *B. subtilis* que expresan los genes de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Cepa	% AGI		Posición del doble enlace ^a
	37°C	25°C	
LC5	ND	ND	ND
LSC116	ND	ND	ND
LSC2983	12 ± 1	39,7 ± 0,4	5
LSC0400	15 ± 2	30 ± 3	10
LSC2106	3 ± 1	12 ± 1	5
LSC2692	ND	ND	ND

Se cultivaron las células en MM hasta fase exponencial a 37°C y luego se dividieron en dos alícuotas, una de ellas se continuó incubando a 37°C y la otra se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos y se convirtieron a MEAG que fueron analizados mediante GC-MS. ND: no detectado. ^aEl número que indica la posición del doble enlace es el primer C del mismo contando desde el extremo carboxilo terminal. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Como puede observarse en las Tablas XI y XII, las cepas que expresan los genes BC2983, BC0400 y BL02106 bajo su propio promotor también son capaces de sintetizar AGI en cepas de *B. subtilis des-*. Las cepas LSC2983 y LSC2106 sintetizaron AGI con el doble enlace en la posición 5 y la cepa LSC0400 en la posición 10, de la misma manera que se había observado al expresar dichos genes bajo el promotor inducible *P_{xyl}*.

Estos resultados confirman lo predicho mediante el análisis *in silico* y mediante los experimentos de expresión con promotores inducibles: los marcos abiertos de lectura

Resultados I

BC2983, BC0400 y BL02106 codifican polipéptidos con actividad desaturasa. Además, permiten asignar correctamente la regioselectividad de las mismas, como $\Delta 5$, $\Delta 10$ y $\Delta 5$ desaturasas, respectivamente. De esta manera, se renombraron los genes que codifican para estas desaturasas como *desA* y *desB* para los genes BC2983 y BC0400 de *B. cereus* y *desL* en el caso del gen BL02106 de *B. licheniformis*. Al gen BL02692 cuyo producto génico no presenta actividad desaturasa, se lo renombró *desX*.

Por otro lado, se observa que las cepas que expresan los genes *desA* y *desL* sintetizan más cantidad de AGI cuando son cultivadas a 25°C como se había observado previamente en cultivos de las cepas *B. cereus* y *B. licheniformis*. Esta información refuerza la hipótesis de que existe regulación de la síntesis de AGI en estas bacterias y sugiere que la expresión o la actividad de estas desaturasas aumentan al disminuir la temperatura de crecimiento. Además, en estos experimentos se determinó que en la cepa que expresa el gen *desB* también se acumulan más AGI $\Delta 10$ a menores temperaturas, lo que indica que la expresión o la actividad de esta desaturasa sí se ve afectada por los cambios en las condiciones de crecimiento y que en *B. cereus*, en donde están las dos proteínas activas, los productos de DesB podrían estar siendo usados por DesA para generar los AG diinsaturados.

Finalmente, a pesar de que el gen BL02692 presenta todas las características típicas de un gen que codifica una desaturasa, la expresión del mismo, ya sea bajo un promotor inducible o bajo su propio promotor, no permite observar acumulación de AGI en los experimentos de GC-MS y sólo una escasa cantidad mediante cromatografía de argentación. Sin embargo, este producto marcado que se evidencia en la TLC podría deberse a otro compuesto diferente de un AGI ya que en la cromatografía gaseosa, en donde se identifican exactamente las moléculas, no hay ningún rastro de AGI en la cepa LSC2692. La actividad de las desaturasas se estudió en diferentes condiciones y cepas y en ningún caso se encontró actividad desaturasa para este gen. Cuando el gen BL02692 se expresó fusionado al gen que codifica para la proteína Mystic en *E. coli*, se evidenció mediante ensayos de Western blot un producto génico que corresponde en peso molecular a la proteína BL02692. Sin embargo, en esta condición tampoco se evidenció actividad desaturasa para el producto de dicho gen (resultados no mostrados).

Por este motivo se continuó el estudio funcional de las dos desaturasas de *B. cereus*, DesA y DesB, y sólo de la desaturasa DesL de *B. licheniformis*.

1.4 – Determinación de los sustratos de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Los motivos consensos encontrados en las secuencias de las desaturasas DesA, DesB y DesL sugieren que las mismas son desaturasas de membrana. Como se desarrolló en la Introducción, las desaturasas de membrana se dividen en dos grupos dependiendo de la especificidad de sustrato. Las acil-CoA desaturasas introducen el doble enlace en AG esterificados a la coenzima A, mientras que las acil lípido desaturasas usan la fracción lipídica de los FL de membrana como sustratos ². Para determinar cuál o cuáles son los sustratos de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* se utilizó un sistema *in vivo* en el cual se desacopló la síntesis de AG de la síntesis de FL inhibiendo este último proceso.

Se ha determinado que PlsC es una acil-ACP-1-acilglicerol-fosfato aciltransferasa involucrada en la síntesis de ácido fosfatídico (Figura 21), precursor de los FL de membrana. En *B. subtilis* la síntesis de FL se inhibe en ausencia de PlsC pero la síntesis de AG continúa haciendo que los mismos se acumulen ¹³⁰.

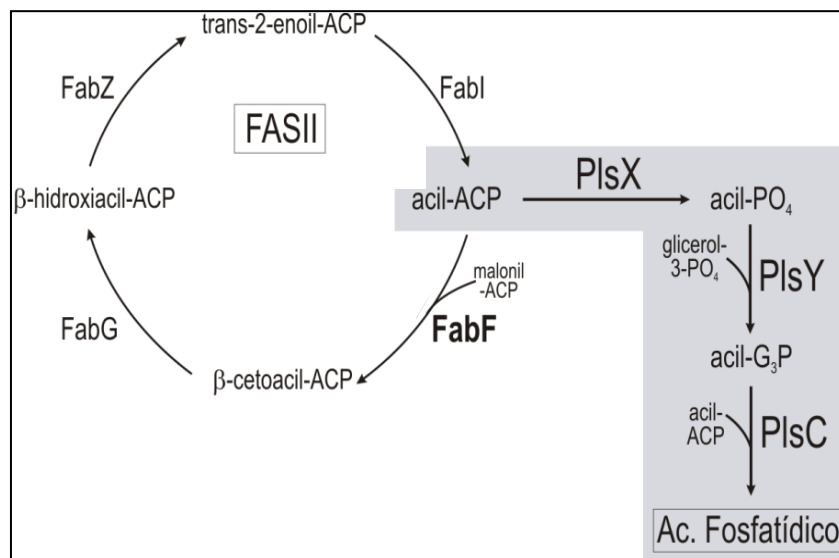


Figura 21. Vías de síntesis de AG y FL en *B. subtilis*. Los acil-ACP de cadena larga son los productos finales de la sintasa de AG de tipo II bacteriano (FAS II). En *B. subtilis*, la síntesis de FL (sombreado en gris) se inicia por la acción de PlsX que convierte los acil-ACPs en acil-PO₄. En el paso siguiente, PlsY transfiere el grupo acilo a la posición 1 de glicerol-3-PO₄, formando acil-G₃P. La acilación de la posición 2 para formar el ácido fosfatídico, está catalizada por PlsC.

Los AG libres (AGL) que se acumulan podrían ser convertidos a acil-CoA por las acil-CoA sintetasas LcfA y YhfL de *B. subtilis* y, de esta manera, las desaturasas podrían usarlos como sustratos para la catálisis. Por ello, para determinar si las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* pueden introducir dobles enlaces en los tioésteres de acil-CoA o en lípidos complejos de membrana, se construyeron cepas de *B. subtilis* que poseen el gen

Resultados I

plsC bajo el control de un promotor inducible por IPTG y que expresan los genes *desA*, *desB* y *desL* bajo el promotor *Pxyl*, obteniéndose las cepas LSC16, LSC17 y LSC18, respectivamente (Figura 22).

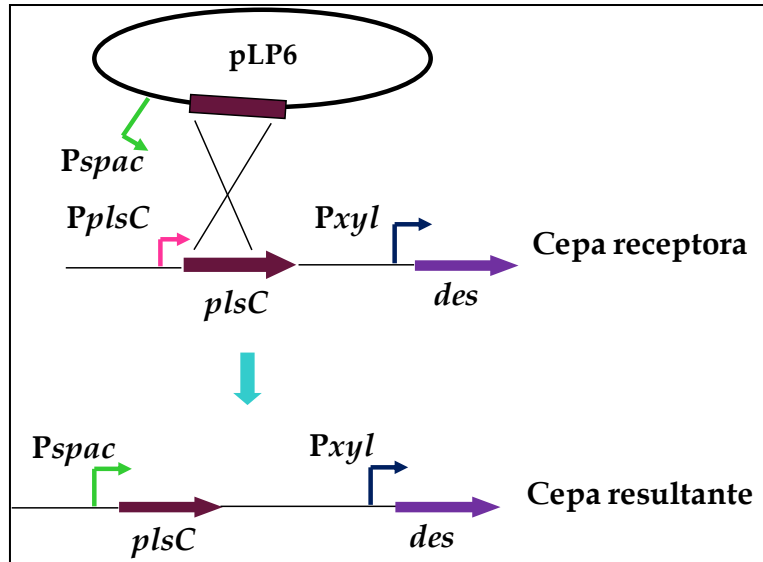


Figura 22. Esquema del evento de integración del plásmido pLP6 en el gen *plsC*. En la parte superior se representa la integración isotópica del plásmido pLP6 en el gen *plsC*. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado de dicha integración, donde el gen *plsC* queda bajo el control transcripcional del promotor *Pspac* inducible por IPTG y los genes de cada desaturasa (*des*) quedan bajo el control transcripcional del promotor *Pxyl* inducible por Xil.

Cuando se cultivan las cepas LSC16, LSC17 y LSC18 en ausencia de IPTG cesa la síntesis de FL, ya que no hay transcripción del gen *plsC* y, por lo tanto, se acumulan AGL como puede verse en la Figura 23A. Para determinar cuál es el sustrato que utilizan las desaturasas en estudio, las tres cepas obtenidas se marcaron con [^{14}C]-acetato en presencia o no de IPTG y los AGL se separaron de los FL en placas de sílica gel. A continuación, la fracción de AGL obtenida en los cultivos sin IPTG y la fracción FL obtenida de los cultivos con IPTG (Figura 23A), se extrajeron de las placas y se derivatizaron para obtener los MEAG de las mismas, los cuales se separaron mediante cromatografía de argentación (Figura 23B).

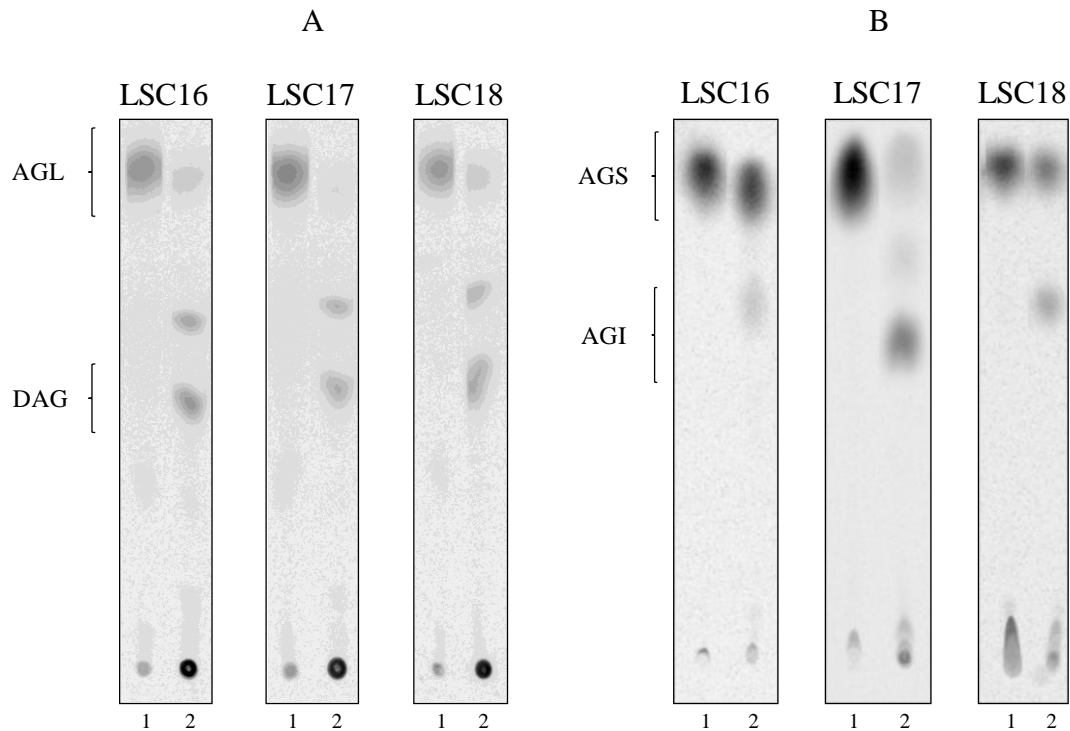


Figura 23. Cromatografías de AG de las cepas de *B. subtilis* LSC16, LSC17 y LSC18 marcadas con [1-¹⁴C]-acetato. Se cultivaron las tres cepas en MM durante toda la noche a 37°C con Xil e IPTG. Al día siguiente se lavaron y resuspendieron en MM fresco con Xil y se crecieron con y sin IPTG. Cuando se detuvo el crecimiento de las cepas crecidas sin IPTG, se tomó una alícuota de cada cultivo, se agregó el acetato radioactivo y se incubó 3 h a 37°C. Se extrajeron los lípidos de todas las fracciones y se separaron por cromatografía en placas de sílica gel (A). Las marcas correspondientes a los FL y AGL se removieron de la placa y se convirtieron a MEAG. Los MEAG marcados se separaron en placas de sílica gel impregnada con nitrato de plata (B). La visualización de la radioactividad se llevó a cabo usando pantallas PhosphorImager y se cuantificó con el programa ImageQuant 5.2. Calle 1: sin IPTG; calle 2: con IPTG. AGL: ácidos grasos libres; DAG: diacilglicérols; AGS: ácidos grasos saturados; AGI: ácidos grasos insaturados.

Como se observa en la Figura 23B, sólo se acumulan AGI en las calles en donde se sembraron las muestras provenientes de los cultivos con IPTG, es decir, en cultivos en donde hay síntesis de FL. Sin embargo, no se encontraron AGI en la fracción de AGL indicando que las desaturasas no pueden actuar sobre AG que no estén esterificados a FL. Este resultado indicaría que los FL están actuando como sustratos de las desaturasas y no los AGL. Es decir que DesA, DesB y DesL reconocen a las cadenas acilo de los FL como sustratos para introducir el doble enlace en la posición que corresponda en cada caso. Por lo tanto, se puede concluir que las tres desaturasas son acil lípido desaturasas.

1.5 – Estudio del sistema de transporte de electrones de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

El proceso de desaturación de AG requiere hierro no hemínico, oxígeno molecular y dos equivalentes de reducción^{2,42,94}. Los electrones son transportados desde el NAD(P)H hasta las desaturasas por dos sistemas de transporte funcionalmente equivalentes y específicos del compartimento subcelular en donde se encuentran. En las desaturasas presentes en el RE de las plantas y en las acil-CoA desaturasas de animales y hongos, la proteína transportadora es el citocromo *b5* ya sea en su forma libre o fusionada a la desaturasa. En las acil-ACP desaturasas solubles y las acil lípido desaturasas de membrana, los electrones son provistos por la Fd. En nuestro laboratorio se ha demostrado, en trabajos previos, que tanto la Fd codificada por el gen *fer*⁹² como las Fld, YkuN e YkuP codificadas en el operón *ykuNOP*⁹³ de *B. subtilis* son capaces de transferir a la desaturasa los electrones necesarios para la catálisis y que la actividad desaturasa es nula en ausencia de las mismas⁹⁴. Es por esto que se propuso investigar si estas proteínas son capaces de transferir electrones a las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*. En primer lugar se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa de comparación de secuencias BLAST y se encontraron en el genoma de *B. cereus* y *B. licheniformis* marcos abiertos de lectura que codifican Fd y Fld. La comparación de las secuencias aminoacídicas de los respectivos polipéptidos con las de *B. subtilis* reveló la presencia de una proteína en *B. licheniformis* con un porcentaje de identidad del 75% a la Fd de *B. subtilis* y una en *B. cereus* 67% idéntica a la Fd de *B. subtilis*. Por otro lado en *B. licheniformis* se encontró una proteína con una identidad del 45% a YkuN de *B. subtilis* y dos proteínas con porcentajes de identidad de 71% y 69% con respecto a YkuP. Por otro lado, en *B. cereus* se hallaron 8 polipéptidos con porcentajes de identidad entre 47% y 57% a YkuN de *B. subtilis*. Sin embargo, no se halló ninguna proteína con identidad significativa a YkuP. Además ninguna de las proteínas encontradas en *B. licheniformis* forman parte de un operón como en el caso del operón *ykuNOP* de *B. subtilis*. Debido a la presencia de estas proteínas en estas bacterias y a los altos porcentajes de identidad que presentan con respecto a Fd y Fld de *B. subtilis*, se decidió evaluar, en *B. subtilis*, la participación de las mismas en el proceso de desaturación de las desaturasas DesA, DesB y DesL. Para ello se construyeron las cepas de *B. subtilis des-* LSA4383, LSA4300 y LSA4321 mutantes en el gen *fer* y que expresan los genes *desA*, *desB* y *desL* bajo su propio promotor. Para evaluar si Fd es requerida para la actividad de DesA, DesB y DesL, se marcaron con palmitato radioactivos en MM-MIV las cepas deficientes en dicha proteína y las isogénicas *fer+* (LSC2983,

Resultados I

LSC0400 y LSC2106) y se ensayó la conversión de dicho AG a ácido *cis*-hexadecenoico. Las cepas deben cultivarse en medio MM-MIV conteniendo los AA metionina, isoleucina y valina (MIV) para evitar el período de latencia largo que tienen las bacterias en ausencia de Fd. Luego de la marcación a 25°C h, se extrajeron y derivatizaron los lípidos y se analizaron mediante TLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Actividad desaturasa en cepas de *B. subtilis* mutantes en Fd.

%AG	LSC2983 (<i>fer</i> +)	LSA4383 (<i>fer</i> -)	LSC0400 (<i>fer</i> +)	LSA4300 (<i>fer</i> -)	LSC2106 (<i>fer</i> +)	LSA4321 (<i>fer</i> -)
AGS	38 ± 2	66 ± 2	25 ± 3	31 ± 2	44 ± 4	70 ± 3
AGI	62 ± 2	34 ± 2	75 ± 3	69 ± 2	56 ± 4	30 ± 3

Las células de las cepas que expresan Fd LSC2983, LSC0400 y LSC2106 y de las cepas mutantes en el gen *fer* LSA4383, LSA4300 y LSA4321, se cultivaron en MM-MIV a 37°C hasta fase exponencial. Se marcaron alícuotas de los cultivos con 0.2 µCi de [¹⁴C]-palmitato a 25°C durante 2 h. Se extrajeron los lípidos marcados y se separaron mediante cromatografía de argentación. La radioactividad se cuantificó con el programa ImageQuant 5.2. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del total de AG.

Como puede observarse en la Tabla XIII se detectó síntesis de AGI en todas las cepas ensayadas. Sin embargo, la desaturación del ácido palmítico en la cepa LSA4383, que expresa la desaturasa DesA y carece de Fd, fue un 50% menor que en la cepa parental LSC2983. Por otro lado, la actividad Δ10 desaturasa no se vio influenciada por la ausencia de Fd. En el caso de la cepa LSA4321, que expresa DesL de *B. licheniformis* y es mutante en el gen *fer*, se encontró que existe una disminución del 50% de la actividad desaturasa comparada con la cepa parental (Tabla XIII).

Como se mencionó anteriormente, las Fld también participan en la biosíntesis de AGI en *B. subtilis*⁹⁴. Por ello, para evaluar si también participan en dicho proceso en las desaturasas en estudio, se construyeron las cepas de *B. subtilis* LSA2883, LSA2800 y LSA2821 (Figura 24). Las mismas no presentan Fd, expresan condicionalmente el operón *ykuNOP*, en el que están codificadas las Fld, bajo el promotor inducible por IPTG *Pspac* y expresan, bajo su propio promotor, los genes *desA*, *desB* y *desL*, respectivamente.

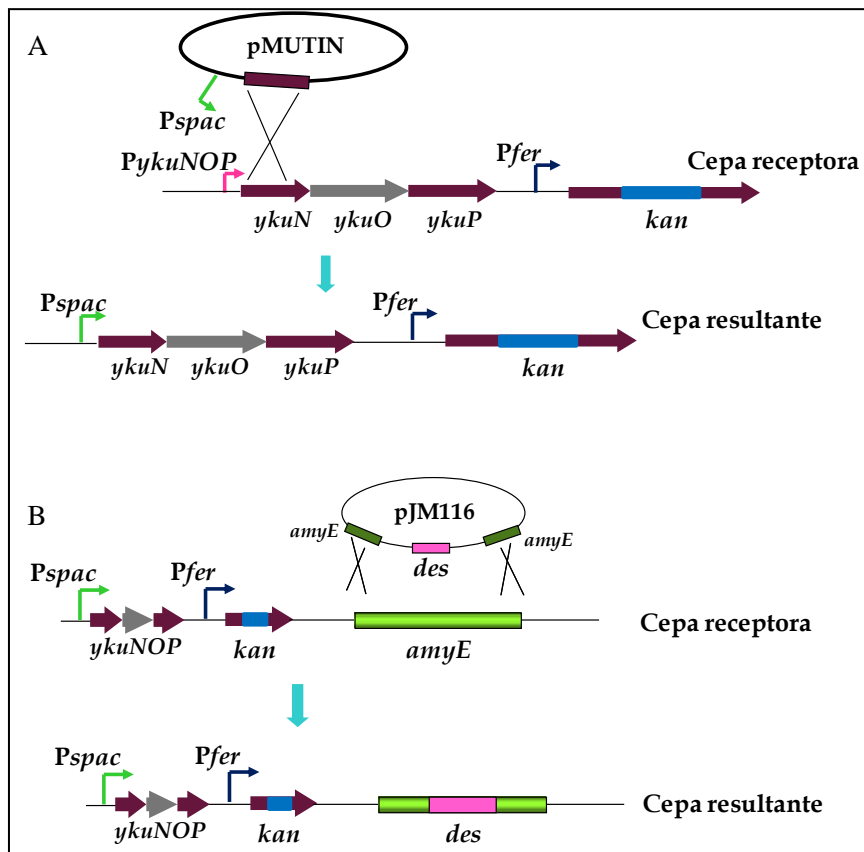


Figura 24. Esquema de la construcción de las cepas de *B. subtilis* LSA2883, LSA2800 y LSA2821. A) Evento de integración del vector pMutin en el operón *ykuNOP* de la cepa L43. En la parte superior se representa la integración isotópica del vector pMutin en el operón *ykuNOP*. En la parte inferior de la figura se muestra el resultado de dicha integración, donde el operón queda bajo el control transcripcional del promotor *Pspac* inducible por IPTG. B) Evento de integración de cada uno de los genes *des* en el locus *amyE* de las cepas mutantes en el gen *fer* y el operón *ykuNOP*. En la parte superior se representa la integración ectópica de los genes de las desaturasa *desA*, *desB* y *desL* en el locus *amyE* de *B. subtilis*. En la parte inferior se muestra el resultado de dicha integración donde queda cada uno de los genes *des* integrado en el cromosoma de la cepa mutante en en gen *fer* y el operón *ykuNOP*.

Las células se cultivaron inicialmente en ausencia de IPTG, en esta condición alcanzan una $DO_{600} = 0,4$ y el crecimiento se detiene debido a que las mismas no poseen Fd ni Fld. En este momento se toma la primera muestra para marcar con palmitato. Luego, se agregó al medio de cultivo IPTG y 2 h más tarde, cuando se reanuda el crecimiento porque se restaura la síntesis de Fld, se volvió a tomar una segunda muestra de cada cultivo. El objetivo de tomar una muestra una vez que el operón se induce nuevamente es determinar si la desaturasa aún se encuentra activa, lo cual permitirá remitir los resultados obtenidos con respecto a la síntesis de AGI a la ausencia de dadores de electrones y no a la presencia de una desaturasa inactiva. Cada una de las muestras marcadas con palmitato se incubó 2 h a 25°C. A continuación se extrajeron y derivatizaron los lípidos y se analizaron

Resultados I

por cromatografía de argenticación como se muestra en la Figura 25. Los valores de la cuantificación de los AGS y AGI se resumen en la Tabla XIV.

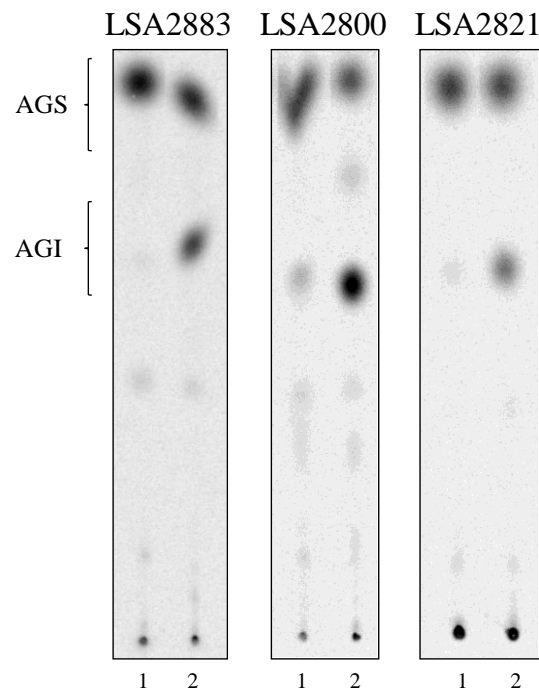


Figura 25. Cromatografía de argenticación de AG de las cepas de *B. subtilis* LSA2883, LSA2800 y LSA2821 marcadas con [1-¹⁴C]-palmitato. Se cultivaron las tres cepas en MM-MIV durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se lavaron y resuspendieron en MM-MIV fresco y se crecieron sin IPTG hasta que se detuvo el crecimiento, en ese momento se tomó una alícuota de cada cultivo, se agregó el palmitato radioactivo y se incubó 2 h a 25°C. Al resto de los cultivos se les agregó IPTG y se incubó 2 h a 37°C. Luego se tomó una alícuota de cada cultivo, se agregó el palmitato radioactivo y se incubó 2 h a 25°C. Se extrajeron los lípidos de todas las fracciones y se separaron por cromatografía de argenticación. La visualización de la radioactividad se llevó a cabo usando pantallas PhosphorImager y se cuantificó con el programa ImageQuant 5.2. Calle 1: sin IPTG; calle 2: con IPTG. AGS: ácidos grasos saturados; AGI: ácidos grasos insaturados.

Tabla XIV. Actividad desaturasa en cepas de *B. subtilis* mutantes en Fd y Fld.

%AG	LSA2883 (<i>fer</i> -)		LSA2800 (<i>fer</i> -)		LSA2821 (<i>fer</i> -)	
	-IPTG (s/Fld)	+IPTG (c/Fld)	-IPTG (s/Fld)	+IPTG (c/Fld)	-IPTG (s/Fld)	+IPTG (c/Fld)
AGS	97 ± 2	65 ± 3	93 ± 3	37 ± 3	96 ± 1	54 ± 2
AGI	3 ± 2	35 ± 3	7 ± 3	63 ± 3	4 ± 1	46 ± 2

Las células de las cepas mutantes en el gen *fer* y que expresan condicionalmente el operón *ykuNOP* LSA2883, LSA2800 y LSA2821 se cultivan en MM-MIV a 37°C hasta fase exponencial con o sin IPTG. Se marcan alícuotas de los cultivos con 0.2 µCi de [¹⁴C]-palmitato a 25°C durante 2 h. Se extraen los lípidos marcados y se separan mediante cromatografía de argenticación. La radioactividad se cuantifica con el programa ImageQuant 5.2. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del total de AG.

Como se observa en la Figura 25 cuando no hay inductor en el medio, es decir, los cultivos no producen Fd y están empobrecidos en Fld, no hay acumulación de AGI. En

Resultados I

cambio, al agregar IPTG se restablece la síntesis de Fld y se vuelve a ver producción de AGI en las tres cepas. Se determinó para las tres cepas que la síntesis de AGI en ausencia de dadores de electrones disminuye alcanzado valores de entre 3-7% del total de la radioactividad incorporada a los AG. Cuando se agrega el inductor se restablece la síntesis de AGI a valores cercanos a los de las cepas parentales (Tabla XIII). Con los resultados obtenidos se puede deducir que tanto DesA como DesL utilizan Fd y Fld como proteínas transportadoras de electrones, mientras que para DesB las principales dadoras serían las Fld. Asimismo se determinó que la Fd y las Fld son las únicas proteínas transportadoras en *B. cereus* y *B. licheniformis* y que no hay actividad desaturasa en ausencia de las mismas.

Es este capítulo de la Tesis se ha descrito la existencia de dos marcos abiertos de lectura en *B. cereus* a los que se ha renombrado como DesA y DesB. DesA es una desaturasa con actividad $\Delta 5$ que utilizaría como sustrato los AG esterificados a los FL de membrana. DesB también es una desaturasa pero con actividad $\Delta 10$ cuyos sustratos de reacción también serían los AG de los FL de la membrana. Además se determinó que DesA utilizaría tanto la Fd como las Fld como proteínas transportadoras mientras que DesB tendría preferencia por las Fld. Por otro lado se determinó que si bien en *B. licheniformis* existen dos marcos abiertos de lectura que codificarían putativas desaturasas, sólo el gen BL02106 codifica un producto que presenta actividad desaturasa, al que se lo renombró como DesL. DesL tiene actividad $\Delta 5$ desaturasa y, al igual que DesA y DesB, sería una acil lípido desaturasa. Además, DesL también puede usar Fd y Fld como dadores de electrones. El segundo marco abierto de lectura hallado en *B. licheniformis* no presentó actividad desaturasa en las condiciones ensayadas. Finalmente, las tres desaturasas en estudio sintetizan mayor proporción de AGI a bajas temperaturas, lo cual estaría indicando que la actividad de las mismas o la expresión de los genes que las codifican se encuentran reguladas por la temperatura de crecimiento. Este tema se analizará en el capítulo III de este trabajo de Tesis.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Los AGI son componentes esenciales de la membrana celular. Asimismo son moléculas esenciales para la replicación de ADN, la diferenciación y la muerte celular. La perturbación en los niveles de los mismos puede ser letal para la célula a causa de la disrupción de la estructura de membrana ¹⁴². La fluidez de la misma es de importancia central para la función e integridad del sistema celular. Un parámetro crucial que determina la fluidez de la membrana es el balance entre los AGS y los AGI. Los organismos vivos, en particular los poiquilotermos, responden a una disminución en la temperatura aumentando la proporción de AGI. Este fenómeno ha sido designado con el nombre de adaptación homeoviscosa ¹. Los AGI son sintetizados por las desaturasas que son un tipo especial de oxigenasas que pueden remover dos hidrógenos de una cadena hidrocarbonada y catalizar la formación de un doble enlace. En este capítulo se describió la biosíntesis de AGI en diferentes especies del género *Bacillus* cultivadas en condiciones definidas a 37°C y luego de un descenso en la temperatura de crecimiento a 25°C. A excepción de *P. polymyxa* todos los bacilos estudiados responden a esta disminución en la temperatura de crecimiento, aumentando la proporción de AGI. Sin embargo, *P. polymyxa*, al igual que otras especies dentro de este género, aumenta la cantidad de AGR (de 25% a 38%) para contrarrestar el efecto del descenso térmico sobre la fluidez de la membrana.

Se realizó la caracterización funcional de las desaturasas presentes en *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis* ATCC 14580. Diferentes autores han mostrado que *B. cereus* sintetiza AGI con los dobles enlaces en diferentes posiciones ^{8,143,144}. de Sarrau y colaboradores hallaron que *B. cereus* ATCC 14579 sintetiza no sólo los AGI $\Delta 5$ y $\Delta 10$ característicos de esta especie, sino que también encontraron AGI 16:1 $\Delta 6$ y 18:1 $\Delta 9$, cuando esta bacteria se cultiva en medios ricos ¹⁴³. Haque y Rusell han estudiado muchas cepas diferentes de *B. cereus* aisladas de muestras de arroz y cultivadas en medios ricos en donde también encontraron AGI con insaturaciones $\Delta 9$ ¹⁴⁴. Durante este trabajo de Tesis se ha demostrado que en MM definido, en el cual no hay ninguna fuente externa de AG, *B. cereus* ATCC 14579 solamente produce AG monoinsaturados $\Delta 5$, $\Delta 10$ y diinsaturados $\Delta 5,10$; éstos últimos no habían sido detectados previamente por ninguno de los autores citados. Los AGI $\Delta 6$ y $\Delta 9$ hallados en otras investigaciones provienen del medio de cultivo y no son productos de las desaturasas de dichos microorganismos.

De la misma manera, Fulco ha detallado la presencia de AGI con los dobles enlaces en las posiciones $\Delta 5$, $\Delta 8$, $\Delta 9$ y $\Delta 10$ en diferentes cepas de *B. licheniformis* ⁵. En nuestro laboratorio se demostró que todas las cepas de *B. licheniformis* estudiadas sintetizan

únicamente AGI $\Delta 5$ en MM y que los demás isómeros hallados serían incorporados por las bacterias del medio de cultivo. Estos resultados fueron obtenidos en nuestro laboratorio al cultivar *B. licheniformis* en medios ricos, reafirmando así la hipótesis de trabajo que propone que sólo trabajando en medios mínimos y definidos es posible determinar la correcta composición de AG de las membranas de las bacterias (Mariana Alemany, Trabajo de Tesina). De allí el profundo interés en determinar las condiciones de crecimiento en MM para poder realizar una correcta identificación de los AG de las cepas en estudio.

También se demostró que tanto *B. cereus* como *B. licheniformis* responden a una disminución en la temperatura de crecimiento aumentando la proporción de AGI. *B. licheniformis* aumenta al doble la cantidad de AGI cuando se transfieren a 25°C los cultivos crecidos a 37°C, (de 3,2 % a 6 %, Tabla IX). En el caso de *B. cereus* los AGI aumentan de 27%, cuando se cultiva a 37°C, a 45% a 25°C y se ve un incremento especialmente de los AGI $\Delta 5$ de 2,7 a 8 %. Los diinsaturados aumentan 6 veces su cantidad de 2% a 37°C a 12% a 25°C, mientras que la proporción de AGI $\Delta 10$ prácticamente no sufre cambios (Tabla IX). Este hallazgo es llamativo ya que estas dos bacterias utilizarían principalmente la variación en la cantidad de AGI como mecanismo de adaptación a bajas temperaturas, mientras que la mayoría de los bacilos previamente descritos en la bibliografía estimulan la biosíntesis de AGR de la serie anteiso para aumentar el desorden en la membrana⁴⁹ y mantener una correcta fluidez ante un descenso en la temperatura de crecimiento. *B. cereus* sólo aumenta de 5,4 a 7% la cantidad de AGR anteiso y *B. licheniformis* mantiene constante la proporción de los mismos alrededor de 18%. Esta observación también estaría influenciada por las condiciones de crecimiento de estas bacterias ya que cuando la determinación se hace en medio rico existen, además de AGI, precursores de los AGR que estarían influyendo sobre el porcentaje final de los mismos.

B. cereus posee dos genes anotados como putativas desaturasas, BC2983 y BC0400. La expresión heteróloga de dichos genes en una cepa *B. subtilis* que no sintetiza AGI, reveló que ambos codifican desaturasas activas que introducen el doble enlace en las posiciones $\Delta 5$ y $\Delta 10$ de las cadenas acilo de los AG esterificados a FL, respectivamente. En el genoma de *B. licheniformis* hay anotados dos genes como posibles desaturasas. La expresión de estos genes en la misma cepa de *B. subtilis* demostró que sólo el producto génico del gen BL02106 es activo como desaturasa con regioselectividad $\Delta 5$, mientras que el segundo gen no codificaría una desaturasa activa. De esta manera se renombraron las

Discusión I

desaturasas como DesA en el caso de la $\Delta 5$ desaturasa y DesB para la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus* y DesL, para la única $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis*. El gen BL02692 se denominó *desX* por su alta homología con otras desaturasas, aún cuando no pudo determinarse qué actividad posee.

Cuando se expresaron los genes *desA* y *desB* de *B. cereus* en la cepa de *B. subtilis* mutante en el gen *des*, se observó mayor acumulación de AGI, tanto para DesA como para DesB, cuando los cultivos a 37°C se transfirieron a menores temperaturas de crecimiento (Tabla XII). Esta observación contrasta con los resultados obtenidos al analizar el perfil lipídico de *B. cereus* (Tabla IX), en donde se observa que al disminuir la temperatura de crecimiento, el contenido de los AGI $\Delta 10$ permanece prácticamente constante. Este hecho estaría sugiriendo que, en *B. cereus*, los isómeros $\Delta 10$ pueden ser desaturados por DesA, dando como resultado mayor cantidad de AG diinsaturados $\Delta 5,10$ a 25°C. La cantidad de isómeros $\Delta 5$ obtenidos al analizar tanto los AG de *B. cereus* (Tabla IX) como cuando se expresa DesA en *B. subtilis* (Tabla XII), aumentan cuando la temperatura de crecimiento disminuye. Estos resultados indican que la inducción a bajas temperaturas de la síntesis de AGI podría deberse a un aumento en la expresión o en la actividad desaturasa de ambas enzimas cuando se disminuye la temperatura de crecimiento.

B. licheniformis presenta dos genes anotados como putativas desaturasas. Sin embargo, con los experimentos llevados a cabo en este trabajo de Tesis, no se pudo hallar actividad desaturasa para el gen *desX*. Como se definió anteriormente, el término desaturasa incluye a todas las enzimas capaces de activar el oxígeno y usar este reactivo para una subsecuente modificación de un enlace C-H de un sustrato saturado o monoinsaturado, dando como productos no sólo dobles enlaces *cis*- o *trans*-, sino que también la inserción de grupos hidroxilo o epoxi, o incluso, como se ha postulado, la decarbonilación de grupos aldehído y deshidrogenación de ubiquinoles⁴². Entonces, es posible que este gen esté codificando una enzima con una actividad diferente, cuyos productos finales de reacción enzimática no se pudieron detectar con las técnicas analíticas utilizadas al analizar los extractos lipídicos de las cepas que expresan este gen. Cabe destacar que los resultados obtenidos a partir de la expresión del gen *desX* son coherentes con los previamente desarrollados a partir de los cultivos de la cepa salvaje. En el perfil lipídico de la cepa *B. licheniformis* ATCC 14580 se encontraron únicamente AGI $\Delta 5$, los cuales serían producto de la desaturasa codificada en el gen *desL*, y no se evidenciaron otra clase de AGI. De esta manera podría suceder que la proteína codificada por el gen *desX* genere productos diferentes a los AGI y que no se han podido detectar con las técnicas

Discusión I

utilizadas o bien que dicho gen, codifique para una desaturasa, en este caso podría ser una $\Delta 5$ desaturasa debido a los altos porcentajes de identidad y similitud con otras $\Delta 5$ desaturasas y que presente alguna mutación en algún dominio esencial para su actividad que hace que la misma no sea activa en las condiciones ensayadas.

Mediante la construcción de enzimas quiméricas, se pudo determinar, en nuestro laboratorio, que la fusión del dominio N-terminal del gen *desA* al gen *desX*, restauraba la actividad desaturasa del polipéptido codificado por este gen. La expresión de la proteína quimérica permitió obtener AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 5$ (Diego Sastre, comunicación personal). Asimismo, el cambio puntual de la cisteína en la posición 40 de *desX* por tirosina, que es el correspondiente AA presente en las desaturasas activas, restauró la actividad desaturasa de dicha enzima. Estos resultados indicarían que *B. licheniformis*, en algún momento durante la evolución, podría haber adquirido por transferencia horizontal de genes un segundo gen que codificaba una $\Delta 5$ desaturasa o bien podría haber duplicado el gen que ya poseía generando una secuencia paróloga en otra región de su genoma. Esta proteína paróloga tendría la misma o similar función, no obstante, se sabe que muchas veces no existe la misma fuerza selectiva original sobre la copia duplicada del gen, y ésta puede adquirir nuevas funciones por mutación y selección. En este caso, el producto del gen *desX* no debe haber tenido una función que le significara una ventaja al organismo y por lo tanto, dicho gen podría haber sufrido mutaciones que inactivaron definitivamente la actividad de su producto génico.

Debido a que las predicciones bioinformáticas realizadas con estas proteínas indican que las tres serían desaturasas de membrana, se estudió la naturaleza de los sustratos mediante experimentos *in vivo* utilizando una cepa de *B. subtilis* mutante en el gen *plsC* que presenta desacoplada la síntesis de AG con la de FL¹³⁰. Grau y de Mendoza habían demostrado que los sustratos de la desaturasa de *B. subtilis* son los AG unidos a los FL de la membrana⁹⁰. En este trabajo de Tesis se pudo determinar que las tres desaturasas en estudio efectivamente introducen los dobles enlaces en las cadenas acilo de los AG esterificados a los FL de la membrana. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que DesA, DesB y DesL serían acil lípido desaturasas del tipo de desaturasas de membrana tilacoides de cianobacterias y cloroplastos de plantas⁵⁷. Si bien los experimentos llevados a cabo con las cepas mutantes en el gen *plsC* sugieren que los AG deben ser incorporados a los FL para poder ser desaturados, no se puede descartar la presencia, tanto en *B. cereus* como en *B. licheniformis* de una vía que involucre la de-acetilación de los lípidos de membrana, la esterificación de los mismos a una coenzima, la desaturación de los

Discusión I

tioésteres formados y la re-acilación del AGI a los FL de la membrana. Para determinar si esta vía opera en estas bacterias se pueden realizar los mismos experimentos llevados a cabo con la cepa *plsC* pero en una cepa mutante en el gen *panE*, que codifica para la reductasa de ácido cetopantoico¹⁴⁵. Esta cepa es incapaz de sintetizar pantoato, precursor del pantotenato. El pantotenato se utiliza para la biosíntesis de CoA y ACP¹⁴⁶. Si en estas cepas todavía se observa acumulación de AGI se podría corroborar que los AG unidos a los FL de la membrana pueden ser desaturados sin necesidad de estar unidos previamente a alguna coenzima como CoA o ACP, como se había determinado previamente para la desaturasa de *B. subtilis*⁹⁰.

La reacción de desaturación consiste en la remoción de dos átomos de hidrógeno formando un doble enlace *cis* en la cadena hidrocarbonada de un AG, proceso para el cual las desaturasas utilizan equivalentes de reducción que obtienen de una cadena de transporte de electrones. En esta cadena participa una proteína transportadora de electrones que, en el caso de las desaturasas bacterianas, es la Fd. En nuestro laboratorio se había descrito por primera vez la participación de las Fld como proteínas transportadoras hacia una desaturasa cuando se analizó la síntesis de AGI en cepas de *B. subtilis* mutantes en dichas proteínas. Así se vio que la desaturasa de *B. subtilis*, Des, utiliza tanto Fd como Fld (YkuN e YkuP) en la cadena de transporte⁹⁴. Utilizando las mismas cepas de *B. subtilis* se estableció que DesA, DesB y DesL también pueden obtener los electrones requeridos para la catálisis de la Fd como de las Fld. Sin embargo, DesB no utilizaría la Fd tan eficiente como las Fld ya que en ausencia de Fd se produce sólo un ligero descenso de la síntesis de AGI. Si bien estos experimentos se llevaron a cabo en cepas de *B. subtilis*, mediante análisis *in silico*, se pudieron identificar proteínas ortólogas en *B. cereus* y *B. licheniformis* con elevados porcentajes de identidad a la Fd y las Fld de *B. subtilis*. Estos datos, junto con los resultados de los experimentos detallados, sugieren que es altamente probable que Fd y Fld sean los dadores de electrones fisiológicos de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA ESENCIALIDAD DE LOS GENES DE LAS DESATURASAS DE *Bacillus cereus*.

RESULTADOS CAPÍTULO II

En el Capítulo I se describió la caracterización funcional de las desaturasas presentes en *B. licheniformis* y *B. cereus*. Se determinó, en *B. licheniformis*, la presencia de una acil lípido desaturasa activa denominada DesL, que tiene actividad $\Delta 5$ y organización génica idéntica a la desaturasa Des de *B. subtilis* ya que, corriente abajo de este gen, se encontraron dos genes con homología al sistema DesK/R de *B. subtilis*. Además se halló un segundo gen, *desX*, anotado previamente como putativa desaturasa, con alta homología a desaturasas delta cinco, al cual no se le encontró ninguna actividad en las condiciones ensayadas. Por otro lado, en *B. cereus* se encontraron dos desaturasas encargadas de sintetizar una inusualmente elevada proporción de AGI. Por un lado, DesA que es una $\Delta 5$ acil lípido desaturasa y se encuentra regulada por temperatura. Sin embargo, su organización genética no muestra la presencia, corriente abajo, de los genes regulatorios *desK-desR*, como sucede en *B. subtilis*. Por otro lado, DesB es una acil lípido desaturasa pero con actividad $\Delta 10$ y muy bajos porcentajes de identidad y similitud con respecto a Des de *B. subtilis*. Por todas estas observaciones se decidió estudiar el rol funcional de DesA y DesB en *B. cereus*. Para ello se inactivaron los genes que codifican estas desaturasas y se evaluó la función de las mismas en la fisiología de *B. cereus*, analizando el impacto de las mutaciones sobre el crecimiento y la síntesis de AGI en esta bacteria y la adaptación a bajas temperaturas de crecimiento.

2.1 – Construcción de cepas mutantes de *B. cereus* en los genes *desA* y *desB*.

Con el objeto de evaluar la esencialidad de las desaturasas de *B. cereus* sobre el crecimiento y la síntesis de AGI, se construyeron las cepas LCER2983, LCER0400 y LCER2904. Para este fin se desarrolló una estrategia novedosa basada en una modificación de la técnica original utilizada para construir cepas mutantes en *B. anthracis*¹²⁸. La innovación se basa en la utilización de un casete de resistencia a un ATB lo cual resulta en una búsqueda mucho más rápida y sencilla de las cepas mutantes. Para la construcción de las mutantes se diseñaron plásmidos conteniendo fragmentos correspondientes a las regiones 5' y 3' de los genes *desA* y *desB*, interrumpidos por un casete de resistencia a un ATB (Figura 26). Con los plásmidos obtenidos se transformó la cepa salvaje de *B. cereus* como se describe en Materiales y Métodos y se llevó a cabo la búsqueda de las cepas mutantes siguiendo la estrategia que se detalla en la Figura 26.

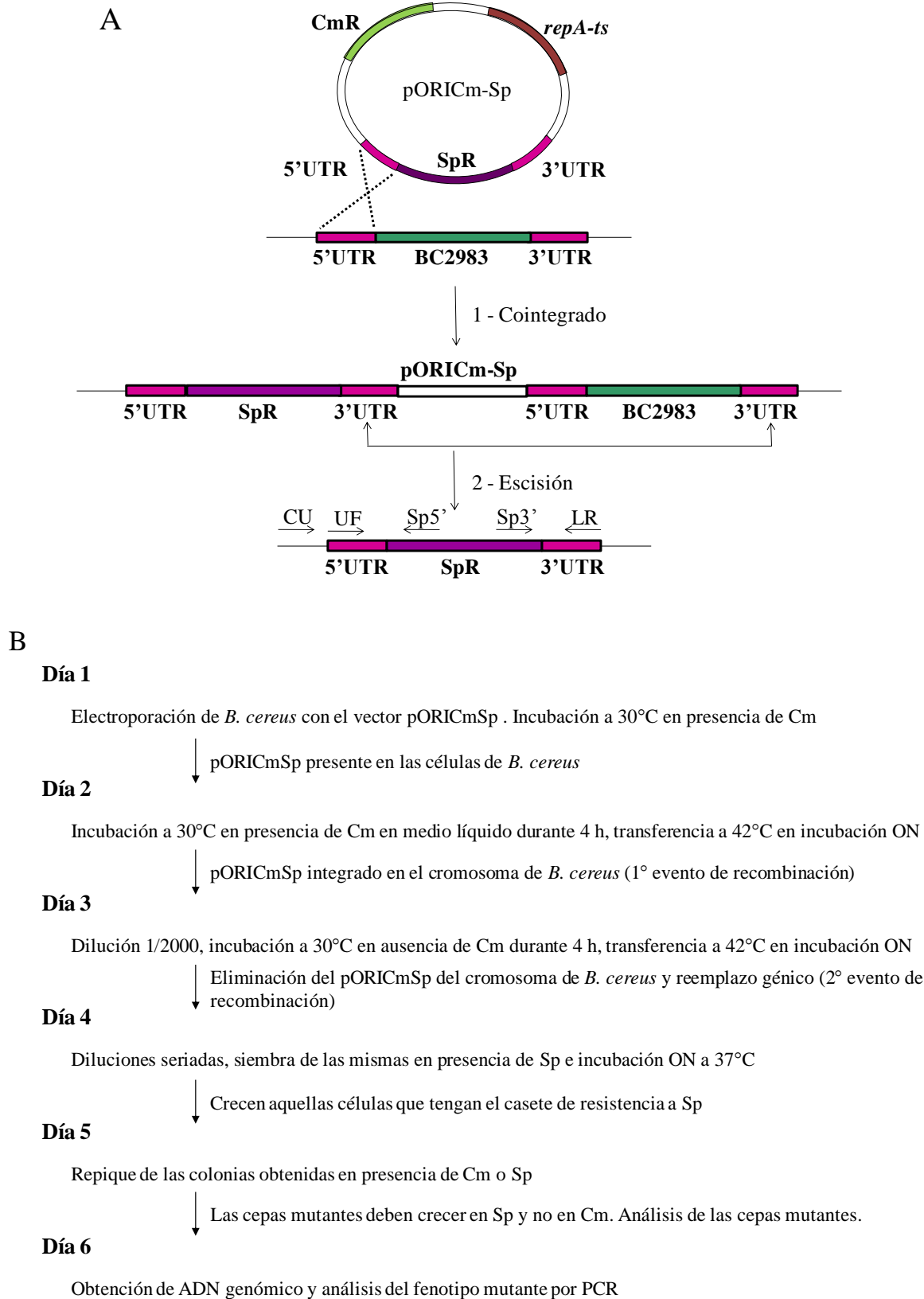


Figura 26. Estrategia para obtención de la cepa mutante LCER2983. La misma estrategia fue utilizada para la obtención de todas las cepas mutantes, cada una con su correspondiente plásmido. A) Diseño del plásmido pORICm-Sp. B) Estrategia de búsqueda de las cepas mutantes.

Resultados II

De esta manera se obtuvieron las cepas mutantes LCER2983 y LCER0400. En la cepa LCER2983 se reemplazó el gen *desA* por un casete de resistencia a Sp, en la cepa LCER0400 se reemplazó el gen *desB* por un casete de resistencia a Kan. Además, con el plásmido utilizado para generar la mutante en el gen *desB* se transformó la cepa mutante en el gen *desA* generando la cepa doble mutante LCER2904 en donde ambos genes se encuentran inactivados por los correspondientes casetes de resistencia a ATB.

A continuación, se analizó el comportamiento de las cepas mutantes en diferentes medios de cultivos con el fin de analizar el impacto de las mutaciones en estos genes en el crecimiento y la síntesis de AG en *B. cereus*.

2.2 – Caracterización fenotípica de la cepa LCER2983 en diferentes condiciones de cultivo.

2.2.1 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER2983 en diferentes condiciones de cultivo.

Las pruebas fisiológicas realizadas en medio rico mostraron que la cepa LCER2983 no presenta ninguna diferencia en el tiempo de crecimiento en medio sólido y líquido, ni distinta morfología de colonia o al microscopio comparado con la cepa salvaje.

Para analizar el crecimiento en MM, se cultivaron las cepas salvaje y mutante en la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus* en dicho medio a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon medios frescos con dicho cultivo y se incubó un frasco a 37°C y uno a 25°C con cada una de las cepas. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 27.

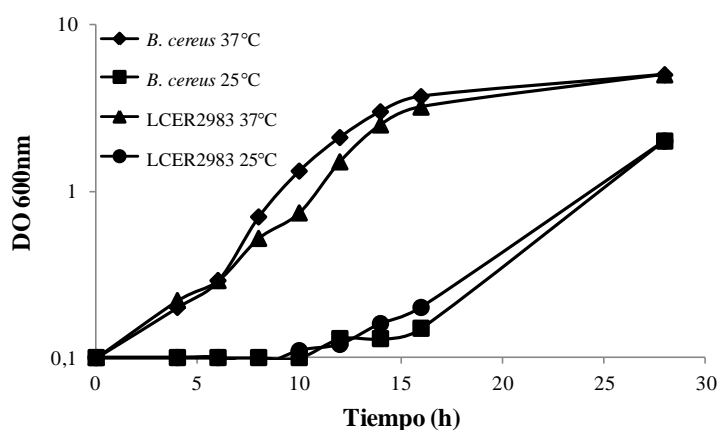


Figura 27. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER2983 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desA*+) y LCER2983 (*desA*) se cultivaron a 37°C durante la noche en MM. Las células se resuspendieron en MM y se cultivaron a 37°C o 25°C. Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

Resultados II

Como puede observarse en la Figura 27 el crecimiento de la cepa LCER2983 en MM líquido es igual al de la cepa salvaje, presentado el mismo período de latencia y tiempo de generación. En este medio de cultivo tampoco se observaron diferencias en la morfología de colonia o al microscopio óptico (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el gen *desA* no sería esencial para el crecimiento de *B. cereus* en las condiciones ensayadas.

2.2.2 – Síntesis de ácidos grasos en la cepa LCER2983.

Para estudiar la composición de AG en la cepa LCER2983 se cultivaron las cepas salvaje y mutante en el gen *desA*, en MM durante toda la noche y al día siguiente se resuspendieron las células en MM y se cultivaron a 37°C hasta una $DO_{600} = 1$ en donde los cultivos se dividieron en dos fracciones. Una de ellas se continuó incubando a 37°C y la otra se cultivó a 25°C durante toda la noche. A continuación, se recolectaron las células y se extrajeron y derivatizaron los lípidos como se describen en Materiales y Métodos. Los mismos se analizaron mediante experimentos de GC-MS. En la Figura 28 se muestra una ampliación entre los 8 y los 11 min de los cromatogramas superpuestos obtenidos para la cepa salvaje y mutante en la $\Delta 5$ desaturasa a 25°C.

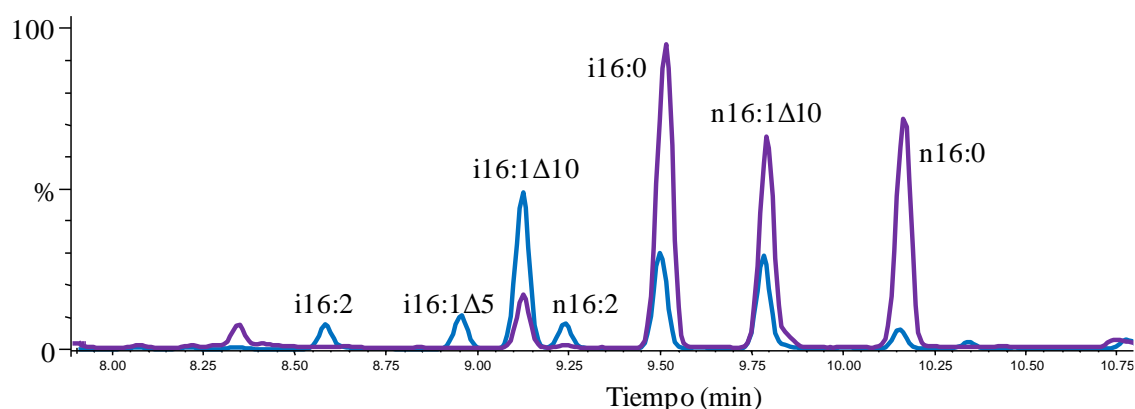


Figura 28. Perfil de AG producidos por las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER2983 a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desA*⁺) y LCER2983 (*desA*) se cultivaron a 37°C durante la noche en MM. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER2983.

Como se observa en la Figura 28 los picos correspondientes a los AGI i16:1 $\Delta 5$, i16:2 y n16:2 no están presentes en el cromatograma de la cepa mutante comparado con el de la cepa salvaje, lo cual corrobora que DesA es la responsable de la síntesis de los AGI $\Delta 5$. Para corroborar que efectivamente la cepa mutante no produce AGI $\Delta 5$, se determinó

Resultados II

la posición del doble enlace en los AGI sintetizados por esta cepa mediante GC-MS de los aductos obtenidos con DMDS ³ (Tabla XV). Así se verificó que la cepa mutante no produce AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 5$, ni tampoco AG diinsaturados $\Delta 5,10$.

Tabla XV. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER2983 en MM.

% AG	<i>B. cereus</i> ATCC 14579		<i>B. cereus</i> LCER2983	
	37°C	25°C	37°C	25°C
AGI Totales	28 ± 3	45 ± 4	25 ± 2	34 ± 2
AGI- $\Delta 5$	3 ± 1	7 ± 1	0	0
AGI- $\Delta 10$	23 ± 2	27 ± 1	25 ± 2	34 ± 2
AGI- $\Delta 5,10$	2,2 ± 0,4	11 ± 2	0	0
AGR Totales	63 ± 3	47 ± 3	67 ± 4	57 ± 4
AGR-Iso	55 ± 2	39 ± 2	58 ± 3	47 ± 3
AGR-Anteiso	8 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
Iso/Anteiso	6,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	6,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2

Las células se cultivaron en MM a 37°C hasta fase exponencial y luego una alícuota se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos de las dos fracciones, se convirtieron a MEAG y los productos se identificaron mediante GC-MS. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos. AG: ácidos grasos; AGI: ácidos grasos insaturados; AGR: ácidos grasos ramificados.

En los cromatogramas de la Figura 28 puede apreciarse que los niveles de los n16:1 $\Delta 10$ son mayores para la cepa mutante, pero la proporción de AGI i16:1 $\Delta 10$ es mayor en la cepa salvaje. Cuando se realizó la cuantificación de los AG producidos por las cepas en estudio (Tabla XV) se observó que la cepa mutante sintetiza mayor proporción de AGI $\Delta 10$ a 25°C que la cepa salvaje lo cual estaría indicando que la cepa mutante debe compensar con estos AGI la ausencia de los AGI $\Delta 5$ y $\Delta 5,10$. Al estar ausente la $\Delta 5$ desaturasa, la $\Delta 10$ desaturasa está cubriendo la demanda de AGI. Al mismo tiempo, el aumento de la proporción de AGI $\Delta 10$ con la disminución de la temperatura demuestra que los isómeros $\Delta 10$ son sustrato de DesA para generar los AG diinsaturados, ya que en esta situación en donde no hay DesA los mismos se acumulan. Si bien la cantidad total de AGI producidos en la cepa mutante no iguala el total de AGI en la cepa salvaje, esa cantidad de AGI, combinado con un ligero aumento de los AGR de la serie iso a 25°C, le es suficiente a la cepa LCER2983 para crecer.

Estos experimentos corroboran que el gen *desA* codifica para la $\Delta 5$ desaturasa en *B. cereus* y que dicha proteína no sería esencial para el crecimiento de esta bacteria en las condiciones ensayadas.

Resultados II

2.3 – Caracterización fenotípica de la cepa LCER0400 en diferentes condiciones de cultivo.

2.3.1 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio rico y medio mínimo.

Cuando se analizó el crecimiento de la cepa LCER0400, mutante en el gen *desB*, en medio rico sólido se obtuvieron colonias de menor tamaño y en medio líquido el tiempo de generación fue mayor que el de la cepa salvaje (resultados no mostrados).

Para estudiar el crecimiento en MM de la cepa mutante en el gen *desB* se llevaron a cabo los mismos ensayos descritos en el punto anterior, obteniéndose las curvas mostradas en la Figura 29.

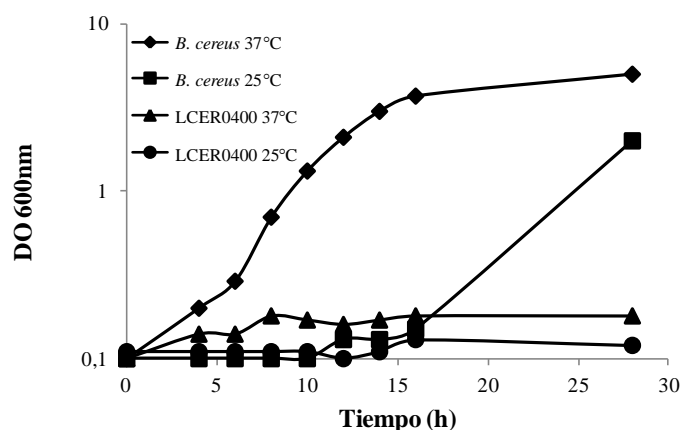


Figura 29. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM y se cultivaron a 37°C o 25°C. Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

En la Figura 29 puede observarse que la cepa mutante LCER0400 no crece en MM a ninguna temperatura comparada con la cepa salvaje. Como se describió en el Capítulo I, *B. cereus* produce en medio mínimo a 37°C un 22-23% de AGI $\Delta 10$ y un 25-27% a 25°C, por lo tanto este resultado estaría sugiriendo que la presencia de estos AG, en cantidades inusualmente elevadas, es indispensable para permitir el crecimiento en estas condiciones, sugiriendo que la desaturasa DesB sería esencial para *B. cereus* en MM a las temperaturas ensayadas. Con este resultado, se describe por primera vez la esencialidad de una desaturasa para el crecimiento de una bacteria del género *Bacillus* en MM.

2.3.2 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con oleato.

Para evaluar si el agregado de un AGI al medio de cultivo de manera exógena restauraba el crecimiento de la cepa LCER0400 se cultivaron las cepas salvaje y mutante en MM suplementado con oleato. En presencia de este AG no se pudo observar crecimiento de ninguna de las dos cepas (resultados no mostrados). Esto estaría sugiriendo que o bien la cantidad de oleato tomada por la bacteria es insuficiente para suplir las necesidades de la mutante o bien el oleato agregado esté produciendo lisis de la bacteria en estas condiciones de cultivo. Se ha visto, para ciertos microorganismos, que el agregado de algunos AG a medios de cultivo puede causar la lisis celular aún en bajas cantidades ^{147,148}, por lo tanto, en este medio puede estar ocurriendo que el agregado de oleato exógeno produzca la muerte de las bacterias y por ello no se observa crecimiento. Se realizó también el agregado de oleato al medio de cultivo en presencia de albumina sérica bovina para evaluar si en este medio, en donde el oleato al estar formado un complejo con la albúmina es liberado más lentamente, se podía rescatar el crecimiento de la cepa mutante y no se obtuvo, tampoco en esta situación, la complementación del fenotipo. Cabe destacar que esta forma de complementación ha sido llevada a cabo en otras bacterias con éxito ¹⁴⁹, por lo que se puede especular que la cantidad de oleato captada en estas condiciones es insuficiente para permitir el crecimiento.

2.3.3 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con aminoácidos.

En la búsqueda de condiciones que restauren el crecimiento de la mutante en la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*, y conociendo que esta mutante podía crecer en medio rico como LB en el cual puede sintetizar AGR gracias a la presencia de los precursores, se decidió suplementar al MM con una solución que contenía los 20 AA. En caso de encontrar que en este medio se restauraba el crecimiento se realizaría un análisis más detallado de las condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos en este medio se muestran en la Figura 30.

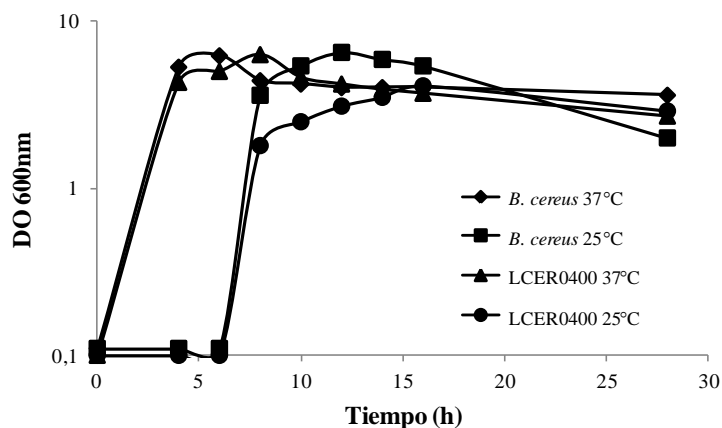


Figura 30. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 0,01% de los 20 AA y se cultivaron a 37°C o 25°C. Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

Como se muestra en la Figura 30, en estas condiciones se obtuvo el mismo comportamiento para las cepas salvaje y mutante. Además, en este medio el crecimiento de la cepa salvaje ATCC 14579 es mucho más rápido que en MM sólo (Figura 29). El suplemento con los AA no sólo restaura el crecimiento de la cepa mutante sino que también acelera la división celular en ambas bacterias produciendo tiempos de generación más cortos. Estos resultados eran previsibles ya que en este medio se necesita utilizar menos energía para la biosíntesis de los AA y por lo tanto el crecimiento es más rápido.

A continuación se estudió el comportamiento de las cepas en MM con el agregado de todos los AA excepto los cuatro AA precursores de los AGR con el objetivo de determinar si el rescate observado frente al agregado de los mismos se debe a que hay un aumento en la síntesis de AGR o si se está produciendo algún otro cambio en el metabolismo celular, diferente a los cambios en la composición de la membrana, que permita el crecimiento bacteriano. Para ello se cultivaron las cepas salvaje y mutante en MM suplementado con los 16 AA que no son precursores de los AGR y las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 31.

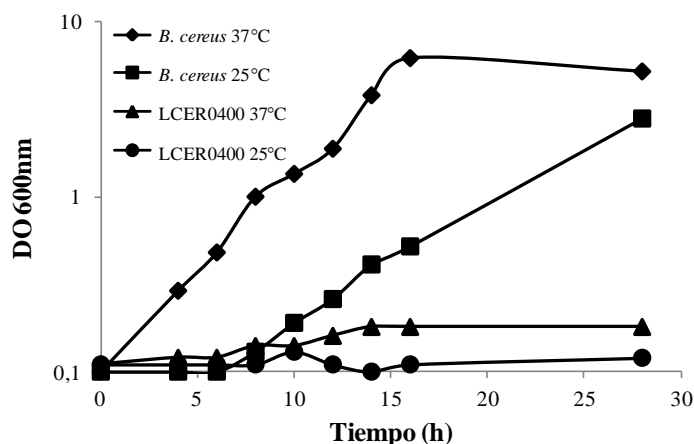


Figura 31. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 0,01% de todos los AA exceptuando los precursores de los AGR y se cultivaron a 37°C o 25°C. Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO_{600}) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

Como puede verse en la Figura 31, en MM con todos los AA excepto aquellos que son precursores de los AGR no se detecta crecimiento de la cepa mutante a ninguna de las temperaturas ensayadas. Esto confirma que el rescate en el crecimiento observado anteriormente se debería únicamente al agregado de precursores de los AGR.

Una vez hallado el medio que restauró el crecimiento de la cepa mutante, se evaluó si era necesario agregar todos los AA al medio de cultivo o sólo alguno/s de ellos podía rescatar a la cepa LCER0400 contrarrestando el efecto de la falta de AGI, esenciales para esta bacteria. Los AA ramificados valina, leucina e isoleucina son los que aportan las cadenas carbonadas para la síntesis de los AGR. Inicialmente estos AA ramificados son convertidos a los 2-cetoácidos (Figura 2 y 32) correspondientes en una reacción de transaminación. Luego los mismos son descarboxilados para generar los derivados C4 a C5-CoA. Estas moléculas son posteriormente elongadas por las adiciones sucesivas de malonil-CoA mediante la sintetasa de AG de tipo II^{24,150}.

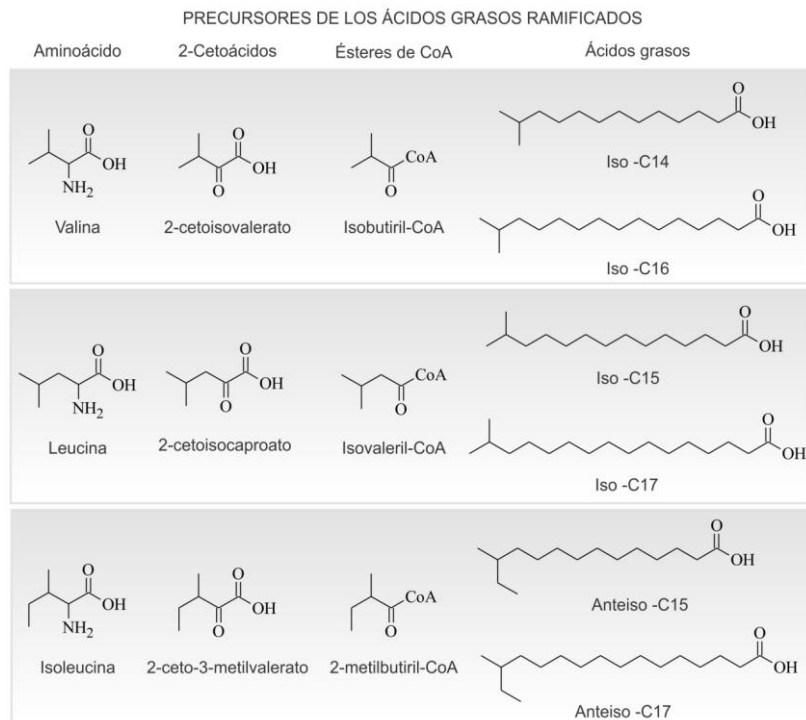


Figura 32. Correlación estructural entre los AA de cadena ramificada con los AG derivados de los mismos.

Además se ha visto en *B. subtilis* que el AA treonina permite el crecimiento a bajas temperaturas ya que es precursor de la síntesis de isoleucina¹⁰⁴ y por ende es precursor de los AGR anteiso, por lo cual también se evaluó el crecimiento de las cepas en estudio frente al agregado del mismo.

Para comprobar la hipótesis planteada y teniendo en cuenta que el agregado de estos AA puede corregir los defectos de la fluidez de membrana, se cultivaron las cepas mutante y salvaje en MM suplementado con leucina, isoleucina, valina y treonina a 37°C y 25°C. Las curvas de crecimiento en este medio se muestran en la Figura 33.

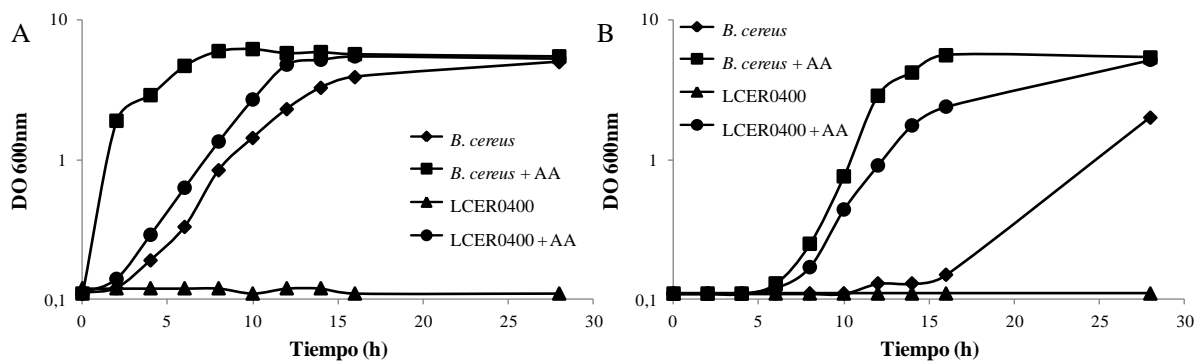


Figura 33. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 0,01% de Leu, Ile, Val y Thr

Resultados II

y se cultivaron a 37°C (A) o 25°C (B). Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

En la Figura 33 se observa que el agregado de los AA precursores permite el crecimiento de la cepa LCER0400 tanto a 37°C como a 25°C. Esto indicaría que la cepa mutante es capaz de crecer en este medio alcanzando la misma DO final que la cepa salvaje con un tiempo de generación mayor, probablemente debido a que con el agregado de estos precursores se logra tener una composición de AG que permita tener una membrana funcional. No obstante, como era de esperar, la velocidad de crecimiento tanto de la cepa salvaje como de la mutante es menor que tras el agregado de los 20 AA.

Habiendo determinado que el agregado de los precursores de los AGR restaura el crecimiento de la cepa mutante se evaluó el comportamiento de dicha cepa frente al agregado de cada uno de ellos por separado para determinar si se necesitan los 4 juntos o sólo uno de ellos es capaz de revertir el efecto causado por la ausencia de AGI $\Delta 10$. Para tal fin, se cultivaron la cepa salvaje y LCER0400 a 37°C y 25°C en MM suplementado con cada uno de los precursores por separado. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 34.

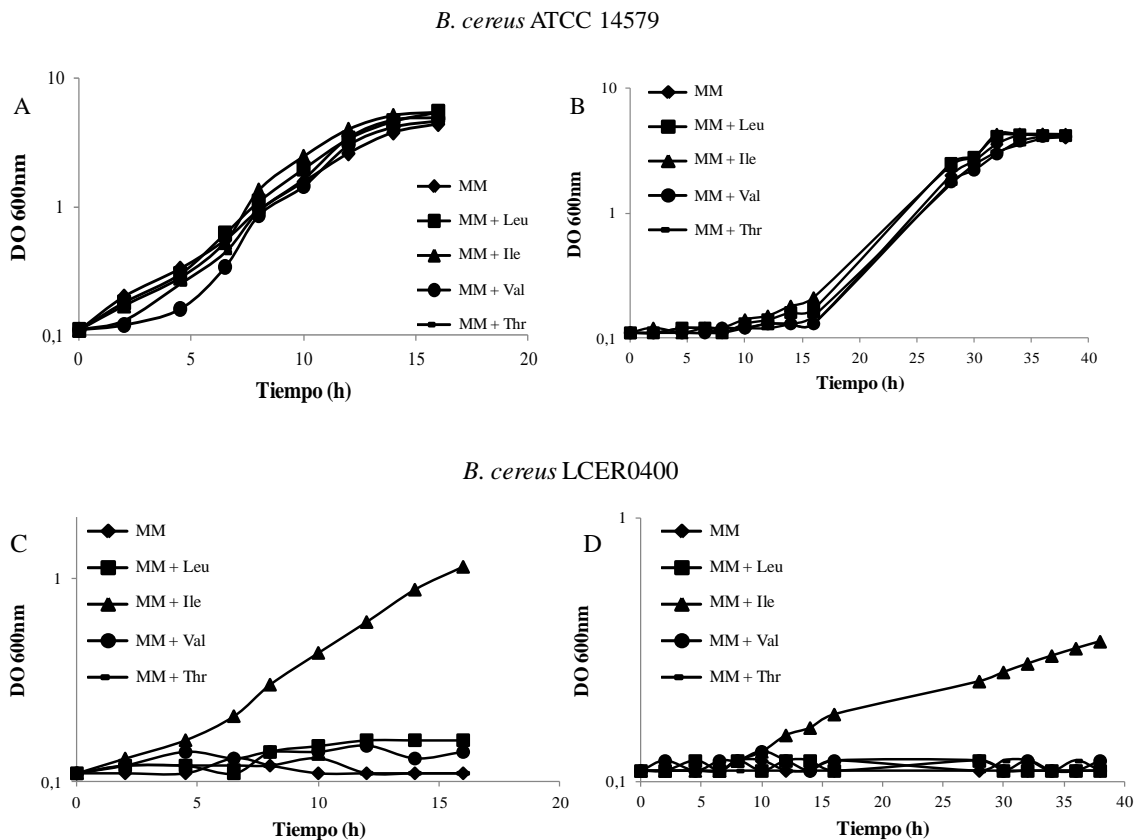


Figura 34. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado individualmente con 0,01% de Leu, Ile, Val o Thr y se cultivaron a 37°C (A y C) o 25°C (B y D). Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀) en alícuotas de los cultivos extraídas a distintos tiempos.

En este caso se observa que para la cepa salvaje de *B. cereus* no hay diferencias en el crecimiento en presencia de cualquiera de los 4 AA precursores en comparación con el MM sin suplementar, tanto a 37°C como a 25°C. Sin embargo, para la cepa mutante se ve que en presencia del AA isoleucina hay crecimiento a ambas temperaturas (DO_{final} a 37°C: 1,14) a diferencia de lo que ocurre en MM sin suplementar o con el agregado de los otros tres AA, aunque el crecimiento es menor que en presencia de los 4 AA precursores (DO_{final} a 37°C: 5,5). Como se observa en la Figura 32, la isoleucina es el AA que da lugar a los AGR de la serie anteiso que son los que tienen menor punto de fusión y por lo tanto presentan un mayor impacto sobre la fluidez de membrana. Estos combinados con la pequeña proporción de AGI $\Delta 5$ estaría permitiendo el crecimiento parcial de la cepa mutante.

2.3.3.1 – Síntesis de ácidos grasos en la cepa LCER0400 cultivada con isoleucina.

El agregado de isoleucina al medio de cultivo llevaría a la síntesis *de novo* de AGR de la serie anteiso que fluidificarían en parte a las membranas en ausencia de AGI $\Delta 10$ permitiendo de esta manera un crecimiento parcial de la cepa mutante en el gen *desB* comparado con la cepa salvaje en el mismo medio. Para analizar esta hipótesis, se analizó la composición de AG en las cepas salvaje y mutantes cultivadas en MM suplementado con isoleucina. Los experimentos se llevaron a cabo en las mismas condiciones arriba descriptas. Mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos se evidenció que en este medio de cultivo la cepa LCER0400 no sintetiza AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 10$ (Figura 35).

Resultados II

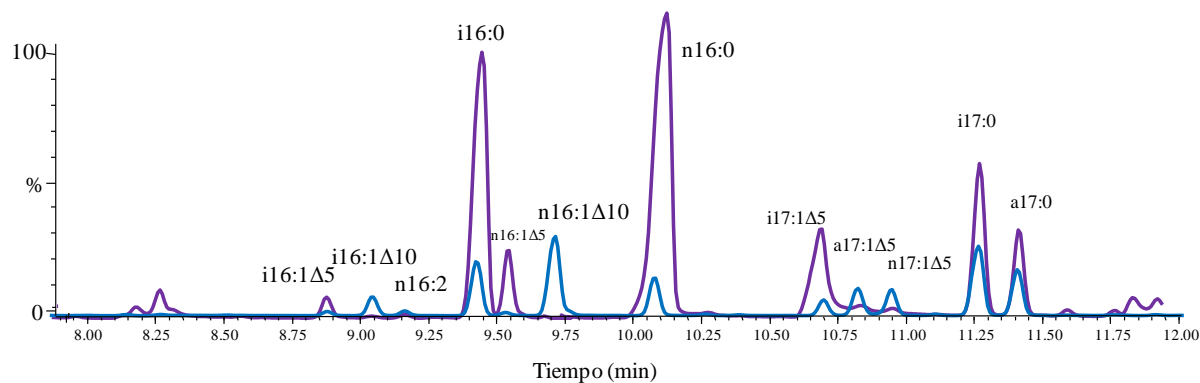


Figura 35. Perfil de AG producidos por las cepas ATCC 14579 y LCER0400 a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desB*+) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 0,01% de isoleucina y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER0400.

La cuantificación de los AG de las dos cepas en todas las condiciones de cultivo se resumen en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM con isoleucina.

AG	<i>B. cereus</i> ATCC14579				<i>B. cereus</i> LCER0400	
	Sin Ile		Con Ile		Con Ile	
	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C
AGI Totales	30 ± 2	45 ± 4	33 ± 2	43 ± 3	4 ± 1	8 ± 1
AGI-Δ5	5 ± 1	9 ± 1	3 ± 1	6 ± 2	4 ± 1	8 ± 1
AGI-Δ10	22 ± 2	30 ± 4	28 ± 3	32 ± 2	0	0
AGI-Δ5,10	2 ± 1	9 ± 1	1,3 ± 0,7	5 ± 1	0	0
AGR Totales	61 ± 4	50 ± 4	72 ± 5	68 ± 6	63 ± 5	78 ± 5
AGR-Iso	51 ± 3	40 ± 3	48 ± 3	42 ± 3	31 ± 3	32 ± 3
AGR-Anteiso	10 ± 1	10 ± 1	24 ± 2	26 ± 3	32 ± 2	46 ± 2
Iso/Anteiso	5,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2	2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1

Las células se cultivaron en MM con y sin 0,01% isoleucina a 37°C hasta fase exponencial y luego una alícuota se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos de las todas fracciones, se convirtieron a MEAG y los productos se identificaron mediante GC-MS. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos. AG: ácidos grasos; AGI: ácidos grasos insaturados; AGR: ácidos grasos ramificados.

Cuando *B. cereus* ATCC 14579 se cultiva en presencia de isoleucina aumenta al doble la cantidad de AGR de la serie anteiso mientras que el resto de los valores de los otros AG se mantienen constantes sin y con el agregado de este AA. Asimismo puede observarse que con isoleucina, la cepa mutante en la Δ10 desaturasa sintetiza un 50% más de AGR anteiso que la cepa salvaje, también con isoleucina, a 37°C y un 100% más a 25°C. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que se estaría compensando la falta de AGI Δ10 con un aumento de dichos AG a ambas temperaturas de crecimiento, mientras

Resultados II

que en *B. cereus* ATCC 14579, en las mismas condiciones, serían los AGI los principales encargados de mantener la integridad celular.

A diferencia de lo que ocurre con isoleucina, el agregado de AA treonina no restaura el crecimiento de la cepa mutante de *B. cereus*.

2.3.4 – Estudio del crecimiento de la cepa LCER0400 en medio mínimo suplementado con oleato y aminoácidos.

En experimentos adicionales, se evaluó nuevamente si era posible rescatar el crecimiento bacteriano con el agregado de un AGI exógeno utilizando, en este caso, el medio suplementado con los AA sin los precursores de los AGR en donde no se había observado crecimiento. Para ello se cultivaron la cepas salvaje y mutante en dicho medio con el agregado de oleato exógeno. Las curvas de crecimiento de este experimento se muestran en la Figura 36.

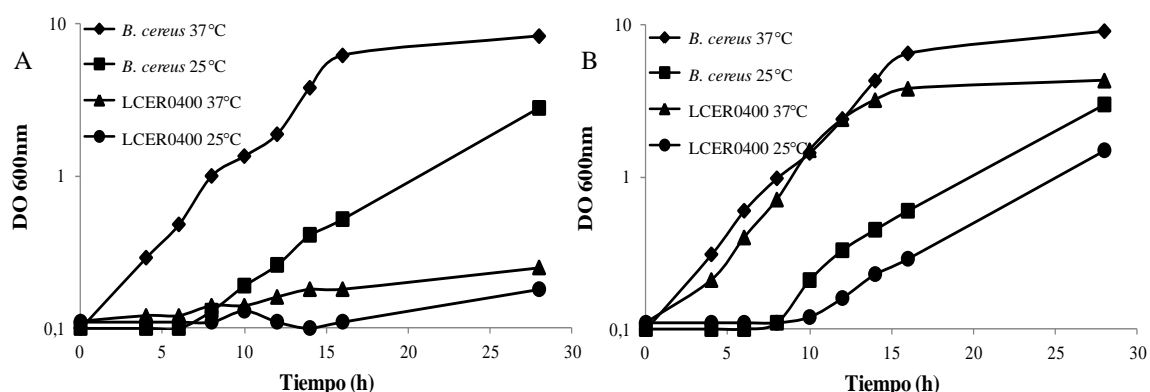


Figura 36. Crecimiento de las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y LCER0400 en MM. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 0,01% de todos los AA exceptuando los precursores de los AGR y sin (A) o con (B) 10 μM oleato y se cultivaron a 37°C o 25°C. Se utilizó como parámetro de crecimiento la absorbancia medida a 600 nm (DO₆₀₀), en alícuotas extraídas de los cultivos a distintos tiempos.

En este experimento se puede observar que en MM suplementado con AA y oleato la cepa LCER0400 es capaz de crecer tanto a 37°C como a 25°C con una cinética de crecimiento levemente menor que la cepa salvaje. Esto indicaría que la combinación del oleato más los AA que proveen esqueletos carbonados para la síntesis de AGR por otras vías lo que permite el crecimiento ya que mantiene la integridad de la membrana.

Resultados II

En todos los medios de cultivo ensayados para la cepa LCER0400 se cultivaron, a la par, células de la cepa doble mutante LCER2904 obteniéndose los mismos resultados que para la primera (resultados no mostrados).

2.3.4.1 – Síntesis de ácidos grasos en las cepas LCER0400 y LCER2904 cultivadas con oleato y aminoácidos.

Con el objeto de evaluar la influencia de la mutación en el gen *desB*, que codifica para la $\Delta 10$ desaturasa sobre la composición de AG en *B. cereus* se cultivaron las cepas salvajes y mutante LCER0400, en MM suplementado con AA exceptuando los precursores de los AGR, para evitar que se acumulen este tipo de AG. Además a este medio se le agregó 10 μM oleato para permitir el crecimiento de la cepa mutante. Las células se cultivaron a 37°C hasta fase exponencial y luego los cultivos se dividieron en dos fracciones, una de ellas se continuó incubando a 37°C y la otra se transfirió a 25°C durante toda la noche. A continuación se recolectaron las células y los AG se extrajeron, derivatizaron y analizaron por GC-MS. En la Figura 37 se muestra para ambas cepas la ampliación de los cromatogramas entre los 8 y 11 min.

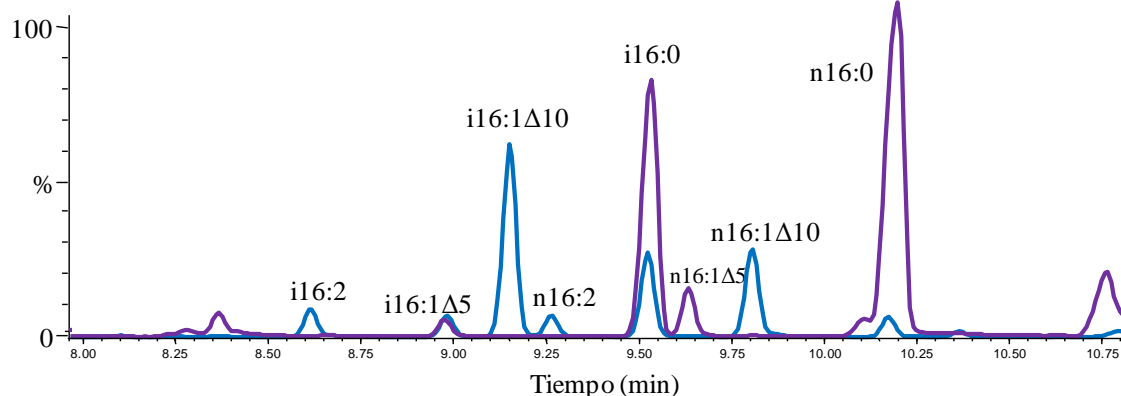


Figura 37. Perfil de AG producidos por las cepas ATCC 14579 y LCER0400 a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desB*⁺) y LCER0400 (*desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 10 μM oleato y AA exceptuando los precursores de los AGR y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER0400.

Como se puede observar en la Figura 37 la cepa mutante LCER0400 no sintetiza AGI $\Delta 10$ ni $\Delta 5,10$ lo cual fue verificado nuevamente mediante espectrometría de masa (MS) de los aductos obtenidos con DMDS. La cuantificación de los AG se muestra en la Tabla XVII.

Resultados II

Con el mismo enfoque se estudió la composición de AG en los FL de la membrana de la cepa doble mutante LCER2904. Esta cepa, en paralelo a la cepa salvaje, se cultivó en el mismo medio que la simple mutante LCER0400. Los cromatogramas obtenidos en esta ocasión se muestran en la Figura 38.

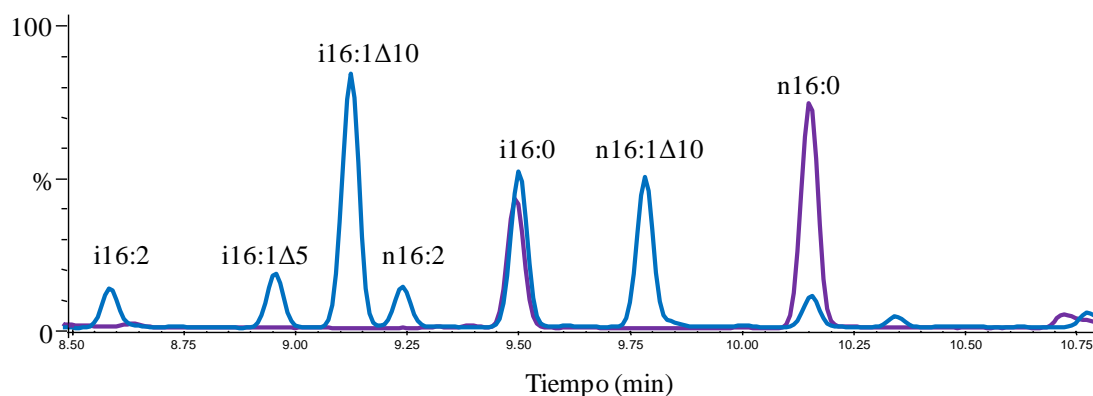


Figura 38. Perfil de AG producidos por las cepas ATCC 14579 y LCER2904 a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desA+* *desB+*) y LCER2904 (*desA desB*) se cultivaron a 37°C durante la noche en medio rico. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 10 μ M oleato y AA exceptuando los precursores de los AGR y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER2904.

En este caso no se observa síntesis de ningún tipo de AGI en la cepa doble mutante. La cuantificación de los AG se detalla en la Tabla XVII.

Tabla XVII. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579, LCER0400 y LCER2904 en MM con oleato.

AG	<i>B. cereus</i> ATCC14579		<i>B. cereus</i> LCER0400		<i>B. cereus</i> LCER2904	
	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C
AGI Totales	21 \pm 2	30 \pm 2	2,3 \pm 0,2	7 \pm 1	1,31 \pm 0,01	0,9 \pm 0,2
AGI- Δ 5	0,77 \pm 0,04	4 \pm 1	0,74 \pm 0,03	2,9 \pm 0,8	0	0
AGI- Δ 10	18 \pm 2	23 \pm 1	0	0	0	0
AGI- Δ 5,10	0,78 \pm 0,02	2,35 \pm 0,05	0	0	0	0
AGI- Δ 9	1,62 \pm 0,03	0,31 \pm 0,01	1,6 \pm 0,2	4 \pm 0,5	1,31 \pm 0,01	0,9 \pm 0,2
AGR Totales	60 \pm 4	42 \pm 5	64 \pm 5	56 \pm 5	67 \pm 6	62 \pm 5
AGR-Iso	54 \pm 3	35 \pm 3	50 \pm 3	43 \pm 4	55 \pm 4	51 \pm 5
AGR-Anteiso	6 \pm 1	7 \pm 2	14 \pm 2	13 \pm 1	12 \pm 2	11 \pm 1
Iso/Anteiso	9 \pm 0,2	5,0 \pm 0,4	3,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2

Las células se cultivaron en MM con 10 μ M oleato y 0,01% de AA exceptuando los precursores de los AGR a 37°C hasta fase exponencial y luego una alícuota se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos de las todas fracciones, se convirtieron a MEAG y los productos se identificaron mediante GC-MS. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos. AG: ácidos grasos; AGI: ácidos grasos insaturados; AGR: ácidos grasos ramificados.

Resultados II

Como puede verse en la Tabla XVII cuando la cepa salvaje se cultiva en presencia de oleato hay incorporación del AG agregado y una disminución en la cantidad total de AGI producidos, probablemente debido a que la pequeña fracción de oleato incorporado con la posición del doble enlace en C9 genera una fluidez tal que hace que no sea necesario sintetizar la misma cantidad de AGI que en ausencia del mismo. También podría suceder, al igual que en *B. subtilis*, que el oleato esté inhibiendo la actividad de las desaturasas y por ello se observe dicha disminución en la cantidad de AGI. Por otro lado se ve que, a diferencia de lo que ocurre en la cepa LCER2983 en donde la desaturasa activa sintetiza más AGI a 25°C comparada con la cepa salvaje, en la cepa LCER0400, la $\Delta 5$ desaturasa no es capaz de acumular la misma cantidad de AGI que en la cepa salvaje. Más aún, la cantidad de AGI $\Delta 5$ disminuye, posiblemente por lo citado arriba con respecto a la presencia de oleato en el medio de cultivo. En el caso de la cepa LCER2904 se puede ver que existe muy poca incorporación de oleato, sin embargo, esta pequeña cantidad le es suficiente para crecer en ausencia de desaturasas activas. Finalmente, lo que puede observarse es que en las dos cepas mutantes existe mayor acumulación de AGR de la serie anteiso. Este resultado sugeriría que estas cepas estarían aumentando la proporción de AGR anteiso de manera de contribuir con estos isómeros a fluidificar la membrana tanto a 37°C como a 25°C en esta condición en la cual hay muy poca síntesis de AGI $\Delta 10$

2.4 – Complementación de las cepas mutantes.

A fin de confirmar que los fenotipos observados en las cepas mutantes se debían a las mutaciones presentes en cada una de las desaturasas, se llevó a cabo la complementación de la cepa LCER2983 con el gen *desA* salvaje y de la cepa LCER0400 con el gen *desB* salvaje. Para ello se construyeron las cepas LCER2983C y LCER0400C como se describe en Materiales y Métodos. En ambas cepas los genes se encuentran bajo el control de su propio promotor y en un número de copias de 15 ± 5 . Inicialmente se determinó el fenotipo de crecimiento de la cepa LCER0400C en MM y se determinó que la misma no presentó diferencias con la cepa salvaje, lo cual representó un indicio de que la complementación había ocurrido exitosamente. A continuación se realizaron los mismos experimentos de crecimiento en MM descritos arriba en los cuales se extrajeron, derivatizaron y analizaron los AG de todas las cepas. En la Figura 39 se muestran los cromatogramas de las cepas salvajes, mutantes y complementadas para el estudio del gen *desA* y en la Figura 40 para el gen *desB*.

Resultados II

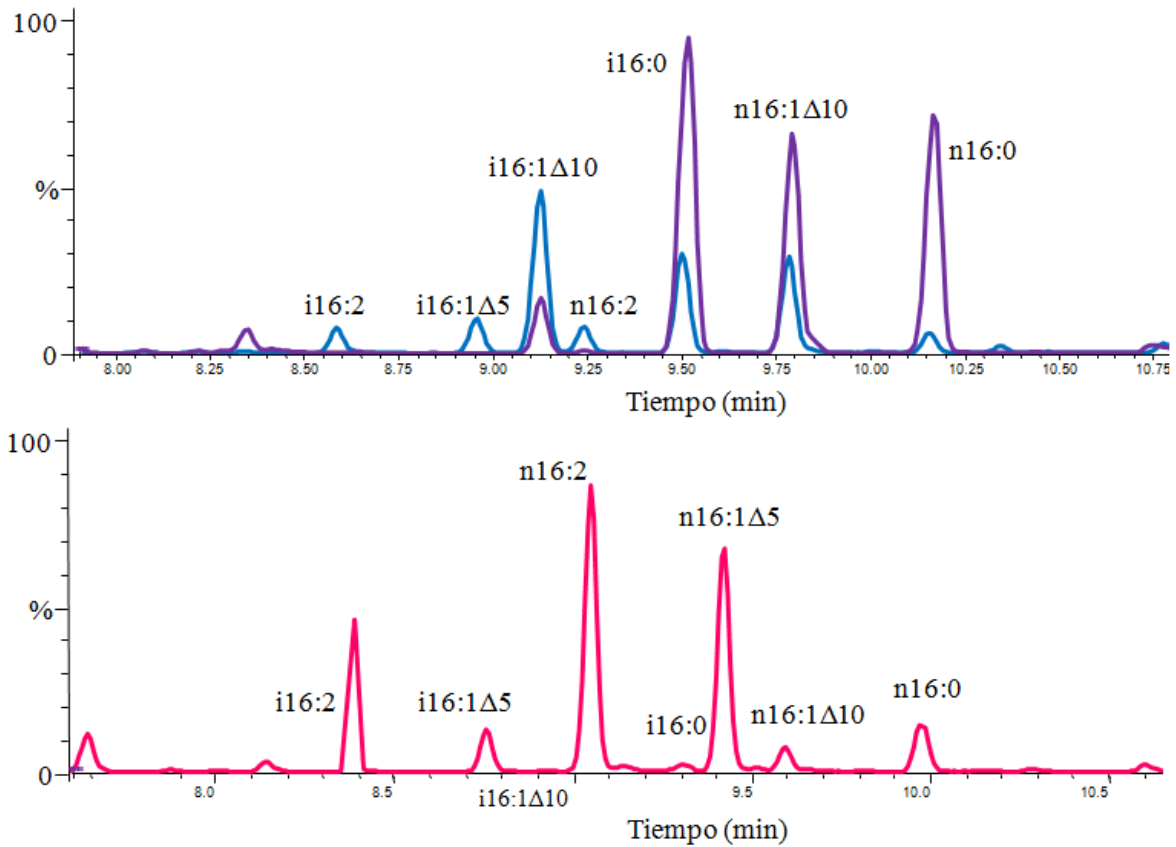


Figura 39. Perfil de AG producidos por las cepas ATCC 14579, LCER2983 y LCER2983C a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desA+*), LCER2983 (*desA*) y LCER2983C (*desA+*) se cultivaron a 37°C durante la noche en MM. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER2983; rosa: *B. cereus* LCER2983C.

Resultados II

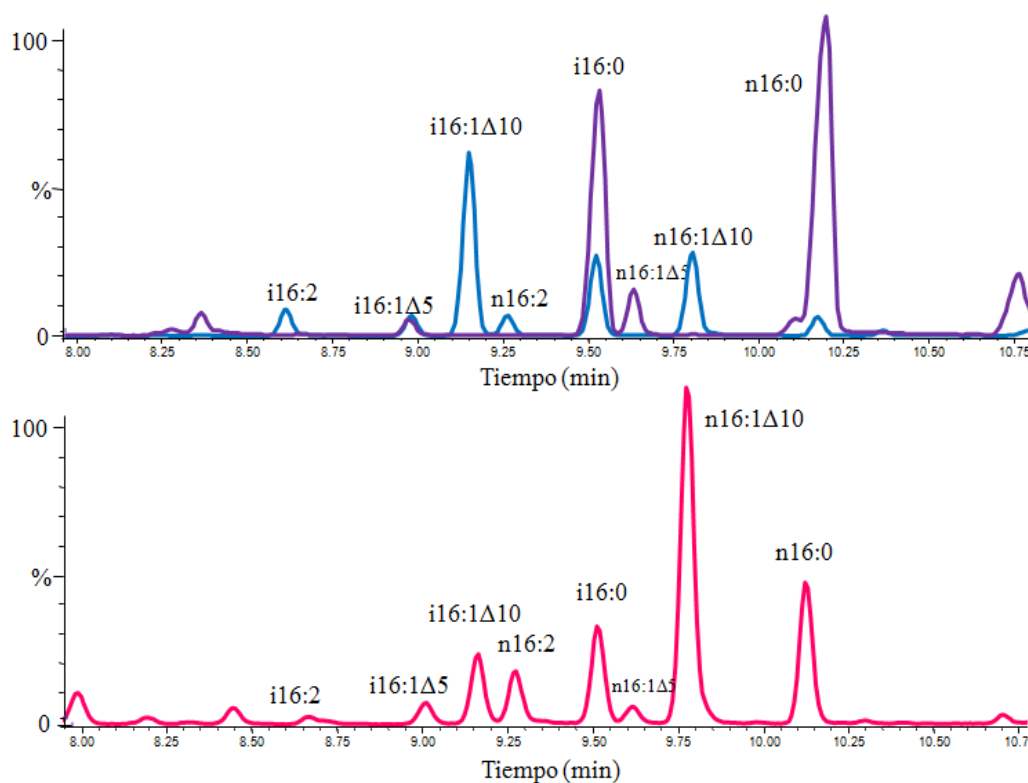


Figura 40. Perfil de AG producidos por las cepas ATCC 14579, LCER0400 y LCER0400C a 25°C. Las cepas ATCC 14579 (*desB+*) y LCER0400C (*desB+*) se cultivaron a 37°C durante la noche en MM. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. La cepa LCER0400 se cultivó a 37°C durante la noche en MM. Las células se lavaron y se resuspendieron en MM suplementado con 10 μM oleato y AA exceptuando los precursores de los AGR y se cultivaron a 37°C seguido de 25°C. Celeste: *B. cereus* ATCC 14579; violeta: *B. cereus* LCER0400; rosa: *B. cereus* LCER0400C.

En la Tabla XVIII se muestra la cuantificación de los AG obtenidos en las cepas complementadas.

Tabla XVIII. Composición de ácidos grasos de *B. cereus* ATCC 14579, LCER2983C y LCER0400C en MM.

AG	<i>B. cereus</i> ATCC14579		<i>B. cereus</i> LCER2983C		<i>B. cereus</i> LCER0400C	
	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C
AGI Totales	29 ± 3	42 ± 3	34 ± 3	51 ± 3	40 ± 4	50 ± 4
AGI-Δ5	3,9 ± 0,3	11 ± 1	12 ± 1	20 ± 1	4,2 ± 0,8	10,3 ± 0,6
AGI-Δ10	19 ± 2	24 ± 1	12,1 ± 0,7	14,6 ± 0,8	31 ± 2	34 ± 2
AGI-Δ5,10	6 ± 1	7 ± 1	10 ± 1	16 ± 1	5 ± 1	6 ± 1
AGR Totales	52 ± 3	40 ± 3	36 ± 3	26 ± 1	50 ± 4	39 ± 3
AGR-Iso	47 ± 2	32 ± 2	31 ± 2	21 ± 1	43 ± 3	31 ± 2
AGR-Anteiso	5 ± 1	8 ± 1	5 ± 1	5,2 ± 0,4	7 ± 1	8 ± 1
Iso/Anteiso	9,4 ± 0,2	4 ± 0,2	6,2 ± 0,3	4 ± 0,1	6,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2

Las células se cultivaron en MM a 37°C hasta fase exponencial y luego una alícuota se transfirió a 25°C. Se extrajeron los lípidos de las todas fracciones, se convirtieron a MEAG y los productos se identificaron mediante GC-MS. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos. AG: ácidos grasos; AGI: ácidos grasos insaturados; AGR: ácidos grasos ramificados.

Resultados II

Como puede verse en las Figuras 39 y 40 y en la Tabla XVIII las dos cepas complementadas son capaces de acumular los AGI que las correspondientes mutantes no podían sintetizar. En la cepa LCER2983C disminuye la cantidad de AGI $\Delta 10$ comparado con la cepa salvaje, esto podría deberse a que al existir más de una copia del gen *desA* habría más cantidad de proteína $\Delta 5$ desaturasa que tomaría los AGI $\Delta 10$ inmediatamente después de ser sintetizados para generar los AG diinsaturados que en la cepa complementada se acumulan en mucha más cantidad que en la cepa salvaje. Además se puede observar que en la cepa complementada hay acumulación de AG n16:1 $\Delta 5$ que, en condiciones normales, es muy difícil de detectar en la cepa salvaje. Esto también podría ser consecuencia de la mayor cantidad de $\Delta 5$ desaturasa presente en la cepa LCER2983C.

Por otro lado, en la cepa LCER0400C también se evidencia acumulación de los AGI ausentes en la cepa mutante. Sin embargo, en este caso no es significativo el aumento de los AG diinsaturados con respecto a la cepa salvaje y lo que sí se ve es un incremento en la proporción de AG con el doble enlace en la posición $\Delta 10$. Esta observación se puede explicar siguiendo el mismo razonamiento anterior. Si se tiene en cuenta que ahora hay varias copias del gen *desB* pero una sola del gen *desA*, entonces se estarían sintetizando más AGI $\Delta 10$, pero los mismos no llegarían todos a ser procesados por la $\Delta 5$ desaturasa para generar más AGI diinsaturados que en la cepa salvaje.

Los resultados obtenidos con las cepas complementadas confirman que los defectos observados en las cepas LCER2983 y LCER0400 se deben a las mutaciones de los genes *desA* y *desB*, respectivamente y no a efectos polares de las mismas.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

El mantenimiento de la composición lipídica de la membrana dentro de los límites estrictos es fundamental para mantener una óptima función celular. Las propiedades biofísicas de la membrana pueden ser influenciadas por el grado de insaturación de las cadenas de acilo de los FL de membrana. La importancia de los AGI para las bacterias se describió ampliamente en numerosos trabajos ^{45,57,103}. Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado desaturasas esenciales para el crecimiento bacteriano.

En el Capítulo I se analizó la síntesis de AGI en *B. cereus* en donde se ha encontrado que esta bacteria acumula una inusualmente elevada cantidad de este tipo lípidos en comparación con el resto de las especies del género. Este hallazgo resultó llamativo y llevó a que se estudiara la importancia de los AGI en la fisiología de *B. cereus*. Para ello se generaron mutantes en los genes que codifican las desaturasas y se analizó el impacto de estas mutaciones sobre la síntesis de AGI y la viabilidad celular.

Las mutaciones en los genes de las desaturasas de *B. cereus* se llevaron a cabo mediante la interrupción de los mismos con casetes de resistencia a ATB. Se desarrolló una nueva estrategia mejorando las descritas hasta el momento en la bibliografía ¹²⁸, en donde se genera un vector a partir del plásmido pORI-Cm que lleva un casete de resistencia a un ATB y permite una búsqueda más rápida y efectiva de las cepas mutantes, en donde el gen a mutagenizar queda interrumpido por el casete de resistencia.

La disrupción del gen *desA* que codifica para la $\Delta 5$ desaturasa no causó cambios significativos en la velocidad de crecimiento a las temperaturas de 25°C y 37°C. Tampoco se observaron diferencia en el tamaño ni la morfología de colonia ni al microscopio óptico. Estos resultados indicarían que la proteína DesA no sería esencial para el crecimiento de *B. cereus* en las condiciones ensayadas. Por otro lado se vio que la composición de AG de la cepa mutante sí es diferente de la de la cepa salvaje ya que no se hallaron AGI $\Delta 5$ ni AG diinsaturados $\Delta 5,10$. Esto indicaría que el gen *desA* codifica la desaturasa encargada de sintetizar este tipo de AGI y la ausencia de los mismos no estaría afectando el crecimiento de *B. cereus*. En *B. subtilis* también se determinó que esta bacteria es capaz de crecer en ausencia de AGI ⁴⁵. Esta capacidad puede ser atribuida a la naturaleza de los AG de este organismo. En lugar de las cadenas normales de AG lineales sintetizadas por la mayoría de los organismos, *B. subtilis* sintetiza AGS que, en una importante proporción, contienen ramificaciones de grupos metilo en posición iso y anteiso ²⁴. Los AGR (especialmente los anteiso) comparten con los AG *cis*-insaturados la capacidad de desestructurar el empaquetamiento de las cadenas acilo de los FL disminuyendo así la temperatura de

Discusión II

transición de fase ²⁴, como ya se ha mencionado anteriormente. De acuerdo a esta hipótesis, el defecto en el crecimiento de *B. subtilis* a bajas temperaturas es revertido mediante el agregado de precursores de la síntesis de AGR ¹⁰⁴. Sin embargo, en *B. cereus* la supervivencia en ausencia de los AGI $\Delta 5$ podría atribuirse en mayor magnitud a la presencia de una elevada proporción de AGI $\Delta 10$ más que a los AGR anteiso que son sintetizados por esta bacteria en muy baja cantidad aún cuando no está presente la proteína DesA. Además como se observa en la Tabla XV no se modifica la relación entre los AGR iso y anteiso ya que el defecto en la fluidez está siendo compensado por un aumento en los AGI $\Delta 10$.

Cuando se analizó el fenotipo de crecimiento de la cepa mutante en el gen *desB* no se evidenció crecimiento de la misma en MM a ninguna de las temperaturas ensayadas. Esto significa que la gran cantidad de AGI $\Delta 10$ que produce *B. cereus* es muy importante para la viabilidad celular ya que, en ausencia de ellos, las células no pueden crecer en MM aún en presencia de los AGI $\Delta 5$ que sí sintetiza la cepa mutante en DesB. Este defecto en el crecimiento se restaura tras el agregado de los 20 AA esenciales al MM (Figura 30).

Cuando se ensayó el crecimiento de la mutante LCER0400 agregando exclusivamente los AA precursores de los AGR se encontró que los mismos restituyen completamente el crecimiento (Figura 33) y cuando se agrega cada uno de ellos en forma individual se halló que el crecimiento se restituye en forma parcial únicamente cuando se adiciona isoleucina al medio de cultivo (Figura 34). Como ya se mencionó, la isoleucina es precursora de los AGR de la serie anteiso. La presencia de este AA en el medio de cultivo permite una mayor acumulación de AGR anteiso en la cepa mutante en DesB, comparado con la cepa salvaje que sintetiza normalmente los AGI (Tabla XVI). Estos AGR serían los únicos responsables de generar una correcta fluidez de membrana suficiente para permitir el crecimiento bacteriano en ausencia de AGI, ya que en la cepa doble mutante LCER2904 que no sintetiza ningún tipo de AGI, el agregado de isoleucina al medio permitió el crecimiento de esta cepa. Además, como se observa en la Tabla XVI, la relación iso/anteiso disminuye a la mitad tras el agregado de isoleucina al medio, lo cual es otro indicio de que, es este caso, la fluidez de membrana se mantiene gracias a un aumento de los AGR anteiso. Es lógico pensar que sólo la isoleucina permita el crecimiento de la cepa *desB*- y no los precursores de los AGR iso. La cepa salvaje de *B. cereus* en condiciones normales sintetiza una gran cantidad de este último tipo de AG (Tabla XV y XVI) y en ausencia de la $\Delta 10$ desaturasa los valores de AGR iso permanecen elevados. Es decir, que aunque exista acumulación de AGR iso, éstos no serían suficientes para rescatar el

Discusión II

crecimiento de la cepa mutante en DesB. Por otro lado, en *B. subtilis* se observó que el agregado de isoleucina al medio de cultivo inhibe la expresión del gen *des*¹⁰³, mientras que el agregado de valina o leucina (precursores de los AGR iso) no presentan un efecto inhibitorio sobre la transcripción del mismo. Sumado a estas observaciones está el hecho de que los AGR anteiso tienen puntos de fusión más bajos y por ende disminuyen más la temperatura de transición de la fase gel a la líquido-cristalina permitiendo una mayor fluidez de la membrana a bajas temperaturas. Esto sugiere que esta bacteria necesita solamente un mecanismo de fluidificación de los AG de los FL de la membrana y, en este caso sería la acumulación de AGI más que de AGR. En condiciones normales los AGI son capaces de complementar completamente la función de los AGR pero, en ausencia de desaturasas activas, *B. cereus* activaría la síntesis de los isómeros anteiso para mantener un correcto funcionamiento de la membrana celular, efecto que se hace más evidente al analizar la composición de AG tras el agregado de isoleucina al medio de cultivo, de lo cual se desprende la observación de que estos isómeros tienen como función principal el mantenimiento de una correcta fluidez de membrana como se había observado previamente en *B. subtilis*¹⁵¹.

Además se puede apreciar que en *B. cereus* no ocurre inhibición de ninguna de las dos desaturasas en presencia de isoleucina como se observó anteriormente en nuestro laboratorio para *B. subtilis*¹⁰³. Sin embargo, el agregado de oleato sí estaría inhibiendo la actividad de las desaturasas de *B. cereus*

En nuestro laboratorio se evaluó si el agregado de oleato podía permitir el crecimiento de la cepa de *B. cereus* mutante en la $\Delta 10$ desaturasa. En un primer intento, tras el agregado de oleato, no se evidenció crecimiento, probablemente debido a que este AGI de cadena larga estaría provocando la lisis celular como se ha descrito previamente^{147,148}. Teniendo en cuenta esta observación se realizó la adición de oleato a un medio de cultivo con AA, encontrándose que en esta condición sí se restauraba el crecimiento bacteriano (Figura 36). La actividad antimicrobiana de estos AG exógenos puede ser efectiva para la preservación de la comida durante su procesamiento y conservación.

Por otro lado, para descartar un efecto polar en la generación de las mutantes y para corroborar que los fenotipos observados se deban únicamente a la ausencia de los genes *des*, las mismas se complementaron con los correspondientes genes y se halló que todas eran capaces de sintetizar todas las clases de AGI.

Todos estos resultados indicarían que la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus* sí sería esencial para el crecimiento de esta bacteria en las condiciones ensayadas. A diferencia de

Discusión II

B. subtilis, los AGI son muy importantes en cianobacterias, donde su función ha sido relacionada con el mantenimiento de la viabilidad del sistema fotosintético a bajas temperaturas^{57,58}. Sin embargo, estos organismos pueden crecer aún en ausencia de estos AGI. Por lo tanto, en este trabajo de Tesis es la primera vez que se describe la esencialidad de una desaturasa para el crecimiento bacteriano.

Determinar de qué manera se sintetizan los AGI y el rol de las desaturasas, podría conducir a establecer roles inesperados de estos AG en la fisiología de la membrana, la síntesis de factores de virulencia y su excreción. En *B. cereus*, las mutaciones en los genes de las desaturasas podrían estar jugando un papel importante en la disminución de la virulencia. Las modificaciones en la composición de la membrana podrían alterar la secreción de toxinas, lo que se vería traducido en cepas menos virulentas, como se ha observado en *P. aeruginosa*⁷³. Actualmente se están llevando a cabo experimentos de infección de estas cepas de *B. cereus* en un modelo eucariota, *C. elegans*, para determinar el impacto de las mutaciones en los genes *desA* y *desB* sobre la virulencia de *B. cereus*. Además se están realizando ensayos *in vitro* para estudiar la producción de factores de virulencia en *B. cereus*.

CAPÍTULO III

CONTROL TERMAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS DESATURASAS DE *Bacillus cereus* Y *Bacillus licheniformis*.

RESULTADOS CAPÍTULO III

Desde hace muchos años se conoce que las bacterias, así como el resto de los organismos poiquiloterms, contienen una mayor proporción de AGI en los FL de sus membranas cuando se cultivan a bajas temperaturas. Este mecanismo, denominado control térmico de la síntesis de AGI, se cree que está diseñado para mantener constante la fluidez de membrana en un amplio rango de temperaturas y mejorar las propiedades físicas de la misma ¹.

Hasta aquí, durante el desarrollo de esta Tesis, se ha determinado que en *B. cereus* y *B. licheniformis* aumenta el contenido de AGI cuando los cultivos de las cepas cultivadas a 37°C se transfieren a temperaturas más bajas de crecimiento. En el Capítulo I se describió, además, que la síntesis de AGI en cepas de *B. subtilis* expresan individualmente las desaturasas DesA, DesB y DesL aumenta al disminuir la temperatura de crecimiento. Esto significa que la expresión o la actividad de estas desaturasas se encuentran reguladas por la temperatura del medio. En esta parte de la Tesis se propuso estudiar el o los mecanismos que regulan el proceso de desaturación en *B. cereus* y *B. licheniformis*.

3.1 – Caracterización de la síntesis de ácidos grasos insaturados en cepas de *B. subtilis* que expresan las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

En bacterias del género *Bacillus* Fujii y Fulco ¹⁵² propusieron que esta adaptación a los cambios de temperatura es un proceso que requiere de la inducción transcripcional del gen que codifica para la actividad desaturasa. Es decir que para la desaturación de AGS, ante la caída de la temperatura de crecimiento, es necesaria la síntesis *de novo* de ARNm y proteínas. Tal postulado se basó en evidencias experimentales que indicaban que la desaturación de AGS a bajas temperaturas era prevenida por la adición de ATB que inhibían la transcripción o la traducción cuando eran agregados antes de la disminución en la temperatura de crecimiento ^{152,153}. Estos experimentos fueron corroborados posteriormente por Grau y de Mendoza ⁹⁰ en *B. subtilis* quienes encontraron que tanto el agregado de Cm como Rif inhibían el proceso de desaturación a bajas temperaturas.

Tomando como punto de partida los experimentos realizados por Fulco y los resultados obtenidos en *B. subtilis*, se evaluó el efecto de los ATB que inhiben la síntesis de proteínas (cloranfenicol) y/o ARNm (rifampicina) sobre la actividad de las distintas desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis*. Con el objeto de analizar el efecto sobre cada desaturasa en forma individual se utilizaron las cepas de *B. subtilis* *des*- LSC2983, LSC0400 y LSC2106 que expresan los genes *desA*, *desB* y *desL* bajo su propio promotor.

Resultados III

Las mismas fueron cultivadas en MM con y sin el agregado de los ATB Cm (100 µg/ml) y Rif (100 µg/ml). Las cepas se cultivaron a 37°C hasta fase exponencial y luego se dividieron en diferentes alícuotas a las que se les agregó cada uno de los ATB y se dejó una como control. A su vez una mitad de las alícuotas, con o sin los agregados, se siguió incubando a 37°C y la otra mitad se pasó a 25°C. A los 10 min de incubación a cada temperatura se agregó [1-¹⁴C]-palmitato y se continuó incubando durante 3 h. Luego, se extrajeron y analizaron los AG mediante cromatografía de argentación como se muestra en la Figura 41.

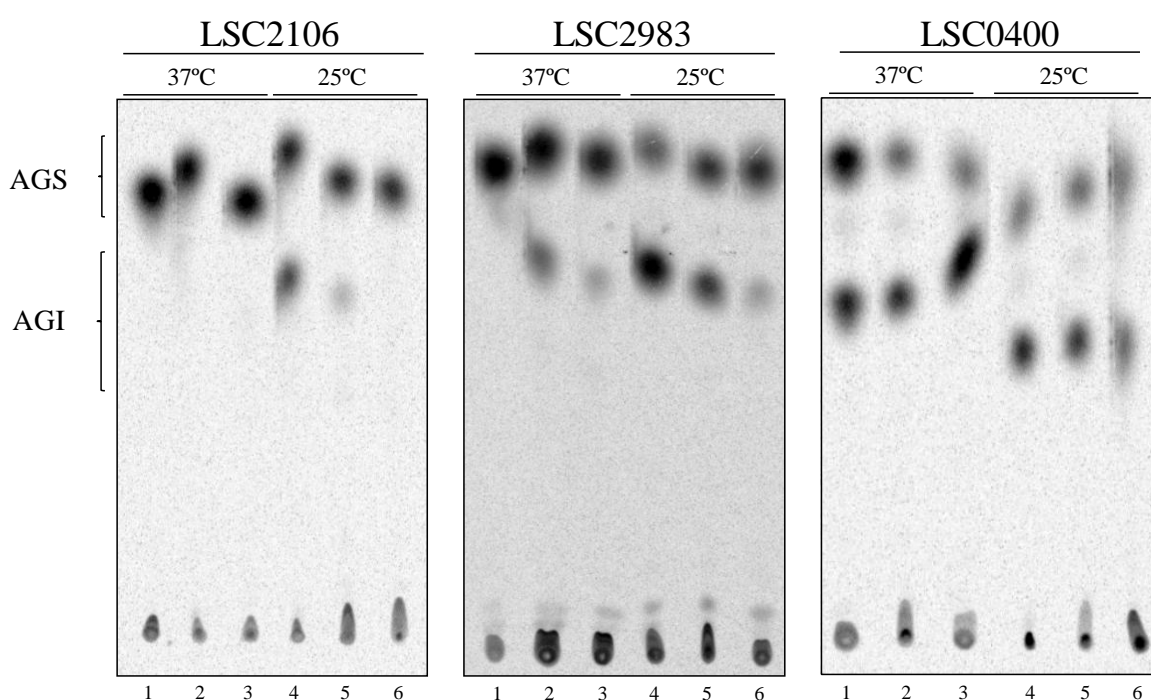


Figura 41. Cromatografía de argentación de AG marcados con [1-¹⁴C]-palmitato. Calle 1: sin ATB; calle 2: con Cm; calle 3: con Rif; calle 4: sin ATB; calle 5: con Cm; calle 6: con Rif. AGS: ácidos grasos saturados; AGI: ácidos grasos insaturados.

La cuantificación de los AG de las TLC se muestra en las tablas XIX, XX y XXI.

Tabla XIX. Composición de ácidos grasos de la cepa de *B. subtilis* LSC2106

%AG	37°C			25°C		
	Sin ATB	Cm	Rif	Sin ATB	Cm	Rif
AGS	99 ± 1	99 ± 1	99 ± 1	65 ± 2	95 ± 1	99 ± 1
AGI	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	32 ± 2	5 ± 1	1 ± 1

La tabla XIX presenta los porcentajes de AG de la cepa de *B. subtilis* LSC2106 cultivada a 37°C y 25°C con y sin Cm y Rif. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Resultados III

Tabla XX. Composición de ácidos grasos de la cepa de *B. subtilis* LSC2983

%AG	37°C			25°C		
	Sin ATB	Cm	Rif	Sin ATB	Cm	Rif
AGS	99 ± 1	85,2 ± 0,6	94 ± 2	25 ± 3	56 ± 1	92 ± 1
AGI	1 ± 1	14,8 ± 0,6	6 ± 2	75 ± 3	44 ± 1	8 ± 1

La tabla XX presenta los porcentajes de AG de la cepa de *B. subtilis* LSC2983 cultivada a 37°C y 25°C con y sin Cm y Rif. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Tabla XXI. Composición de ácidos grasos de la cepa de *B. subtilis* LSC0400

%AG	37°C			25°C		
	Sin ATB	Cm	Rif	Sin ATB	Cm	Rif
AGS	59 ± 3	31 ± 2	19 ± 3	27 ± 1	28 ± 3	39 ± 4
AGI	41 ± 3	69 ± 2	81 ± 3	73 ± 1	63 ± 3	61 ± 4

La tabla XXI presenta los porcentajes de AG de la cepa de *B. subtilis* LSC0400 cultivada a 37°C y 25°C con y sin Cm y Rif. Los valores de la tabla son el promedio de tres experimentos.

Como se observa en la Figura 41 y en la tabla XIX, en el caso de la cepa LSC2106, que expresa la $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis*, no se evidencia síntesis de AGI a 37°C en ninguna condición. Por otro lado, a 25°C se observa aumento de la síntesis de AGI en ausencia de ATB, que disminuye en los cultivos tratados, lo cual indicaría que para que se sinteticen estos AG es necesaria la transcripción y traducción del gen *desL*. La pequeña cantidad de AGI observada en el cultivo tratado (5%, Tabla XIX) podría significar que agregado de Cm no fue suficiente para inhibir completamente la síntesis de la desaturasa o que el tiempo de tratamiento con Cm previo a la marcación fue insuficiente. Esto es análogo a lo que ocurre en *B. subtilis* y es además un resultado esperado ya que ambas bacterias comparten un elevado porcentaje de homología a nivel genómico y las desaturasas son 89 % idénticas.

En el caso de la cepa LSC2983, que expresa la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus* el resultado obtenido es diferente. Cuando la cepa se cultivó a 37°C sin ATB, no se observan AGI, sin embargo, se observa un ligero aumento de los niveles de AGI a 37°C en los cultivos tratados (Tabla XX) con Cm y con Rif. A 25°C se observa un fuerte aumento de los AGI en los cultivos sin tratar y dicha inducción se ve atenuada frente al agregado de los ATB, en particular por el agregado de Rif. Estos resultados muestran que la disminución de la temperatura de crecimiento a 25°C tiene un fuerte impacto sobre la actividad de esta desaturasa y la misma se ve afectada por el agregado de Cm, aun cuando la inhibición no es completa. También se observa una disminución de la actividad por el agregado de Rif indicando que la transcripción y la traducción están afectadas, lo que sugiere que se estaría en presencia de una desaturasa con comportamiento similar a las $\Delta 5$ desaturasas de *B.*

Resultados III

licheniformis y *B. subtilis* y las ya descritas por Fulco. Los resultados observados a 37°C podrían estar sugiriendo la presencia de un modulador negativo que sería, al menos, sintetizado a esta temperatura dado lo observado frente al agregado de ATB. La existencia de ese modulador a 25°C es incierta para *DesA* probablemente por la alta activación del gen a bajas temperaturas.

Cuando se estudia la cepa LSC0400, que expresa la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*, se observa síntesis de AGI en todas las condiciones ensayadas (Tabla XXI). A 37°C se puede ver que el porcentaje de AGI se ve afectado por la presencia de los ATB en el medio de cultivo, lo que podría indicar nuevamente la existencia de un modulador negativo que esté ausente en los cultivos tratados y permita que la $\Delta 10$ desaturasa sea más activa. A 25°C se observa nuevamente, como en los casos anteriores, un fuerte efecto de la temperatura, que se ve ligeramente afectado por el agregado de ATB. Este resultado sugiere que la actividad de esta desaturasa se ve aumentada tras un descenso de la temperatura de crecimiento.

Dada la naturaleza indirecta de los datos obtenidos y con el objetivo de profundizar en el estudio del mecanismo de regulación por temperatura de los genes *des*, se llevó a cabo un análisis transcripcional como se detalla más adelante.

3.2 – Determinación del sitio de iniciación de la transcripción de los genes *desA*, *desB* y *desL*.

Para identificar las zonas promotoras y analizar la presencia de secuencias de unión de elementos regulatorios específicos presentes, se mapeó el sitio de iniciación de la transcripción de cada gen mediante la técnica de 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Para llevar a cabo este experimento se utilizó ARN de las cepas *B. licheniformis* ATCC 14580 y *B. cereus* ATCC 14579 y se procedió a tratar a una parte de las muestras con la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternero a fin de remover todos los grupos fosfatos presentes en el extremo 5' de los ARN (posiciones α , β y γ), para luego adicionar a estos mismos extremos el grupo fosfato α utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa y ATP como fuente dador del grupo fosfato. Luego de estas reacciones, tanto los ARN tratados y los controles sin tratar se ligaron con un oligonucleótido de ARN adaptador utilizando la enzima T4 ARN ligasa. Seguidamente se realizó en ambas muestras una reacción de retrotranscripción empleando la enzima Superscript III (Invitrogen) y un hexanucleótido de secuencia al azar (dN₆). Posteriormente, se amplificó por PCR el extremo 5' de cada gen empleando los oligonucleótidos específicos para los genes *desA*, *desB* y *desL* y el oligonucleótido de ARN, GeneRacer5' y el ADNc obtenido en el paso

Resultados III

anterior como molde de la reacción (Ver Materiales y Métodos). Con los productos obtenidos se realizó una segunda PCR, anidada, también con oligonucleótidos específicos. Los productos así obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 3.5 % junto con un marcador de peso molecular y los controles correspondientes. Los fragmentos obtenidos se secuenciaron. Los resultados obtenidos para los genes *desL*, *desA* y *desB* se muestran en las figura 42, 43 y 44, respectivamente.

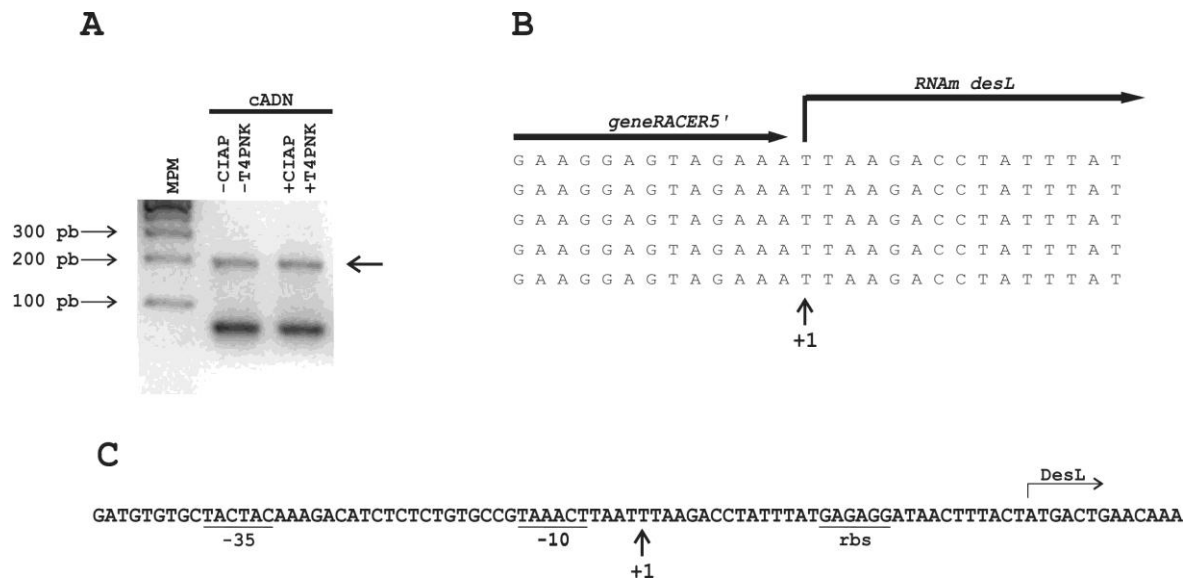
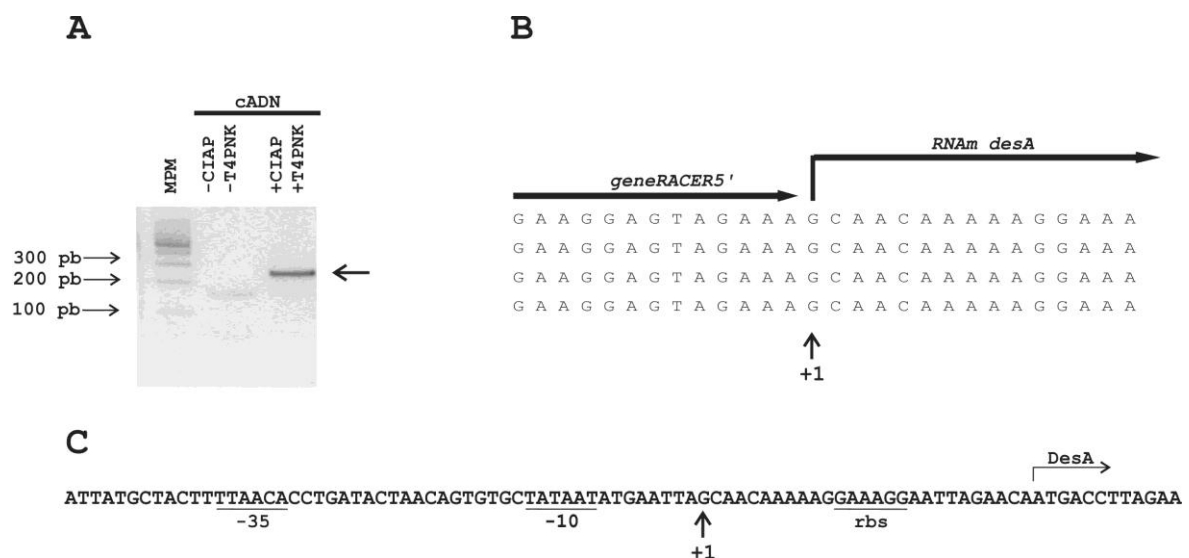


Figura 42. Identificación del transcrito primario del gen *desL* mediante 5' - RACE. A) Electroforesis en gel de agarosa 3.5 % de los productos obtenidos luego de realizar la PCR descrita en el texto para el gen *desL*. La flecha indica los productos de PCR purificados y secuenciados. B) Apilamiento de las 5 secuencia independientes obtenidas a partir de la muestra con tratamiento enzimático. C) Ubicación del sitio de inicio de transcripción (+1) determinado por 5' - RACE sobre la secuencia 5' no traducida del gen *desL*, de los elementos -10 y -35. También se indica el sitio de unión a ribosomas (rbs) ubicado entre el sitio de inicio de la transcripción y el primer codón codificante del gen.



Resultados III

que los nucleótidos G₋₂₇ y G₋₃₃ corresponderían a los sitios de inicio de la transcripción de los ARN mensajeros de *desA* y *desB*, respectivamente (Figuras 43C y 44C).

Cabe mencionar que corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción se encuentran las regiones -10 y -35 características, separadas una de otra por una distancia de 20 pb, 19 pb y 19 pb para *desL*, *desA* y *desB*, respectivamente. Además, se pueden identificar las secuencias de unión a ribosomas Shine-Delgarno (rbs) corriente debajo de los sitios de inicio de la transcripción propuestos, separada a su vez por 11, 10 y 9 pb de los codones iniciadores de la traducción, respectivamente.

Los elementos genéticos descritos no se encuentran restringidos únicamente a estas cepas. El gen *desL* presenta conservación perfecta de las secuencias -35, -10, rbs y cajas regulatorias con *B. subtilis*⁴ como se muestra en la Figura 45.

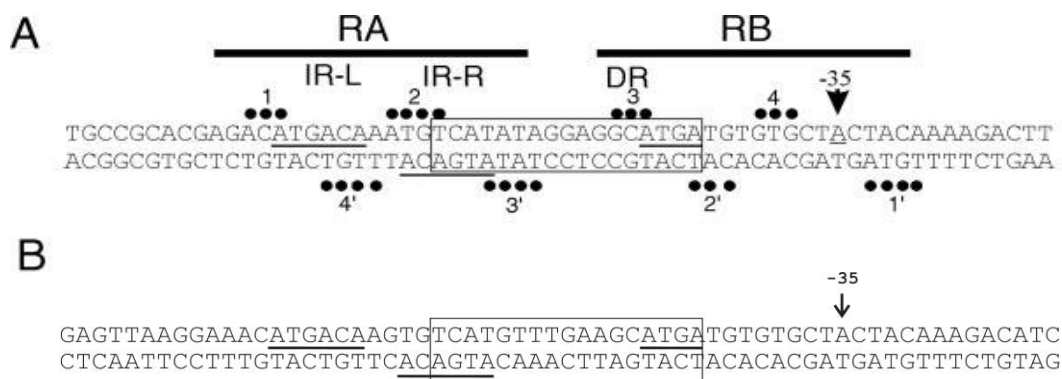


Figura 45. Región regulatoria de los genes *des* de *B. subtilis* y *desL* de *B. licheniformis*. A) Región regulatoria del gen *des*. Las líneas RA y RB representan el sitio de unión de los dos DesR-P. Las repeticiones invertidas están subrayadas. Los círculos negros indican las bases que se encuentran protegidas por DesR. En el recuadro se muestra las repeticiones invertidas de 4 pb separadas por 9 pb. El sitio -35 se representa con una flecha. Adaptado de ¹⁰¹. B) Región regulatoria del gen *desL*.

La gran conservación entre los elementos regulatorios presentes en los promotores de los genes *des* y *desL* podría ser la causa de que en *B. licheniformis* exista un mecanismo de regulación por temperatura que actuara de manera similar al presente en *B. subtilis*.

3.3 – Control por temperatura de la expresión de los genes *des*.

3.3.1 – Estudio de la expresión de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* en cepas de *B. subtilis*.

Una vez llevado a cabo el mapeo de los sitios de inicio de la transcripción se realizó un análisis de la expresión de los genes de las desaturasas en estudio mediante la construcción de cepas de *B. subtilis* que portan las zonas promotoras de los genes *des* de *B.*

Resultados III

cereus y *B. licheniformis* fusionadas transcripcionalmente al gen *lacZ* de *E. coli*. Para ello, en el vector integrativo pJM116 se clonaron los fragmentos de ADN corriente arriba del codón de iniciación de la traducción de cada uno de dichos genes (ver Materiales y Métodos). Los vectores resultantes, denominados pJM77, pJM60 y pJM81, que contienen las regiones promotores de los genes *desA*, *desB* y *desL*, respectivamente, se integraron ectópicamente en el locus *amyE* del cromosoma de *B. subtilis* mediante un proceso de doble recombinación homóloga (ver Materiales y Métodos). De esta manera se obtuvieron las cepas LSC78, LSC61 y LSC82. Las mismas se cultivaron en MM a 37°C y cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,4$ se dividieron en dos alícuotas, a una de ellas se la continuó incubando a 37°C y la otra se transfirió a 25°C. A diferentes tiempos se tomaron muestras y se midió la actividad β -galactosidasa. Los resultados obtenidos se muestran en los gráficos de las Figuras 46 y 47.

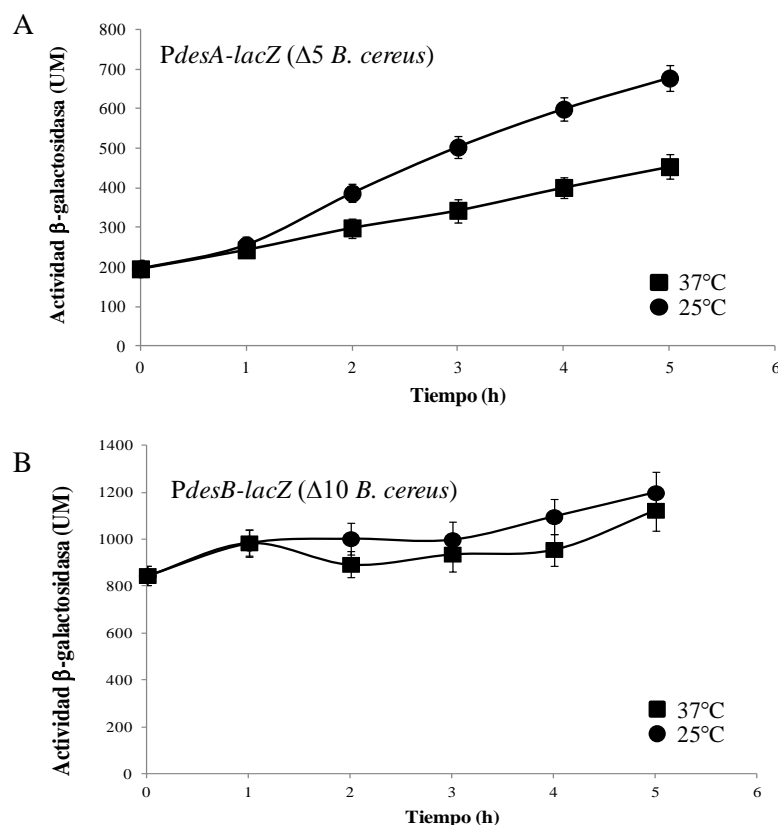


Figura 46. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PdesA-lacZ* (A) y *PdesB-lacZ* (B) en la cepa de *B. subtilis* JH642.

Como puede verse en la Figura 46A, cuando la cepa LSC78 que contiene la fusión *PdesA-lacZ* se cultivó a 37°C mostró niveles de actividad β -galactosidasa que fueron

Resultados III

relativamente bajos, pero cuando se la transfirió a 25°C, la actividad β -galactosidasa aumentó casi al doble, mostrando que la expresión del gen de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus* es activada por la temperatura de crecimiento. Sin embargo, en el caso del gen *desB* (Figura 46B) no se observan diferencias en su expresión cuando los cultivos son transferidos a menores temperaturas de crecimiento. Además los valores de actividad β -galactosidasa fueron más elevados que los medidos para el promotor de *desA*.

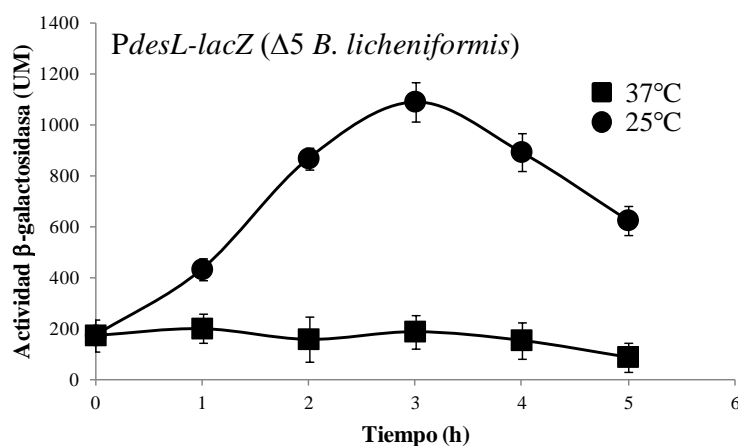


Figura 47. Actividad β -galactosidasa de la fusión *PdesL-lacZ* en la cepa de *B. subtilis* JH642.

En la Figura 47 se muestra la curva de actividad β -galactosidasa ensayada en la cepa LSC82 que contiene la fusión *PdesL-lacZ*. Cuando esta cepa se cultivó a 37°C los valores de actividad fueron muy bajos y comenzaron a aumentar cuando el cultivo se transfirió a 25°C alcanzando un máximo cerca de las 3 h luego de la caída de la temperatura con niveles de inducción de 6 veces (Figura 47). Luego de este período de tiempo la síntesis de la β -galactosidasa decrece. Estos experimentos permiten concluir que la transcripción del gen *desL* de *B. licheniformis* es controlada por la temperatura de crecimiento en *B. subtilis*.

Si bien se determinó que la expresión de las dos $\Delta 5$ desaturasas estudiadas estaría regulada por la temperatura de crecimiento, se observa que existe una diferencia entre ambas, ya que la actividad β -galactosidasa comienza a disminuir luego de 3 horas a 25°C en el caso de la fusión *PdesL-lacZ*. Estos experimentos fueron realizados en la cepa de *B. subtilis* salvaje que expresa su propia desaturasa y a 25°C sintetiza AGI, los resultados observados para *DesL* sugieren que la acumulación de AGI que ocurre a baja temperatura como consecuencia de la expresión simultánea de la $\Delta 5$ desaturasa nativa de *B. subtilis* está influenciando la expresión del gen *desL* mientras que estos AGI no parecen afectar la respuesta a la temperatura del gen *desA*.

Resultados III

Para evaluar el efecto de los AGI endógenos en la expresión de estas desaturasas se llevaron a cabo los mismos experimentos en la cepa de *B. subtilis* LC5 que no expresa su desaturasa endógena y no sintetiza AGI. Los resultados obtenidos para las cepas LSC77 y LSC60 que expresan los promotores *PdesA* y *PdesB* de la $\Delta 5$ y $\Delta 10$ desaturasas de *B. cereus*, respectivamente se muestran en la Figura 48.

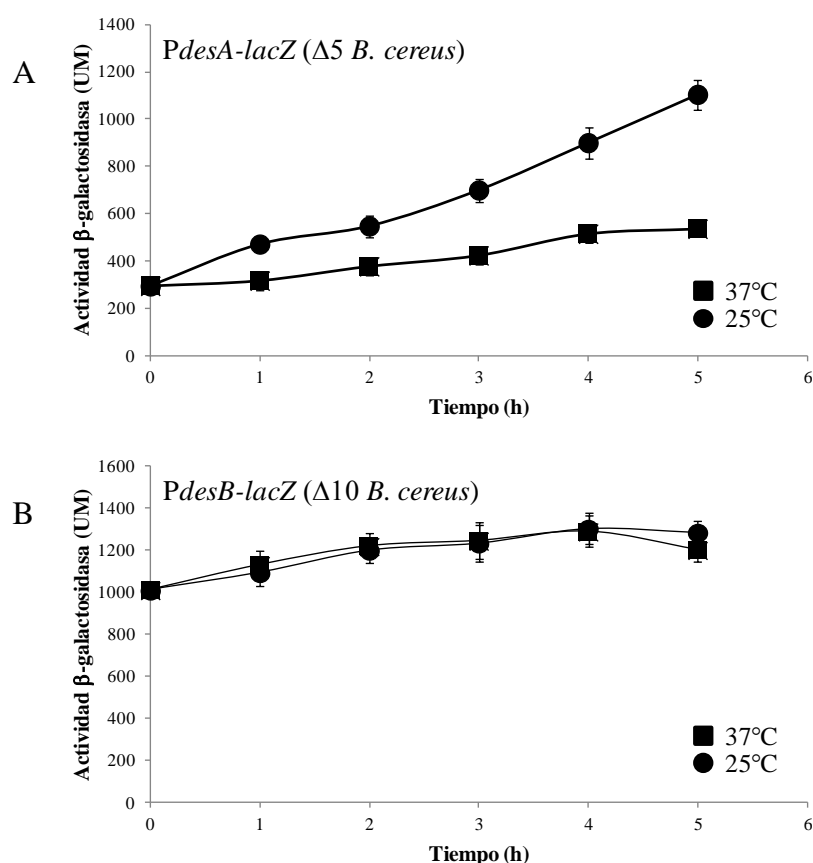


Figura 48. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PdesA-lacZ* (A) y *PdesB-lacZ* (B) en la cepa de *B. subtilis* LC5.

Como se observa en la Figura 48, los niveles de actividad β -galactosidasa para la cepa LSC77, en la que no hay síntesis de AGI endógena, son iguales a los obtenidos en la cepa salvaje, manteniéndose independientes de la presencia de AGI en la membrana de la bacteria a 37°C, sin embargo cuando el cultivo se transfirió a menor temperatura, se produce un incremento mayor en la transcripción del gen de la β -galactosidasa que el obtenido en la cepa de *B. subtilis* JH642 en donde hay acumulación de AGI.

A diferencia del efecto negativo que ejercen los AGI sobre la expresión del gen *desL* (Figura 47) en donde se observa que disminuyen los valores de actividad β -

Resultados III

galactosidasa luego de 3 h de incubación a 25°C, en el caso del gen *desA* es menor la expresión en presencia de AGI pero en ningún momento se observa disminución de la misma con el tiempo. Para el caso de la cepa LSC60 los valores de actividad siguen presentándose independientes de la temperatura y aquí, también, de la ausencia de otros AGI. Por otro lado se observa que los niveles de transcripción son ligeramente mayores que los observados en la cepa que sintetiza AGI.

Cuando se ensaya la cepa LSC81 conteniendo la fusión *PdesL-lacZ* se obtienen los resultados esquematizados en la Figura 49.

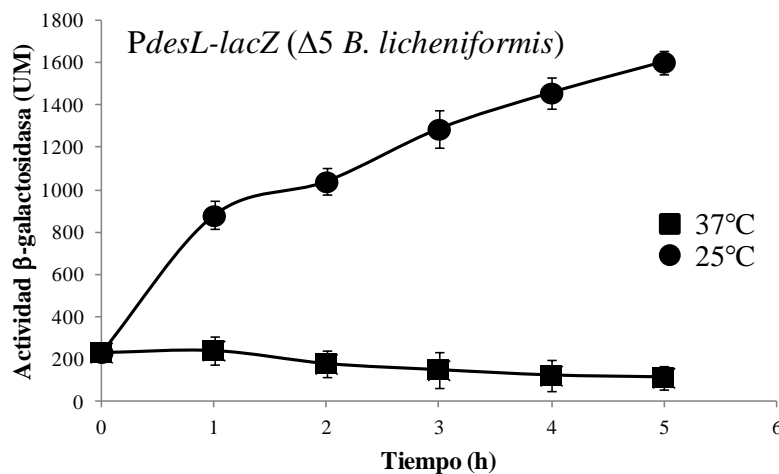


Figura 49. Actividad β -galactosidasa de la fusión *PdesL-lacZ* en la cepa de *B. subtilis* LC5.

Para la $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis* se ve que en ausencia de AGI los valores de la actividad β -galactosidasa a 25°C aumentan durante todo el tiempo que dura el ensayo y nunca disminuyen como ocurría en presencia de AGI (Figura 47). La ausencia de este tipo de AG estaría generando una activación continua del promotor de la desaturasa ya que nunca se acumularán AGI que permitan fluidificar la membrana y generar la señal para terminar con la expresión del gen *desL* como ocurre en *B. subtilis* ⁴.

Finalmente, en esta primera etapa de análisis transcripcionales se evaluó la influencia del sistema de dos componentes DesK/R que regula la expresión del gen *des* en *B. subtilis* ya que en los experimentos con ATB descritos previamente surgió la posibilidad de que la expresión de las desaturasas estudiadas esté controlada por algún sistema de regulación. Para ello se construyeron las cepas LSC79, LSC62 y LSC83 que expresan las fusiones *PdesA-lacZ*, *PdesB-lacZ* y *PdesL-lacZ* en un contexto génico de *B. subtilis des- desKR*-. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 50 y 51.

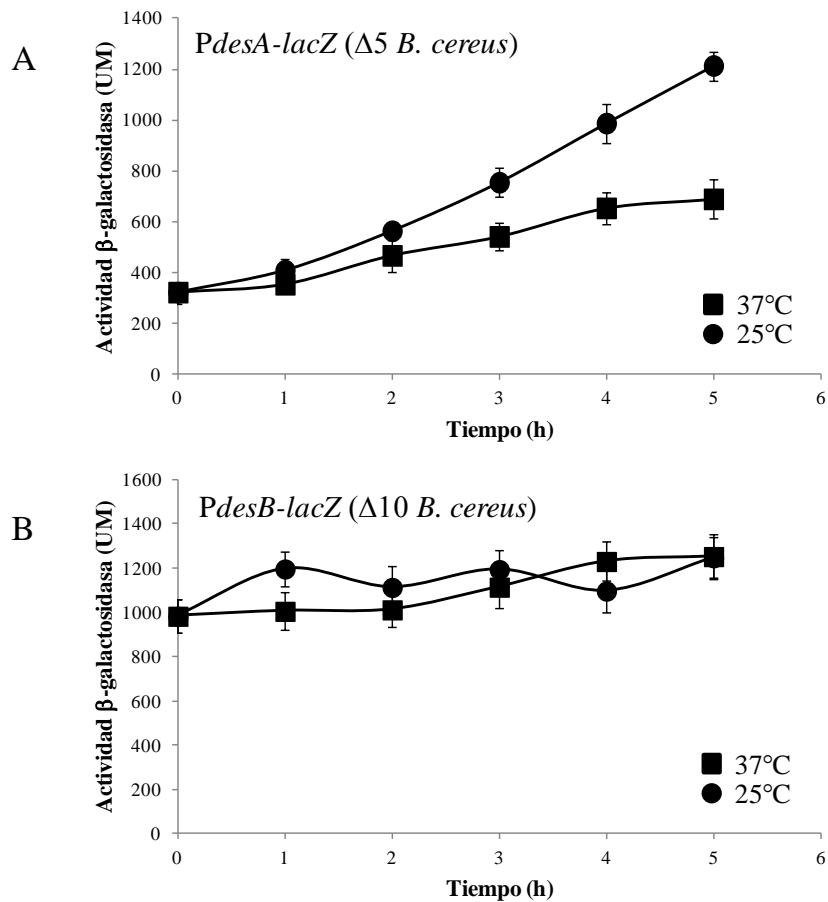


Figura 50. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PdesA-lacZ* (A) y *PdesB-lacZ* (B) en la cepa de *B. subtilis* LSC204.

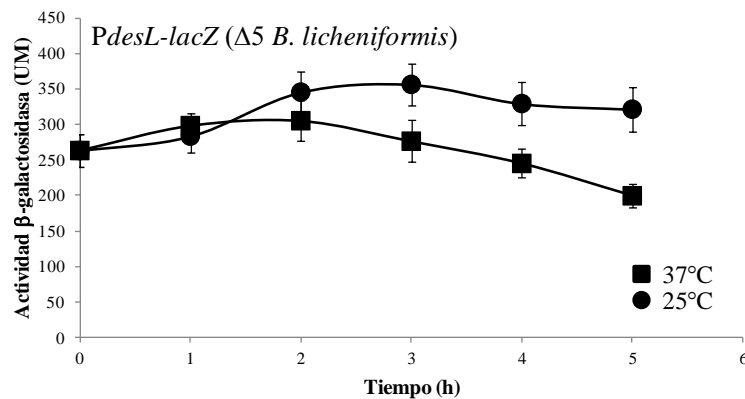


Figura 51. Actividad β -galactosidasa de la fusión *PdesL-lacZ* en la cepa de *B. subtilis* LSC204.

En la Figura 50A se ve que a 25°C se sigue produciendo un aumento en los valores de actividad β -galactosidasa comparados con los valores a 37°C cuando los cultivos de la cepa que expresa la fusión *PdesA-lacZ* son transferidos a menores temperaturas de crecimiento. Debido a que la cepa LSC79 no posee el sistema de dos componentes DesK/R, se puede inferir que la regulación de la expresión del gen de la $\Delta 5$ desaturasa de

Resultados III

B. cereus no estaría controlada por dicho sistema. Asimismo, este sistema tampoco estaría actuando sobre la expresión de la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*, ya que en este caso los valores de actividad permanecen iguales que en las demás condiciones ensayadas (Figura 50B), lo cual estaría corroborando la naturaleza constitutiva de la expresión de este gen.

Por otro lado, al evaluar la actividad β -galactosidasa en la cepa LSC83 que contiene la fusión *PdesL-lacZ* se puede ver que no se produce aumento de los valores de actividad al disminuir la temperatura de crecimiento. Esta observación indicaría que la expresión de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis* si sería controlada por el circuito *DesK/R* de *B. subtilis*. Si se comparan las regiones génicas correspondientes a las dos $\Delta 5$ desaturasas estudiadas (Figura 52) se puede apreciar que en *B. licheniformis* aparecen dos genes corriente abajo del gen de la desaturasa como ya se había mencionado anteriormente. Dichos genes presentan alta homología de secuencia con *desK* y *desR* y sus productos génicos presentan un porcentaje de identidad del 91,62% y 95,98%, respectivamente, con las correspondientes proteínas de *B. subtilis*. Estos dos genes podrían ser los encargados de regular la expresión de la $\Delta 5$ desaturasa en *B. licheniformis*. Además se encontraron las mismas regiones regulatorias del gen *des* de *B. subtilis* en el promotor del gen *desL*, como se detalló en el punto 3.2. Sin embargo, esto no se evidencia para *B. cereus* en donde el control termal de la $\Delta 5$ desaturasa sería llevado a cabo por otro sistema.

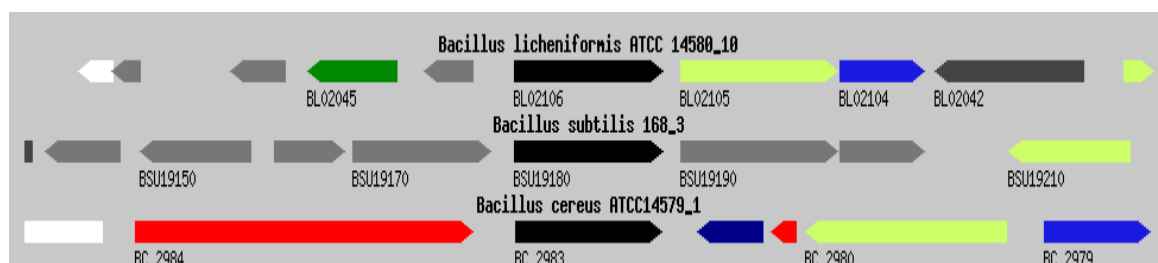


Figura 52. Esquema de la región génica de las $\Delta 5$ desaturasas de *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Para una mejor visualización de los resultados hasta aquí obtenidos se agruparon los valores de actividad β -galactosidasa por cepas en los distintos contextos genéticos como se muestra en la Figura 53.

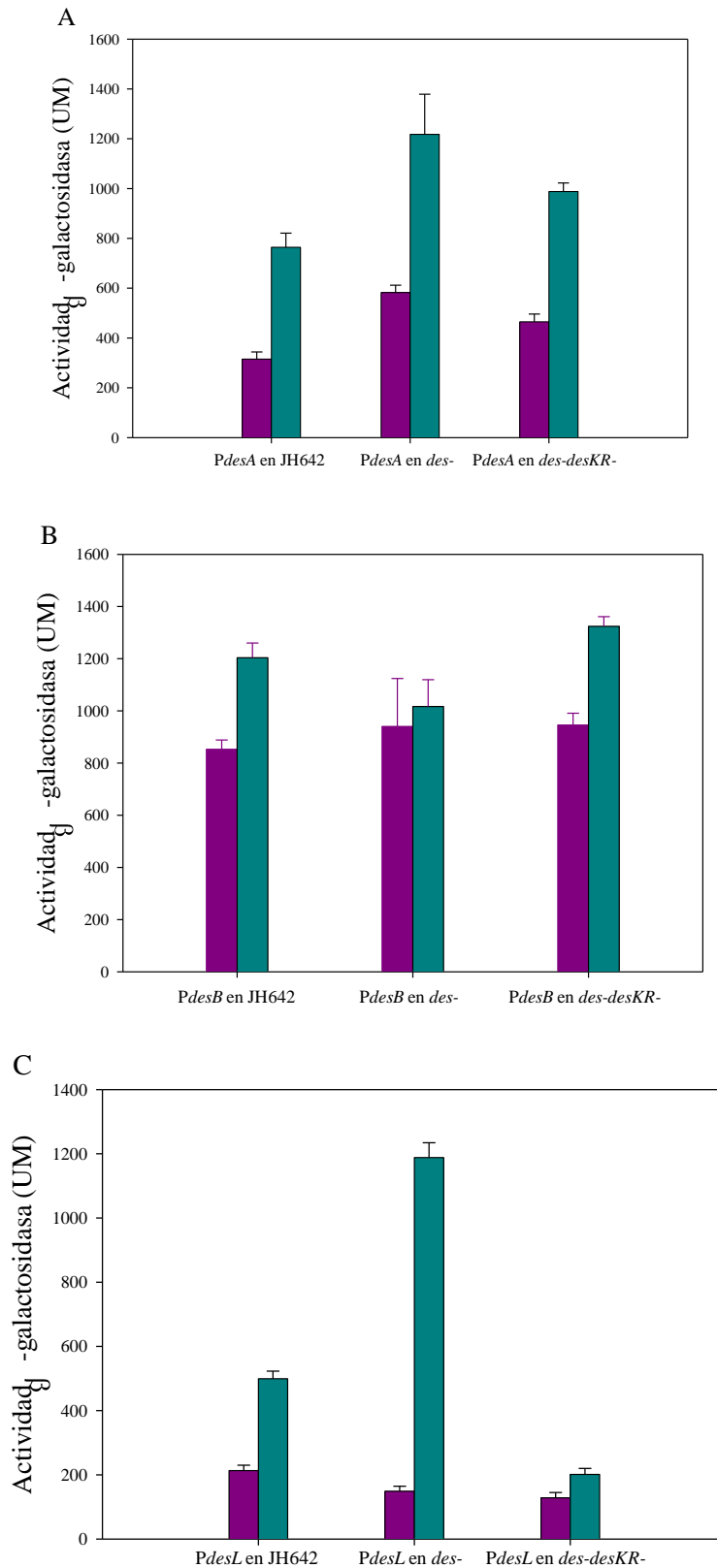


Figura 53. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *PdesA-lacZ*, *PdesB-lacZ* y *PdesL-lacZ* en la cepas de *B. subtilis* JH642, LC5 y LSC204.

Resultados III

Como conclusión de esta serie de experimentos se puede decir que el gen *desL*, que codifica la $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis*, está sujeto a regulación transcripcional y su expresión se induce cuando la bacteria se cultiva a bajas temperaturas. Los resultados mostraron que dicha regulación estaría controlada por el sistema de dos componentes DesK/R en *B. subtilis*, y que sería equivalente a lo que ocurre en *B. licheniformis* ya que los análisis *in silico* muestran que en esta bacteria existe un sistema similar al de *B. subtilis* con alto grado de homología. Una observación adicional que sugiere que este sistema funcionaría de la misma manera es que en *B. subtilis* la expresión de este gen está afectada negativamente por la presencia de AGI produciéndose un descenso de la misma luego de un período de tiempo de crecimiento a baja temperatura luego del cual se permitió la acumulación de estos AG. En ausencia de los mismos la expresión de dicho gen se encuentra todo el tiempo encendida como se explicó más arriba. Por otro lado, la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus*, codificada por el gen *desA*, también posee regulación transcripcional por temperatura. Sin embargo, esta regulación no estaría controlada por el sistema DesK/R. Los valores de actividad β -galactosidasa para *PdesA* son menores en la cepa que sintetiza AGI indicando que la expresión estaría regulada por la presencia de AGI, pero sin embargo, no se observa la disminución de actividad luego de un tiempo de incubación a 25°C que se ve en el caso del gen *desL*. Esto indicaría que la fluidez generada por la incorporación de AGI en la membrana no es suficiente para apagar completamente la expresión del gen *desA* en los tiempos ensayados. Finalmente, la expresión del gen *desB*, que codifica para la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*, no estaría regulada por temperatura ni se vería afectada negativamente por la presencia de AGI lo cual indicaría que dicho gen se expresaría de forma constitutiva.

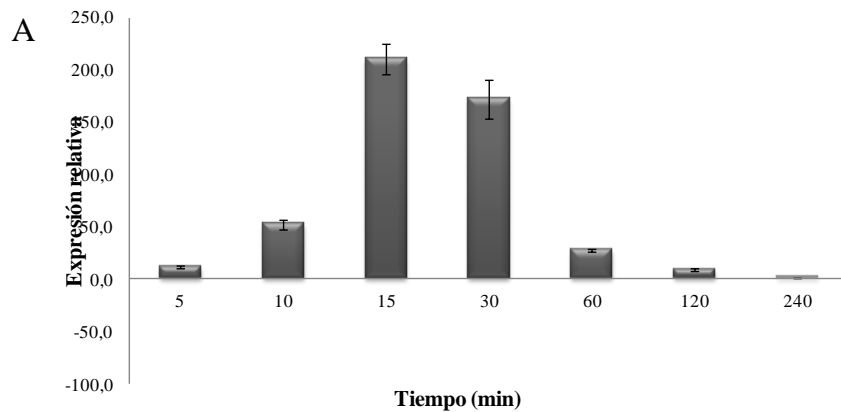
3.3.2 – Análisis de los niveles del ARNm de los genes *des* durante la adaptación al frío en *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Hasta el momento se ha estudiado cómo es la regulación de los genes de las desaturasas de *B. cereus* y *B. licheniformis* expresándolos en diferentes cepas *B. subtilis*. Para indagar aún más en este mecanismo, se llevaron a cabo experimentos con *B. cereus* y *B. licheniformis*, diseñados para examinar las cantidades de los transcritos de los genes *des* en diferentes condiciones de crecimiento de estas cepas.

Resultados III

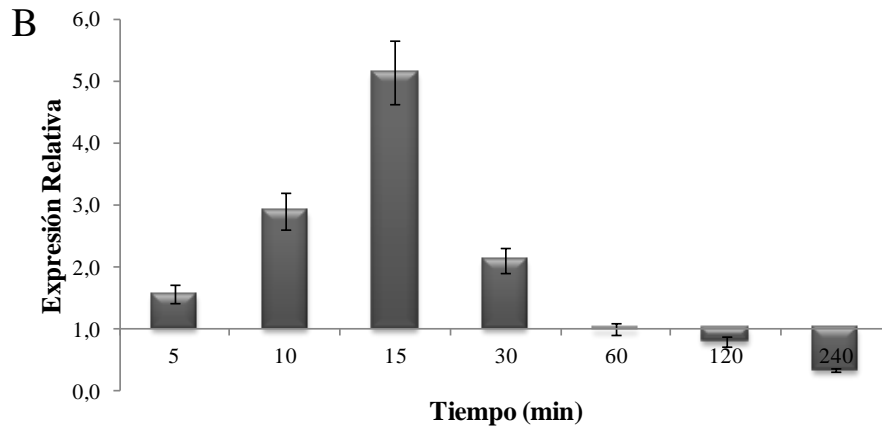
3.3.2.1 – Análisis de los transcritos de los genes *des* en cepas salvajes de *B. cereus* y *B. licheniformis*.

Para realizar el estudio de la regulación de los genes *des* se cultivaron las cepas salvajes de *B. cereus* y *B. licheniformis* a 37°C en MM hasta fase logarítmica temprana. Luego, los cultivos se dividieron en dos alícuotas de las cuales una se continuó incubando a 37°C y la otra se transfirió a 25°C. De todos los cultivos se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se extrajo el ARN total de las mismas utilizando un kit comercial de Promega. Para llevar a cabo la cuantificación del ARN mensajero de los genes en estudio en las condiciones ensayadas se realizaron experimentos de qPCR en tiempo real. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los genes en estudio y para el gen de referencia, en este caso el gen que codifica para el ARNr 16S. La eficiencia de amplificación de los cebadores se determinó utilizando ADN genómico cuantificado de cada especie. Finalmente, se desarrollaron los experimentos de qPCR en tiempo real utilizando como molde el ARN total extraído en cada condición y los cebadores específicos diseñados y analizados previamente. La expresión de los transcritos de las cepas cultivadas a 25°C se relativizó a cultivos controles (37°C) y se calculó utilizando el método Pfaffl¹³⁸ y el ARNr 16S como control interno. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 54.

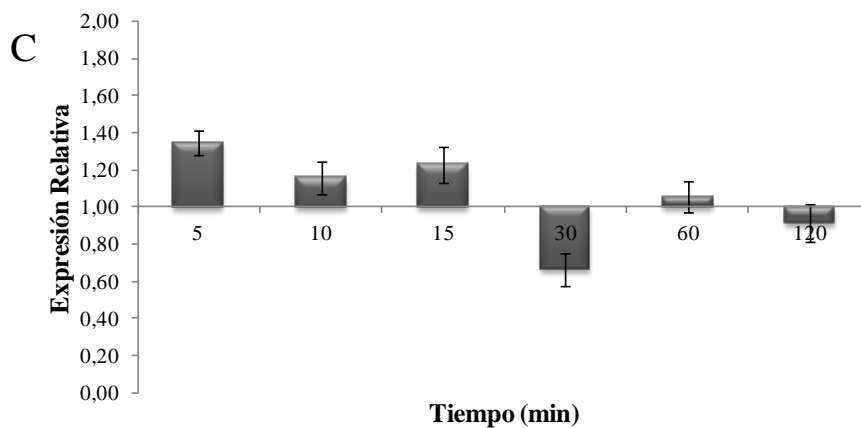


Tiempo (min)	5	10	15	30	60	120	240
Expresión relativa <i>desL</i> 25°C/ <i>desL</i> 37°C	12 ± 1	52 ± 5	210 ± 14	172 ± 18	28 ± 1	9 ± 1	1,4 ± 0,1

Resultados III



Tiempo (min)	5	10	15	30	60	120	240
Expresión relativa <i>desA</i> 25°C/ <i>desA</i> 37°C	1,6 ± 0,7	2,9 ± 0,8	5,2 ± 0,8	2,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,2



Tiempo (min)	5	10	15	30	60	120
Expresión relativa <i>desB</i> 25°C/ <i>desB</i> 37°C	1,35 ± 0,07	1,16 ± 0,09	1,2 ± 0,1	0,66 ± 0,09	1,05 ± 0,09	0,9 ± 0,1

Figura 54. Expresión relativa de los genes de las desaturasas a 25°C y 37°C determinada por PCR Cuantitativa en Tiempo Real. Las cepas de *B. cereus* ATCC 14579 y *B. licheniformis* ATCC 14580 se cultivaron en MM a 37°C hasta fase logarítmica temprana y luego la mitad de los cultivos se transfirieron a 25°C. Se siguió incubando a ambas temperaturas y se tomaron muestras a diferentes tiempos luego de la inducción. Se utilizó como molde el RNA total extraído de tres experimentos independientes. Cada reacción se normalizó utilizando los valores de Ct correspondientes al RNAr 16S como control interno. La expresión de los transcritos de la cepas cultivadas a 25°C fue relativizada a cultivos controles (37°C). **A)** expresión relativa del gen *desL*; **B)** expresión relativa del gen *desA*; **C)** expresión relativa del gen *desB*. Debajo de cada gráfico se muestra una tabla con los valores de expresión relativa.

Como se observa en la Figura 54 los niveles de los ARNm de las dos $\Delta 5$ desaturasas van aumentando con el tiempo llegando a un máximo de acumulación a los 15

Resultados III

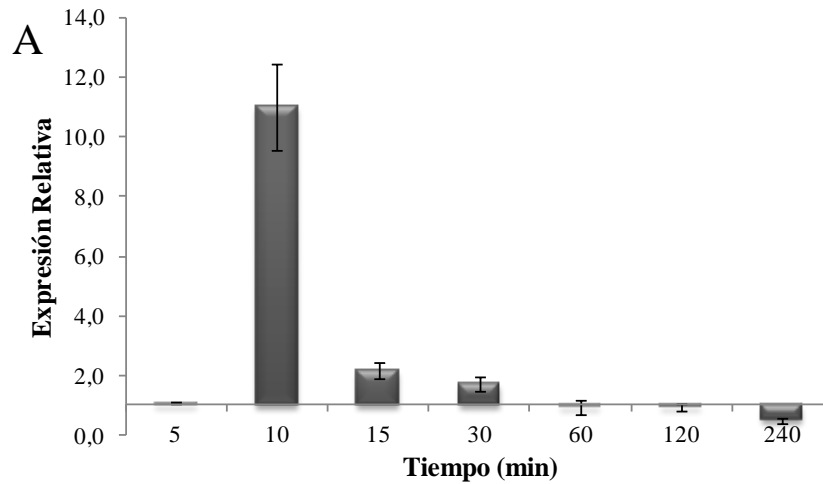
min luego de la transferencia de los cultivos a 25°C. Luego de dicho lapso los niveles comienzan a decaer. Esto puede traducirse en que la disminución de la temperatura produce un aumento significativo y transitorio en los niveles de ARNm de los genes de las $\Delta 5$ desaturasas. En el caso del ARNm de la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus* no se observa un aumento del nivel del mismo al disminuir la temperatura de crecimiento. Estos resultados sugieren que los genes de las $\Delta 5$ desaturasas se inducen cuando la temperatura de crecimiento disminuye y que el gen de la $\Delta 10$ desaturasa se expresa de manera constitutiva en las condiciones ensayadas. A su vez, estos resultados coinciden con los observados mediante ensayos de actividad β -galactosidasa obtenidos previamente en cepas de *B. subtilis*, en donde se vio que la actividad β -galactosidasa aumenta cuando disminuye la temperatura en los casos donde dicho gen se fusionó a los promotores de las $\Delta 5$ desaturasas y no para el promotor de la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*.

En base a todos estos resultados también se puede mencionar que tanto en *B. licheniformis* como en *B. cereus* existe una regulación transcripcional por temperatura para la expresión de los genes que codifican para las $\Delta 5$ desaturasas. En el caso de *B. licheniformis*, podría estar involucrado el sistema de dos componentes DesK/R en el mecanismo de regulación, como se propuso anteriormente. Para corroborar esta posibilidad podrían diseñarse mutantes en este sistema y evaluar la expresión del gen de la desaturasa. Sin embargo, para la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus*, se observa nuevamente que es otro el mecanismo que estaría involucrado en la regulación ya que este sistema se encuentra ausente en este organismo y los resultados obtenidos cuando se trabajó con cepas de *B. subtilis* indican que el sistema no está involucrado en la regulación de este gen. Esta desigualdad en cuanto a las proteínas regulatorias también podría ser la responsable de la diferencia observada en los niveles de expresión. Se ha determinado que para ambas $\Delta 5$ desaturasas existe una acumulación temprana y temporal del ARNm, sin embargo, el gen *desL* aumenta su expresión 210 veces a 25°C mientras que el gen *desA* de *B. cereus* sólo lo hace 5 veces.

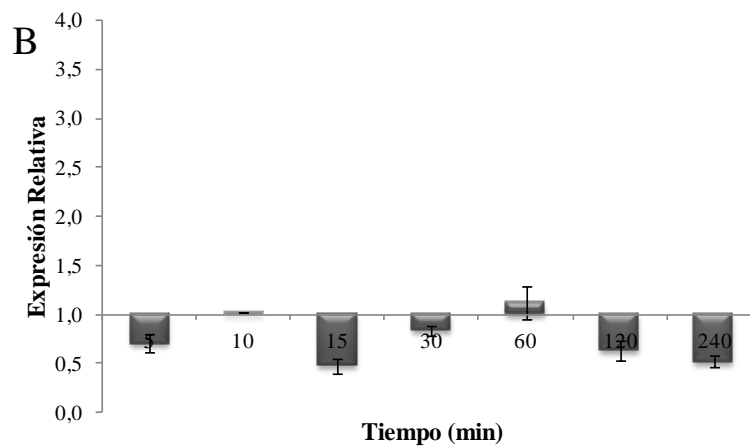
3.3.2.2 – Análisis de los transcritos de los genes *des* en cepas mutantes de *B. cereus*.

Con el fin de evaluar el impacto de las mutaciones en cada desaturasa sobre la expresión del otro gen en *B. cereus*, se realizaron los mismos experimentos descriptos más arriba pero en este caso se utilizaron las cepas mutantes, LCER0400 (*desB*) y LCER2983 (*desA*). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 55.

Resultados III



Tiempo (min)	5	10	15	30	60	120	240
Expresión relativa <i>desA</i> 25°C/ <i>desA</i> 37°C	1,06 ± 0,04	11 ± 1	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,49 ± 0,09



Tiempo (min)	5	10	15	30	60	120	240
Expresión relativa <i>desB</i> 25°C/ <i>desB</i> 37°C	0,70 ± 0,09	1,02 ± 0,01	0,47 ± 0,07	0,83 ± 0,05	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,06 ± 0,52

Figura 55. Expresión relativa de los genes de las desaturasas a 25°C y 37°C determinada por PCR Cuantitativa en Tiempo Real. Las cepas de *B. cereus* LCER0400 y LCER2983 se cultivaron en MM a 37°C hasta fase logarítmica temprana y luego la mitad de los cultivos se transfirieron a 25°C. Se siguió incubando a ambas temperaturas y se tomaron muestras a diferentes tiempos luego de la inducción. Se utilizó como molde el RNA total extraído de tres experimentos independientes. Cada reacción se normalizó utilizando los valores de Ct correspondientes al RNAr 16S como control interno. La expresión de los transcritos de la cepas cultivadas a 25°C fue relativizada a cultivos controles (37°C). **A)** expresión relativa del gen *desA*; **B)** expresión relativa del gen *desB*. Debajo de cada gráfico se muestra una tabla con los valores de expresión relativa.

Como se ve en la figura 55A, en ausencia de AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 10$, los niveles de ARNm del gen *desA* aumentan con el tiempo llegando a un máximo de

Resultados III

acumulación más rápido que en la cepa salvaje (10 min vs. 15 min). Además la expresión de este gen aumenta 11 veces a 25°C mientras que en presencia del gen *desB* lo hace sólo 5 veces. Por lo tanto, podemos decir que existe un incremento en la expresión del gen *desA* a fin de compensar rápidamente la falta de AGI $\Delta 10$. Por otro lado, en el caso de la mutante en el gen *desA* (Figura 55B), se observa nuevamente que no hay modificaciones en los niveles de expresión del gen *desB*, que codifica para la $\Delta 10$ desaturasa. Aún en ausencia de AGI con la insaturación en la posición $\Delta 5$, la $\Delta 10$ desaturasa se expresa de manera constitutiva, es decir, no le estaría afectando a esta cepa la ausencia de estos AGI lo cual concuerda con todos los resultados obtenidos anteriormente.

DISCUSIÓN CAPÍTULO III

Tanto las células procariotas como las eucariotas exhiben una respuesta adaptativa al frío. Esta respuesta se traduce en la regulación de varios genes con la posterior inducción de distintas actividades enzimáticas, entre ellas, la actividad desaturasa, encargada de sintetizar AGI. El estudio de la regulación de la expresión y actividad de estas enzimas es un paso esencial para el entendimiento en su conjunto de la respuesta y adaptación al frío. Hasta el momento, los mecanismos moleculares de la percepción de la temperatura se han estudiado extensamente en *B. subtilis*⁴⁹ que a diferencia de otros organismos poiquilotermos tales como cianobacterias¹⁵⁴ y plantas⁴⁰, posee una única actividad desaturasa la cual está codificada por un único gen cuya expresión es controlada a nivel transcripcional por la temperatura^{4,49}. Mientras que células cultivadas en MM a 37°C presentan una leve transcripción del gen *des*, la producción del ARNm correspondiente se induce fuertemente ante una disminución en la temperatura. A su vez, se ha determinado que ambos componentes del sistema de transducción de señales DesK/R son necesarios para la transcripción de *des* y que el mismo es responsable de la regulación de la transcripción de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. subtilis*. Los resultados obtenidos sugieren que el sistema DesK/R percibe cambios en la fluidez de la membrana y modula la expresión del gen *des* en función de este estímulo^{4,103}. Asimismo, la modulación de la síntesis de AGI a bajas temperaturas se llevaría a cabo también a nivel de la actividad desaturasa junto a la regulación transcripcional descrita¹⁵⁵.

En este Capítulo se llevó a cabo el estudio de la regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de *B. licheniformis* y *B. cereus*.

Se evaluó la expresión de los genes *desA* de *B. cereus* y *desL* de *B. licheniformis*, mediante fusión transcripcional de los promotores al gen *lacZ*, y se comprobó que la misma se induce ante una caída en la temperatura de crecimiento (Figuras 46A y 47). Estos resultados concuerdan con lo observado para *B. subtilis*⁹⁶ y con estudios previos de Fujii y Fulco¹⁵² los cuales sugirieron que la síntesis de la enzima desaturasa de *B. megaterium* se encuentra regulada por la temperatura a nivel transcripcional. Sin embargo, cuando se estudió la expresión del gen *desB* de *B. cereus* que codifica para la $\Delta 10$ desaturasa, no se observó un aumento de la actividad β -galactosidasa al disminuir la temperatura de crecimiento (Figura 46B), lo cual sugiere que este gen se transcribe constitutivamente. Sin embargo, cuando se analizó la síntesis de AGI en una cepa de *B. subtilis* que expresa este gen se determinó que aumenta de 15% a 30% la cantidad de estos AG al disminuir la temperatura de cultivo (Tabla XII), sugiriendo que esta enzima es más activa a bajas

Discusión III

temperaturas. Un nivel de control adicional de la síntesis de AGI puede ser la función de la enzima desaturasa, la cual puede ser menos eficiente a altas temperaturas de crecimiento dado que la desaturación es menor cuando aumenta la temperatura de crecimiento (Tabla XII). Esta posibilidad concuerda con trabajos previos¹⁵⁶ que postulan que la inactivación de la desaturasa mediada por la temperatura es uno de los mecanismos para regular el nivel de AGI en *B. megaterium*.

Los datos presentados hasta aquí demuestran que la transcripción de los genes *desA* y *desL* estaría regulada por la temperatura de crecimiento pero no la de *desB*. Es factible entonces postular la existencia de proteínas reguladoras de la transcripción (ya sean activadoras o represoras) que participen en la regulación de la expresión de los dos primeros genes durante los cambios de temperatura de crecimiento. Para analizar la participación del sistema de dos componentes DesK/R que regula la expresión de la desaturasa de *B. subtilis* en la regulación transcripcional de dichos genes, se llevaron a cabo medidas de actividad β -galactosidasa en cepas de *B. subtilis* mutantes en dicho sistema. En estos experimentos se determinó que en ausencia del sistema de dos componentes, la expresión del gen *desL* disminuye (Figura 51) comparada con la que se observa en presencia del sistema. Como se ha demostrado, corriente abajo del gen *desL*, están codificados dos genes cuyos productos génicos muestran una gran identidad y similitud con DesK y DesR de *B. subtilis* (Figura 52). Además, la región promotora del gen *desL* presenta los mismos sitios regulatorios (Figura 45) a los cuales se uniría DesR fosforilado para activar la transcripción de la desaturasa de la misma manera que ocurre en *B. subtilis*. Con estas observaciones es factible concluir que en *B. licheniformis* la regulación de la expresión del gen *desL* se llevaría a cabo a través de un mecanismo similar al de *B. subtilis* en donde también participarían estas dos proteínas regulatorias en una vía parecida a la vía DesK/R. Además, al igual que ocurre en *B. subtilis*, se necesitaría síntesis *de novo* de ARN y proteínas como se demostró mediante marcación con precursores radioactivos en ausencia y presencia de ATB que bloquean la transcripción y traducción (Figura 41, Tabla XIX). En este caso, luego de un descenso en la temperatura de crecimiento se activaría una putativa vía Des que permitiría la transcripción del gen *desL* y la posterior síntesis de la desaturasa. En presencia de ATB que bloquean estos procesos no se pudo observar acumulación de AGI, lo cual estaría reforzando la hipótesis de la presencia de un mecanismo similar al circuito Des. Finalmente se estudió el impacto de la presencia de AGI sobre la expresión ya que es posible que los AGI o bien los cambios de la fluidez de membrana generado por la presencia de los mismos sean los responsables de

Discusión III

reprimir la expresión de los genes *des* como se observó previamente en nuestro laboratorio para *B. subtilis*⁴. En estos experimentos, llevados a cabo en mutantes que no sintetizan AGI, se comprobó que la expresión del gen *desL* de *B. licheniformis* se ve afectada por la presencia de AGI, ya que a diferencia de lo que se observa en la Figura 47, en donde luego de 3 h de cultivo a 25°C los valores de actividad β-galactosidasa comienzan a disminuir, en ausencia total de AGI, los valores de actividad aumentan indefinidamente en los tiempos que dura el ensayo (Figura 49). Al no restaurarse la fluidez de la membrana no se reprime la expresión del gen de la desaturasa y por lo tanto, mantendría encendido el circuito Des todo el tiempo.

Cuando se analizaron los perfiles de expresión de los genes *des* de *B. cereus* en cepas de *B. subtilis* que no poseen el sistema DesK/R, se determinó que los valores de actividad β-galactosidasa permanecen elevados para la fusión *PdesA-lacZ* y no se observó efecto alguno sobre la expresión del gen *desB* (Figura 50). Además, se determinó que los AGI disminuyen los valores de actividad β-galactosidasa pero no inhiben completamente la inducción del gen *desA* así como tampoco modifican significativamente la expresión del gen *desB* (Figura 46). En *B. cereus* la vía DesK/R no se encuentra presente, lo que sugiere que los mecanismos regulatorios que controlan la expresión de los genes de las desaturasas en *B. cereus* serían diferentes a los descritos para la Δ5-Des de *B. subtilis*. Cuando se ensayó la actividad desaturasa de DesA por marcación con precursores radioactivos en ausencia o en presencia de diferentes ATB, a 37°C en cultivos no tratados prácticamente no se acumulan AGI. Sin embargo, en cultivos tratados si hay síntesis de AGI (Figura 41, Tabla XX). La baja actividad desaturasa observada a 37°C podría deberse a la presencia de un modulador negativo que, en cultivos tratados, al interrumpirse la transcripción o traducción del mismo, permitiría la acumulación de AGI. Estas observaciones indican que podría tratarse de un modulador negativo a 37°C y a 25°C, el impacto del descenso de la temperatura sería tan importante, que no se podría evaluar la presencia de dicho modulador. Se ha citado en la bibliografía¹⁵⁷ que la transcripción del gen *cspA* de *E. coli* aumenta cuando se produce un descenso en la temperatura de crecimiento o cuando se agrega Cm al medio de cultivo. CspA es la principal proteína de adaptación al frío de *E. coli*. Los investigadores sugieren que en presencia de ese ATB se estaría inhibiendo la síntesis de un represor de la proteína CspA. Asimismo, este tipo de regulación por temperatura mediado por cambios conformacionales en factores transcripcionales ha sido descrito para el factor de virulencia de *Salmonella typhimurium*, TlpA¹⁵⁸. Esta proteína funciona como un represor homodimérico cuyo estado de plegamiento determina la

Discusión III

capacidad de unión al ADN. Un aumento en la temperatura ambiente favorece el estado monomérico y por lo tanto la disociación de TlpA del ADN con la consiguiente activación de los genes antes reprimidos. Un mecanismo similar a estos podría estar actuando en el caso de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus*. Por otra parte, el hecho de observar una disminución en la acumulación de AGI en cultivos tratados a 25°C con respecto a los no tratados (Figura 41, Tabla XX) sugiere que cuando disminuye la temperatura de cultivo, no habría efecto del modulador y si ocurriría transcripción y traducción del gen *desA* lo cual refuerza lo observado mediante medidas de actividad β -galactosidasa.

Cuando se estudia con precursores radioactivos la actividad de DesB se evidencia acumulación de AGI a 37°C y 25°C tanto en cultivos tratados como no tratados con ATB. Sin embargo, a 37°C se observa un aumento en la síntesis de AGI en cultivos tratados, lo cual podría sugerir también la presencia de un modulador negativo que esté ausente en los cultivos tratados y permita que la $\Delta 10$ desaturasa sea más activa.

Por otro lado se ha visto que existe un sistema de dos componentes, CasK/R (cold adaptation sensor), involucrado en la adaptación y crecimiento de *B. cereus* a bajas temperaturas. Mutantes en este sistema presentan una menor proporción de AGI $\Delta 5$ mientras que los niveles de AGI $\Delta 10$ no se ven afectados¹⁵⁹. Además se determinó que dichas mutantes presentan defectos en el crecimiento a 20°C y no pueden crecer a 10°C. Es decir, se determinó que este sistema participa de la regulación de la síntesis de AGI a bajas temperaturas aunque nuevamente se observa que debe existir un mecanismo más complejo que estaría regulando la expresión de estos genes, ya que en ausencia de CasK/R aún se observa acumulación de AGI.

Finalmente, para corroborar los resultados obtenidos mediante medidas de actividad β -galactosidasa en cepas de *B. subtilis* se llevaron a cabo experimentos de PCR en tiempo real con ARN extraído de *B. licheniformis* y de *B. cereus* salvaje y de las cepas mutantes en los genes *desA* y *desB* descritas en el Capítulo II de este trabajo. Mediante estos análisis se evidenció un aumento de 210 veces en la expresión del gen *desL* cuando los cultivos crecidos a 37°C se transfieren a 25°C (Figura 54A). Este gran incremento relativo no se ve reflejado en la cantidad de AGI que *B. licheniformis* sintetiza cuando disminuye la temperatura, ya que se pasa de 3% a 37°C a 6% cuando se transfieren los cultivos a 25°C. Podría ocurrir que si bien se induce muchas veces la expresión del gen, la desaturasa DesL no aumente proporcionalmente su actividad a bajas temperaturas.

En el caso de los genes de *B. cereus* se observó que la expresión relativa del gen *desA* aumenta 5 veces al disminuir la temperatura de crecimiento, con un máximo a los 15

Discusión III

min del descenso térmico y luego la misma disminuye (Figura 54B). En la cepa mutante en el gen *desB*, en la cual no hay síntesis de AGI $\Delta 10$, la inducción del gen *desA* es de 11 veces y el tiempo en el cual se produce el máximo es de 10 min (Figura 55A). Esta observación indicaría que en esta cepa, en donde no hay AGI $\Delta 10$, se produce una mayor expresión del gen que codifica para la $\Delta 5$ desaturasa de manera de generar más enzima y por ende más AGI $\Delta 5$ para contrarrestar la ausencia de los primeros.

El estudio del gen *desB* no reveló ningún aumento en la expresión relativa a 25°C ni en la cepa salvaje ni en la cepa mutante en el gen *desA* (Figuras 54C y 55B). Lo cual corroboraría que este gen, en las condiciones ensayadas en este trabajo, se expresa de manera constitutiva y que lo que estaría pasando al disminuir la temperatura es un aumento en la actividad de esta enzima ya que en lo experimentos de TLC como de GC-MS cuando dicho gen se expresa individualmente en la cepa LC5 de *B. subtilis*, se observa mayor acumulación de AGI a bajas temperaturas (Figura 41; Tablas XI, XII y XXI). Esta mayor acumulación de AGI a 25°C no se observa en *B. cereus* ya que como se analizó anteriormente, los AGI $\Delta 10$ serían sustrato de DesA para generar los AG diinsaturados.

Evidentemente aún queda mucho por investigar para terminar de entender el rol de las desaturasas en la fisiología de *B. cereus* y *B. licheniformis* y las bases moleculares de la regulación por temperatura de la síntesis de AGI en estos organismos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- En *Bacillus cereus* se encontraron dos desaturasas, una con actividad $\Delta 5$, a la que se nombró DesA y otra con actividad $\Delta 10$, a la que se llamó DesB.
- En *Bacillus licheniformis* se encontró una desaturasa con actividad $\Delta 5$, a la que se denominó DesL. Además se encontró un segundo gen, BL02692, anotado como posible desaturasa, al cual no se le encontró ninguna actividad enzimática en las condiciones ensayadas y se lo denominó *desX*.
- Las tres desaturasas halladas introducen el doble enlace en los AG unidos a los FL de membrana, es decir, son acil lípido desaturasas.
- Las tres desaturasas utilizan Fd y/o Fld como proteínas transportadoras de electrones.
- Se desarrolló un protocolo para generar mutantes en *B. cereus* utilizando el vector termosensible pORI-Cm.
- La cepa mutante en el gen *desA* de *B. cereus*, LCER2983, no presentó defectos en el crecimiento en MM comparada con la cepa salvaje, lo cual indicaría que el gen no es esencial para el crecimiento de esta bacteria en las condiciones ensayadas.
- La cepa LCER2983 es incapaz de sintetizar AGI con el doble enlace en posición $\Delta 5$.
- La síntesis de AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 10$ en la cepa mutante aumenta con respecto a la cepa salvaje. Este mecanismo podría estar compensando la ausencia de AGI $\Delta 5$.
- Las cepas LCER0400, mutante en la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus*, así como la cepa LCER2904, mutante en ambas desaturasas, fueron incapaces de crecer en MM y el defecto en el crecimiento se revirtió a valores cercanos a los de la cepa salvaje tras el agregado de ácido oleico a un medio suplementado con AA o parcialmente, tras el agregado de isoleucina.
- La cepa LCER0400 no puede sintetizar AGI con el doble enlace en la posición $\Delta 10$ y la cepa LCER2904 no acumula ningún tipo de AGI.
- La expresión de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. licheniformis* está regulada por la temperatura de crecimiento y esta regulación sería llevada a cabo por un sistema de dos componentes homólogo al sistema DesK/R de *B. subtilis*. Los AGI actúan como reguladores negativos de la expresión del gen *desL*.

Conclusiones

- La expresión de la $\Delta 5$ desaturasa de *B. cereus* también se encuentra regulada por la temperatura de crecimiento, sin embargo esta regulación no dependería de un sistema como DesK/R. Además la desaturación de AG a 25°C requiere la síntesis *de novo* de ARN y proteínas ya que la misma disminuye en presencia de Rif y Cm a dicha temperatura. Sin embargo, a 37°C la actividad desaturasa aumenta en presencia de dichos ATB. Los AGI actúan como reguladores negativos de la expresión del gen *desA*.
- La expresión de la $\Delta 10$ desaturasa de *B. cereus* no está regulada por la temperatura de crecimiento y presenta una expresión constitutiva en las condiciones ensayadas. Además la desaturación de AG no requiere síntesis *de novo* de ARN ni proteínas a ninguna temperatura.
- El objetivo general de este trabajo de Tesis en donde se propuso determinar las bases moleculares que explicarían la relación estructura-función de estas enzimas no se pudo alcanzar debido a la gran similitud entre las desaturasas con actividad $\Delta 5$ y las diferencias en estructura primaria con la $\Delta 10$ desaturasa. Los resultados de estudios con enzimas quiméricas diseñadas con fragmentos de las desaturasas en estudio, llevados a cabo en forma paralela a este trabajo, no aportaron información relevante. Sin embargo, se pudo determinar de qué manera se sintetizan los AGI y la función de las desaturasas, lo cual puede conducir a establecer nuevas funciones de estos AG en la fisiología de la membrana. Además se pudo establecer que la $\Delta 10$ desaturasa sería esencial para el crecimiento de *B. cereus*, lo cual sienta bases para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas ya que es la primera vez que se muestra que una desaturasa bacteriana es esencial para el crecimiento.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Sinensky, M. (1974) Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 522–5.
2. Shanklin, J. y Cahoon, E. B. (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids 1 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611–641.
3. Altabe, S. G., Aguilar, P., Caballero, G. M. y Mendoza, D. De. (2003) The *Bacillus subtilis* Acyl Lipid Desaturase Is a $\Delta 5$ Desaturase. *Society* 185, 3228–3231.
4. Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, a M., Cybulski, L. E., Erazo, a C. y de Mendoza, D. (2001) Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 20, 1681–91.
5. Fulco, A. J. (1969) The biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. I. Temperature induction of the desaturation reaction. *J. Biol. Chem.* 244, 889–95.
6. Dart, R. K. y Kaneda, T. (1970) The production of $\Delta 10$ -monounsaturated fatty acids by *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 218, 189–194.
7. Quint, J. F. y Fulco, A. J. (1973) The biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. V. In vivo substrate specificities of fatty acid desaturases. *J. Biol. Chem.* 248, 6885–95.
8. Kaneda, T. (1972) Positional preference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. *Biochim. Biophys. Acta* 280, 297–305.
9. Gitai, Z. (2005) The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* 120, 577–86.
10. Pfanner, N., Orci, L., Glick, B., Amherdt, M., Arden, S., Malhotra, V. y Rothman, J. (1989) Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59, 95–102.
11. Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Sumiya, T., Nishida, H., Sakuma, S. y Fujita, T. (1995) Effects of fatty acyl coenzyme A esters on lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 255–8.
12. Gordon, J. I., Duronio, R. J., Rudnick, D. A., Adams, S. P. y Gokel, G. W. (1991) Protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 266, 8647–50.
13. Schneiter, R. y Kohlwein, S. D. (1997) Organelle structure, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* 88, 431–4.
14. DiRusso, C. C. y Nyström, T. (1998) The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.* 27, 1–8.

Bibliografía

15. Amri, E. Z., Ailhaud, G. y Grimaldi, P. (1991) Regulation of adipose cell differentiation. II. Kinetics of induction of the aP2 gene by fatty acids and modulation by dexamethasone. *J. Lipid Res.* 32, 1457–63.
16. Singer, S. J. y Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–31.
17. Pike, L. J. (2009) The challenge of lipid rafts. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S323–8.
18. Vereb, G., Szöllosi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. y Damjanovich, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8053–8.
19. Cossins, A. R., Behan, M., Jones, G. y Bowler, K. (1987) Lipid-protein interactions in the adaptive regulation of membrane function. *Biochem. Soc. Trans.* 15, 77–81.
20. Sandercock, S. P. y Russell, N. J. (1980) The elongation of exogenous fatty acids and the control of phospholipid acyl chain length in *Micrococcus cryophilus*. *Biochem. J.* 188, 585–92.
21. Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P. y Wilkinson, B. J. (1997) Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3887–94.
22. Lu, Y.-J., Zhang, Y.-M. y Rock, C. O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. (2004) *Biochem. Cell Biol.* 82, 145–55.
23. Parsons, J. B. y Rock, C. O. (2013) Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 52, 249–76.
24. Kaneda, T. (1991) Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302.
25. Oku, H. y Kaneda, T. (1988) Biosynthesis of branched-chain fatty acids in *Bacillus subtilis*. A decarboxylase is essential for branched-chain fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.* 263, 18386–96.
26. Choi, K. H., Heath, R. J. y Rock, C. O. (2000) beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182, 365–70.
27. Scheuerbrandt, G., Goldfine, H., Baronowsky, P. E. y Bloch, K. (1961) A novel mechanism for the biosynthesis of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 236, PC70–PC71.
28. Scheurbrandt, G. y Bloch, K. (1962) Unsaturated fatty acids in microorganisms. *J. Biol. Chem.* 237, 2064–8.

Bibliografía

29. Cronan, J. E., Birge, C. H. y Vagelos, P. R. (1969) Evidence for two genes specifically involved in unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 100, 601–4.
30. Cronan, J. E. (2006) A bacterium that has three pathways to regulate membrane lipid fluidity. *Mol. Microbiol.* 60, 256–9.
31. Zhang, Y.-M. y Rock, C. O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 222–33.
32. Garwin, J. L. y Cronan, J. E. (1980) Thermal modulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli* does not involve de novo enzyme synthesis. *J. Bacteriol.* 141, 1457–9.
33. De Mendoza, D., Klages Ulrich, A. y Cronan, J. E. (1983) Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. *J. Biol. Chem.* 258, 2098–101.
34. Garwin, J. L., Klages, A. L. y Cronan, J. E. (1980) Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. Evidence for function in the thermal regulation of fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 255, 3263–5.
35. Campbell, J. W. y Cronan, J. E. (2001) Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 305–32.
36. Heath, R. J., White, S. W. y Rock, C. O. (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* 40, 467–97.
37. Marrakchi, H., Choi, K.-H. y Rock, C. O. (2002) A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 277, 44809–16.
38. Lu, Y.-J. y Rock, C. O. (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 59, 551–66.
39. Bloomfield, D. K. y Bloch, K. (1960) The formation of delta 9-unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 235, 337–45.
40. Los, D. a y Murata, N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* 1394, 3–15.
41. Behrouzian, B. y Buist, P. H. (2002) Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 577–82.
42. Sperling, P., Ternes, P., Zank, T. K. y Heinz, E. (2003) The evolution of desaturases. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 73–95.
43. Shanklin, J. y Somerville, C. (1991) Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2510–4.

44. Stukey, J. E., McDonough, V. M. y Martin, C. E. (1990) The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20144–9.
45. Aguilar, P. S., Cronan, J. E. y de Mendoza, D. (1998) A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* 180, 2194–200.
46. Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G. y Shanklin, J. (1996) Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.* 15, 4081–92.
47. Liu, Q., Chai, J., Moche, M., Guy, J., Lindqvist, Y. y Shanklin, J. (2015) Half-of-the-Sites Reactivity of the Castor Δ 9-18:0-Acyl Carrier Protein Desaturase. *Plant Physiol.* 169, 432–41.
48. Shanklin, J., Whittle, E. y Fox, B. G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787–94.
49. Mansilla, M. C. y de Mendoza, D. (2005) The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch. Microbiol.* 183, 229–35.
50. Cahoon, E. B., Cranmer, a M., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B. (1994) delta 6 Hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble delta 6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *J. Biol. Chem.* 269, 27519–26.
51. Yadav, N. S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C., Pérez-Grau, L., Kinney, A., Hitz, W., Booth, J., Schweiger, B. y Stecca, K. (1993) Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 103, 467–76.
52. Hitz, W., Carlson, T., Booth, J., Kinney, A., Stecca, K. y Yadav, N. (1994) Cloning of a higher-plant plastid omega-6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium. *Plant Physiol.* 105, 635–41.
53. Uttaro, A. D. (2006) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes. *IUBMB Life* 58, 563–71.
54. Sayanova, O., Shewry, P. R. y Napier, J. A. (1999) Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage delta6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiol.* 121, 641–6.
55. Cyanobacteria ecology niche adaptation and genomics. at <https://getinfo.de/en/search/id/BLSE%3ARN099511059/>

Bibliografía

56. Jeamton, W., Mungpakdee, S., Sirijuntarut, M., Prommeenate, P., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M. y Hongsthong, A. (2008) A combined stress response analysis of *Spirulina platensis* in terms of global differentially expressed proteins, and mRNA levels and stability of fatty acid biosynthesis genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 121–31.
57. Murata, N. y Wada, H. (1995) Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308 Pt 1, 1–8.
58. Nishida, I. y Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 541–568.
59. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K. y Murata, N. (1996) Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J.* 15, 6416–25.
60. Sakamoto, T. y Murata, N. (2002) Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 208–10.
61. Wada, H., Gombos, Z. y Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature* 347, 200–3.
62. Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M. y Murata, N. (1994) Identification of conserved domains in the delta 12 desaturases of cyanobacteria. *Plant Mol. Biol.* 24, 643–50.
63. Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M. y Murata, N. (1994) Delta 9 Acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups. *J. Biol. Chem.* 269, 25576–80.
64. Sakamoto, T., Los, D., Higashi, S., Wada, H., Nishida, I., Ohmori, M. y Murata, N. (1994) Cloning of omega 3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. *Plant Mol. Biol.* 26, 249–63.
65. Reddy, A. S., Nuccio, M. L., Gross, L. M. y Thomas, T. L. (1993) Isolation of a delta 6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Mol. Biol.* 22, 293–300.
66. Murata, N., Wada, H. y Gombos, Z. (1992) Modes of Fatty-Acid Desaturation in Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 33, 933–941.
67. Suzuki, I., Los, D. A., Kanasaki, Y., Mikami, K. y Murata, N. (2000) The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* 19, 1327–34.

68. Los, D. A. y Murata, N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 142–57.
69. Van Delden, C. y Iglewski, B. H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 551–60
70. Zhu, K., Choi, K.-H., Schweizer, H. P., Rock, C. O. y Zhang, Y.-M. (2006) Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 60, 260–73.
71. Zhang, Y.-M., Zhu, K., Frank, M. W. y Rock, C. O. (2007) A *Pseudomonas aeruginosa* transcription factor that senses fatty acid structure. *Mol. Microbiol.* 66, 622–32.
72. Beatty, A. L., Malloy, J. L. y Wright, J. R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* Degrades Pulmonary Surfactant and Increases Conversion In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 128–134.
73. Schweizer, H. P. y Choi, K.-H. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* aerobic fatty acid desaturase DesB is important for virulence factor production. *Arch. Microbiol.* 193, 227–34.
74. Hoang, T. T. y Schweizer, H. P. (1997) Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning and characterization of the *fabAB* operon encoding beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabA) and beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I (FabB). *J. Bacteriol.* 179, 5326–32.
75. Watanabe, M., Aoyagi, Y., Mitome, H., Fujita, T., Naoki, H., Ridell, M. y Minnikin, D. (2002) Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiology* 148, 1881–902.
76. Yuan, Y., Lee, R. E., Besra, G. S., Belisle, J. T. y Barry, C. E. (1995) Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6630–4.
77. Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V., Lanéelle, M., Yu, K., Quémar, A., Smith, I y Daffé, M. (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36, 630–7.
78. Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C., Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M., Rajandream, M., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J., Taylor, K., Whitehead, S. y Barrell, B. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–44.

Bibliografía

79. Phetsuksiri, B., Jackson, M., Scherman, H., McNeil, M., Besra, G., Baulard, A., Slayden, R., DeBarber, A., Barry, C., Baird, M., Crick, D. y Brennan, P. (2003) Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 278, 53123–30.
80. Ntambi, J. M. (1995) The regulation of stearyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 34, 139–50.
81. Ntambi, J., James M., Miyazaki, M., Stoehr, J., Lan, H., Kendzierski, C., Yandell, B., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. y Attie, A. (2002) Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11482–6.
82. Sassetti, C. M. y Rubin, E. J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12989–94.
83. Dyer, D. H., Lyle, K. S., Rayment, I. y Fox, B. G. (2005) X-ray structure of putative acyl-ACP desaturase DesA2 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Sci.* 14, 1508–17.
84. Wong, H. C., Liu, G., Zhang, Y.-M., Rock, C. O. y Zheng, J. (2002) The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 277, 15874–80.
85. Szurmant, H. y Ordal, G. W. (2004) Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 301–19.
86. Claverys, J.-P., Prudhomme, M. y Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 451–75.
87. Claverys, J.-P. y Håvarstein, L. S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 219–29.
88. González-Pastor, J. E. (2011) Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 415–24.
89. Chang, N. C. y Fulco, A. J. (1973) The effects of temperature and fatty acid structure on lipid metabolism in *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 296, 287–99.
90. Grau, R. y de Mendoza, D. (1993) Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 8, 535–42.
91. Diaz, A. R., Mansilla, M. C., Vila, A. J. y de Mendoza, D. (2002) Membrane topology of the acyl-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 277, 48099–106.
92. Green, A., Munro, A., Cheesman, M., Reid, G., von Wachenfeldt, C. y Chapman, S. (2003) Expression, purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin:

- a potential electron transfer donor to cytochrome P450 BioI. *J. Inorg. Biochem.* 93, 92–9.
93. Lawson, R. J., von Wachenfeldt, C., Haq, I., Perkins, J. y Munro, A. W. (2004) Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP: biophysical properties and interactions with cytochrome P450 BioI. *Biochemistry* 43, 12390–409.
 94. Chazarreta-Cifre, L., Martiarena, L., de Mendoza, D. y Altabe, S. G. (2011) Role of ferredoxin and flavodoxins in *Bacillus subtilis* fatty acid desaturation. *J. Bacteriol.* 193, 4043–8.
 95. Mansilla, M. C., Banchio, C. E. y de Mendoza, D. (2008) Signalling pathways controlling fatty acid desaturation. *Subcell. Biochem.* 49, 71–99.
 96. Aguilar, P. S., Lopez, P. y de Mendoza, D. (1999) Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the $\delta 5$ desaturase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 7028–33.
 97. Cybulski, L. E., Martín, M., Mansilla, M. C., Fernández, A. y de Mendoza, D. (2010) Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Curr. Biol.* 20, 1539–44.
 98. Albanesi, D., Mansilla, M. C. y de Mendoza, D. (2004) The Membrane Fluidity Sensor DesK of *Bacillus subtilis* Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator. 186, 2655–2663.
 99. Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M., Haouz, A., Alzari, P., de Mendoza, D. y Buschiazzo, A. (2009) Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16185–90.
 100. Martín, M., Albanesi, D., Alzari, P. M. y de Mendoza, D. (2009) Functional in vitro assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK. *Protein Expr. Purif.* 66, 39–45.
 101. Cybulski, L. E., del Solar, G., Craig, P. O., Espinosa, M. y de Mendoza, D. (2004) *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J. Biol. Chem.* 279, 39340–7.
 102. Saita, E. A. y de Mendoza, D. (2015) Thermosensing via transmembrane protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1848, 1757–64.
 103. Cybulski, L., Albanesi, D., Mansilla, M., Altabe, S., Aguilar, P. y de Mendoza, D. (2002) Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol. Microbiol.* 45, 1379–88.
 104. Klein, W., Weber, M. H. y Marahiel, M. A. (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* 181, 5341–9.

105. Weber, M. H., Klein, W., Müller, L., Niess, U. M. y Marahiel, M. A. (2001) Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* 39, 1321–9.
106. Beranová, J., Mansilla, M. C., de Mendoza, D., Elhottová, D. y Konopásek, I. (2010) Differences in cold adaptation of *Bacillus subtilis* under anaerobic and aerobic conditions. *J. Bacteriol.* 192, 4164–71.
107. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A. y Gottschalk, G. (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 204–11.
108. Pedersen, P. B., Bjørnvad, M. E., Rasmussen, M. D. y Petersen, J. N. (2002) Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus sp.* *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36, 155–61.
109. Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O. P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1–17.
110. Rey, M., Ramaiya, P., Nelson, B., Brody-Karpin, S., Zaretsky, E., Tang, M., Lopez de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I., Olsen, P., Rasmussen, M., Andersen, J., Jørgensen, P., Larsen, T., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S., Dusko, B. y Randy, M. (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5, R77.
111. Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kämpfer, P., Andersson, M., Honkanen-Buzalski, T. y Scoging, A. (1999) Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637–45.
112. Ceuppens, S., Boon, N. y Uyttendaele, M. (2013) Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 433–50.
113. Guinebretière, M.-H., Thompson, F., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M. y De Vos, P. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* 10, 851–65.
114. Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M.-H., Auger, S., Sorokine, A. y Nguyen-Thé, C. (2010) Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, 1885–1894.
115. Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. y Granum, P. E. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 579–606.
116. Lechner, S., Mayr, R., Francis, K., Prüss, B., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. y Scherer, S. (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new

- psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 4, 1373–82.
117. Guinebretière, M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C. y Sorokin, A. (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 31–40.
118. Senesi, S. y Ghelardi, E. (2010) Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2, 1690–703.
119. Klein, G. (2011) Molecular characterization of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. toyoi NCIMB 40112 and differentiation from food poisoning strains. *J. Food Prot.* 74, 1189–93.
120. Stabb, E. V, Jacobson, L. M. y Handelsman, J. (1994) Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4404–12.
121. Hoch, J. A. (1991) Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* 204, 305–20.
122. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S., Overbeek, R. y Kyrpides, N. (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87–91.
123. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. y Komagata, K. (1996) Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 939–46.
124. Jeong, H., Park, S., Chung, W., Kim, S., Kim, N., Park, S. y Kim, J. (2011) Draft genome sequence of the *Paenibacillus polymyxa* type strain (ATCC 842T), a plant growth-promoting bacterium. *J. Bacteriol.* 193, 5026–7.
125. Dartois, V., Djavakhishvili, T. y Hoch, J. A. (1996) Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 1178–86.
126. Lewis, P. J. y Marston, a L. (1999) GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 227, 101–10.
127. Nishibori, A., Kusaka, J., Hara, H., Umeda, M. y Matsumoto, K. (2005) Phosphatidylethanolamine domains and localization of phospholipid synthases in *Bacillus subtilis* membranes. *J. Bacteriol.* 187, 2163–74.

Bibliografía

128. Brunsing, R., Clair, C., Tang, S., Chiang, C., Hancock, L., Perego, M. y Hoch, J. (2005) Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Bacillus anthracis*. 187, 6972–6981.
129. Arantes, O. y Lereclus, D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108, 115–9.
130. Paoletti, L., Lu, Y.-J., Schujman, G. E., de Mendoza, D. y Rock, C. O. (2007) Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189, 5816–24.
131. Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44:1072-1078.
132. Sambrook, J. y Russell, D. W. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.*
133. Dubnau, D. y Davidoff-Abelson, R. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56, 209–21.
134. Turgeon, N., Laflamme, C., Ho, J. y Duchaine, C. (2006) Elaboration of an electroporation protocol for *Bacillus cereus* ATCC 14579. *J. Microbiol. Methods* 67, 543–8.
135. Miller, J. H. 1972 Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor, N.Y.*
136. Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–7.
137. Morris, L. J. (1966) Separations of lipids by silver ion chromatography. *J. Lipid Res.* 7, 717–32.
138. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
139. Guy, J. E., Whittle, E., Kumaran, D., Lindqvist, Y. y Shanklin, J. (2007) The crystal structure of the ivy Delta4-16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of regioselectivity. *J. Biol. Chem.* 282, 19863–71.
140. Cahoon, E. B., Lindqvist, Y., Schneider, G. y Shanklin, J. (1997) Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4872–7.
141. Yousten, A. A., Fretz, S. B. y Jelley, S. A. (1985) Selective Medium for Mosquito-Pathogenic Strains of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1532–3.

142. Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66, 199–232.
143. De Sarrau, B., Clavel, T., Clerté, C., Carlin, F., Giniès, C. y Nguyen-The, C. (2012) Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1715–23.
144. Haque, A. y Russell, N. J. (2005) Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 23–34.
145. Baigori, M., Grau, R., Morbidoni, H. R. y de Mendoza, D. (1991) Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* mutants blocked in the synthesis of pantothenic acid. *J. Bacteriol.* 173, 4240–2.
146. Rock, C. O. y Jackowski, S. (1982) Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Composition of the acyl-acyl carrier protein pool in vivo. *J. Biol. Chem.* 257, 10759–65.
147. Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M. y Thompson, J. K. (1971) Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* 34, 803–13.
148. Desbois, A. P. y Smith, V. J. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1629–42.
149. Altabe, S., Lopez, P. y de Mendoza, D. (2007) Isolation and characterization of unsaturated fatty acid auxotrophs of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 189, 8139–44.
150. Willecke, K. y Pardee, A. B. (1971) Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain alpha-keto acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 246, 5264–72.
151. Martin, N., Lombardía, E., Altabe, S. G., Mendoza, D. De y Mansilla, M. C. (2009) A *lipA* (*yutB*) mutant, encoding lipoic acid synthase, provides insight into the interplay between branched-chain and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Society* 191, 7447–7455.
152. Fujii, D. K. y Fulco, A. J. (1977) Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. Hyperinduction and modulation of desaturase synthesis. *J. Biol. Chem.* 252, 3660–70.
153. Fulco, A. J. (1983) Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res.* 22, 133–60.
154. Sakamoto, T. y Bryant, D. (1997) a. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* strain PCC 7002. *Mol. Microbiol.* 23, 1281–92.

Bibliografía

155. Bonamore, A., Macone, A., Colotti, G., Matarese, R. M. y Boffi, A. (2006) The desaturase from *Bacillus subtilis*, a promising tool for the selective olefination of phospholipids. *J. Biotechnol.* 121, 49–53.
156. Fulco, A. J. (1972) The biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli. IV. Temperature-mediated control mechanisms. *J. Biol. Chem.* 247, 3511–9.
157. Jiang, W., Jones, P. y Inouye, M. (1993) Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *J. Bacteriol.* 175, 5824–8.
158. Hurme, R., Berndt, K. D., Normark, S. J. y Rhen, M. (1997) A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90, 55–64.
159. Diomandé, S., Nguyen-The, C., Abee, T., Tempelaars, M., Broussolle, V. y Brillard, J. (2015) Involvement of the CasK/R two-component system in optimal unsaturation of the *Bacillus cereus* fatty acids during low-temperature growth. *Int. J. Food Microbiol.* 213:110-7.