



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Trabajo de tesis doctoral

**“Caracterización estructural y funcional del
termosensor DesK de *Bacillus subtilis*”**

Lic. Emilio Adolfo Saita

Rosario, Argentina

2016

Caracterización estructural del termosensor DesK de *Bacillus subtilis*

Emilio Adolfo Saita

Licenciado en Biotecnología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional del Litoral.

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 el 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 2011 y el 30 de marzo del 2016, bajo la dirección del Dr. Diego de Mendoza y la co-dirección de la Dra. Daniela Albanesi.

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

Dr. Diego de Mendoza. Director.....

Dra. Daniela Albanesi. Co-directora.....

Dr. Fernando Goldbaum. Miembro del Jurado.....

Dra. Claudia A. Studdert. Miembro del Jurado.....

Dr. Javier Girardini. Miembro del Jurado.....

Defendida:.....

*“Crees que sabes todas tus posibilidades.
Entonces, otras personas llegan a tu
vida y de repente hay muchas más.”*

David Levithan
El reino de la posibilidad, 2004

Agradecimientos

Al Dr. Diego de Mendoza por abrirme las puertas de su laboratorio, por su estímulo constante, su dirección certera y por todas las posibilidades que me brindó para desarrollarme laboral y personalmente.

A la Dra. Daniela Albanesi por co-dirigir este trabajo, por su dedicación, por brindarme sus conocimientos y por las incansables correcciones de los manuscritos.

Al CONICET, a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario y al IBR por brindarme el apoyo económico, material y logístico para desarrollar el presente trabajo

A todo el personal de apoyo, especialmente a Mónica, Vivi y Lilo por preparar los materiales para mis experimentos y facilitar enormemente mi trabajo.

A todos los miembros del IBR que me ayudaron de alguna manera, especialmente a la gente de la Administración y en particular a Marta, Santiago, Ciro y Elba que siempre estuvieron dispuestos a solucionar rápidamente cualquier pedido.

A mis compañeros de laboratorio, los que están y los que estuvieron. A Vero, Lupo, Geor, Naka, Naty y Lore, muchas gracias por recibirme con la mejor onda y sumarme al grupo desde el principio. A todos los chicos del Lab 6, Agos, Anto, Caro, Celi, Danielita, Diego R, Fede, Gastón, Paula y Pili, por las horas compartidas, las charlas divertidas, las reacciones efusivas, los mates, las tortas, los afterlabs, el aguante, los consejos, las locuras y por estar.

A la Turca, por su locura sincera, la experiencia y los consejos compartidos, y por animar el laboratorio, es imposible aburrirse cuando estás acá. A Ceci, por su tranquilidad, paciencia y cordura, que nos calman un poco.

A Mariana, por dedicarme tanto tiempo y por su paciencia para iniciarme en el trabajo de laboratorio, en la biología molecular y las purificaciones de proteínas.

A Ber, Ale y Pablo, por las horas de tenis, asado y las charlas con cervezas de por medio.

A mis amigos de toda la vida, Guille y Gustavo, porque siempre estuvieron y siempre estarán. Por los viajes, las salidas, las charlas, los juegos, la vida.

A Jesi, por su amistad incondicional, su locura desentendida y su generosidad; por las horas de estudio, las charlas, las salidas, las visitas, los cafés de madrugada, y por aguantar mis raptos de sinceridad.

A mi familia, por su apoyo constante, sus enseñanzas, su amor. Nada hubiese sido posible sin ustedes.

A Sol, mi compañera de vida con quien disfruto día a día. Por su amor, su compañía, sus esfuerzos, sus risas y sus enojos. Por hacerme feliz.

A Ángela. Todavía te estamos esperando y ya nos llenaste de felicidad.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones

PUBLICACIONES

- **Saita, E.A. & de Mendoza, D.**, 2015. Thermosensing via transmembrane protein-lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, pp.1757–1764. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.04.005
- **E. Saita, L. A. Abriata, Y.T. Tsai, F. Trajtenberg, T. Lemmin, A. Buschiazzo, D. de Mendoza, D. Albanesi.** A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK, *Mol. Microbiol.* 98 (2015) 258–271. doi:10.1111/mmi.13118.
- **Saita, E., Albanesi, D. & de Mendoza, D.**, 2016. Sensing membrane thickness: Lessons learned from cold stress. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2016.01.003

REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Emilio Saita; Diego de Mendoza; Mariana Martin.** 2011. Purification and functional characterization of a cys-less version of bacillus subtilis thermosensor. Argentina. Mendoza. Revista. Resumen. Congreso. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.
- **Emilio Saita; Daniela Albanesi; Cecilia Mansilla; Diego de Mendoza.** 2012. Setting up a purification protocol for active variants of DesK, the Bacillus subtilis thermosensor. Argentina. Mendoza. Revista. Resumen. Congreso. XLVIII Reunión Anual th Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular.
- **Emilio Saita; Diego de Mendoza; Luciano Abriata; Daniela Albanesi; Mateo Dal Peraro.** 2014. A 2-helix coiled-coil controls the activities of DesK, a bacterial thermosensor. Argentina. Mendoza. Revista. Resumen. Congreso. 50th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- **Emilio Saita; Daniela Albanesi; Luciano Abriata; Matteo Dal Peraro; Diego de Mendoza.** 2014. Temperature Sensing by Membranes. Reino Unido. Congreso. 55th International Conference on the Biosciences of Lipids: Lipids as Mediators of Health and Disease.

Índice

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	17
1. LA MEMBRANA PLASMÁTICA	18
1.1. LÍPIDOS DE MEMBRANA: ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	18
1.2. PROTEÍNAS DE MEMBRANA	20
1.3. CURVATURA DE MEMBRANA	21
1.4. DESAJUSTE HIDROFÓBICO	23
1.5. PRESIONES LATERALES	24
1.6. TRANSICIÓN DE FASE GEL A LÍQUIDO CRISTALINA.....	26
2. RESPUESTA A UN DESCENSO EN LA TEMPERATURA	27
2.1. ADAPTACIÓN DE LA MEMBRANA ANTE UN DESCENSO EN LA TEMPERATURA	28
2.2. REGULACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MEMBRANA EN <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 30	
3. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES	33
3.1. HISTINA QUINASAS.....	35
3.1.1. <i>Características básicas</i>	35
3.1.2. <i>Dominio catalítico</i>	37
3.1.3. <i>Bifuncionalidad de las histidina quinasa</i>	39
3.1.4. <i>Mecanismos de señalización</i>	39
3.2. REGULADORES DE RESPUESTA	44
4. EL SISTEMA DESK/DESR DE <i>B. SUBTILIS</i>	45
4.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE DESK.....	46
4.2. MODULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES CATALÍTICAS DE DESK.....	47
4.3. EL SENSOR MINIMALISTA MS-DESK	49
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	53
5. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	54
5.1. LURIA-BERTANI (LB):	54
5.2. TERRIFIC BROTH	54
6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	55
6.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	55
6.2. OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	55
6.3. TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE ADN.....	55
6.4. MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA	55
6.5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	57
7. TÉCNICAS GENÉTICAS	60
7.1. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i>	60

8.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	60
8.1.	SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	60
8.2.	AISLAMIENTO DE MEMBRANAS Y SOLUBILIZACIÓN EN MICELAS DE DETERGENTE.....	61
8.2.1.	<i>Protocolo 1</i>	61
8.2.2.	<i>Protocolo 2</i>	61
8.3.	SELECCIÓN DE DETERGENTES PARA LA SOLUBILIZACIÓN DE MEMBRANAS	62
8.4.	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A NÍQUEL.....	63
8.5.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	63
8.6.	CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	63
8.7.	CONCENTRADO DE PROTEÍNAS	64
8.8.	PROTEÓLISIS MEDIADA POR TEV	64
8.9.	RECONSTITUCIÓN DE PROTEÍNAS EN LIPOSOMAS.....	64
8.10.	PURIFICACIÓN DE DESR-GST	65
9.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	65
9.1.	ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN	65
9.2.	TINCIÓN CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE	66
9.3.	DOSAJE DE PROTEÍNAS POR DENSITOMETRÍA.....	66
10.	MEDICIONES DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>.....	66
10.1.	FOSFORILACIÓN	66
10.2.	FOSFOTRANSFERENCIA	67
10.3.	DEFOSFORILACIÓN.....	67
11.	ANÁLISIS INFORMÁTICO	68
11.1.	ANÁLISIS DE COVARIANCIA DE RESIDUOS	68
11.2.	MODELADO MOLECULAR Y SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.....	68
CAPÍTULO I		70
HACIA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA DE DESK: PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD Y MEDIDAS DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>		70
12.	PURIFICACIÓN DE DESK_{CYS}.....	73
13.	ACTIVIDAD AUTO-QUINASA DE DESK_{CYS}.....	74
14.	ACTIVIDAD FOSFOTRANSFERASA DE DESK_{CYS}.....	75
15.	GENERACIÓN DE VARIANTES DE DESK: INSERCIÓN DE RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LOS SEGMENTOS TM.....	76
16.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	78
17.	ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE DESK Y SUS VARIANTES.....	81
17.1.	OPTIMIZACIÓN DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS E INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA	82
17.2.	OPTIMIZACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE MEMBRANAS	83
17.3.	OPTIMIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE DESK.....	87
17.3.1.	<i>DesK_{Y28C}_TEV</i>	87
17.3.2.	<i>TEV_DesK_{Y28C}</i>	90
17.3.3.	<i>DesK_{Y28C}_TEV-GFP</i>	91
18.	INTEGRACIÓN DE DESK_{T15C} Y DESK_{Y28C} EN LIPOSOMAS.....	93
19.	ACTIVIDAD AUTO-QUINASA DE DESK_{T15C} Y DESK_{Y28C} EN LIPOSOMAS.....	94
20.	ANÁLISIS INFORMÁTICO DE COVARIANCIA DE RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS..	95
21.	DISCUSIÓN	97

CAPÍTULO II.....	100
MECANISMOS DE SENSADO Y TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL DE TEMPERATURA EN DESK.....	100
22. ESTRUCTURA Y PREDICCIONES DEL DOMINIO CONECTOR DE DESK.....	101
23. EL MOTIVO 2-HCC TIENE UN ROL CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE DESK <i>IN VIVO</i>.....	103
24. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS ACTIVIDADES DE DESK_{STA}	104
24.1. ACTIVIDAD DE DESK _{STA} EN MICELAS DE BRIJ58	105
24.2. ACTIVIDAD CATALÍTICA DE DESK _{STA} EN LIPOSOMAS	106
25. ¿QUÉ FUERZAS LLEVAN A LA ESTABILIZACIÓN Y DESESTABILIZACIÓN DEL 2- HCC?	108
26. MODELADO DEL 2-HCC EN EL CONTEXTO DE UNA PROTEÍNA MINIMALISTA COMPLETAMENTE FUNCIONAL.....	111
27. DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

Abreviaturas

2-HCC: Motivo de dos hélices enrolladas (2-HCC)
4-HB: Paquete de 4 hélices
ABD: Dominio de unión de ATP
AGIs: Ácidos grasos insaturados
AGRs-ai: Ácidos grasos ramificados ante iso
AGRs-i: Ácidos grasos ramificados iso
AGSs: Ácidos grasos saturados
BCAT: Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada
BCIP: 5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato
BCKAD: Complejo deshidrogenada de α -cetoácidos de cadena ramificada
Brij58: Polioxietilen-(20)-cetil-eter
BSA: Albúmina sérica bovina
CC: Motivo de hélices enrolladas
CCT: Proteína CTP:fosfocolina citidiltransferasa
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato
Ci: Curie
CL: Cardiolipina
C-terminal: Carboxilo terminal
DDM: n-Dodecil- β -D-maltosido
DEPC: 1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DHp: Dominio de dimerización y fosforilación de histidina
di(14:0)PC: Dimiristoilfosfatidilcolina
di(16:0)PC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
di(18:0)PC: Distearoilfosfatidilcolina
di(18:1)PC: Dioleoilfosfatidilcolina
DM: Dinámica molecular
DO: Densidad óptica
DOPC: 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glicero-3-phosphocholine)
DTT: Ditiotretitol
FASII: Sintasa de ácidos grasos
GFP: Proteína fluorescente verde

HPt: Dominio de fosforilación y transferencia
HQ: Histidina quinasa
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB: Luria-Bertani
LDAO: Laurildimetilamina-oxido
LMVs: Vesículas multilamelares grandes
LUVs: Vesículas unilamelares grandes
L α : Líquido cristalino
L β : Líquido ordenado o gel
MscL: Canal mecano-sensitivo de alta conductancia
MS-DesK: Sensor minimalista de DesK
MTSSL: (1-Oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-metil) metanotiosulfonato
mUA: mili unidades de absorbancia
NBT: Cloruro de tetrazolio nitro-azul
N-terminal: Amino terminal
°C: Grados Celcius
°K: Grados Kelvin
PA: Ácido fosfatídico
PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PC: Fosfatidilcolina
PE: Fosfatidiletanolamina
PG: Fosfatidilglicerol
PI: Fosfatidilinositol
pI: Punto isoeléctrico
PL: Fosfolípidos
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PS: Fosfatidilserina
RR: Regulador de respuesta
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SEC: Cromatografía de exclusión molecular
TB: Terrific Broth
TM: Transmembrana
Tritón X-100: polietilen-glicol P-1,1,3,3-tetrametil-butilfenil-eter
Tween 20: polioxietilen-sorbitan-monolaurato 20

UA: Unidades arbitrarias

V_0 : Volumen no retenido

$\Delta 5$ -Des: $\Delta 5$ acil lípido desaturasa

Resumen

B. subtilis se adapta rápidamente a disminuciones de temperatura mediante un mecanismo denominado vía Des, el cual es controlado por el sistema de dos componentes DesK/DesR. El termosensor DesK es el encargado de detectar cambios en la temperatura ambiental y regular la transcripción del gen *des* que codifica para una $\Delta 5$ acil lípido desaturasa, la cual genera insaturaciones en los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana plasmática modificando la fluidez de la misma.

En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar los eventos moleculares que tienen lugar en los segmentos transmembrana (TM) de DesK durante la detección de la señal de temperatura. La estrategia inicial que decidimos aplicar es la marcación de *spin* sitio-dirigida y posterior medición por resonancia paramagnética electrónica (EPR). Dicha estrategia implica la unión de una sonda de *spin* a residuos de cisteína ubicados en diferentes posiciones de los segmentos TM, para estudiar la dinámica de los mismos en membranas artificiales. Este procedimiento requiere de la purificación de las proteínas en estudio a homogeneidad. Hasta la escritura de esta tesis, los estudios *in vitro* de DesK completa requerían de la utilización de un sistema de expresión *in vitro*. Aunque el sistema libre de células ha demostrado ser adecuado para la expresión de DesK, el mismo es muy costoso para ser usado de forma rutinaria. Por este motivo, en una primera instancia nos enfocamos en desarrollar un protocolo que permitiese purificar DesK a partir de cultivos bacterianos, en concentración y pureza suficientes para estudios biofísicos posteriores a un costo reducido. Con este fin, ensayamos diversas estrategias para la expresión y purificación de DesK, incluyendo diferentes vectores de expresión, medios de cultivo, condiciones de crecimiento para la expresión proteica, detergentes para la solubilización de las proteínas de membrana y diversas técnicas cromatográficas. En función de los resultados obtenidos planificamos un protocolo que permitirán purificar DesK a homogeneidad en micelas de detergente. Resultados posteriores mostraron que la integración de DesK en liposomas permite incrementar la pureza de la misma, indicando que sería posible realizar la marcación con la sonda de *spin* de las proteínas purificadas en detergente, y posteriormente reconstituir las mismas en liposomas para las subsiguientes mediciones por EPR.

Por otra parte, a partir de un análisis informático de covariancia de residuos identificamos pares de aminoácidos con alta probabilidad de interactuar, ya sea por su cercanía en la estructura cuaternaria, o a través del esqueleto peptídico de DesK. En función a estos resultados seleccionamos posiciones de los segmentos TM que próximamente se reemplazarán por cisteínas, generando variantes de DesK con mutaciones puntuales, para su posterior marcación con la sonda de *spin* y mediciones de EPR. Estos experimentos

permitirían obtener información estructural y dinámica de los segmentos TM durante la detección de la señal de temperatura.

En base a predicciones de estructura secundaria junto con el análisis de las estructuras cristalográficas de la porción catalítica soluble de DesK (DesK_C) en distintos estados funcionales, identificamos un motivo de hélices enrolladas (2-HCC) que conecta el dominio TM sensor y el dominio catalítico soluble. La construcción de dos variantes de DesK en las cuales se estabilizó (DesK_{STA}) o desestabilizó (DesK_{DEST}) el dominio 2-HCC mediante mutaciones puntuales permitió determinar que este motivo juega un rol importante en la regulación de las actividades catalíticas de DesK.

Además, de acuerdo con medidas de actividad *in vitro* de DesK salvaje y DesK_{STA} insertadas en liposomas, y a ensayos de dinámica molecular de modelos atómicos de DesK salvaje, DesK_{DEST} y DesK_{STA}, se propuso que en el estado fosfatasa las hélices del segmento TM5 podrían continuar formando un 2-HCC a través de toda la membrana, y que la hidratación de este motivo podría favorecer la apertura del mismo durante la transición al estado auto-quinasa.

Por otra parte, se construyeron modelos del estado fosfatasa y auto-quinasa de una quimera funcional de DesK (MS-DesK), la cual posee un único segmento TM por monómero, generado por la fusión de los 17 residuos N-terminales de DesK a los 14 residuos C-terminales del TM5 de DesK. En función a ensayos de dinámica molecular de estos modelos embebidos en bicapas lipídicas de diferente espesor, se propuso un modelo para la detección y transmisión de la señal de temperatura por parte de MS-DesK. En este modelo, a 37 °C la membrana se encuentra fluida y delgada, y MS-DesK adopta una conformación fosfatasa competente, caracterizada por el enrollamiento de las hélices TM formando un 2-HCC que se prolonga hacia el dominio citoplasmático. Los residuos polares del extremo N-terminal de los segmentos TM se encuentran hidratados debido a la apertura del 2-HCC generada por la bisagra formada entre Gly13 y Pro16, y los dominios de unión a ATP (ABDs) interactúan fuertemente con el dominio de dimerización y fosforilación de histidina (DHp). Frente a una disminución de la temperatura, la membrana pierde fluidez y se ensancha, generando un movimiento de tijera en el N-terminal de los segmentos TM, favoreciendo la deshidratación de los residuos polares. Los segmentos TM sufren un estiramiento debido al cierre del extremo N-terminal y al segmento citoplasmático KERER que permanece anclado en la interface lípido-agua citoplasmática. Este estiramiento promueve la rotación de las hélices que a su vez provoca el desenrollamiento de los segmentos TM y del 2-HCC. El desenrollamiento estaría favorecido por la hidratación de los

residuos polares que se orientan hacia el núcleo del CC. Esta rotación se transmite al DHp, que ahora esconde los residuos hidrofóbicos que le permitían interactuar con los ABDs. Finalmente, los ABDs quedan libres favoreciendo el estado auto-quinasa competente.

Introducción

1. La membrana plasmática

La membrana celular o membrana plasmática constituye una barrera que separa el interior de las células del ambiente exterior. Esta membrana es permeable selectivamente para iones y moléculas orgánicas, y controla el tráfico de sustancias que entran y salen de las células. A su vez, las membranas plasmáticas participan de diversos procesos celulares tales como adhesión, conductividad iónica, y señalización. Las membranas plasmáticas consisten de bicapas de fosfolípidos con proteínas embebidas. La naturaleza anfipática de las moléculas lipídicas, y principalmente la capacidad de sus cadenas hidrocarbonadas no polares para auto-asociarse en presencia de agua, constituye la base física de la formación espontánea de membranas, generando barreras virtualmente impermeables a solutos polares. Estos principios fundamentales permitieron que las primeras células separaran sus constituyentes internos del ambiente externo, un proceso que luego se produjo en las células nucleadas para formar organelas [1].

Aunque una única especie lipídica sería suficiente para generar una barrera que impida el movimiento libre de solutos, la mayoría de las membranas biológicas contienen una mezcla compleja de lípidos que difieren en sus grupos polares y en sus cadenas de ácidos grasos, y que varían en la estructura molecular de un organismo a otro. Además, la composición lipídica de las membranas no se mantiene constante, variando por ejemplo, de acuerdo a la dieta en animales, y a las condiciones de crecimiento en bacterias. La diversidad de lípidos y la combinación precisa de estas moléculas define la identidad y función de las diversas membranas biológicas [1]. Por lo tanto, es esencial comprender las propiedades individuales y colectivas de las moléculas lipídicas para profundizar en el estudio de las membranas biológicas y sus roles en los procesos celulares.

1.1. Lípidos de membrana: estructura y propiedades

Los lípidos que conforman las membranas biológicas se clasifican en tres clases; glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides. Los más comunes son los glicerofosfolípidos, también llamados simplemente fosfolípidos (PL). La esterificación de cadenas de ácidos grasos a los átomos de carbono 1 y 2 de L-glicerol 3-fosfato produce el ácido fosfatídico (PA), y la esterificación con otro alcohol produce los fosfolípidos fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). Además, PG puede unir otro PA para formar difosfatidilglicerol (CL por su nombre común cardiolipina) (Figura 1) [2]. El grupo fosfato y los alcoholes esterificados son las

porciones polares, y las cadenas de acilos son las regiones no polares de estas moléculas anfipáticas. Los fosfolípidos se pueden clasificar de acuerdo a sus propiedades, como son la carga neta, la capacidad de formar enlaces, o su tamaño. Todas estas propiedades determinan la naturaleza de las membranas biológicas. Por ejemplo, los fosfolípidos aniónicos (PS, PI, PG y CL) tienen carga negativa a pH fisiológico, mientras que los fosfolípidos zwitterionicos (PE y PC) son neutros. PE y PS contienen aminas reactivas que pueden participar en enlaces de hidrógeno, mientras que PI, PC y CL son relativamente grandes lo cual afecta su acomodamiento en bicapas. Además, los lisofosfolípidos (PLs que pierden una cadena acilo por la actividad de enzimas fosfolipasas) tienen propiedades surfactantes que alteran la estructura de la membrana lipídica [2]. Más aún, el grado de insaturación de las cadenas acilo de los PL contribuye a la elasticidad de la membrana, una propiedad fundamental para la inserción y adhesión de proteínas (Figura 1).

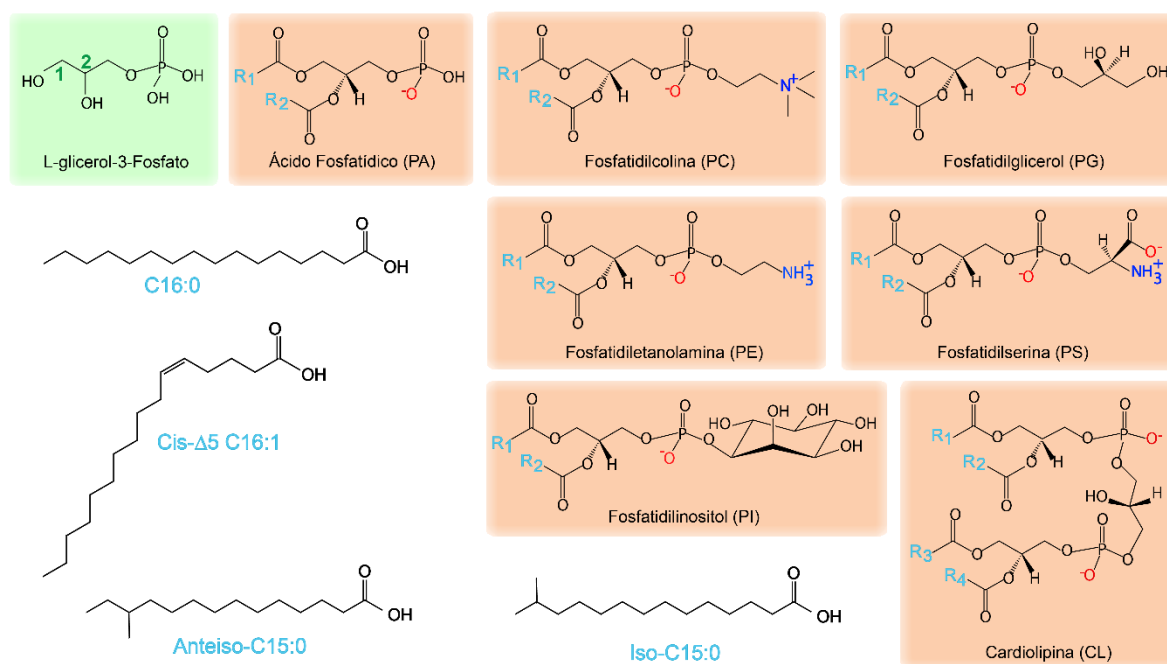


Figura 1: Estructura química de las moléculas lipídicas. En las posiciones 1 y 2 de L-glicerol-3-fosfato (verde) se esterifican cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos que varían en longitud, grado de saturación, posiciones de insaturaciones y ramificaciones (ej: C16:0, cis-Δ5 C16:1, Anteiso-C15:0 e Iso-C15:0), formando ácido fosfatídico (PA). Una segunda esterificación con diversos alcoholes modifica el grupo polar generando distintos fosfolípidos (PC, PG, PE, PS, PI y CL, en recuadros anaranjados). R1 y R2 denotan los sitios de unión de las cadenas hidrocarbonadas.

1.2. Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana representan entre un 20% y un 35% de todas las proteínas codificadas en los genomas de diversos organismos [3]. Estas proteínas pueden distinguirse en integrales y periféricas, según la naturaleza de las interacciones membrana-proteína (Figura 2). Las proteínas integrales atraviesan la bicapa lipídica con uno o más segmentos transmembrana (TM) que poseen residuos hidrofóbicos que interactúan con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, permitiendo la fijación de la proteína a la membrana. En cambio, las proteínas periféricas no interactúan con el núcleo hidrofóbico de la membrana, sino que se unen indirectamente al interactuar con proteínas integrales, o directamente con los grupos polares de los lípidos de membrana.

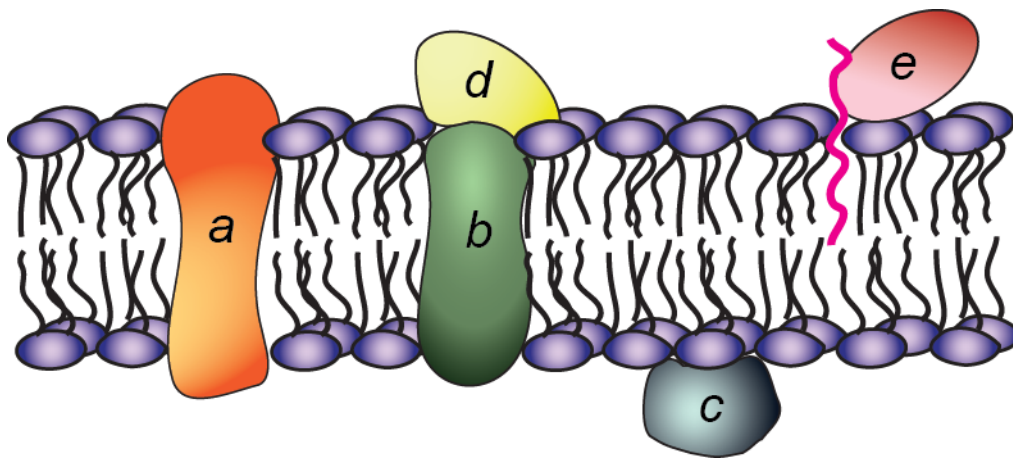


Figura 2: Proteínas de membrana integrales y periféricas. Las proteínas de membrana integrales (a y b) se encuentran embebidas interactuando con las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa. La mayoría de las proteínas integrales de membrana atraviesan completamente la bicapa lipídica. Las proteínas de membrana periféricas interactúan con los grupos polares de los lípidos (c) o se unen a superficies expuestas de proteínas integrales (d). Otras proteínas están ancladas fuertemente a la membrana mediante una molécula lipídica a la cual se unen covalentemente (e).

Todas las proteínas que se encuentran embebidas en membranas pueden ser afectadas, tanto en su estructura como en su actividad enzimática (en caso de poseerla), por su interacción con los lípidos que componen las membranas. Por lo tanto, comprender las propiedades de las moléculas lipídicas que constituyen las membranas, y las alteraciones que sufren frente a diferentes estímulos físicos y químicos, es indispensable en el estudio de dichas proteínas. En este sentido, aunque la influencia de las moléculas lipídicas sobre diversas funciones celulares es ampliamente aceptada, recién comienza a comprenderse la relación entre la composición

lipídica y la regulación del plegamiento, tráfico, organización y función de las proteínas de membrana [4–10]. Los intentos de parametrizar las interacciones laterales entre lípidos de membrana y proteínas integrales [11], han llevado al desarrollo de diferentes modelos y conceptos, tales como: fluidez de la bicapa [12], compresión o desajuste hidrofóbico [13], curvatura intrínseca de los lípidos o frustración de curvatura [8,14], energía de deformación [15], empaquetamiento de las cadenas acilo [16], volumen libre [17], perfil de presiones laterales [18], estrés de empaquetamiento lipídico [19], o rigidez de membrana [20].

A continuación se desarrollan algunos de estos modelos que explican cómo las membranas podrían regular la actividad de ciertas proteínas.

1.3. Curvatura de membrana

La estructura molecular de los lípidos determina el tipo de agregados que forman espontáneamente en presencia de agua. Estos agregados se pueden clasificar en tres principales familias: lamelares (incluye las bicapas), hexagonales (arreglos hexagonales agrupados en una formación cilíndrica) y cúbicas (empaquetamiento cúbico de elementos con forma de vara o cilindro). Las estructuras lamelares pueden adoptar un estado fluido denominado líquido cristalino ($L\alpha$), o un estado poco fluido denominado líquido ordenado o gel ($L\beta$) (Figura 3Ai). Por su parte, las fases hexagonales y cúbicas pueden estar compuestas por estructuras tipo I o tipo II, según cómo se ordenen las moléculas lipídicas, con los grupos polares hacia afuera y las colas hidrofóbicas hacia el centro, o viceversa (Figura 3Aii y 3Aiii) [20–22]. Las moléculas lipídicas que presentan una forma de cono o cono invertido (Figura 3B) tienden a formar fases no lamelares [1,14,23]. Cuando estos lípidos son forzados a constituir una bicapa, se encuentran en un estado denominado frustración de curvatura. Si la frustración de curvatura de ciertos lípidos genera una inestabilidad en la bicapa que excede la estabilidad proporcionada por las interacciones hidrofóbicas se forman fases hexagonales y cúbicas. La frustración de curvatura también depende de la temperatura, pH, concentración de sales, concentración de cationes divalentes e hidratación de grupos polares [2,24].

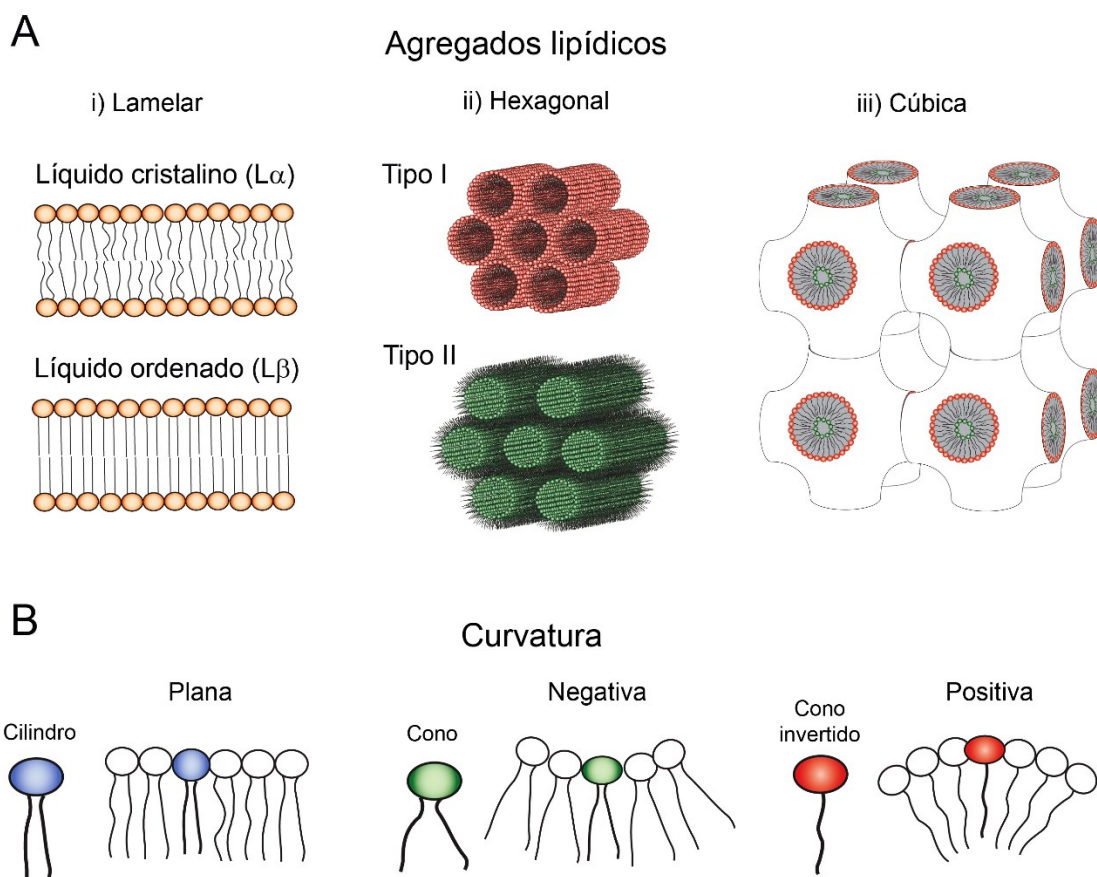


Figura 3: Esquemas descriptivos de estructuras lipídicas. A) Agregados lipídicos lamelares (i) en fase líquido cristalino ($L\alpha$) o líquido ordenado ($L\beta$), hexagonales (ii) tipo I y tipo II, y cúbicos (iii). B) Curvatura de membranas en función a la forma de los lípidos. Los lípidos cilíndricos tienden a formar bicapas planas sin curvatura, mientras que los lípidos con forma de cono tienen a producir curvaturas negativas, y los lípidos con forma de cono invertido tienden a producir curvaturas positivas.

Uno de los mejores ejemplos de enzimas que son directamente afectadas por el estrés de curvatura intrínseca es el de la proteína CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) que cataliza la formación de citidina difosfato colina, el paso limitante de la biosíntesis de PC [25,26]. CCT contiene una hélice anfipática, llamada dominio M, que silencia la actividad de la enzima en su forma soluble [8]. En la presencia de bicapas de PC con un alto contenido de lípidos cónicos como diacilglicerol o PE, el dominio M sufre un cambio conformacional que genera un dominio hidrofóbico para la unión a membrana. La asociación con las membranas alivia la auto-inhibición y aumenta drásticamente la afinidad de CCT por su substrato CTP, estimulando la síntesis de PC. Por contraste, la asociación a membranas y la actividad de CCT se reduce en bicapas de PC con bajo contenido de diacilglicerol o PE. Entonces, aparentemente CCT actúa como un sensor general de defectos de empaquetamiento de lípidos, señalizando una demanda

de síntesis de PC para expandir la membrana o prevenir su transición hacia un estado poroso [26].

1.4. Desajuste hidrofóbico

Un desajuste hidrofóbico ocurre cuando la sección hidrofóbica de una proteína de membrana no se ajusta al espesor hidrofóbico – la región no polar – de la membrana en la que está inserta. Un desajuste positivo describe la situación extrema en la cual la membrana es demasiado delgada, y un desajuste negativo describe la situación opuesta, cuando la membrana es demasiado ancha respecto a la región hidrofóbica de la proteína embebida (Figura 4A) [27]. El espesor hidrofóbico de una membrana depende de la composición lipídica, principalmente del largo de las cadenas acilo y de su estado de saturación y fluidez. Para bicapas puras de PC en estado líquido, el espesor hidrofóbico se incrementa linealmente con el largo de las cadenas saturadas, como se ha observado para dimiristoilfosfatidilcolina [di(14:0)PC] (25.7 Å), dipalmitoilfosfatidilcolina [di(16:0)PC] (28.5 Å) y distearoilfosfatidilcolina [di(18:0)PC] (31.9 Å) [28,29]. Sin embargo, el espesor disminuye considerablemente con un doble enlace en la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos, como se observa al comparar di(18:0)PC (31.9 Å) con dioleoilfosfatidilcolina [di(18:1)PC] (28.8 Å), donde el espesor hidrofóbico es 3,1 Å menor a la misma temperatura (30°C) [28,29]. Si las regiones hidrofóbicas de lípidos y proteínas no se ajustan, la bicapa lipídica se debe estirar o comprimir (Figura 4B), o la proteína debe cambiar su estructura mediante inclinaciones de las hélices, oligomerización, pliegues de las hélices, rotaciones de las cadenas laterales, u otros cambios conformacionales de manera tal de compensar el desajuste hidrofóbico (Figura 4C).

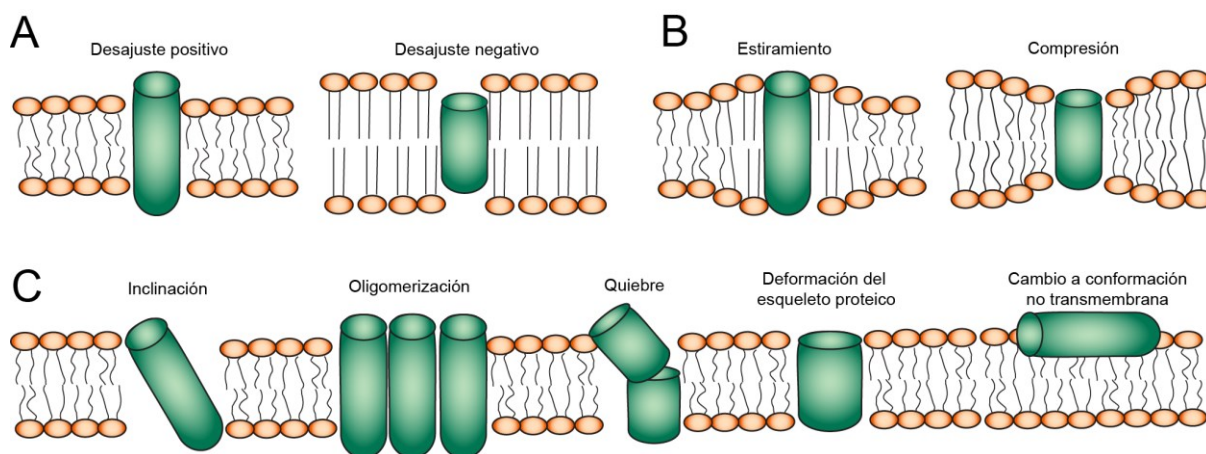


Figura 4: Desajuste hidrofóbico. A) Se define como desajuste positivo cuando la membrana es demasiado delgada respecto a la sección hidrofóbica de la proteína, y desajuste negativo cuando la bicapa es demasiado ancha. B) Frente a desajustes hidrofóbicos positivos la membrana se adapta estirándose (izquierda), y en desajustes

negativos la membrana se adapta comprimiéndose (derecha). C) Cuando la bicapa lipídica no puede ajustarse a la proteína, es esta última la que se adapta mediante diferentes mecanismos. De izquierda a derecha: inclinación de las hélices, oligomerización, quiebre o pliegue de las hélices, deformación del esqueleto proteico y cambio a una conformación no transmembrana.

Sin embargo, aunque las proteínas y los lípidos pueden adaptarse para compensar el desajuste hidrofóbico, las proteínas prefieren unirse a lípidos que no requieran adaptación. Por ejemplo, rhodopsina reconstituida en liposomas de PC con diferentes largo de cadena, es activa en di(14:0)PC pero cuando se inserta en di(12:0)PC se segrega hacia dominios enriquecidos en la proteína, mientras que en di(18:0)PC forma agregados. Esto sugiere que la proteína se localiza preferencialmente en la fase gel en fosfolípidos de cadenas acilo cortas, y en la fase líquido cristalina en fosfolípidos de cadenas acilo más largas, debido a que, como veremos más adelante, la bicapa es más ancha en la fase gel que en la fase fluida y la proteína se adapta para encontrar el espesor correcto [2].

1.5. Presiones laterales

Las adaptaciones entre las proteínas de membrana y las bicapas lipídicas también pueden explicarse en función del perfil de presiones laterales (π) [18,30,31]. Este perfil describe un estrés no homogéneo a través de la membrana, que surge de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y estéricas entre los fosfolípidos. Aunque las presiones laterales están balanceadas para formar una bicapa plana estable, la distribución de las fuerzas a través de la membrana varía de acuerdo a la profundidad dentro de la misma [18,31]. La repulsión entre las cadenas hidrocarbonadas y las interacciones electrostáticas entre las cabezas polares producen presiones positivas, que se equilibran con la fuerte presión negativa producida por la tensión interfacial cohesiva entre las cadenas acilo y las cabezas polares [18,32,33] (Figura 5). Las presiones positivas y negativas, producidas a distintas profundidades de la bicapa, afectarían a las proteínas de membrana induciendo cambios conformacionales que no ocurren cuando la proteína se encuentra fuera de la membrana. Se ha propuesto que este perfil de presiones laterales es sensible a cambios en las estructuras de las cadenas de los fosfolípidos, como por ejemplo la presencia de doble ligaduras *cis*, especialmente si se ubican cerca de los grupos polares [30]. Además, los lípidos no formadores de bicapas, según sean de forma cónica o cónica invertida, pueden incrementar las presiones laterales tanto en la región de las cadenas hidrocarbonadas como entre los grupos polares, respectivamente (Figura 5). Estos cambios en presiones laterales pueden afectar la estabilidad de las proteínas de membrana favoreciendo

cambios conformacionales, como se describió para el canal de potasio KcsA de *Streptomyces lividans* reconstituido en liposomas. En este caso, se observó la desestabilización de la conformación tetramérica activa de KcsA, debido a la integración de moléculas pequeñas de alcohol en proteoliposomas, las cuales incrementan las presiones laterales en la región de las cabezas polares, que a su vez es compensada por una disminución en las presiones laterales entre las cadenas hidrocarbonadas [34].

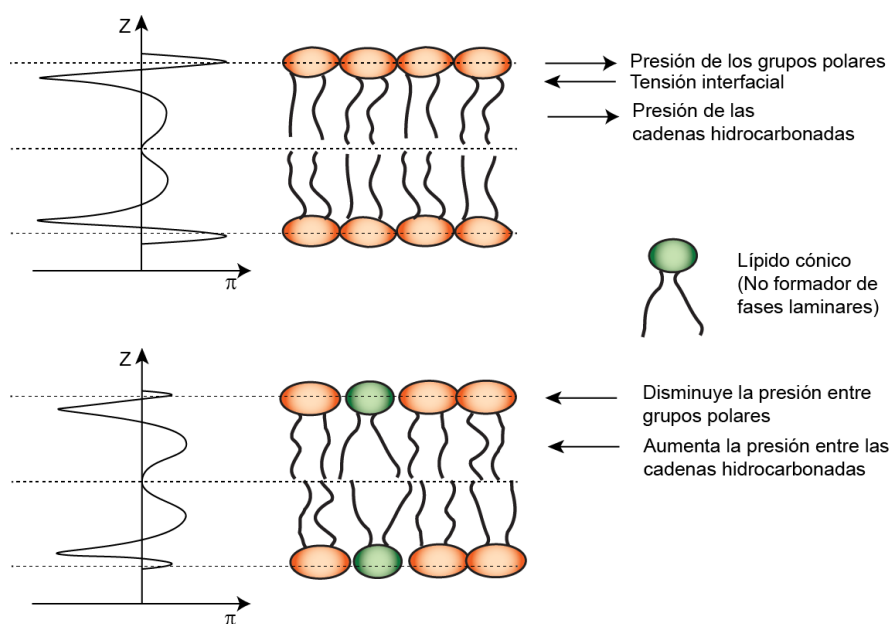


Figura 5: Perfiles de presiones laterales (π) en una bicapa con lípidos cilíndricos (panel superior) y una bicapa con lípidos cónicos (panel inferior). La presencia de lípidos cónicos disminuye la presión entre grupos polares e incrementa la presión entre las cadenas hidrocarbonadas.

Dado el caso en el cual la activación/desactivación de una proteína de membrana requiere un cambio conformacional a una profundidad particular de la bicapa, dicho cambio sería afectado por las presiones laterales. Entonces, todo lo que modifique el perfil de presiones laterales también afectará el equilibrio conformacional de la proteína, y por lo tanto será relevante en la funcionalidad de la misma [18,35]. En este sentido, Perozo y colaboradores mostraron que el canal mecano-sensitivo de alta conductancia (MscL) puede abrirse al agregar lisofosfatidilcolina de forma asimétrica a sólo una de las capas de la bicapa lipídica, pero se mantiene cerrado al agregarla de forma simétrica en ambas capas [36]. Por lo tanto, los lípidos de membrana pueden actuar como reguladores alostéricos de la actividad proteica al alterar el perfil de presiones laterales.

1.6. Transición de fase gel a líquido cristalina

En una célula que se encuentra en condiciones normales la bicapa lipídica de su membrana plasmática se encuentra en un estado altamente fluido; más aún, la membrana lipídica de la mayoría de los organismos es total o mayoritariamente fluida a temperaturas fisiológicas. Sin embargo, ante un descenso en la temperatura las membranas biológicas sufren la transición de fase de las cadenas de acilo de los lípidos que las componen, de un estado fluido L_{α} a un arreglo no fluido L_{β} (Figura 6) [37,38]. El cambio de fluidez de la membrana, debido a la transición de fase, modifica el empaquetamiento lipídico, afectando tanto el perfil de presiones laterales como también el espesor de membrana, con el consecuente desajuste hidrofóbico con las proteínas embebidas. Si las proteínas se encuentran en una situación sub-óptima de ajuste hidrofóbico, un pequeño cambio en el espesor de la membrana puede producir un efecto significativo en la actividad de la proteína. Esto se observó con la proteína diacilglicerol quinasa, cuya actividad decrece cuando se la inserta en membranas de di(16:0)PC en fase gel, y aumenta a la misma temperatura en di(16:1)PC, es decir en fase líquido-cristalina. Cuando el ambiente lipídico se acerca al espesor óptimo [en di(14:0)PC] no se observó ningún cambio en la actividad de diacilglicerol quinasa al cambiar de L_{β} a L_{α} [39]. Por lo tanto, si una proteína de membrana es sensible al espesor hidrofóbico, el estado de fluidez de los lípidos de membrana es una forma efectiva y precisa de modular su activación/desactivación.

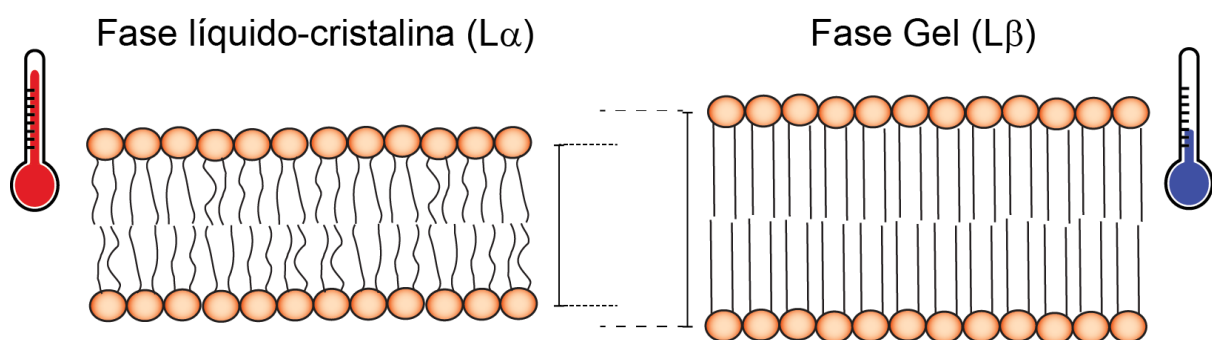


Figura 6: Cambios en el estado físico de una bicapa lipídica en función de la temperatura. A temperaturas fisiológicas la membrana plasmática se encuentra en un estado fluido desordenado (L_{α}) mientras que ante un descenso en la temperatura adquiere un estado ordenado cristalino, tipo gel (L_{β}), que no es compatible con sus funciones biológicas.

2. Respuesta a un descenso en la temperatura

Los cambios de temperatura son condiciones de estrés a las cuales los organismos se enfrentan frecuentemente, por lo que han desarrollado mecanismos moleculares que les permiten adaptarse con rapidez y sobrevivir. Las vías de adaptación a altas temperaturas se han estudiado ampliamente tanto en bacterias como en eucariotas. Sin embargo, los mecanismos de detección y transducción de señales frente a bajas temperaturas se descubrieron más recientemente y aún no se han dilucidado completamente.

El estudio de la respuesta al frío es importante en bacterias como *Lactobacillus* que son ampliamente utilizadas en la industria láctea. A su vez, dado que la refrigeración es un método comúnmente utilizado para la conservación de alimentos es necesario comprender la adaptación al frío de las bacterias que son capaces de contaminarlos. Uno de estos ejemplos es la bacteria *Listeria monocytogenes*, un patógeno oportunista. Esta bacteria causa listeriosis, una enfermedad que afecta principalmente a mujeres embarazadas, neonatos y pacientes inmunodeprimidos [40].

El rango de temperatura en el cual se ha detectado crecimiento de microorganismos abarca desde -12°C hasta aproximadamente 112°C . En este marco, la velocidad de las reacciones químicas y las propiedades físicas de las biomoléculas cambian dramáticamente, de manera tal que los microorganismos son sólo capaces de crecer dentro de un rango termal limitado. Esto ha llevado a la clasificación general de los microorganismos como psicrófilos (capaces de vivir a muy bajas temperaturas), mesófilos y termófilos (capaces de vivir a temperaturas de moderadas a elevadas, respectivamente) e hipertermófilos (capaces de vivir a muy altas temperaturas). Los ambientes a temperaturas muy elevadas o muy bajas, están en general habitados por microorganismos unicelulares, lo que demuestra su habilidad de adaptación a hábitats que presentan condiciones extremas [41]. Es sabido que, en general, las bacterias mesofílicas tienen que lidiar con diversos problemas que surgen luego de producirse un descenso en la temperatura del medio: a) la fluidez de la membrana es muy baja, b) la densidad de superenrollamiento del ADN es demasiado elevada para la apertura de la doble hélice, c) las actividades enzimáticas decrecen dramáticamente, pero probablemente en distintas proporciones, por lo que deben ajustarse los niveles de proteínas, d) el plegamiento de proteínas puede ser muy lento o ineficiente, e) los ribosomas deben adaptarse para funcionar correctamente y f) las estructuras secundarias en el ARN son más propensas a formarse y por lo tanto afectan la iniciación de la traducción [42]. En esta introducción nos centraremos en los

efectos de la temperatura sobre la fluidez de la membrana y cómo los microorganismos se adaptan a ellos. Para una revisión de la respuesta a nivel citosólico ver [40–44].

Hay dos puntos clave a responder en lo que se refiere a la adaptación al descenso brusco de la temperatura: 1) cómo las bacterias perciben el cambio de la temperatura, es decir, cuáles son los termosensores celulares (este punto se discute más adelante), y 2) cómo estos microorganismos se adaptan y resisten a este estrés.

2.1. Adaptación de la membrana ante un descenso en la temperatura

Como se describe en la sección 1.6, el descenso de temperatura puede producir la transición de fase de los lípidos de membrana. La temperatura de transición (temperatura en el punto medio de este cambio de fase) depende de la composición lipídica de la membrana y, en los organismos deficientes en colesterol, depende principalmente de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos que la componen [37,38]. Básicamente, los fosfolípidos que contienen ácidos grasos insaturados (AGIs) poseen una temperatura de transición mucho menor que aquellos que exclusivamente contienen ácidos grasos saturados (AGSs). Así mismo, los fosfolípidos que poseen ácidos grasos ramificados ante iso (AGRs-ai) o ácidos grasos ramificados iso (AGRs-i) (Figura 7) tienen una temperatura de transición menor que aquellos que poseen únicamente ácidos grasos de cadena lineal. Esto se debe a la diferencia de empaquetamiento de las distintas clases de fosfolípidos. Las cadenas de acilo de los AGSs de cadena lineal pueden interaccionar y empacarse ajustadamente. Sin embargo, en el caso de los AGIs y de los AGRs la insaturación en conformación *cis*, así como los grupos metilos laterales, imprimen un impedimento estérico para esta interacción, incluso por debajo de la temperatura de transición [37,45,46]. Por lo tanto, hay una correlación inversa entre la proporción de ácidos grasos insaturados o ramificados en los fosfolípidos y la temperatura de transición de las membranas compuestas por los mismos.

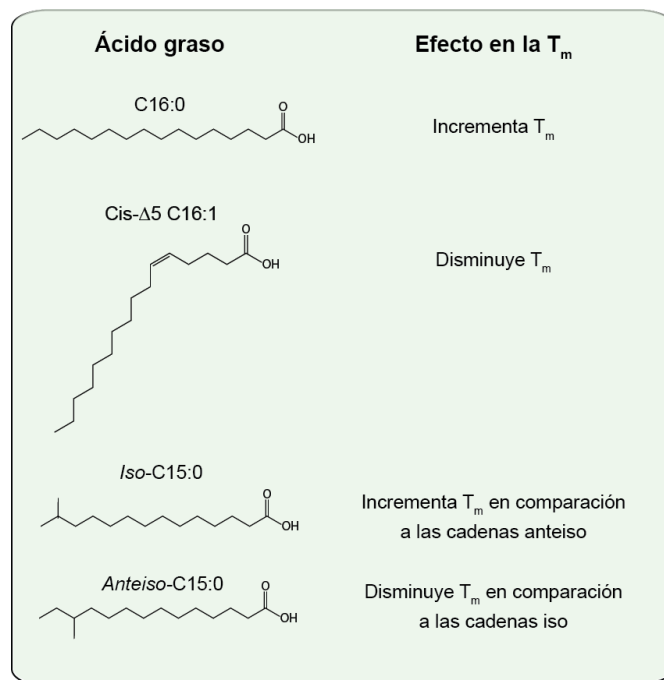


Figura 7: Estructura química y propiedades físicas de los lípidos. Esquema de la estructura general de AGSs, AGIs y AGRs del tipo iso- y anteiso (izquierda). Las insaturaciones y ramificaciones interfieren en la interacción lateral de las cadenas de ácidos grasos otorgándole mayor fluidez a las membranas que los contienen. La temperatura de fusión de los AGRs-ai es menor que la de los AGRs-i (derecha), debido a la posición de esta ramificación.

A partir de estas consideraciones, es evidente que los organismos poiquiloterms, como las bacterias y las plantas, deben ajustar la transición de fase de sus membranas plasmáticas en respuesta a cambios en la temperatura. Sin regulación, cuando un organismo es expuesto a disminuciones de temperatura tendría una membrana con una fluidez inadecuada para su correcto funcionamiento. El mecanismo de adaptación ante el descenso de temperatura implica el ajuste de la composición de los lípidos de membrana incrementando la proporción de ácidos grasos de menor punto de fusión [37,47–49]. Esto puede implicar el acortamiento, ramificación y/o desaturación de las cadenas de acilo. En la mayoría de los casos estudiados, el cambio de composición lipídica de la membrana ocurre a través de una variación en la proporción de AGIs de los fosfolípidos. A medida que la temperatura decrece, la proporción de AGIs en los lípidos de membrana aumenta. Este mecanismo de regulación, llamado control térmico de la síntesis de ácidos grasos, parece ser una respuesta adaptativa universalmente conservada, que estaría diseñada para amortiguar los efectos de los cambios de temperatura sobre el estado físico de los fosfolípidos de membrana [37,47,49,50].

En bacterias existen mecanismos tanto aeróbicos como anaeróbicos para la síntesis de AGIs. La regulación de la proporción de AGIs en función de la temperatura depende del mecanismo empleado para su síntesis.

2.2. Regulación de la composición de ácidos grasos de la membrana en *Bacillus subtilis*

El hábitat de *B. subtilis* es el suelo, un entorno en el cual las condiciones, tales como la temperatura y osmolaridad, cambian repentina y transitoriamente. Las células del género *Bacillus* responden a una disminución en la temperatura ambiente generando insaturaciones en las cadenas de acilo de los fosfolípidos de la membrana (para una revisión ver [51]) y aumentando la proporción de AGRs-ai de menor punto de fusión, con la concomitante disminución en la proporción de AGRs-i de mayor punto de fusión (Tabla I) [46,52]. Se ha propuesto que esta respuesta adaptativa sería importante para proveer un grado de fluidez adecuado para el crecimiento a bajas temperaturas [52]. Las estructuras carbonadas iniciadoras para la síntesis de AGRs son los α -cetoácidos derivados de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. La isoleucina es precursor de los AGRs-ai mientras que la leucina y la valina son precursores de los AGRs-i (Figura 8) [46,53].

Tabla I: Composición de ácidos grasos en extractos lipídicos totales de membrana de *B. subtilis*^a

Ácido graso	% del total de ácidos grasos		
	37	25	15
Iso-C _{13:0}	0.11	0.109	0.044
Anteiso-C _{13:0}	0.037	0.03	0.022
Iso-C _{14:0}	2.176	2.01	2.98
n-C _{14:0}	0.787	0.486	1.08
Iso-C _{15:0}	23.72	20.71	13.5
Anteiso-C _{15:0}	29.80	30.80	24.8
n-C _{15:0}	2.44	1.36	2.19
Iso-C _{16:1}	0.15	1.11	0.275
Iso-C _{16:0}	4.65	6.4	8.26
n-C _{16:1}	1.69	3.45	1.036
n-C _{16:0}	10.17	7.85	21.88
Iso-C _{17:1}	0.47	2.7	0.456
Anteiso-C _{17:1}	0.09	0.655	0.117
Iso-C _{17:0}	14.6	12.05	10.66
n-C _{17:1}	0	0	0
Anteiso-C _{17:0}	7.10	8.8	6.96
n-C _{17:0}	1.06	0.52	2.13
Iso-C _{18:0}	0.060	0.14	0.022
Iso-C _{18:1 0}	0.065	0.18	0.19
n-C _{18:0}	0.82	0.82	3.38
Iso/anteiso ^b	1.537	1.127	1.17
UFAs	2.465	8.1	2.074

^a Cepa JH642 de *B. subtilis* crecida a 37°C en medio mínimo suplementado con glucosa hasta fase exponencial, y luego cambiada a 25°C o 15°C. Análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa de metilésteres derivados de extractos lipídicos totales. Modificada de [54]

^b Relación AGRs Iso y Anteiso

UFAs: AGIs.

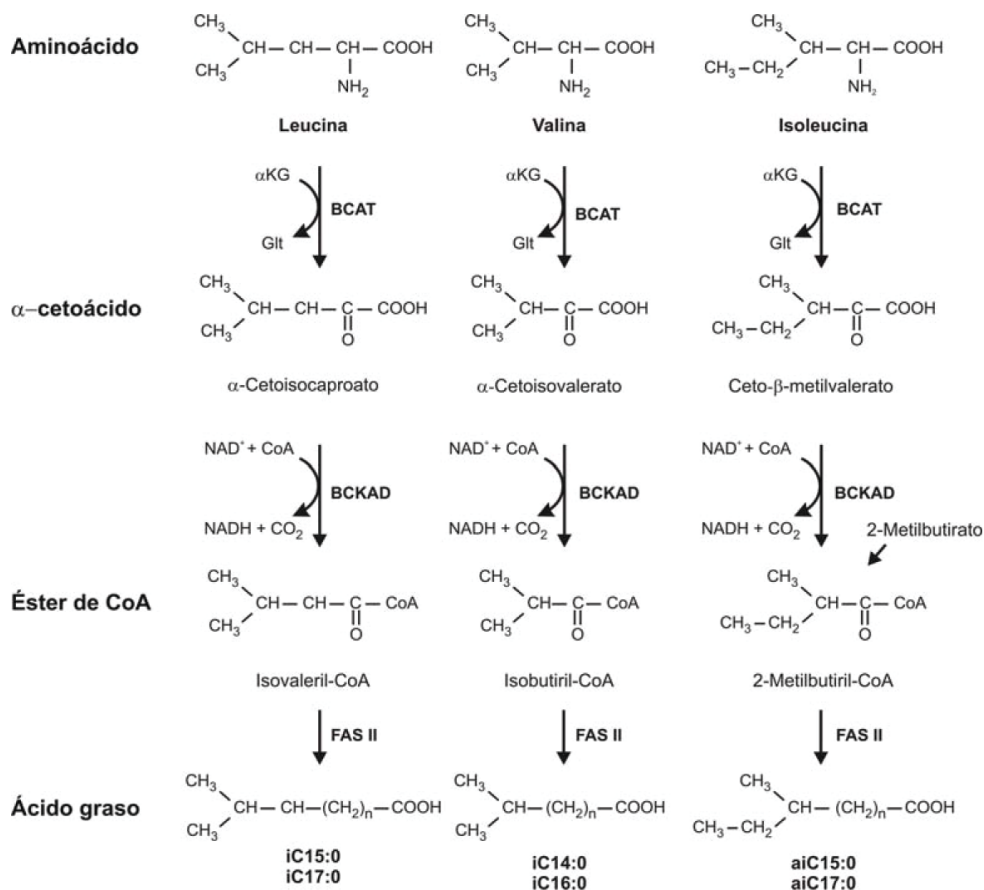


Figura 8: Síntesis de AGRs en *B. subtilis*. Los aminoácidos de cadena ramificada son convertidos a 2-ceto-ácidos por una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT). Luego, se sintetizan los acil-CoA intermediarios en una reacción que está catalizada por un complejo deshidrogenada de α-cetoácidos de cadena ramificada (BCKAD). El isovaleril-CoA, el isobutiril-CoA y el 2-metilbutiril-CoA son sustratos de la sintasa de ácidos grasos (FASII), la cual sintetiza los AGRs correspondientes. La isoleucina es precursor de los AGRs-ai con un número impar de átomos de carbono, en sus cadenas. La leucina y la valina son precursores de los ácidos AGRs-i con un número de átomos de carbono impar, y par, respectivamente, en sus cadenas. i: iso; ai: anteiso; αKG: α-cetoglutarato; Glt: glutamato.

Se ha propuesto que el aumento en la síntesis de AGRs-ai a bajas temperaturas podría deberse a una regulación por temperatura de la especificidad de selección del iniciador por FabH, la enzima condensante involucrada en el primer paso de la elongación de ácidos grasos [55], o a cambios en la disponibilidad intracelular de los iniciadores para la síntesis de ácidos grasos [52]. De todas formas, el mecanismo bioquímico responsable del ajuste de la proporción de AGRs del tipo anteiso e iso en la membrana aún se desconoce.

Por otra parte, la síntesis de AGIs en ciertas bacterias tales como *B. subtilis*, al igual que en eucariotas, se produce mediante una reacción catalizada por un sistema de desaturación que depende de O_2 y que requiere la participación de una cadena transportadora de electrones específica [48,56,57].

Cuando *B. subtilis* es cultivada en medio rico a $37^\circ C$ sintetiza casi exclusivamente AGSs. Sin embargo, cuando los cultivos son transferidos a $20^\circ C$ se induce la expresión del gen *des* que codifica para una $\Delta 5$ acil lípido desaturasa ($\Delta 5$ -Des) que produce AGIs $\Delta 5$ (Figura9) [54]. Esta regulación transcripcional está mediada por el sistema de dos componentes DesK/DesR, encargado de detectar los cambios de temperatura e iniciar la respuesta adaptativa.

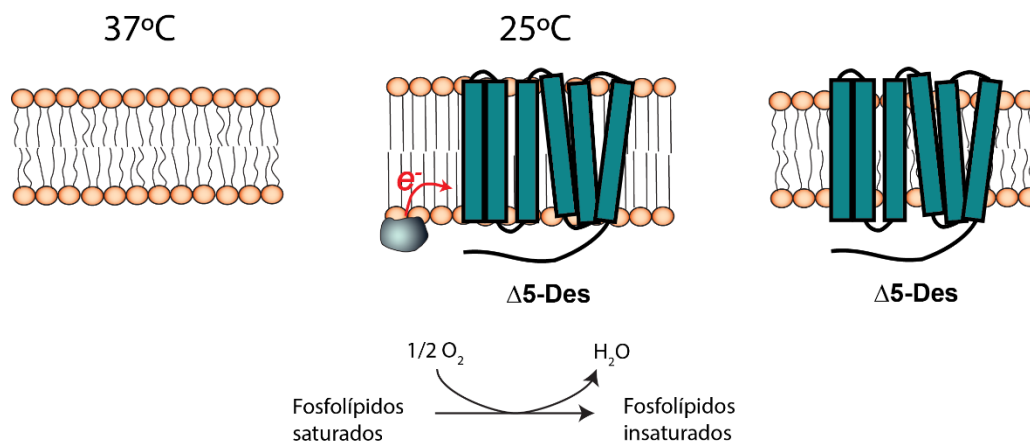


Figura 9: Síntesis de ácidos grasos insaturados en *B. subtilis*. Un cultivo de *B. subtilis* creciendo a $37^\circ C$ sintetiza casi exclusivamente AGSs, sin embargo si la temperatura desciende a $20^\circ C$ se induce la síntesis de una $\Delta 5$ acil lípido desaturasa ($\Delta 5$ -Des) que produce $\Delta 5$ C16:1 en una reacción que involucra O_2 y una cadena transportadora de electrones [54].

3. Sistemas de dos componentes

Los organismos vivos deben tener la capacidad primaria de detectar cambios ambientales para luego desencadenar las respuestas adaptativas que les permitan sobrevivir y crecer en diversas condiciones. En bacterias, los sistemas de dos componentes son los principales sensores de señales ambientales, tanto físicas como químicas, adaptados durante la evolución para detectar cambios específicos y transmitir la señal que desencadena los mecanismos celulares necesarios para la adaptación y supervivencia en las nuevas condiciones [58,59].

Los sistemas de dos componentes están conformados por una histidina quinasa (HQ) que detecta los estímulos y transduce las señales, y un regulador de respuesta (RR) que generalmente activa la transcripción de genes que codifican proteínas específicas para la adaptación a dicho estímulo (Figura 10). Algunos de los sistemas que se han estudiado ampliamente son KdpD/KdpE (transporte de potasio) [60], NtrB/NtrC (regulación de nitrógeno) [61,62], PhoR/PhoB (regulación de fosfato) [63], EnvZ/OmpR (expresión de porinas) [64], FixL/FixJ (fijación de nitrógeno) [65] y NarX/NarL (regulación de la expresión de la nitrato reductasa) [66].

En general las HQs poseen dos dominios distinguibles: el dominio sensor y el dominio catalítico. El primero reconoce la señal específica provocando que la quinasa se auto-fosforile en un residuo de histidina (His) que se encuentra en el dominio catalítico, mediante una reacción dependiente de ATP [67]. Luego, el grupo fosforilo es transferido al segundo componente del sistema, el RR, en un residuo aspartato (Asp) conservado. El RR está constituido por el dominio fosforilable que contiene el Asp, o dominio regulatorio, y un dominio efector o de respuesta, el cual se activa para llevar a cabo su función. Esta activación ocurriría por un cambio conformacional inducido por la fosforilación del RR [68]. Las bases de este mecanismo de transducción de señales son las mismas independientemente de la señal de estímulo o del RR [58,67].

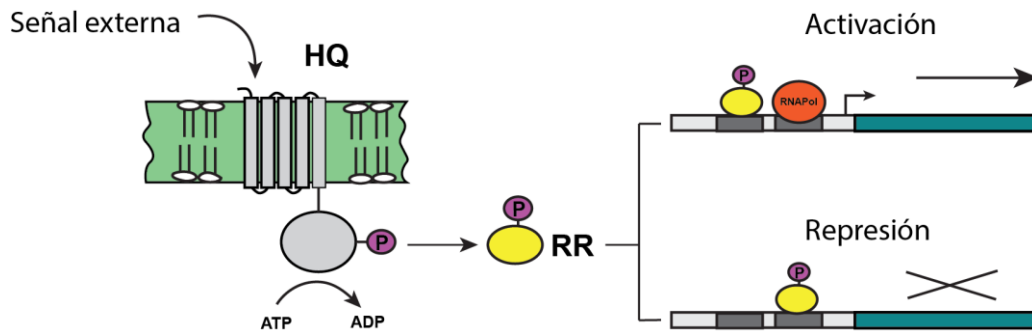


Figura 10: Los sistemas de transducción de señales de dos componentes consisten en una histidina quinasa sensora (HQ) y un regulador de respuesta (RR), que puede actuar tanto como activador o como represor de la transcripción, dependiendo del sistema en particular.

Estos sistemas se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo al esquema de transferencia de fosfato. La arquitectura que predomina en bacterias es la de fosfotransferencia simple, en la cual un único evento de transferencia del grupo fosforilo desde la HQ hacia el RR es suficiente para activar la respuesta adaptativa. El sistema EnvZ/OmpR es el caso paradigmático de fosfotransferencia simple [69,70] (Figura 11A). Aunque el caso más común es en el que participan una única HQ y un único RR, también hay variaciones de este sistema donde varias HQs fosforilan el mismo RR, o una única HQ fosforila varios RR. Un ejemplo de estas variaciones lo presenta la HQ CheA (involucrada en la quimiotaxis de *E. coli*), la cual es capaz de fosforilar a CheB y a CheY de forma competitiva [71]. El segundo grupo se encuentra principalmente en eucariotas y se compone de sistemas más complejos llamados *phosphorelay*, o de transmisión de fósforo, que involucran varios puntos de control de la regulación, así como puntos de comunicación entre vías de señalización (Figura 11B) [72,73]. El diseño básico de estos sistemas involucra cuatro eventos de fosforilación secuenciales alternando transferencias entre residuos His y Asp. Los dominios que contienen His o Asp se usan como elementos de fosfotransferencia. Un ejemplo de estos sistemas es el sistema de control de la esporulación en *B. subtilis*. En este sistema, múltiples HQ fosforilan a Spo0F, luego se transfiere el fosfato a Spo0B y finalmente al factor de transcripción Spo0A [73].

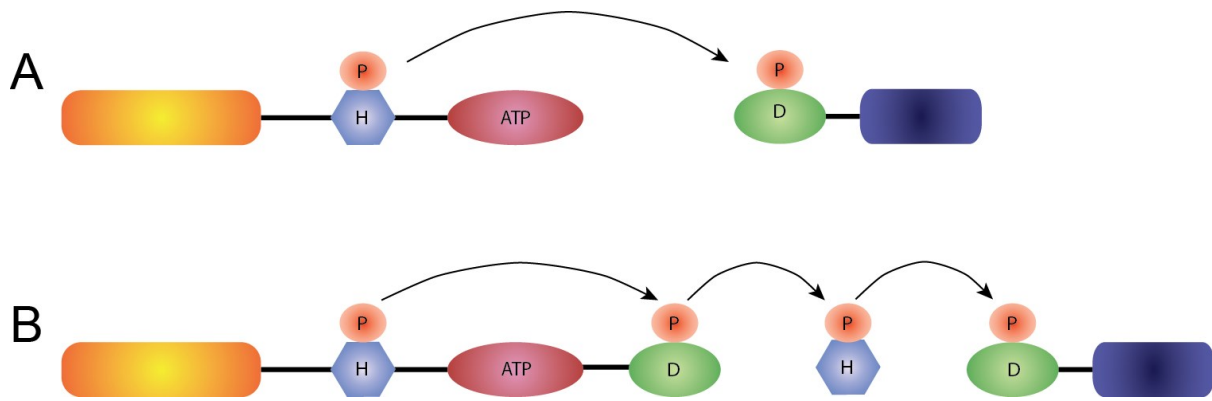


Figura 11: Arquitectura de los dominios en los sistemas de dos componentes. A) Los sistemas de dos componentes clásicos utilizan una vía de transferencia del fosfato que involucra una sola HQ y un único RR. Las HQs sensoras generalmente consisten en un dominio sensor transmembrana (anaranjado) que está acoplado a un dominio central HQ que a su vez puede subdividirse en el dominio de dimerización que contiene la histidina (celeste) y el dominio catalítico y de unión a ATP (violeta). Ocurre una única transferencia de fosfato entre la His~P de la HQ y el residuo de Asp (D) del RR correspondiente, el cual está constituido por el dominio regulador (aceptor del fosfato) N-terminal (verde) y el dominio efector (azul). B) Los elementos básicos de un sistema de dos componentes clásico pueden combinarse para producir un *phosphorelay*. En el ejemplo se muestra una HQ híbrida, que contiene tanto un dominio HQ clásico y un dominio regulador típico de los RRs, un dominio de fosforilación y transferencia (HPt) separado y un RR. En los distintos *phosphorelays* pueden encontrarse diferentes arreglos. La complejidad de estos sistemas permite integrar múltiples puntos de control y etapas regulatorias dentro de la vía.

3.1. Histina quinasas

3.1.1. Características básicas

Las HQs, procarióticas y eucarióticas, poseen los mismos componentes básicos de señalización, un dominio sensor y un dominio catalítico con un plegamiento único ampliamente conservado y diferente a la superfamilia de serina/treonina/tirosina quinasas. Las HQs son activas como dímeros, y su actividad es regulada por las señales detectadas por el dominio sensor. Las HQs se auto-fosforilan, mediante una reacción dependiente de ATP, en un residuo de His conservado del dominio catalítico. El paradigma de fosforilación de HQ implica la reacción en *trans* en la cual un monómero fosforila el residuo de His conservado en el otro monómero. Este mecanismo fue ampliamente estudiado en NrII y EnvZ [74,75]. Sin embargo, recientemente se observó la fosforilación en *cis* de algunas HQs, como HK583 [76,77]. Dado

que el RR es fosforilado por la HQ, de esta última depende la regulación de la activación del sistema.

La familia de las HQs presenta gran diversidad de estructuras, muchas formadas por la simple combinación de dominios sensores, catalíticos y auxiliares. La naturaleza modular de estas proteínas permite que se modifique la arquitectura estructural de las HQs adaptándose a las necesidades específicas de cada sistema de señalización. Esta diversidad también se evidencia en los tamaños de las estructuras, que pueden variar de <40 kDa a >200 kDa, con las más grandes conteniendo cinco o seis dominios estructural y funcionalmente únicos.

Prácticamente todas las HQs pueden ser clasificadas en tres grandes grupos de acuerdo al mecanismo que utilizan para detectar los estímulos [78]:

- El primer grupo corresponde a HQs sensoras periplasmáticas o extracelulares. Es el grupo más extenso. Incluye proteínas con un dominio sensor extracelular flanqueado por al menos dos hélices TM seguido de un dominio transmisor C-terminal citoplasmático. De esta manera el dominio sensor y el dominio quinasa están separados por la membrana y la señal debe transducirse a través de la misma. Este tipo de topología es típica en la detección de solutos y nutrientes (Figura 12A).
- El segundo grupo contiene HQs con mecanismos de percepción de la señal asociados con las hélices transmembrana. Este grupo es muy diverso y la característica que lo unifica es la presencia de entre 2 y 20 segmentos TM implicados en la percepción de la señal. Además carecen de un dominio extracelular N-terminal por lo que los estímulos detectados deben estar asociados a la membrana u ocurrir directamente en la interface de la misma (Figura 12B).
- El tercer grupo está formado por HQs citoplasmáticas, tanto ancladas a la membrana como solubles. Este tipo de proteínas detectan el estado del ciclo celular o detectan la presencia de solutos citoplasmáticos (Figura 12C).

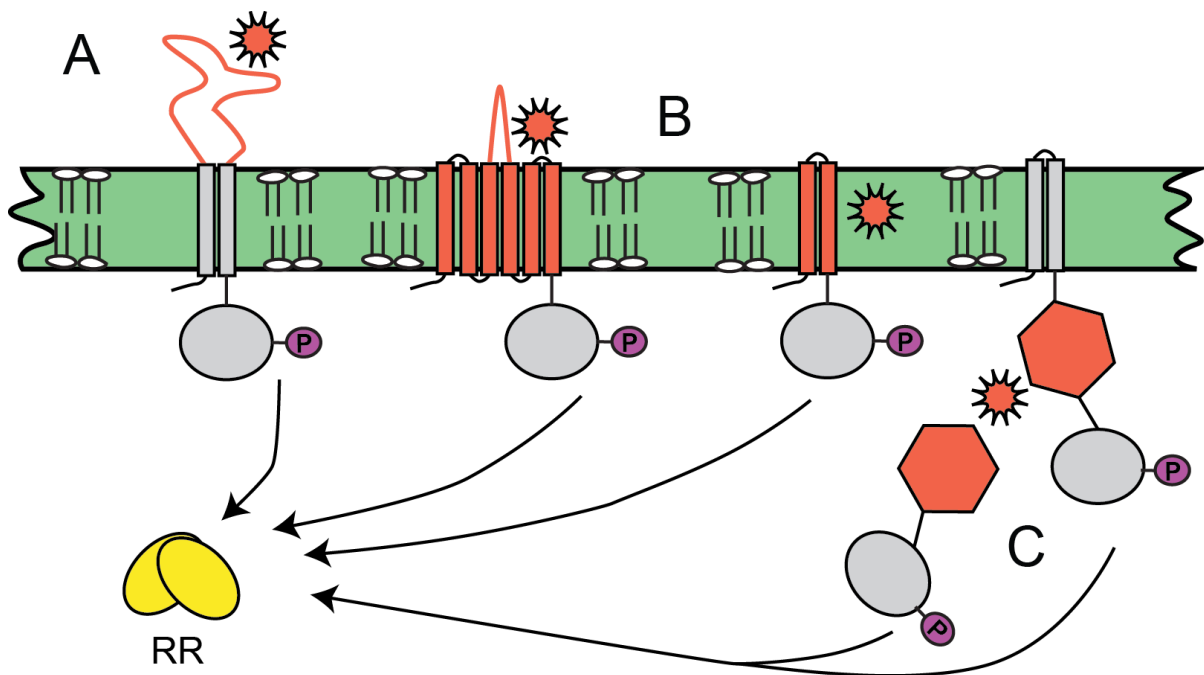


Figura 12: Representación esquemática de las tres clases de HQ. A) HQs periplasmáticas o extracelulares. B) HQs con mecanismos de percepción de la señal asociados a los TM. C) HQs citoplasmáticas (tanto solubles como ancladas a la membrana). El estímulo y las regiones de las proteínas involucradas en su percepción están identificados con el mismo color (anaranjado). La señal se representa con una estrella (Mascher y col., 2006).

3.1.2. Dominio catalítico

Todas las HQs se identifican por el dominio catalítico, compuesto por ~350 residuos, responsables de unir ATP y dirigir la fosforilación. En dicho dominio, existen cinco cajas conservadas tanto en HQs de eucariotas como de procariotas [79–81]. La caja H contiene la His fosforilable y las cajas N, G1, F y G2 definen el sitio de unión del nucleótido (ABD, por su denominación en inglés *ATP binding domain*). El dominio catalítico de las HQs es totalmente diferente al de las Ser/Thr/Tyr quinasas [74,82]. El plegamiento de los ABDs consta de cinco láminas β y tres hélices α acomodadas en forma de sándwich. Este dominio es muy flexible, lo cual puede reflejar cambios conformacionales que se producen luego de la unión de ATP.

Las HQs se pueden clasificar de acuerdo a la organización de estos dominios en clase I y clase II. En las HQs de clase I la caja H forma parte del dominio de dimerización y fosforilación de histidina (DHp), directamente ligado al dominio ABD. Los dominios DHp consisten en un paquete de 4 hélices (4-HB) formado por dos hélices α de cada monómero en estructura de horquilla. Las hélices ubicadas hacia el extremo N-terminal contienen el residuo

de histidina fosforilable. En cambio, en las HQs de clase II el residuo His conservado se ubica en el extremo N-terminal en otro dominio fosforilable (HPt), pero estos no participan en la dimerización de la proteína (Figura 13). Los dominios HPt se encuentran en muy pocos sistemas de dos componentes, y en procariotas casi exclusivamente en HQs híbridas, mientras que en eucariotas se encuentran en proteínas separadas. Estos dominios están conformados por ~120 residuos y contienen un residuo His capaz de participar en reacciones de transferencia de fosforilo. Los dominios HPt no muestran actividad quinasa o fosfatasa [83] y por lo tanto son ideales como módulos de comunicación cruzada entre diferentes proteínas.

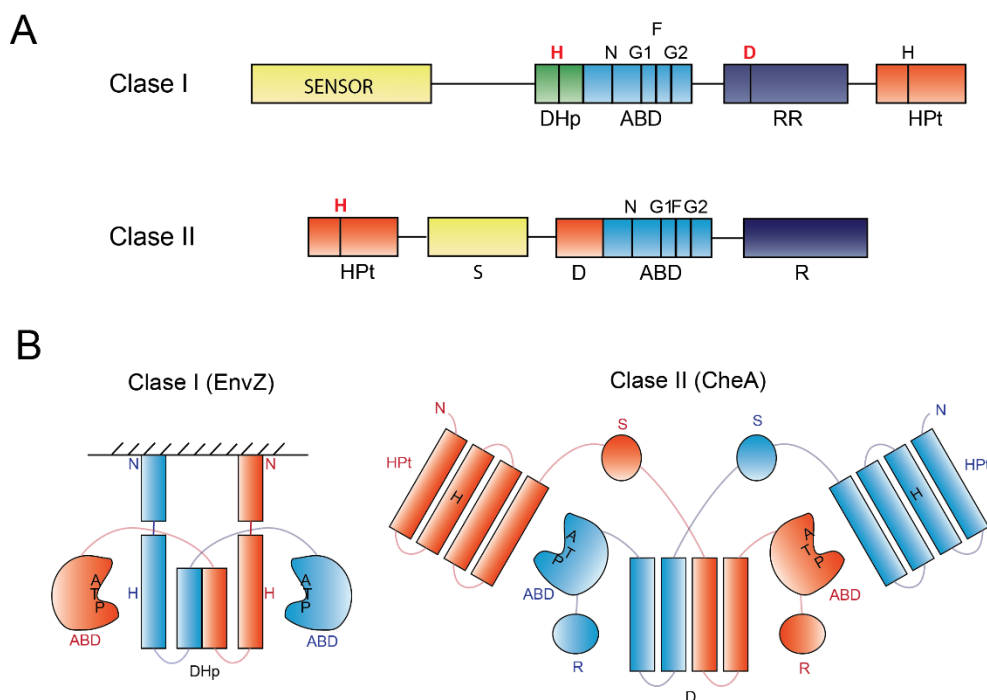


Figura 13: Histidina quinastas de clase I y II. A) Esquemas de organización de los dominios de las HQs de clase I y II. Esta clasificación se basa en la posición de la región conservada que contiene la histidina respecto al dominio ABD (que contiene las cajas conservadas N, G1, F y G2 en su secuencia primaria). Las HQs de clase I poseen la histidina de fosforilación primaria (H) en el dominio DHp. Luego se transfiere el fosforilo al Asp conservado (D) en el dominio regulador de respuesta (RR) unido covalentemente y de allí a la histidina del dominio HPt. Estos últimos dos dominios sólo se encuentran en las HQs híbridas. En las HQs de clase II el dominio His conservado se encuentra en la caja H del dominio HPt. S, es el dominio de unión a sustrato, D el dominio de dimerización, y R el dominio regulatorio. B) Modelos de la organización de los dominios de las HQs de clase I (tipo EnvZ) y de clase II (tipo CheA). Los dos monómeros de cada dímero se distinguen con diferentes colores. La zona rayada indica la membrana plasmática. En las HQs de clase I, el dominio DHp forma el núcleo de dimerización, que también es el dominio de fosforilación en *trans*. En las HQs de clase II la *trans*-auto-fosforilación en el residuo conservado His ocurre en el dominio HPt que está apartado del dominio catalítico. Adaptado de Dutta y col, 1999.

3.1.3. Bifuncionalidad de las histidina quinasa

Muchas HQs, además de mediar la fosforilación de su regulador de respuesta correspondiente, participan en la defosforilación del mismo. La mayoría de las HQs de clase I son proteínas bifuncionales que poseen tanto actividad quinasa como fosfatasa [84]. Ejemplos de sistemas de dos componentes con HQs bifuncionales incluyen a EnvZ/OmpR [85], KdpD/KdpE [86], DegS/DegU [87], PhoP/PhoR [88], PhoP/PhoQ [89] y FixL/FixJ [90] entre otros. Estudios genéticos han demostrado que la actividad fosfatasa de las HQs está altamente regulada por las señales que modulan al sistema [58,59]. Frecuentemente están involucradas proteínas accesorias. En el caso de NtrB, su actividad fosfatasa es dramáticamente estimulada por una proteína llamada PII en una interacción que es regulada por la unión de α -cetoglutarato y ATP a PII [73,91]. Un ejemplo muy bien estudiado de HQs bifuncionales es EnvZ. La actividad fosfatasa de EnvZ está asociada a su dominio de dimerización [92] y estaría mediada por interacciones proteína-proteína que son similares a las involucradas en la fosfotransferencia desde el residuo de His al de Asp. La actividad fosfatasa de EnvZ depende de la presencia de Mg^{2+} y se ve altamente estimulada por la unión de nucleótidos, pero no involucra la hidrólisis del nucleósido fosfato ya que los análogos no hidrolizables de ATP funcionan tan eficientemente como el ATP. El requerimiento de nucleótidos sugiere que el dominio quinasa de EnvZ tendría algún rol en su actividad fosfatasa. El dominio DHP aislado posee algo de actividad fosfatasa tanto *in vivo* como *in vitro* pero la actividad de este dominio es modulada por el dominio ABD unido a ADP [92]. El reemplazo de la His fosforilable por determinados residuos permite retener cierto grado de actividad fosfatasa, tanto en EnvZ como en NtrB. Esto indica que para la actividad fosfatasa no se requiere la transferencia reversa del fosfato a la His catalítica [67,92–95].

3.1.4. Mecanismos de señalización.

Uno de los mayores interrogantes que existen hoy en día relacionados a los sistemas de dos componentes es cómo las actividades del dominio HQ son reguladas en función de la señal, es decir, cómo el dominio sensor detecta y transmite la señal al dominio catalítico. Una posibilidad es que el ligando/estímulo afecte el estado de dimerización del sensor [84]. Tal como se mencionó anteriormente, las HQs deben funcionar obligadamente como dímeros. La inducción de la dimerización provocaría la activación de la HQ al modificar el equilibrio entre una HQ monomérica inactiva y la forma dimérica activa. A su vez, se han propuesto mecanismos en los cuales la unión del ligando o detección de la señal no afecta el estado de

dimerización del sensor sino que provocaría movimientos relativos entre las subunidades o dentro de una misma subunidad. Por ejemplo, se ha sugerido que el receptor de aspartato transmite la señal de unión del ligando mediante un movimiento de pistón de uno de los segmentos transmembrana respecto al otro [96]. Por otro lado, existen evidencias de que la actividad catalítica de ArcB sería modulada mediante un mecanismo que se denominó rotacional, que implica cambios en la orientación del dominio citosólico de un monómero respecto del dominio citosólico del segundo, dentro de un homodímero [97]. En este caso particular también se determinó que los segmentos transmembrana solo actúan como un ancla para mantener a ArcB cerca de la membrana y no están involucrados en la percepción de la señal [98].

En muchas HQs de membrana el dominio TM y el dominio catalítico soluble están ligados por una hélice transmembrana y un segmento conector citoplasmático. Aunque esta última es el motivo menos comprendido de cualquier HQ, existen diversos estudios que señalan a estos segmentos como críticos para la correcta transmisión de la señal [59,67,99,100].

Las regiones conectoras son de longitud variable, entre 40 y más de 180 aminoácidos [101]. Los análisis de similitud de secuencia indican que en estas regiones se encuentran motivos del tipo hélices enrolladas (CC, por su denominación en inglés, *coiled-coil*), los cuales suelen preceder a la caja H del dominio catalítico [102]. Se ha sugerido que los CCs pueden estar involucrados en diversas funciones, tales como promover asociaciones intramoleculares [103], el alineamiento estructural correcto entre los monómeros del dímero, o detección y transmisión de cambios conformacionales del dominio sensor al dominio catalítico. Los CCs son conjuntos de hélices alfa que se unen entre sí de forma paralela o anti-paralela para formar estructuras súper-helicoidales con características particulares (Figura 14A). Los CCs se caracterizan por la ubicación de residuos hidrofóbicos en el núcleo del paquete de hélices. La configuración típica, o canónica, se denomina nudos-en-huecos (del inglés *knobs-into-holes*) y consiste en el acomodamiento de un residuo de una cadena (nudo) en el espacio formado por cuatro residuos de la otra cadena (hueco) [104]. Para lograr este acomodamiento las hélices alfa deben estar distorsionadas ubicando 3.5 aminoácidos por giro, en lugar de los 3.6 de las hélices canónicas [104]. De esta forma cada 7 residuos se repite la ubicación relativa en el empaquetamiento dentro del núcleo del CC. Estas 7 posiciones se identifican con letras *abcdefg*, ubicando los residuos hidrofóbicos en las posiciones *a* y *d* (nudos), y los residuos hidrofílicos en las posiciones *b*, *c*, *e*, *g* (huecos) [104]. Por lo tanto, la secuencia de los CC presenta héptadas de residuos que repiten la naturaleza química de sus cadenas laterales [105]. El empaquetamiento canónico muestra una repetición 3-4, es decir, con los residuos

hidrofóbicos ubicados cada 3 o 4 posiciones en la secuencia aminoacídica (Figura 14B y 14C). Alternativamente, las hélices que conforman los CC pueden sufrir “saltos” o “fallas” en las repeticiones de las héptadas, que modifican el empaquetamiento canónico. En CCs de más de 2 hélices estos saltos pueden generar el acercamiento de los residuos en posición *a* hacia el núcleo del CC, y el alejamiento de los residuos de la posición *d*, o viceversa, modificando el empaquetamiento canónico *ad* por un empaquetamiento *x-da* complementario. En el empaquetamiento *x-da* la repetición de residuos hidrofóbicos es 3-3-1 (Figura 14C).

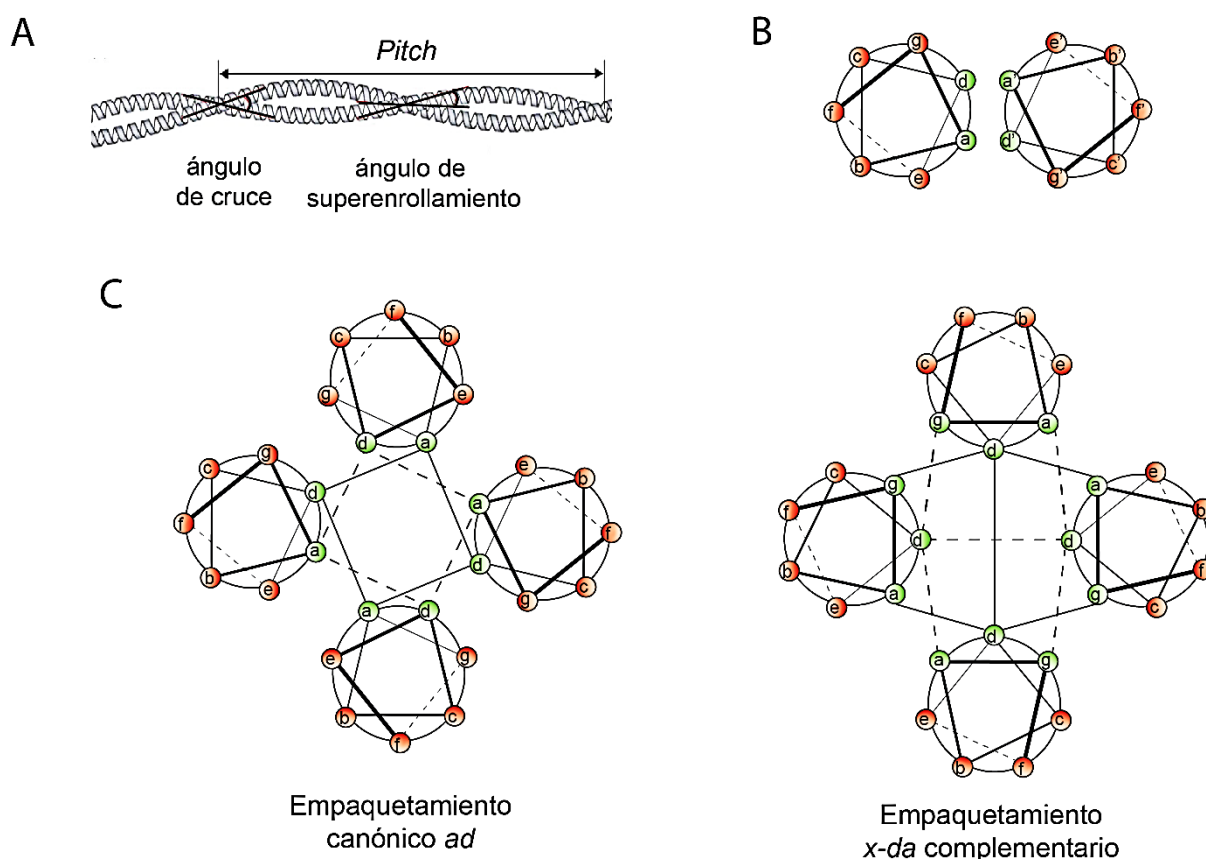


Figura 14: Estructuras de hélices enrolladas o CC típicos. Los diagramas de ruedas helicoidales muestran las hélices desde su extremo N-terminal. Las posiciones de las héptadas se identifican con letras. Los círculos rojos y verdes identifican residuos cargados o polares e hidrofóbicos, respectivamente. A) La distancia que abarca una vuelta completa de la superhélice se denomina “Pitch”. El ángulo de cruce entre las hélices y el ángulo de superenrollamiento son característicos de estas estructuras. B) CC de dos hélices paralelas canónico con repetición 3-4, es decir con los residuos hidrofóbicos ubicados en la secuencia aminoacídica cada 3 o 4 posiciones. La denominación prima (ej, a’) denota el mismo residuo en la cadena opuesta. C) Tetrámeros antiparalelos con empaquetamiento canónico (repetición 3-4) a la izquierda y empaquetamiento *x-da* complementario (repetición 3-3-1) a la derecha.

Muchas HQs presentan, al igual que quimiorreceptores, nucleotidilciclasas bacterianas y fosfatasas, un dominio conservado que conecta el dominio sensor y el dominio catalítico. Estos dominios conectores denominados HAMP (del inglés *Histidine kinase*, *Adenylyl cyclase*, *MCP* y *Phosphatase*), se constituyen por 4 α hélices que se empaquetan formando un CC. Este motivo se compone por dos subunidades de dos hélices paralelas conectadas por un segmento no helicoidal, que en total comprenden aproximadamente 50 aminoácidos (Figura 15). Se han propuesto dos mecanismos de transducción de la señal por HAMP. En un caso se producen rotaciones de las hélices en el plano de la membrana que promueven el intercambio entre dos conformaciones del CC, una compacta y otra laxa, relacionadas con la transición del empaquetamiento canónico a un empaquetamiento complementario *x-da* como se describe en la Figura 14C [106] y se ejemplifica en la Figura 15A para el quimiorreceptor Tsr [107]. En el otro caso, los movimientos de las hélices son del tipo pistón con desplazamientos en un plano perpendicular a la membrana, como se ha propuesto para el receptor de aspartato stTar, el dominio de unión a ligandos de NarX y el dominio periplasmático de TorS [108,109]. Cualquiera sea el mecanismo, los cambios conformacionales se transmiten hacia las hélices del dominio contiguo, favoreciendo su estabilización o desestabilización cuando HAMP adopta su conformación laxa o compacta, respectivamente [107].

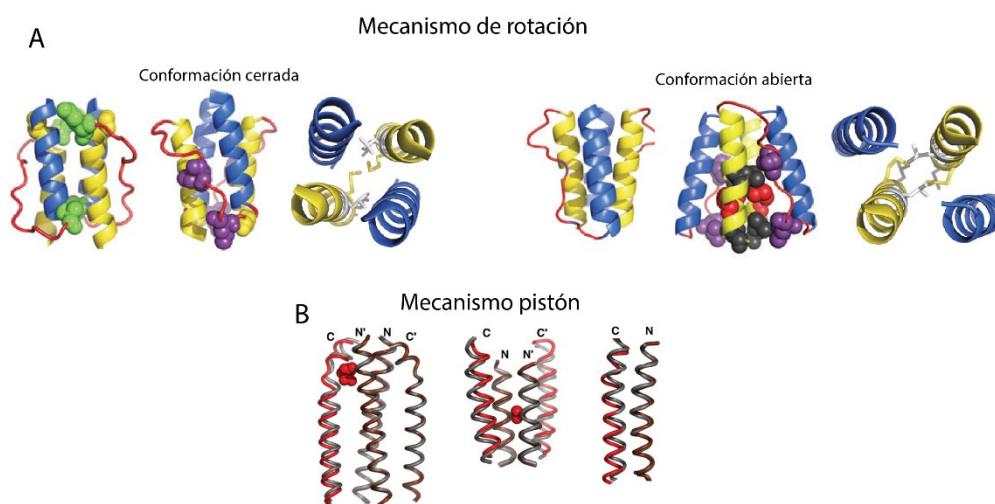


Figura 15: Modelos de transmisión de señales a través del dominio HAMP. A) El mecanismo de rotación propuesto para el quimiorreceptor Tsr [107], sugiere una transición de empaquetamiento del CC entre ad canónico y *x-da* complementario. B) Tres dominios sensores periplasmáticos (receptor de aspartato stTar, dominio de unión a ligando de NarX y dominios periplasmáticos monoméricos de TorS), en los cuales se sugiere un desplazamiento de las hélices longitudinal tipo pistón luego de la percepción de la señal [109].

En numerosas HQs se han identificado también dominios de señalización citosólicos como los dominios PAS y GAF. Los dominios PAS, son una familia evolutivamente relacionada de módulos versátiles de señalización cuya función depende de un cofactor asociado. En bacterias y en arqueas los mismos se encuentran casi exclusivamente en HQs, mientras que en eucariotas están involucrados en un conjunto de funciones regulatorias diversas. Las HQs FixL y PhoQ contienen un dominio PAS. El dominio PAS contiene una región central que podría interaccionar con una gran variedad de cofactores (por ejemplo grupos hemo, FAD), una región que promovería interacciones proteína-proteína y un conector helicoidal que une este dominio a otros módulos de las proteínas

Otro motivo descrito entre los dominios conectores es la hélice de señalización (hélice S). Este motivo se encuentra en un amplio rango de proteínas de señalización, y conecta una gran diversidad de dominios sensores y efectores, entre ellos HAMP, PAS y DHp [110]. La hélice S se compone de aproximadamente 40 aminoácidos, conteniendo 5 repeticiones de héptadas, y se predice que formaría CCs diméricos paralelos. Su característica principal es la secuencia ERT de la héptada central, con el residuo básico situado en una posición *d* (Figura 16). Se ha propuesto que la hélice S funcionaría como un interruptor que previene la activación constitutiva de los dominios efectores, pero que frente a cambios conformacionales producidos en los dominios sensores por la unión de un ligando o el reconocimiento de otra señal, la hélice S permitiría la activación del dominio efector [110].

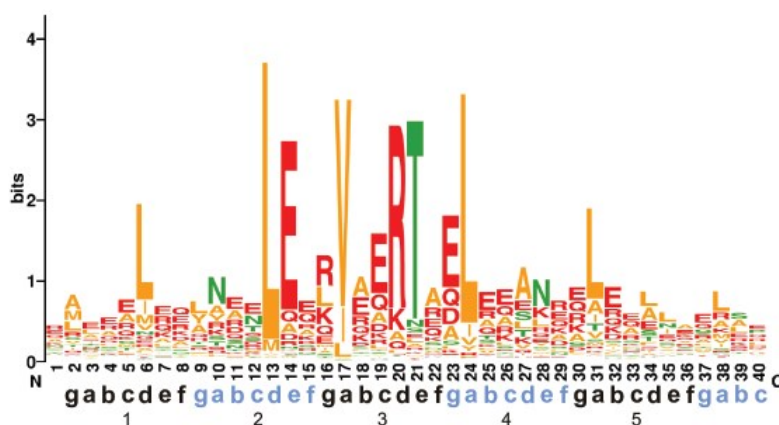


Figura 16: Secuencia aminoacídica de la hélice S. El tamaño de las letras se correlaciona con el nivel de conservación de cada residuo considerando 1000 secuencias de hélice S pertenecientes a organismos de tres dominios (o super reinos) de los seres vivos [111]. La secuencia ERT característica de las hélices S se ubica en las posiciones *cde* de la héptada central.

3.2. Reguladores de respuesta

Los RRs son proteínas citoplasmáticas que generalmente están constituidas por un dominio regulatorio N-terminal conservado, de aproximadamente 125 residuos de aminoácidos, y un dominio efector unidos por una secuencia conectora (Figura 17).

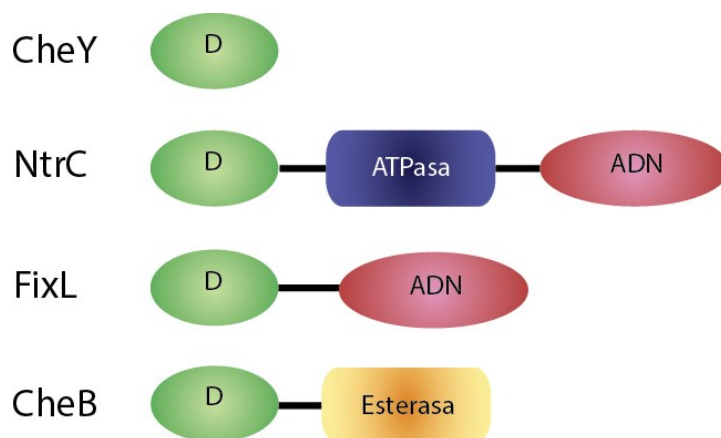


Figura 17: Organización típica de dominios en los reguladores de respuesta. Los RR poseen un dominio regulatorio conservado N-terminal (verde), y un dominio efector cuya actividad generalmente es la de unión al ADN (bordó). Sin embargo, en otros casos, el dominio efector puede tener otras actividades (CheB, amarillo) o simplemente estar ausente (CheY). D: residuo de aspartato fosforilable del dominio regulatorio.

El dominio regulatorio conservado posee tres actividades: fosfotransferencia, auto-fosfatasa, y regulación de la función del dominio efector. Aunque a este dominio generalmente se lo llama dominio receptor, el mismo no tiene un rol pasivo en la reacción de fosfotransferencia. El dominio regulatorio tiene actividad enzimática y cataliza activamente la transferencia de un grupo fosforilo desde la His~P de la HQ a uno de sus residuos de aspartato [67]. Esta actividad catalítica también permite la fosfotransferencia *in vitro* a partir de otros dadores de fosfato, tales como pequeñas moléculas que contienen grupos fosforilos de alta energía. Ejemplos de estas moléculas son el acetil fosfato, el carbamil fosfato y el fosforamidato [112].

Los RR también regulan su propia defosforilación [113]. La actividad auto-fosfatasa varía enormemente entre los distintos RRs, ajustándose al rol biológico de cada sistema en particular [114,115].

En todos los sistemas de dos componentes la respuesta del sistema depende del nivel de fosforilación del RR. Así, la regulación de la fosforilación del RR debe estar estrictamente acoplada a las señales de entrada. Para lograr esta regulación los sistemas de dos componentes

han desarrollado diversas estrategias. Los mecanismos que regulan la fosforilación de los RRs pueden agruparse en dos categorías principales: aquellos que están directamente mediados por la HQ y aquellos que no.

Hay dos formas en que las HQs pueden regular directamente los niveles de fosforilación de los RRs: la fosforilación y la defosforilación. En muy pocas vías de señalización la autofosforilación de la HQ constituye la etapa limitante para la fosfotransferencia. En estos sistemas, típicamente aquellos con RRs~P de tiempo de vida media cortos, tales como el sistema de quimiotaxis bacteriano [116], el nivel de fosforilación del RR está controlado por la regulación de la actividad auto-quinasa de la HQ. Sin embargo, en la mayoría de los sistemas, el nivel de RR fosforilado está regulado principalmente por la actividad RR~P fosfatasa de la HQ. En muchos casos, la unión del ligando u otro estímulo modula directamente esta actividad, mientras que en otros sistemas la regulación de la misma depende de proteínas accesorias que están ligadas directa o indirectamente a la percepción de la señal [103].

4. El sistema DesK/DesR de *B. subtilis*

Como mencionamos anteriormente la vía Des, encargada de la adaptación rápida de *B. subtilis* a bajas temperaturas, está regulada por el sistema de dos componentes DesK/DesR. La HQ DesK contiene 5 segmentos TM que definen el dominio sensor [117] y una cola citoplasmática C-terminal que posee el dominio catalítico [118,119]. Estudios genéticos, fisiológicos y bioquímicos mostraron que DesK es una enzima multifuncional con actividades auto-quinasa, fosfotransferasa y DesR~P fosfatasa [118,120]. El modelo aceptado para la activación de la vía Des al comienzo de esta tesis, proponía que los cambios en la fluidez de la membrana, ya sean causados por un descenso en la temperatura del medio o por un cambio en la composición lipídica a una temperatura constante [121], regularían el equilibrio de las actividades quinasa y fosfatasa de DesK, modulando así la expresión del gen *des*, que codifica una $\Delta 5$ acil-lípido desaturasa ($\Delta 5$ -Des) y por lo tanto la síntesis de AGIs. De acuerdo a este modelo ante la disminución de la fluidez de la membrana, DesK se comportaría como quinasa auto-fosforilándose en el residuo His188 (Figura 18). El grupo fosforilo sería luego transferido al residuo Asp54 de DesR, el cual al ser fosforilado sufriría cambios en su estructura cuaternaria que le permitirían unirse a los sitios regulatorios del promotor *des* y activar su transcripción (Figura 18A). Una vez sintetizada, $\Delta 5$ -Des genera un doble enlace entre el C5 y el C6 de las cadenas de acilo de los fosfolípidos de la membrana, lo cual incrementa la relación AGIs/AGSs reestableciendo la fluidez de la misma. Ante este aumento en la fluidez de la membrana DesK

adoptaría nuevamente el estado fosfatasa, defosforilando a DesR, y deteniendo así la transcripción de *des* (Figura 18B) [118].

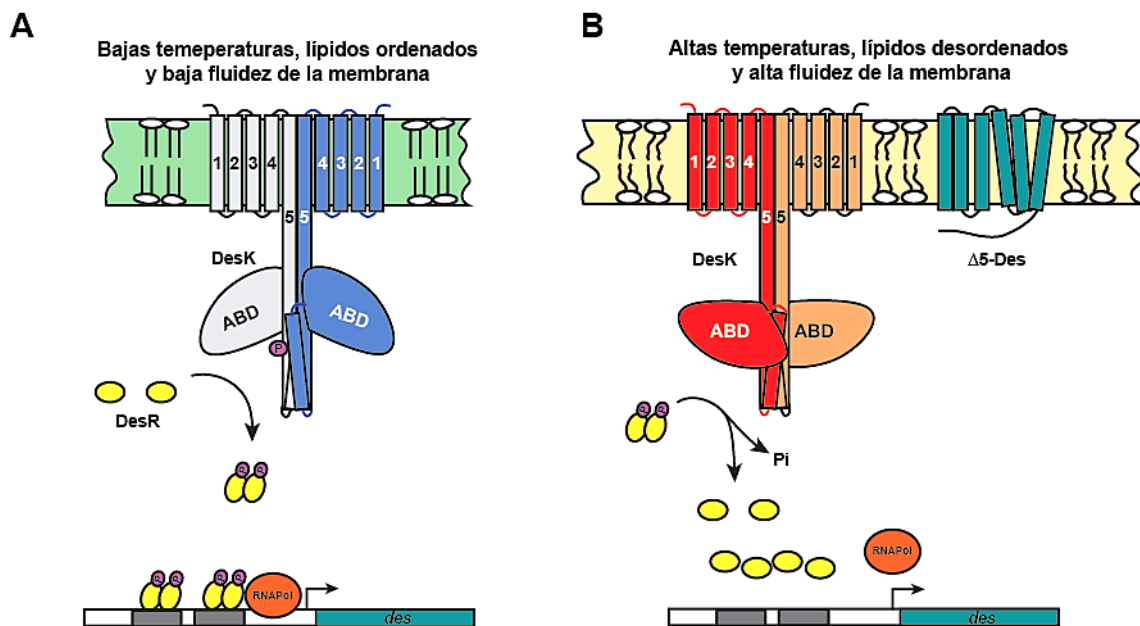


Figura 18: Modelo para el mecanismo regulatorio de la expresión de *des*. A) Cuando se reduce la fluidez de la membrana, ya sea por una disminución en la temperatura o de la proporción de AGR-ai se induce la actividad quinasa de DesK. La fosforilación de DesR mediada por DesK permite la interacción de dímeros de DesR-P con el promotor del gen que codifica para la desaturasa, *des*. 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 $\Delta 5$ -Des. B) $\Delta 5$ -Des introduce dobles enlaces en las cadenas de acilo de los fosfolípidos de membrana. Estos AGIs 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*.

4.1. Características estructurales de DesK

DesK es una HQ de clase I con 370 residuos de aminoácidos y un peso molecular estimado de 43 kDa. El dominio sensor N-terminal está compuesto por 5 segmentos TM (residuos 1 a 153) que está conectado a un dominio catalítico citoplasmático C-terminal, denominado DesKC (residuos 154 a 370) [118]. La resolución de las estructuras cristalográficas de DesKC en distintos estados funcionales (Figura 19) permitió identificar sus principales características estructurales y proponer un mecanismo de acción [119]. Este dominio citoplasmático es de naturaleza homodimérica y en cada monómero pueden distinguirse claramente dos subdominios: un subdominio N-terminal de dimerización y fosforilación de histidina (DHP) que consiste en dos α -hélices anti-paralelas, $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y un

subdominio globular C-terminal (ABD), compuesto por una lámina β plegada de cinco hebras rodeada de tres α -hélices, $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$, que se ubican en forma paralela al plano de la misma [119] (Figura 19A, verde). En la dimerización, las dos α -hélices, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un monómero interactúan estrechamente con las dos hélices, $\alpha 1'$ y $\alpha 2'$ del otro monómero generando un paquete de 4 hélices (4-HB). En el centro de la hélice $\alpha 1$ de cada uno de los monómeros se encuentra el residuo His188, aceptor del fosfato en la reacción de auto-fosforilación [119]. Las hélices $\alpha 1$ de cada monómero se extienden más allá del 4-HB formando el dominio conector que une la región transmembrana con el dominio catalítico.

4.2. Modulación de las actividades catalíticas de DesK

Ensayos *in vitro* mostraron que DesKC es capaz de auto-fosforilarse en presencia de ATP, en una reacción dependiente de Mg^{2+} , y luego transferir el grupo fosforilo al RR DesR. Además, DesKC participa de la defosforilación de DesR~P en una reacción que también depende de Mg^{2+} [118]. El residuo His188 aceptor del grupo fosforilo en la reacción de auto-fosforilación no es esencial para la actividad fosfatasa, ya que la mutante DesK_{H188V} es capaz de defosforilar DesR~P tanto *in vivo* como *in vitro*, en niveles similares a DesK salvaje [118].

El dominio transmembrana sensor es fundamental para la regulación de las actividades catalíticas de DesK. La eliminación sistemática de los segmentos TM mostró que el TM1 contiene un motivo sensor de temperatura, ya que la eliminación de este único segmento inhibe la detección de la señal, generando una variante con actividad auto-quinasa constitutiva que no responde a cambios de temperatura [117]. La posterior eliminación de los segmentos TM2 a TM4 produjo variantes de DesK que también son insensibles a la temperatura pero con actividad auto-quinasa disminuida o nula [117]. Por su parte, la eliminación del dominio TM completo produce la variante DesKC, la cual presenta actividad auto-quinasa dominante *in vivo* y no responde a temperatura tanto *in vivo* como *in vitro* [117,118].

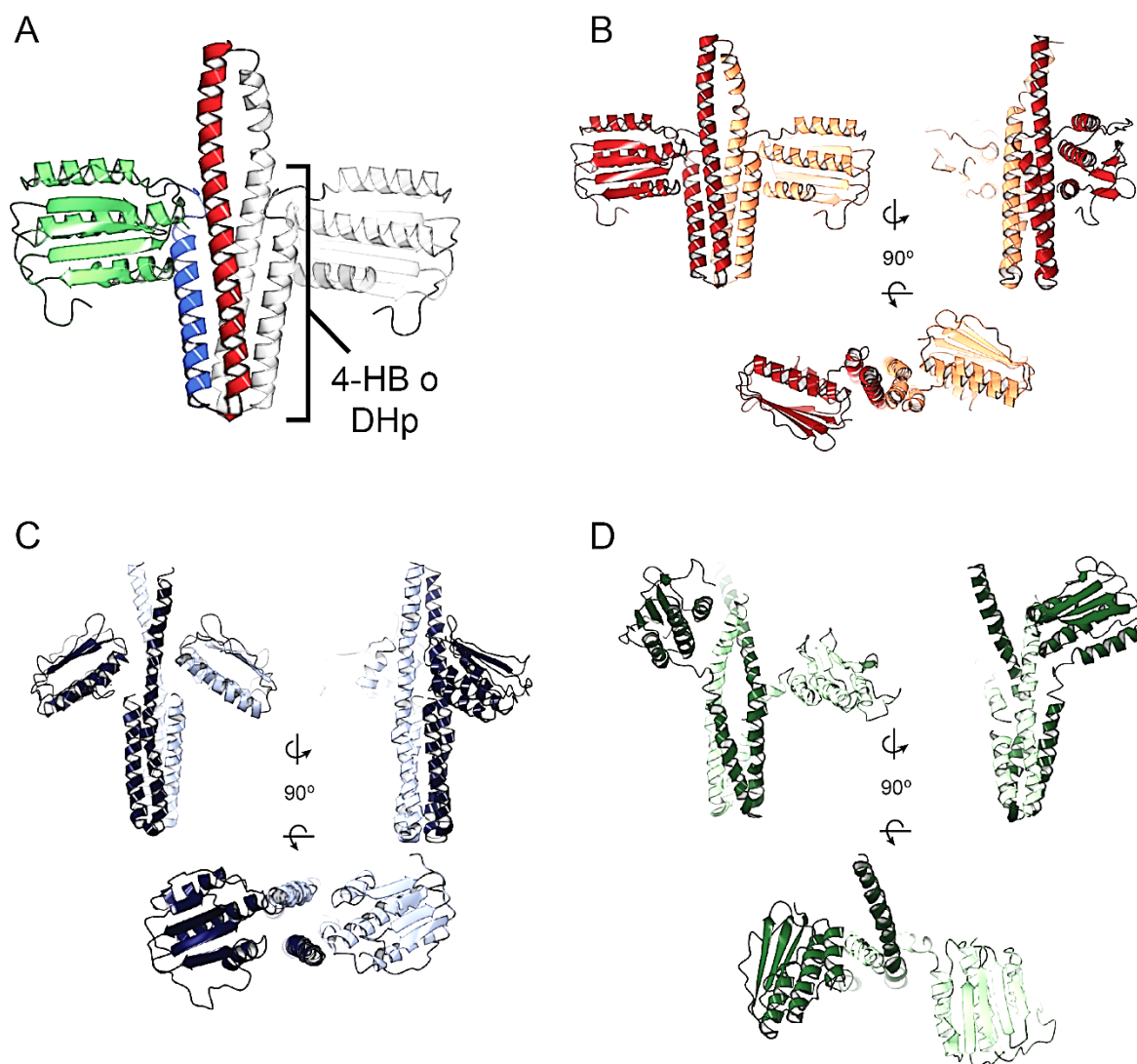


Figura 19: Estructuras cristalográficas de DesKC en sus tres estados funcionales. A) Se destacan las hélices $\alpha 1$ (rojo), $\alpha 2$ (azul) y los ABDs (verde) de uno de los monómeros. Las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un monómero interactúan con las correspondientes hélices del otro monómero formando el paquete de cuatro hélices (4-HB) conocido como dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp) B) DesKC en estado fosfatasa (PDB 3EHJ). En esta conformación las hélices $\alpha 1$ se extienden hacia el dominio TM formando el 2-HCC. C) DesKC en estado auto-quinasa (PDB 3GIE). D) DesKC en estado fosfotransferasa (PDB 3GIG) [119]. Los tres estados conformacionales difieren en el empaquetamiento de las hélices que conforman el dominio DHp, y las movibilidades y orientaciones relativas de los dominios ABD.

La obtención, comprensión y análisis de las estructuras cristalográficas de las tres variantes de DesKC (auto-quinasa, fosfotransferasa y fosfatasa) mostradas en la Figura 19, permitió formular un modelo de regulación de las actividades catalíticas de DesK frente a la señal de temperatura [119]. La estructura de la conformación fosfatasa competente se

caracteriza por una unión entre los dominios DHp y ABDs, y por la formación de un CC constituido por dos hélices paralelas (2-HCC) (Figura 19A). Este motivo se ha observado en muchas HQs, típicamente precediendo un 4-HB, y se corresponde con una hélice de señalización, o hélice S descrita en la Figura 16. En contraste, la estructura correspondiente al estado auto-quinasa competente es menos compacta (Figura 19B), las hélices salientes desde el extremo N-terminal del 4-HB no se empaquetan en un 2-HCC, y los ABDs están disociados del DHp (Figura 19B). La caracterización estructural de los estados funcionales de DesK permitió generar una hipótesis mecánica de transmisión de la señal, en la cual la formación o ruptura del 2-HCC sería un paso clave para alternar la actividad catalítica de DesK entre fosfatasa y quinasa respectivamente. Este motivo 2-HCC, capaz de transmitir los cambios conformacionales necesarios, podría modular la exposición de la histidina fosforilable. Bajo este mecanismo, en el contexto de una membrana fluida, el dominio TM estabilizaría el 2-HCC y el núcleo catalítico en una conformación rígida y compacta, exponiendo la superficie del DHp que interacciona con los ABDs. Esta conformación inhibiría la actividad auto-quinasa. Frente a la señal de frío, el 2-HCC se rompería y la consiguiente reorganización estructural liberaría los ABDs para la fosforilación de la histidina, resultando en la conformación auto-quinasa [119].

4.3. El sensor minimalista MS-DesK

La eliminación sistemática de los segmentos TM de DesK sugirió que el segmento TM1 contiene un motivo sensor de temperatura, ya que la eliminación de este único segmento TM produce una variante de DesK con actividad auto-quinasa *in vivo* constitutiva, que no responde a cambios de temperatura [117]. Al eliminar también los segmentos TM2, TM3 y TM4, se generan variantes que tampoco responden a cambios de temperatura pero que además presentan actividad auto-quinasa baja o nula [117], y la eliminación de todo el dominio TM produce la variante soluble DesKC con actividad auto-quinasa exacerbada y constitutiva tanto *in vivo* como *in vitro* [118,119]. Estos resultados sugirieron que el segmento TM1 detecta la señal de temperatura y transmite esta información al segmento TM5 el cual se conecta directamente al dominio catalítico para controlar su actividad. En función a esto, se creó una proteína quimérica con un único segmento TM, que consiste de los primeros 17 residuos del extremo N-terminal de DesK fusionados a los 14 residuos C-terminales del segmento TM5 [117]. Esta proteína quimérica, que se denominó sensor minimalista (MS-DesK), es capaz de activar o reprimir la expresión del gen *des* frente a cambios de temperatura, de forma similar a DesK salvaje. A

partir de mutantes puntuales de MS-DesK se postuló que los residuos Lys10 y Asn12, ubicados cerca de la interface de la membrana con el medio extracelular, tendrían un rol clave en la detección de la señal de temperatura [117].

Objetivos

Objetivo general

Los sistemas de dos componentes se encuentran en organismos pertenecientes a todos los reinos de la vida, y cumplen roles fundamentales para la adaptación y crecimiento en condiciones diversas. No obstante, sólo se conoce la función de un pequeño conjunto de estos sistemas, y de aquellos cuya actividad es conocida, los mecanismos de detección y transducción de señales dilucidados corresponden a una mínima proporción. En particular, el estudio de las histidina quinasas de membrana ha resultado infructuoso debido a las dificultades intrínsecas de trabajar con las proteínas de membrana, principalmente para su purificación, ensayos de actividad biológica y cristalización. Por lo tanto, los mecanismos moleculares por los cuales los segmentos TM de proteínas señalizadoras detectan y transmiten las señales a través de la membrana es aún una cuestión clave en la investigación biológica.

En este trabajo de tesis, se planteó como objetivo principal comprender los mecanismos moleculares involucrados en la detección y transmisión de la señal por la proteína termosensora DesK.

Objetivos particulares

- Establecer un protocolo de purificación de DesK que permita su estudio por EPR.
- Identificar los cambios conformacionales de los segmentos TM de DesK implicados en el mecanismo de detección de temperatura.
- Estudiar el rol del dominio conector de DesK en la transmisión de la señal y la regulación de sus actividades catalíticas.

Materiales y Métodos

5. Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla II. Las cepas se cultivaron a 37°C 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.

Los antibióticos se adicionaron a los medios en las siguientes cantidades: ampicilina (Ap) 100 µg ml⁻¹, cloramfenicol (Cm) 25 µg ml⁻¹ y kanamicina (Km) 50 µg ml⁻¹.

5.1. Luria-Bertani (LB):

Peptona de caseína	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O	c.s.p 1 l

5.2. Terrific Broth

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol (85%)	4 ml
H ₂ O	c.s.p 900 ml

Autoclavar y dejar enfriar a menos de 60 °C. Agregar 100 ml de solución estéril de 170 mM KH₂PO₄, 720 mM K₂HPO₄.

Tabla II: Cepas bacterianas

DH5α	<i>supE44thi-1ΔlacU169 (f80lacZΔM15) endA1 recA1 hsdR17 gyrA96 relA1 trp6 cysT329::lac inm^λp1(209)</i>	Colección del Laboratorio
BL21 (λDE3)	<i>F⁻ ompT rB⁻ mB⁻</i>	Colección del Laboratorio
C41	<i>F⁻ ompT gal dcm hsd S_B(r_B⁻ m_B⁻)(DE3)</i>	Colección del Laboratorio

6. Técnicas de biología molecular

6.1. Electroforesis en geles de agarosa

Se trabajó con geles submarinos de agarosa entre 0,8% p/v y 1,2 % p/v, siguiendo la técnica descrita en [122]. Como solución *buffer* se utilizó TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), tanto para disolver la agarosa como para realizar la corrida electroforética, y Gel Green™ como colorante fluorescente (1 µg µl⁻¹).

Para sembrar las muestras se empleó Solución de Siembra (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v y glicerol 30% v/v) en proporción 1:5 con respecto al volumen de muestra.

Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago Lambda digerido con la enzima de restricción Hind III o BstE II, o bien con Ladder 100 pb (PBL) de acuerdo a los tamaños a observar en cada experimento.

La visualización de los ácidos nucleicos se realizó utilizando un equipo BIORAD Gel Doc 1000.

6.2. 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).

6.3. Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de ADN

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción y la ligación con T4 ADN ligasa se efectuó siguiendo las recomendaciones de los respectivos proveedores. Para purificar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizaron los reactivos "GFX PCR DNA and GEL BAND purification" (GE HealthCare).

6.4. Mutagénesis sitio-dirigida

Para sustituir el residuo Cys286 de DesK por Ala se utilizaron los oligonucleótidos mutagénicos DesKC286AFor y DesKC286ARev (Tabla III) mediante la técnica de PCRs solapadas. Como templado se utilizó el plásmido pAG47 (Tabla IV). En una primera ronda amplificamos fragmentos que se solapan en dos reacciones de PCR separadas. Uno de los fragmentos se obtuvo utilizando los oligonucleótidos KinvUP y DesKC286ARev (Tabla III),

y el otro fragmento se obtuvo utilizando los oligonucleótidos KinvDW y DesKC286AFor (Tabla III).

Los productos de ambas reacciones fueron purificados a partir de un gel de agarosa y utilizados para realizar una tercera reacción de PCR únicamente con los oligonucleótidos terminales (KinvUP y KinvDW) los cuales introducen los sitios de restricción NdeI y SmaI, respectivamente. El ORF desK con el residuo de Cys reemplazado por Ala se denominó desKC286A.

El fragmento desKC286A amplificado por PCR fue insertado en el plásmido de clonado pCR™-Blunt II-TOPO® (Invitrogen). El reemplazo de la Cys por Ala fue confirmado por análisis de secuencia del ADN (DNA Sequencing Facility, Maine University, USA).

La misma técnica de PCRs solapadas se utilizó para reemplazar la Cys303 por Val usando como templado el ORF de desKC286A. Los pares de oligonucleótidos utilizados en este caso fueron KinvUP, DesKC303VRev y KinvDW, DesKC303VFor (Tabla III). El ORF de desK con ambos reemplazos (Cys286Ala y Cys303Val) se denominó desK_{Cys-} y se insertó en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) generando el plásmido pEMI4, y se verificó por secuenciación (DNA Sequencing Facility, Maine University, USA).

Tabla III: Oligonucleótidos

Nombre del oligonucleótido	Secuencia ^a	Sitios de restricción
KinvUp	5'-ATGAGGTAAGCATATGATTA <u>AAAAAT</u> CATTTTAC-3'	Nde I
KinvDw	5'-CTTTACCCGGGTTTTGAATTATTAGGAATTGCC-3'	Sma I
DesKTEV	5'- <u>GTCGACCCCGGGGCCCTGAAAATACAGGTTTTCTTTT</u> GAATTAGGAATTGCC-3'	SalI – SmaI
TevDesKBN_UP	5'- <u>CAGGATCCCATATGGAAAACCTGTATTTTCAGGGCA</u> TGATTA <u>AAAAAT</u> CATTTTAC-3'	Bam HI – Nde I
DesKBS_DW	5'-ATAGGATCCGTCGACTATGTTTATTTTGAATTATTAG G-3'	Bam HI – Sal I
DesKBS_DWnostop	5'- <u>GTCGACGGATCC</u> TTTTGAATTATTAGGAATTGCC-3'	Sal I – Bam HI
DesKC286AFor	5'-CATTTT <u>GAGCATGGCCTTAAAGGAAGCT</u> -3'	-
DesKC286ARev	5'-AGCTTCCTTTAAGGCCATGCTCA <u>AAAATG</u> -3'	-

DesKC303VFor	5'-CAGGCTAA ^a ACTGTGCGAGTTGACATTC-3'	-
DesKC303VRev	5'-GAATGTCAACTCGCACAGTTTTAGCCTG-3'	-

^a Los sitios de restricción se encuentran subrayados. En negrita se muestra la secuencia codificante para el sitio de corte de la proteasa TEV.

6.5. Construcción de plásmidos

Todos los plásmidos y vectores utilizados en este trabajo se indican en la Tabla IV. Las secuencias codificantes para DesK y sus variantes se insertaron en diferentes vectores de expresión. El protocolo general consistió en la amplificación de los templados utilizando oligonucleótidos mutagénicos que introducen sitios de restricción necesarios para la posterior inserción del fragmento en el vector de expresión correspondiente. A continuación, los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se clonaron en el vector pCRTM-Blunt II- TOPO[®]. La secuencia se verificó por secuenciación y con los plásmidos generados se transformaron células de la cepa DH5 α para su preservación a -80 °C. A partir de dichos plásmidos se escindieron los fragmentos con las enzimas de restricción correspondientes y se ligaron en los vectores de expresión, con los cuales se transformaron células DH5 α para su preservación, o células BL21 o C41 para su expresión y posterior purificación.

El plásmido pEMI11 se generó escindiendo el ORF desK_{Cys-} del plásmido pEMI4 utilizando las enzimas Nde I y Sma I, y ligando el mismo en el plásmido pIVEX2.3d previamente tratado con las mismas enzimas.

Los plásmidos pEMI13 y pEMI14 expresan las variantes DesK_{T15C} y DesK_{Y28C}, respectivamente, cada una conteniendo una única Cys en el primer segmento transmembrana. Dichos plásmidos se generaron reemplazando en cada caso el fragmento de secuencia que codifica los segmentos transmembrana de DesK_{Cys-} por el fragmento de secuencia que codifica los segmentos transmembrana de DHp15C y DHp28C respectivamente (dos variantes de DesK que carecen de los dominios ABD, y que poseen una única cisteína en el dominio TM). Para ello, los plásmidos pDHp15C y pDHp28C se trataron con las enzimas Nde I y Xho I, y el fragmento liberado en cada caso se clonó en el plásmido pEMI11 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

El plásmido pEMI17 que expresa DesK_{Y28C}Tev se generó amplificando el ORF desK_{Y28C}, codificado en el plásmido pEMI14, con los oligonucleótidos KinvUP y TevDesKDW. El amplicón se insertó en el vector pCRTM-Blunt II- TOPO[®] y el ORF desK_{Y28C}Tev se escindió por digestión enzimática con Nde I y SmaI, y se clonó en el vector de expresión pIVEX2.3d previamente digerido con las mismas enzimas.

El plásmido que expresa la variante DesK_{Y28C} fusionada a GFP se denominó pEMI24 y se generó utilizando los oligonucleótidos DesKBNUP y DesKBSDW_noStop, con los cuales se amplificó el ORF desK_{Y28C} a partir del plásmido pEMI14. EL producto de PCR se insertó en el vector pCRTM-Blunt II- TOPO[®] y el fragmento correspondiente al ORF desK_{Y28C} se escindió por digestión enzimática con BamHI y NdeI. Luego, dicho fragmento se clonó en el vector de expresión pWALDO-GFPd previamente tratado con las mismas enzimas.

Para expresar las proteínas codificadas en los plásmidos pEMI11, pEMI13, pEMI14 y pEMI17, generados a partir del vector pIVEX2.3d, se transformaron células de la cepa C41/pDIA17. El plásmido pDIA17 contiene el gen *lacI*, que codifica para el represor de expresión LacI, bajo el control del promotor del casete de resistencia a tetraciclina. La expresión basal de LacI permite incrementar la eficiencia de transformación de células de *E. coli* con vectores que no expresan LacI tales como pIVEX2.3d.

Para expresar las proteínas codificadas en los plásmidos pCM_desR, pWALDO-GFPd, pET22b_desK, pEMI20 y pEMI24, generados a partir de los vectores pET, se transformaron células de la cepa BL21 (λ DE3).

Tabla IV: Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pAG47	Pxyl-DesKR clonado en pDG795	[120]
pCMdesR	Vector de expresión de <i>E. coli</i> (expresa DesR fusionada a glutatión S-transferasa)	[118]
pWALDO-GFPd	Vector de expresión de <i>E. coli</i> (expresa proteínas fusionadas a tev-GFP-8His en el C-terminal)	[123]
pET15b	Vector de expresión de <i>E. coli</i> (fusiones a cola de 6His en N-terminal)	Novagen

pET22b	Vector de expresión de E. coli (fusiones a cola de 6His en C-terminal)	Novagen
pIVEX2.3d	Vector de expresión en E. coli (fusiones a cola de 6His en C-terminal)	[124]
pDIA17	Expresa LacI bajo el promotor de tetraciclina (Incrementa la eficiencia de transformación de células de E. coli con pIVEX2.3d)	[125]
pCR™-Blunt II-TOPO®	Vector de clonado (Invitrogen)	Invitrogen
pDHp15C	DHp15C clonado en pCR™-Blunt II- TOPO®	M. Martin, comunicación personal
pDHp28C	DHp28C clonado en pCR™-Blunt II- TOPO®	M. Martin, comunicación personal
pET22b_desK	desK clonado en pET22b	[126]
pEMI4	desKCys- clonado en pTOPO Zero Blunt II	Este trabajo
pEMI11	desKCys- clonado en pIVEX2.3d	Este trabajo
pEMI13	desKT15C clonado en pIVEX2.3d	Este trabajo
pEMI14	desKY28C clonado en pIVEX2.3d	Este trabajo
pEMI17	desKY28CTEV clonado en pIVEX2.3d	Este trabajo
pEMI20	tevdesKY28C clonado en pET15b	Este trabajo
pEMI24	desKY28C clonado en pWALDO-GFPd	Este trabajo

7. Técnicas genéticas

7.1. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para inducir la formación de células competentes se utilizó la técnica de cloruro de calcio descrita por Ausubel y colaboradores. Básicamente, la cepa de interés se cultiva durante toda la noche en medio líquido LB a 37 °C con agitación. Al día siguiente, se inoculan 15 ml de LB con 0,2 ml de dicho cultivo y se incuba con agitación a 37 °C hasta que el cultivo alcance una $DO_{600}=0,5$. A continuación se recuperan las células por centrifugación durante 10 min a 7000 rpm a 4°C y el sedimento bacteriano se lava con solución 1 (10 mM MOPS, 10 mM KCl, pH=7) fría. Las células se recuperan nuevamente por centrifugación y se resuspenden en solución 2 (100 mM MOPS, 50 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, pH=6,5) y se incuban en hielo por 15 min. Luego, las células se recuperan por centrifugación durante 10 min a 7000 rpm a 4 °C y se resuspenden en 100 μ l de solución 2. A esta suspensión se les agrega el ADN plasmídico y se incuban en hielo durante 30 min. Posteriormente, se transfieren a un baño a 43-44°C durante 30 segundos y nuevamente se colocan en hielo por 1-2 min. Al cultivo se le agrega 1 ml de LB y se mantiene, sin agitación, a 37 °C por 1 h. Finalmente, se siembra una alícuota adecuada en medio selectivo y se incuba durante toda la noche a 37 °C.

8. Expresión y purificación de proteínas

8.1. Sobreexpresión de proteínas

Las células de las cepas BL21 y C41/pDIA17 transformadas con los plásmidos que expresan las proteínas de interés, se cultivaron en LB o TB a 37 °C con una velocidad de agitación ~180 rpm, hasta que los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0,6 - 0,8$. En ese momento se adicionó a los cultivos isopropil β -D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) en concentración 0,2-0,5 mM para inducir la expresión de las proteínas recombinantes, y luego los mismos se transfirieron a 18 °C – 20 °C con agitación ~200 rpm. Se continuó el crecimiento durante toda la noche (~14-18 hs), las células se recuperaron por centrifugación a 4 °C. Las células recuperadas se procesaron para la extracción de membranas celulares.

8.2. Aislamiento de membranas y solubilización en micelas de detergente

8.2.1. Protocolo 1

Las células sobreexpresantes se cosecharon las células y se resuspendieron en la solución *buffer* A (PMSF 1mM, DTT 1mM, Tris-HCl 50mM pH 8 y NaCl 300mM). Esta suspensión celular se incubó durante 30 minutos a 37 °C con lisozima 1 mg/ml y luego 30 minutos a 30 °C con DNasa 5 µg/ml y MgCl₂ 5 mM.

La ruptura de células se realizó por sonicación. Se aplicaron 6 pulsos de 30 segundos con 45% de amplitud. Las células remanentes se separaron por centrifugación a 12000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se sometió a ultra-centrifugación a 200.000 g durante 1:30 hs para recuperar las membranas plasmáticas.

La fracción de membranas se resuspendió en solución *buffer* B (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 300mM, β-mercaptoetanol 5mM, glicerol 5%) y luego se agregó el detergente Brij58 a una concentración final de 2%. Esta suspensión se incubó a 4 °C durante toda la noche con agitación suave. Las membranas no solubilizadas se descartaron por ultra-centrifugación a 200.000 g durante 1:30 hs. y se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas de membrana solubilizadas.

8.2.2. Protocolo 2

Las células se crecieron en 3 litros de medio de cultivo TB a 37 °C hasta DO₆₀₀=0,6, en este momento se agregó 0,2 mM IPTG y se incubaron durante toda la noche a 18 °C con agitación fuerte (180 rpm). Las células se resuspendieron en la solución *buffer* A (PMSF 1mM, DTT 1mM, Tris-HCl 50mM pH 8 y NaCl 300mM). Esta suspensión celular se incubó durante 30 minutos a 37 °C con lisozima 1 mg/ml y luego 30 minutos a 30 °C en presencia de DNasa 5 µg/ml y 5 mM MgCl₂.

La ruptura de células se realizó con el homogeneizador Emulsiflex C3, con tres ciclos de 15000-20000 psi. Luego se separaron las células remanentes mediante centrifugación a 12000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se sometió a ultra-centrifugación a 200.000 g durante 1:30 hs para recuperar las membranas plasmáticas.

La fracción de membranas se homogeneizó en la solución *buffer* B (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 300mM, β-mercaptoetanol 5mM, glicerol 5%) con un homogeneizador Potter-Elvehjem, y luego se agregó una mezcla de detergentes Brij58 y DDM a una concentración final de 2% y 0,1% respectivamente. Esta suspensión se incubó a 4°C durante toda la noche

con agitación suave. Luego, las membranas no solubilizadas se descartaron por ultracentrifugación a 200.000 g durante 1:30 hs. y se recuperó el sobrenadante conteniendo las proteínas extraídas. A esta fracción se le agregó 3 volúmenes de solución *buffer* B para diluir los detergentes y facilitar la interacción de las proteínas con la resina de afinidad.

8.3. Selección de detergentes para la solubilización de membranas

Para optimizar la solubilización de las proteínas de membrana se utilizaron los detergentes detallados a continuación.

Tabla V: Detergentes evaluados para la solubilización de las proteínas de membrana.

<i>Detergente</i>	<i>carga^a</i>	<i>CMC^b</i>	<i>Concentración utilizada^c</i>
<i>n-Dodecil-β-D-maltosido (DDM)</i>	N	0,009	0,1; 0,5; 1
<i>Polioxietilen-(20)-cetil-eter (Brij58)</i>	N	0.009	2
<i>Laurildimetilamina-oxido (LDAO)</i>	Z	0.052	0,5

^a N: no iónico; Z: zwitteriónico.

^b CMC: concentración micelar crítica. Concentración mínima en la cual las moléculas de detergente forman micelas, expresada en porcentaje (%).

^c Concentración del detergente utilizada en este trabajo para solubilizar la fracción de membranas, expresada en porcentaje (%).

Las membranas celulares, obtenidas por centrifugación a 200.000 g, se homogeneizaron en solución *buffer* B y se agregó el detergente en la concentración detallada en la Tabla V. La suspensión se incubó durante toda la noche a 4 °C con balanceo suave. Las membranas no solubilizadas se separaron por centrifugación a 200.000 g y se descartaron. Las alícuotas de las membranas totales (antes del agregado de detergente) y de las membranas solubilizadas (sobrenadante de la centrifugación posterior al agregado del detergente), se analizaron por SDS-PAGE. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul brillante de *coomassie* y las proteínas totales de cada calle se cuantificaron por densitometría utilizando el programa ImageJ. La capacidad de solubilización de cada condición se calculó como la relación de proteínas solubilizadas y proteínas totales en membrana.

8.4. Cromatografía de afinidad a níquel

A la muestra de proteínas de membrana solubilizadas se le agregó imidazol 10 mM y se incubó con 4 ml de resina de níquel-agarosa (previamente equilibrada con solución *buffer* B (Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 300mM, DTT 1 mM, glicerol 5%)) durante 4 hs a 4 °C con agitación suave. Los lavados y la elución de las proteínas se hicieron con solución *buffer* B conteniendo 0,1% del detergente Brij58 (0,5% en el protocolo 1), e imidazol en concentraciones crecientes. Para los lavados se utilizó solución *buffer* B con imidazol 50 mM pasando por la resina al menos 100 ml, es decir, >20 volúmenes de columna. Se utilizó imidazol 30 mM para los lavados, y 100 mM, 200 mM y 500 mM para la elución de las proteínas.

Una muestra de cada fracción fue analizada en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se seleccionaron las fracciones que contenían la proteína de interés en mayor concentración y con mayor pureza. Estas fracciones se juntaron y se dializaron contra la solución *buffer* B (Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 300mM, DTT 1 mM, glicerol 5%) conteniendo Brij58 0,1 % durante toda la noche para minimizar la concentración de imidazol.

8.5. Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó un equipo de purificación rápida de cromatografía líquida (FPLC AKTA ®) y una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Helathcare Life Sciences). Para sembrar las proteínas purificadas en micelas de detergente, se equilibró la columna utilizando solución *buffer* B (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 300 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%) conteniendo Brij 0,1 %. Para sembrar las muestras de proteoliposomas se equilibró la columna utilizando solución *buffer* R (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, glicerol 1 %, KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM). Se inyectó hasta 1 ml de muestra en la columna y se utilizó un flujo de 0,3 ml/min. Se midió la absorbancia a 220 nm, 260 nm y 280 nm, de la muestra eluida de la columna y se fraccionó de a 1 ml. A partir del cromatograma de absorbancia en función del volumen de elución, se seleccionaron las fracciones de mayor absorbancia y se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul brillante de coomassie.

8.6. Cromatografía de intercambio iónico

Las muestras proteicas se dializaron frente a la solución *buffer* Q1 (Tris-HCl pH=8, NaCl 20mM, glicerol 5%, Brij58 0,1%, DTT 1 mM). Estas muestras se concentraron utilizando tubos concentradores VIVASPIN de 100000 kDa. Posteriormente, la unión a la resina se realizó en batch, incubando las muestras proteicas con 1,5 ml de resina, pre-equilibrada con solución

buffer Q1, durante 1:30 hs a temperatura ambiente. A continuación se recolectó el volumen no retenido y se realizaron tres lavados con solución *buffer* Q1, para luego eluir las proteínas unidas a la resina con 2 volúmenes de columna de solución *buffer* Q1 más NaCl 100 mM, 200 mM y 500 mM. Las eluciones se recolectaron en fracciones de 1,5 ml y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida.

8.7. Concentrado de proteínas

Se utilizaron concentradores VIVASPIN de 100000 kDa de tamaño de poro, considerando que el tamaño del dímero de DesK (86 kDa) sumado al de las micelas de Brij58 (80 kDa) alcanza los 166 kDa. Los concentradores se centrifugaron a 4000 rpm a 4-10 °C. Cada 10 minutos se homogeneizó la muestra retenida mediante pipeteo. Se repitió el proceso hasta alcanzar el volumen de muestra deseado.

8.8. Proteólisis mediada por TEV

Aquellas proteínas purificadas que contienen un sitio de corte para TEV se incubaron con esta proteasa en relación molar 10:1 (TEV:proteína de interés) durante la diálisis, a la temperatura indicada en cada experimento en particular, durante toda la noche. Se utilizó la proteasa recombinante TEVsh, purificada mediante una cromatografía de afinidad a níquel, siguiendo el protocolo descrito anteriormente [127].

8.9. Reconstitución de proteínas en liposomas

Las proteínas purificadas en micelas de Brij58 se insertaron en liposomas preformados. Para ello, se resuspendieron 8 mg de lípidos polares de *E. coli* (Avanti), en 0,3 ml de cloroformo:metanol (2:1), y luego se secaron en atmósfera de nitrógeno durante 15 minutos y en vacío durante 2 hs a 60 °C. Para generar las vesículas multilamelares grandes (LMVs), se rehidrataron los lípidos con solución *buffer* H (20 mM Tris HCl pH=8, 250 mM sacarosa y 100 mM K₂SO₄) en un baño termostático a 65 °C con agitación fuerte durante 1 hora. Las LMVs se sometieron a 10 ciclos de congelado y descongelado con nitrógeno líquido y un baño termostático a 65 °C, y luego se sometieron a 21 pasos de extrusión por un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro, para formar vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Una vez formadas las LUVs se incubaron con Tritón X-100 0,24% durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se agregó la proteína purificada en micelas de Brij58 en relación molar 1:800 (proteína:lípidos). Luego de incubar 1 hora a 4 °C con agitación suave,

se agregaron cuentas de poliestireno no polares (Biobeads SM2[®]) para adsorber y extraer el detergente. Las Biobeads se renovaron cada 12hs, seis veces en total.

Luego de las incubaciones con Biobeads, se procedió a recuperar los proteoliposomas mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Para esto, se armó un gradiente de tres pasos con concentraciones de 1,6 M, 1,2 M y 0,2 M de sacarosa. Luego de ultracentrifugar a 115000 g durante 16 horas, los proteoliposomas se recuperaron de la superficie del gradiente, se lavaron con solución *buffer* H y se ultracentrifugaron a 200.000 g durante 2 hs. Finalmente, el pellet de proteoliposomas se resuspendió en 200 µl de *buffer* R (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1 mM y Glicerol 20%).

8.10. Purificación de DesR-GST

Con el fin de purificar a GST-DesR, se transformó la cepa de *E. coli* BL21 (λDE3) con el plásmido pCMdesR. La cepa transformada se cultivó durante toda la noche en LB y luego fue diluida 1/10 en el mismo medio. El cultivo se incubó por 1 h a 37 °C y luego se agregó 0.1 mM IPTG. Se continuó la incubación durante 4 h y luego las células se recuperaron por centrifugación a 4 °C y se resuspendieron en PBS 1X (0.14 M NaCl, 0.27 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) frío. Las células se rompieron por sonicación. Luego de centrifugar a 9,500 rpm por 5 min se recuperó el sobrenadante se le agregó 0,1% Tritón X-100 y se incubó al mismo por 1 h con resina de glutatión-agarosa al 50% (Sigma) equilibrada con PBS 1X. Luego, la resina se lavó varias veces con PBS 1X y luego se eluyó a GST-DesR con 5 mM glutatión. La proteína purificada se dializó contra 50 mM Tris pH=8, 300 mM NaCl y 10 % glicerol. La proteína de fusión se conservó a -80°C para los experimentos subsiguientes.

9. Análisis de proteínas

9.1. Electroforesis, transferencia e inmunodetección

Las proteínas de las muestras de interés se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue luego pre-incubado con *buffer* de transferencia (25 mM Tris; 192 mM glicina). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, que había sido previamente incubada con el mismo *buffer* por 15 min, mediante una corriente eléctrica utilizando un equipo de transferencia húmeda (Trans-blot, BioRad). El proceso de transferencia se desarrolló por un período de 2 hs a una corriente constante de 300 mA. Una vez terminado este proceso la membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación en TBS 1X-BSA. (0,3 % BSA en TBS 1X) para bloquearla. La membrana se incubó con una dilución 1/3000 en TBS 1X de

anticuerpos policlonales anti-DesKC durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron 4 lavados de 5 min con TBS 1X y se incubó 1 h con una dilución 1/3000 de los anticuerpos secundarios (anticuerpos de conejo anti-ratón para reconocer los anticuerpos anti-His, o de cabra anti-conejo para reconocer los anticuerpos anti-DesKC) los cuales están conjugados a fosfatasa alcalina. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 min con TBS 1X y se procedió a revelar. Para ello la membrana se lavó durante 10 min con *buffer* FA (100 mM Tris pH=9,5; 100 mM NaCl; 5mM MgCl₂). Luego la membrana se colocó en el mismo *buffer* y se agregó BCIP 0,15 mg/ml y NBT 0,3 mg/ml y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad hasta la visualización de las bandas. Por último, la membrana se lavó con agua y se secó a temperatura ambiente.

9.2. Tinción con azul brillante de Coomassie

Para detectar proteínas totales, los geles se fijaron con acético-H₂O (3:7), se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante 15 minutos y se destiñeron en acético-etanol-agua (1:3:7). Como marcadores de peso molecular se utilizaron estándares proteicos (New England Biolabs® Inc.).

9.3. Dosaje de proteínas por densitometría

Debido a la interferencia del detergente Brij58 con la mayoría de los métodos espectrofotométricos, decidimos utilizar un método densitométrico para el dosaje de proteínas.

Para cuantificar las proteínas purificadas, se sembraron diluciones de las muestras en geles de poliacrilamida, en los cuales también se sembraron al menos 5 calles con soluciones estándar de albúmina sérica bovina (BSA), conteniendo entre 0.1 µg y 2 µg de BSA por calle. El gel teñido con azul brillante de Coomassie se digitalizó y se analizaron las bandas proteicas por densitometría con el programa ImageJ. En base a las medidas correspondientes a las bandas de BSA se generaron curvas de calibración para calcular la concentración de las proteínas de interés.

10. Mediciones de actividad *in vitro*

10.1. Fosforilación

Las medidas de actividad quinasa se realizaron incubando las proteínas purificadas (1 µM) con solución *buffer* R (Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, KCl 50 mM,

MgCl₂ 1 mM y Glicerol 20%) conteniendo 25 μM ATP y 0,325 μCi/μl de [³²P-γ] ATP, y tomando alícuotas a diferentes tiempos en solución *buffer* de siembra 5x, para detener la reacción. Estas muestras se analizaron en geles de poliacrilamida, normalizando el volumen de siembra de acuerdo a la concentración proteica. Luego, los geles se secaron y se expusieron durante 2-3 días a placas radiográficas Amersham Hyperfilm™ MP, que posteriormente se trataron con revelador y fijador Kodak®.

Las bandas observadas en la placa radiográfica se cuantificaron usando el programa ImageJ y se analizaron con el software OriginLab. Las actividades específicas se calcularon a partir de la pendiente inicial de las curvas de fosforilación, y se expresan en unidades arbitrarias por miligramos de proteína por minuto de reacción (UA/mg.min).

10.2. Fosfotransferencia

Para evaluar la fosfotransferencia, primeramente se fosforilaron las variantes de DesK como se detalla más arriba. Transcurridos 10 minutos de reacción de fosforilación se agregó a DesR (purificado mediante cromatografía de afinidad a níquel aplicando el protocolo establecido anteriormente [119]) en concentración equimolar con las proteínas fosforiladas. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, deteniendo la reacción con solución *buffer* de siembra 5x. Estas muestras se sembraron en geles de poliacrilamida, normalizando el volumen de siembra de acuerdo a la concentración proteica. Luego, los geles se secaron y se expusieron durante 2-3 días a placas radiográficas que posteriormente se trataron con revelador y fijador Kodak®.

Las bandas observadas en la placa radiográfica se cuantificaron por densitometría utilizando el programa ImageJ, y se analizaron con el software OriginLab.

10.3. Defosforilación

Para evaluar la actividad fosfatasa primeramente se purificó la porción soluble de DesK (DesKC) según el protocolo establecido anteriormente [119]. Luego, se fosforiló DesKC siguiendo el protocolo descrito más arriba. A los 10 minutos de reacción de fosforilación se agregó GST-DesR (purificado mediante cromatografía de afinidad a glutatión, aplicando el protocolo establecido anteriormente [118]) en concentración equimolar con DesKC, para producir la fosfotransferencia. Luego de 2 minutos se detuvo la reacción con EDTA 10 mM. GST-DesR fosforilado (DesR-P) se purificó con 100 μl de resina glutatión-agarosa previamente equilibrada con *buffer* R (Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 200 mM, DTT 1 mM, KCl

50 mM, MgCl₂ 1 mM y Glicerol 20%) + EDTA 10 mM. Luego de 2 horas de interacción con la resina, se eliminó el [³²P-γ] ATP libre mediante lavados con *buffer* R + EDTA 10 mM hasta no detectar marca radiactiva en el sobrenadante. Luego se lavó con 2 ml de solución *buffer* R y se eluyó GST-DesR-P con solución *buffer* R + glutatión 5 mM. Esta muestra se utilizó para evaluar la actividad fosfatasa de las proteínas en estudio.

La actividad fosfatasa se determinó incubando las proteínas en estudio con GST-DesR~P, tomando alícuotas a distintos tiempos y deteniendo la reacción con solución *buffer* de siembra 5x. Estas muestras se sembraron en geles de poliacrilamida, normalizando el volumen de siembra de acuerdo a la concentración proteica. Luego, los geles se secaron y se expusieron durante 2-3 días a placas radiográficas que posteriormente se trataron con revelador y fijador Kodak®.

Las bandas observadas en las placas radiográficas se cuantificaron utilizando el programa ImageJ y se analizaron con el software OriginLab. Las actividades específicas se calcularon a partir de la pendiente inicial de las curvas de defosforilación, y se expresan en unidades arbitrarias por microgramos de proteína por minuto de reacción (UA/mg.min).

11. Análisis informático

11.1. Análisis de covariancia de residuos

Se utilizó el servidor evfold.org (<http://evfold.org/evfold-web/evfold.do>). Se ingresó la secuencia del dominio TM de DesK y de los resultados arrojados se seleccionaron los pares de residuos capaces de formar enlaces de hidrógeno, para construir un gráfico de contactos.

11.2. Modelado molecular y simulaciones de dinámica molecular

Para la construcción de los modelos moleculares así como las simulaciones de dinámica molecular se inició una colaboración con el grupo del Dr. Matteo Dal Peraro del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) de Laussane, Suiza. El Dr. Luciano Abriata construyó los modelos y realizó los ensayos de dinámica molecular.

Los sistemas se construyeron combinando operaciones manuales y automatizadas con los programas PyMOL, VMF y NAMD, basadas en las estructuras cristalográficas de DesKC_{H188V} (PDB ID 3EHJ) y H_{188E} (PDB ID 3GIE), y considerando las predicciones de topología basadas en la secuencia. Se agregaron aminoácidos hacia el extremo N-terminal de cada hélice en cada modelo siguiendo la secuencia aminoacídica correspondiente y considerando la geometría predicha por la herramienta de parametrización de *coiled-coil* de Crick [104,128].

Con el agregado de cada giro de ambas hélices los segmentos crecientes se acercaron al aplicar pasos de minimización de energía restringida utilizando las descripciones de proteínas en agua implícita del campo de fuerzas AMBER99SB [129]. Los modelos finales fueron minimizados en solvente implícito con restricciones de estructura secundaria. A continuación, utilizando el servidor CHARMM-GUI [130,131], cada uno de los tres modelos se embebieron en membranas de DOPC o DEPC como predice OPM [132,133], y se hidrataron con agua explícita e iones K^+ y Cl^- a concentración 0,15 M. Además, dentro de CHARMM-GUI, los sistemas resultantes fueron parametrizados usando los parámetros de CHARMM27 para las proteínas, CHARMM36 para los lípidos y el modelo TIP3P para el agua. El protocolo provisto por el servidor CHARMM-GUI se utilizó en el programa NAMD para equilibrar los sistemas a 303,15 °K y 1 atm. Luego se realizaron simulaciones de producción con NAMD, usando intervalos de tiempo de 2 fs para la integración, y un corte de 12 Å para las interacciones no ligantes con una función cambiante de 10 a 12 Å y un tratamiento Ewald de partícula-grilla para electrostáticos con un espaciamiento de grilla de 1 Å.

Capítulo I

*Hacia la caracterización estructural del dominio
transmembrana de DesK: Purificación a homogeneidad y
medidas de actividad in vitro*

A fin de entender los eventos moleculares que ocurren en el dominio transmembrana de DesK durante la detección de la señal de cambio de temperatura, es necesario responder preguntas básicas relacionadas con la naturaleza biofísica del estímulo, y con los cambios del entorno lipídico en el que se encuentran los segmentos TM. La cristalización y difracción de rayos X son unas de las herramientas con mayor poder de resolución de estructuras proteicas, que han permitido comprender los mecanismos moleculares que ocurren en diversas proteínas, principalmente en proteínas solubles aunque también en proteínas de membrana. Sin embargo, hasta el momento todos los intentos de cristalizar DesK completa, incluyendo su dominio transmembrana han sido infructuosos. Por este motivo, decidimos intentar en paralelo la aplicación de una técnica alternativa que permita obtener información estructural y fundamentalmente dinámica, como es la resonancia paramagnética electrónica de onda continua (CW-EPR, por sus siglas en inglés *Continuous Wavelength Electron Paramagnetic Resonance*) acoplada con mutagénesis sitio-dirigida. Esta técnica ha abierto nuevas posibilidades para el estudio estructural de diversas proteínas de membrana [134–136]. Mediante esta técnica se determinó por ejemplo la estructura y la posición relativa de los segmentos transmembrana del sistema transportador de magnesio CorA de *Thermotoga marítima* [136]; se analizó la apertura y cierre dependiente de pH del canal de K⁺ KcsA [137]; se estudiaron los mecanismos asociados con la activación de los canales mecano-sensitivos MscS [135] y MscL [36]; se evaluaron los cambios conformacionales de transportadores como MsbA (proteína exportadora de lípido A) [138] y BtuB (proteína transportadora de vitamina B12) [139]; y se observaron cambios conformacionales en BtuB [139] y en la integrina β1a [140], cuando se encuentran en un entorno micelar y en uno de bicapa lipídica.

El estudio de proteínas no paramagnéticas mediante CW-EPR implica la utilización de sondas de *spin* que se unan a la proteína en el dominio estructural de interés. Estas sondas poseen un radical libre, generalmente un grupo nitróxido, que puede ser detectado por EPR, y se unen a la estructura proteica de diversas formas. En particular, la sonda (1-Oxil-2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-metil) metanotiosulfonato (MTSSL) se une a residuos de cisteína formando enlaces disulfuro, lo cual implica que la proteína en estudio debe poseer una única cisteína en su secuencia de aminoácidos, ubicada en la región deseada. Esta característica genera ciertas condiciones que pueden ser problemáticas en la práctica. En primer lugar, si la proteína en estudio posee residuos de cisteínas nativos es necesario reemplazarlos por otros residuos que no interaccionen con la sonda y que no provoquen cambios estructurales o funcionales significativos, generalmente Ala, Val o Ser. En segundo lugar, la proteína en estudio debe ser la única de la muestra proteica que contenga cisteínas, y por lo tanto, para

asegurar que se cumpla esta condición, debe purificarse a homogeneidad, esto es, que la proteína eluya de una cromatografía de exclusión molecular en un único pico bien definido.

DesK posee dos residuos de cisteína por monómero, ubicados en el dominio de unión a ATP (ABD) en las posiciones 286 y 303, por lo que para poder realizar los estudios de EPR con esta proteína es necesario reemplazarlos. La elección de las mutaciones conservativas de dichos residuos se realizó mediante el análisis de las estructuras cristalográficas de DesKC, el dominio catalítico soluble de DesK (Figura 20) [119]. Estas estructuras muestran que las cisteínas se ubican en un entorno hidrofóbico y compacto, separadas a más de 10 Å de distancia, por lo cual no formarían enlaces disulfuro (~ 2 Å) entre sí. Además, la cisteína de la posición 286 se ubica en una hélice alfa, mientras que la cisteína de la posición 303 se localiza en una lámina beta. En función a este análisis se generó la variante DesK_{Cys-}, con los reemplazos Cys286Ala y Cys303Val, considerando que los residuos de alanina y valina son relativamente hidrofóbicos y pequeños, y que Ala se localiza preferentemente en hélices alfa y Val en láminas beta. Por lo tanto, sería de esperar que estos reemplazos produzcan, en principio, alteraciones mínimas en la estructura de DesK sin afectar su funcionalidad.

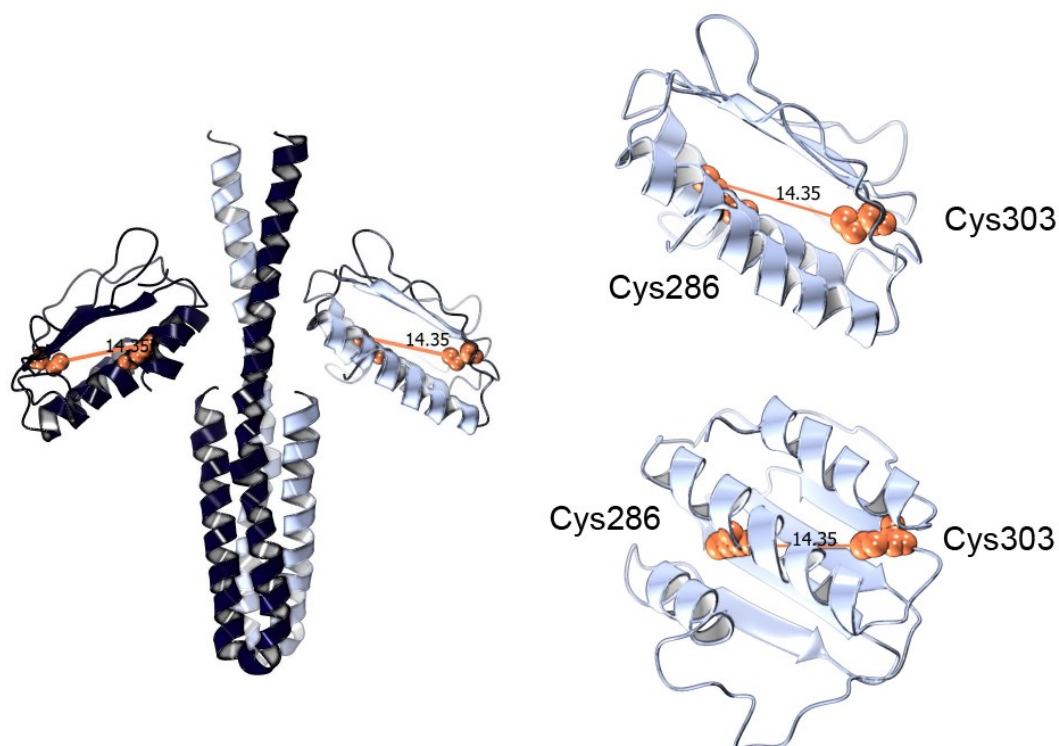


Figura 20: Localización de los residuos de cisteína en DesK. Las cisteínas (esferas) se ubican en los ABDs (ampliación a la derecha). La distancia mínima entre los átomos de azufre de las cisteínas de un mismo monómero es de 14,35 Å, por lo cual las cisteínas no formarían enlaces disulfuro (~ 2 Å). Se muestra la estructura cristalográfica del estado auto-quinasa (PDB 3GIE) en representación de los tres estados funcionales, ya que la distancia entre las cisteínas varían menos de 1 Å de una estructura a otra.

12. Purificación de DesK_{Cys-}

En una primera instancia evaluamos si los reemplazos Cys286Ala y Cys303Val afectan la funcionalidad de DesK. Para esto, generamos el plásmido pEMI11 que contiene la secuencia codificante para DesK_{Cys-} bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG. Con el mismo transformamos células de la cepa C41/pDIA17 de *E. coli* y determinamos la expresión de *desK_{Cys-}* en extractos crudos luego de 18 hs de inducción con IPTG a 20 °C mediante inmunodetección con anticuerpos anti-histidinas. Como se observa en la Figura 21A, DesK_{Cys-} se expresó correctamente encontrándose principalmente en el sobrenadante de los extractos crudos. Luego, a partir de estos extractos crudos recuperamos las membranas plasmáticas aplicando el protocolo 1 detallado en la sección Materiales y Métodos, y procedimos a purificar DesK_{Cys-}. Brevemente, obtuvimos la fracción de membranas mediante centrifugación de los extractos crudos a 200.000 g, solubilizamos las proteínas con detergente Brij58 2% y purificamos DesK_{Cys-} mediante cromatografía de afinidad a níquel, ya que la proteína se expresa con una cola 6His en el extremo C-terminal. Luego, analizamos las eluciones de la columna de afinidad por SDS-PAGE. En la Figura 21B se observa que DesK_{Cys-} eluye principalmente a una concentración de imidazol de 100 mM aunque con muchas proteínas contaminantes, mientras que con imidazol 200 mM, 500 mM y 1M eluye más pura pero más diluida. Juntamos las muestras en dos grupos de acuerdo a la cantidad de proteínas contaminantes que co-purificaron con DesK_{Cys-}. En un grupo se juntaron las fracciones eluidas con imidazol 50-100 mM y en el otro con imidazol 200-1000 mM. Los dos grupos se dializaron por separado y se concentraron utilizando concentradores VIVASPIN de 100 kDa de tamaño de poro (Figura 21C). En este proceso se concentraron todas las proteínas, incluso las de bajo peso molecular, y se perdió una pequeña proporción de DesK_{Cys-} por precipitación. Con estas muestras se midieron las actividades auto-quinasa y fosfotransferasa de DesK_{Cys-}.

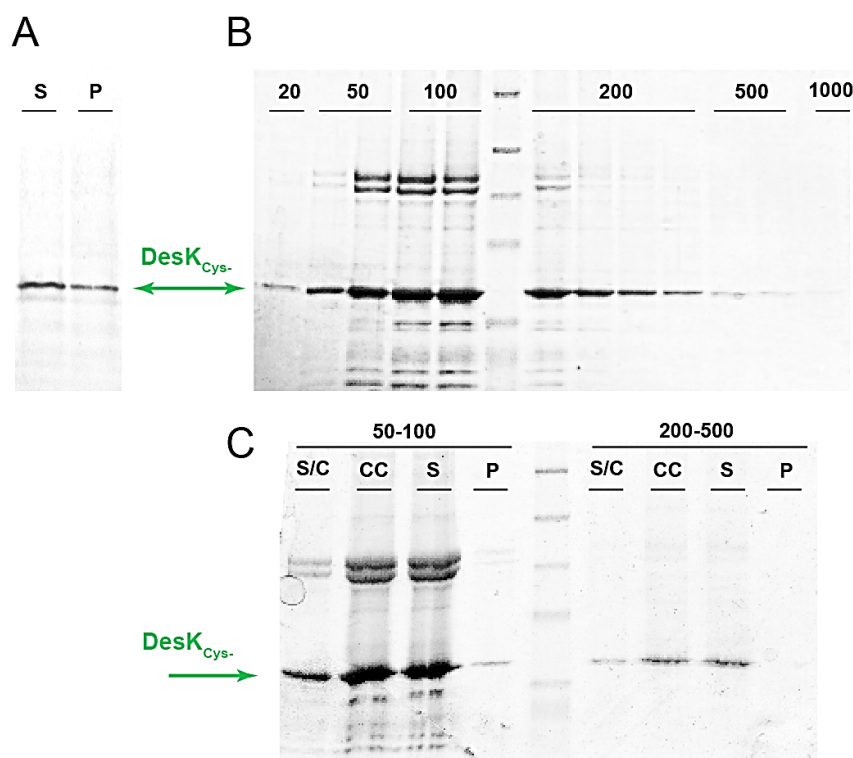


Figura 21: A) Inmunodetección de DesK_{Cys-} con anticuerpos anti-His en el sobrenadante (S) y precipitado (P) de extractos crudos. B) Fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad a níquel. La mayor proporción de DesK_{Cys-} eluye principalmente con 50 mM y 100 mM de imidazol. Con 200-1000 mM de imidazol eluye DesK_{Cys-} con mayor pureza pero más diluida. C) Las eluciones de la columna de níquel (S/C) se concentraron (CC) en concentradores VIVASPIN de 100 kDa de tamaño de poro. Se sembraron las fracciones solubles (S) y precipitadas (P).

13. Actividad auto-quinasa de DesK_{Cys-}

Para evaluar la actividad auto-quinasa *in vitro* de DesK_{Cys-} se utilizó el protocolo establecido anteriormente para la porción soluble DesKC [118]. Brevemente, las muestras se incubaron con [³²P-γ] ATP a 25 °C o a 37 °C, se tomaron alícuotas de las reacciones a distintos tiempos, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior auto-radiografía.

De acuerdo a estos ensayos, la actividad auto-quinasa específica de DesK_{Cys-} a 25 °C ($3,4 \times 10^6$ UA/mg.min) es aproximadamente la mitad que la de DesK salvaje a la misma temperatura ($7,3 \times 10^6$ UA/mg.min) (Figura 22B). Sin embargo, DesK_{Cys-} mantiene la regulación de la actividad auto-quinasa por temperatura, siendo aproximadamente el doble a 25 °C ($3,4 \times 10^6$ UA/mg.min) que a 37 °C ($1,5 \times 10^6$ UA/mg.min) (Figura 22A).

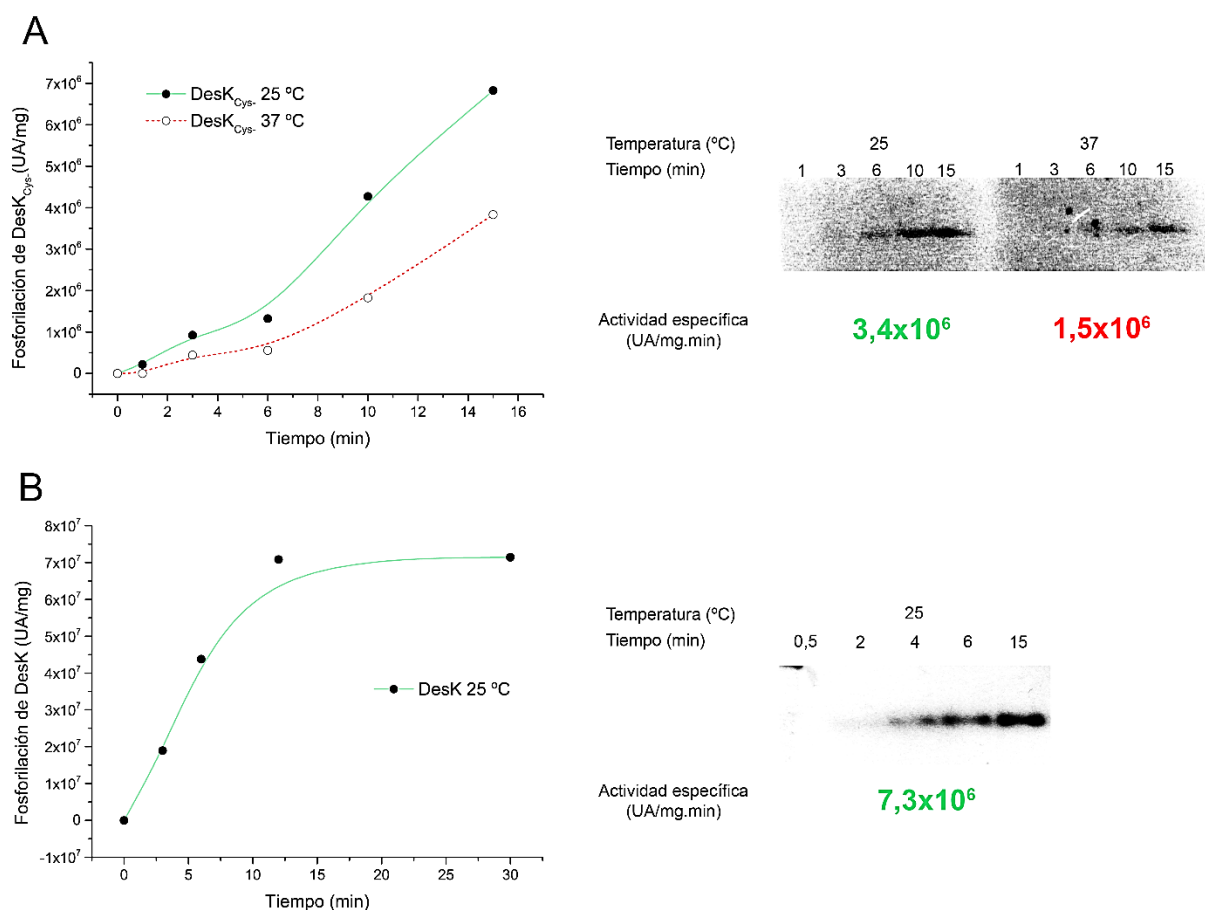


Figura 22: Fosforilación *in vitro* de DesK_{Cys-} (A) y DesK salvaje (B). Las proteínas se incubaron con [³²P-γ] ATP a 25 °C o 37 °C, se tomaron alícuotas de las reacciones a distintos tiempos, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior auto-radiografía (derecha). Las bandas se cuantificaron por densitometría, y los valores expresados en unidades arbitrarias por miligramo de proteína (UA/mg) se graficaron en función del tiempo. La actividad específica (UA/mg.min) se determinó a partir de la pendiente inicial de las curvas (izquierda). DesK_{Cys-} regula su actividad auto-quinasa en función de la temperatura, aunque la actividad medida a 25 °C es aproximadamente la mitad de la actividad de DesK salvaje a 25 °C.

14. Actividad fosfotransferasa de DesK_{Cys-}

Una vez verificada la actividad auto-quinasa de DesK_{Cys-}, evaluamos su capacidad de transferir el grupo fosfato al regulador de respuesta DesR, siguiendo el protocolo descrito previamente [118]. Brevemente, DesK_{Cys-} se incubó con [³²P-γ] ATP durante 10 minutos, momento en el cual se agregó a la reacción una cantidad equimolar de DesR purificado (ver Materiales y Métodos). Se tomaron alícuotas de la reacción a distintos tiempos y se analizaron las muestras por SDS-PAGE y auto-radiografía. En la Figura 23A se observa DesR~P a los 10 y 20 minutos, verificando que DesK_{Cys-} es capaz de transferir el grupo

fosfato a DesR, y por lo tanto de interaccionar con el RR. Sin embargo, la eficiencia de la transferencia de fosfato hacia DesR es mucho menor que la obtenida con DesK salvaje, donde se detecta DesR~P a partir de los 30 segundos de iniciada la reacción (Figura 23B).

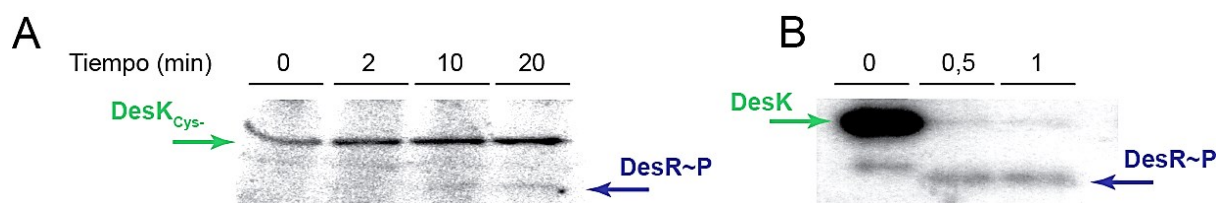


Figura 23: Fosfotransferencia de DesK_{Cys-} (A) y DesK salvaje (B) hacia el regulador DesR. Las HQs se incubaron con [³²P-γ] ATP durante 10 minutos, momento en el cual se agregó DesR en concentración equimolar (tiempo 0). Se tomaron alícuotas de la reacción a distintos tiempos y se analizaron por SDS-PAGE y posterior autoradiografía. La aparición de la banda correspondiente a DesR~P a partir de los 10 minutos (A) indica que hay interacción entre la DesK_{Cys-}~P y DesR permitiendo la fosfotransferencia, aunque la eficiencia es muy baja en relación a la observada con DesK~P y DesR.

De acuerdo a los resultados de actividad auto-quinasa (Figura 22) y fosfotransferasa (Figura 23), podemos decir que los reemplazos Cys286Ala y Cys303Val disminuyen parcialmente la actividad de DesK *in vitro*, pero permiten mantener la regulación por temperatura. Esto indica que DesK_{Cys-} es funcional en lo que se refiere a la detección y transducción de la señal que modula las actividades de la proteína. Por lo tanto, en principio, esta proteína podría ser utilizada como base para introducir residuos de cisteína en los segmentos transmembrana y generar las variantes requeridas para la marcación de *spin* y mediciones de EPR.

15. Generación de variantes de DesK: inserción de residuos de cisteína en los segmentos TM.

La técnica de marcación de *spin* sitio-dirigida y CW-EPR brindaría una gran cantidad de información estructural del dominio transmembrana de DesK, si se lograra marcar cada uno de los residuos que se ubican en los segmentos TM. Sin embargo, este enfoque requiere la construcción de 113 mutantes puntuales de DesK, con la respectiva purificación y caracterización funcional de cada una de ellas, implicando costos y consumo de tiempo excesivos. Por este motivo, es importante optimizar la estrategia para generar información

estructural relevante, seleccionando la menor cantidad posible de posiciones a marcar. La variante quimérica MS-DesK resulta funcional a este fin. Esta proteína quimérica mantiene la funcionalidad de DesK salvaje pero posee un único segmento TM por monómero, formado mediante la fusión de los primeros 17 residuos del extremo N-terminal de DesK con los 14 residuos del extremo C-terminal del TM5 [117]. Dado que TM1 y TM5 son suficientes para generar una proteína funcional que responde a variaciones de temperatura, decidimos comenzar los estudios de EPR en posiciones presentes en estos segmentos TM. Utilizando la secuencia de DesK_{Cys-} como molde generamos los reemplazos Thr15Cys y Tyr28Cys en el TM1 (ver Materiales y Métodos). Construimos los plásmidos pEMI13 y pEMI14 para expresar las variantes DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} respectivamente, bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG y con una cola de 6His en el extremo C-terminal. Con estos plásmidos transformamos células de la cepa C41/pDIA17, y purificamos estas variantes de DesK aplicando el mismo protocolo utilizado previamente con DesK_{Cys-}.

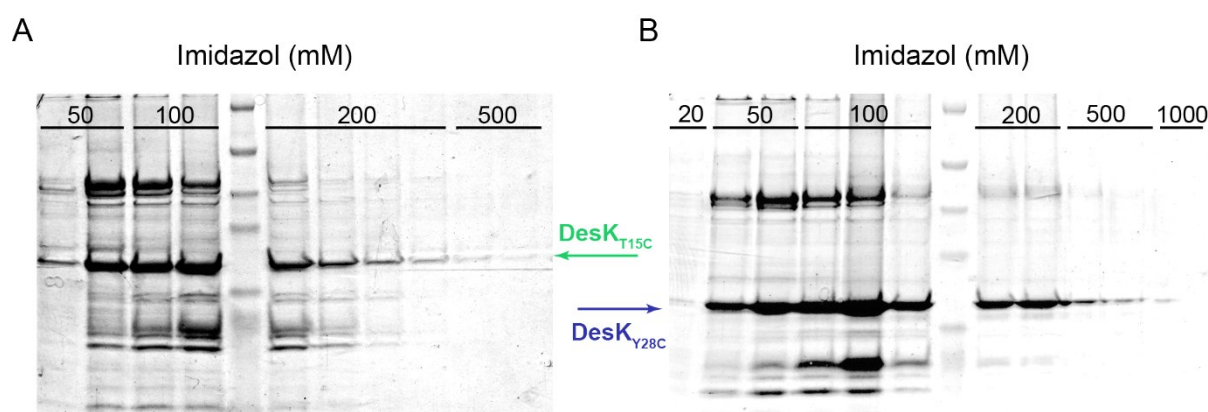


Figura 24: Eluciones de las cromatografías de afinidad a níquel se analizaron por SDS-PAGE. DesK_{T15C} (A) y DesK_{Y28C} (B), se purificaron con el mismo protocolo utilizado para DesK_{Cys-}. Ambas proteínas eluyen en mayor proporción en las fracciones con 50 mM y 100 mM de imidazol, aunque continúan eluyendo hasta con 500 mM de imidazol. En las fracciones en las que las proteínas eluyen con mayor pureza las mismas se encuentran muy diluidas.

Como puede observarse en la Figura 24, los patrones de elución de estas proteínas son similares al observado para DesK_{Cys-}, siendo las fracciones más enriquecidas en la proteína de interés las eluidas con imidazol 100 mM, mientras que las fracciones eluidas con 200 mM y 500 mM contienen las proteínas de interés más puras pero también más diluidas.

En este punto es importante destacar que para proceder a la marcación con la sonda de *spin* y las posteriores mediciones por EPR, evitando interferencias producidas por la marcación de proteínas contaminantes, es fundamental que la proteína a marcar sea

purificada a homogeneidad. El parámetro de purificación a homogeneidad se corresponde con la observación de un único pico perfectamente definido en una cromatografía de exclusión molecular (SEC), y por lo tanto éste fue el siguiente paso ensayado para purificar las variantes de DesK.

16. Cromatografía de exclusión molecular e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Con la intención de alcanzar la purificación a homogeneidad de las variantes de DesK aplicamos una cromatografía SEC utilizando un equipo de purificación de cromatografía líquida rápida (FPLC AKTA®) y una columna Superdex 200. En esta columna sembramos la muestra de DesK_{Cys-} eluida de la cromatografía de afinidad a níquel con imidazol 50-100 mM y concentrada en un concentrador VIVASPIN de 100 kDa de tamaño de poro (Figura 21C, 50-100 calle CC). El cromatograma obtenido con las medidas de absorbancia a 220 nm, 260 nm y 280 nm, muestra la elución de proteínas a distintos volúmenes, con la principal fracción eluyendo en 11 ml (Figura 25). Al analizar alícuotas de los distintos volúmenes de elución por SDS-PAGE, se observa que DesK_{Cys-} eluye en los volúmenes de 9 ml a 13 ml, correspondiente a tres picos del cromatograma. Este perfil de eluciones indicaría en principio la presencia de diferentes especies de DesK_{Cys-} que presentan movilidad diferencial a través de la columna.

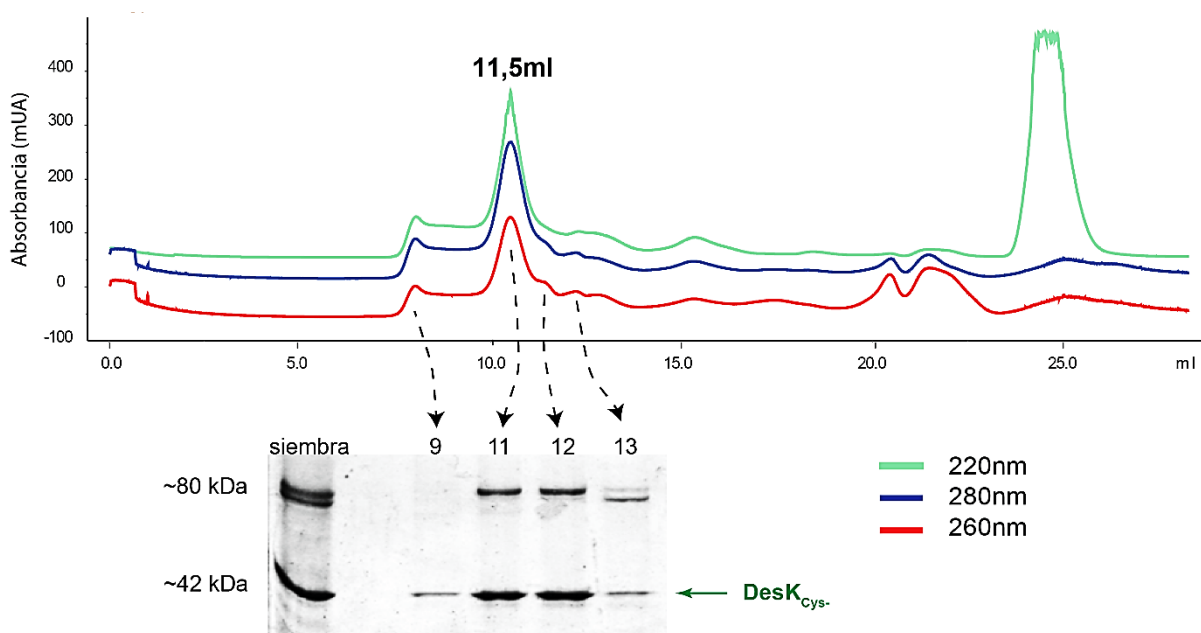


Figura 25: Cromatograma de exclusión molecular de DesK_{Cys-}, y posterior SDS-PAGE. Para la cromatografía se utilizó un equipo AKTA FPLC con una columna Superdex 200. La absorbancia medida a tres longitudes de onda:

220 nm, 260 nm y 280 nm, se graficó en función del volumen de elución. La escala en el eje Y corresponde a la absorbancia expresada en mili unidades de absorbancia (mUA). Las muestras que corresponden a los picos entre 9 ml y 13 ml del volumen eluido se analizaron por SDS-PAGE. La mayor proporción de DesK_{Cys-} eluye entre 11 ml y 12 ml, pero en estas fracciones también eluye una proteína contaminante de aproximadamente 80 kDa.

Por otra parte, en las eluciones de 11 ml a 13 ml se observan proteínas de aproximadamente 80 kDa que eluyen junto con DesK_{Cys-} (42 kDa). Dado que DesK es activa como dímero, la banda de 80 kDa podría corresponderse con el dímero de DesK_{Cys-}. Para evaluar esta posibilidad, analizamos las muestras por inmunodetección con anticuerpos anti-His (Figura 26A). Considerando que estos anticuerpos reconocen tanto a la banda de 42 kDa como a la de 80 kDa, intentamos romper el dímero putativo incubando las muestras eluidas de la columna de níquel, con urea y DTT a 37°C, pero no observamos ningún cambio en el patrón de bandas respecto a la muestra sin tratar (Figura 26B).

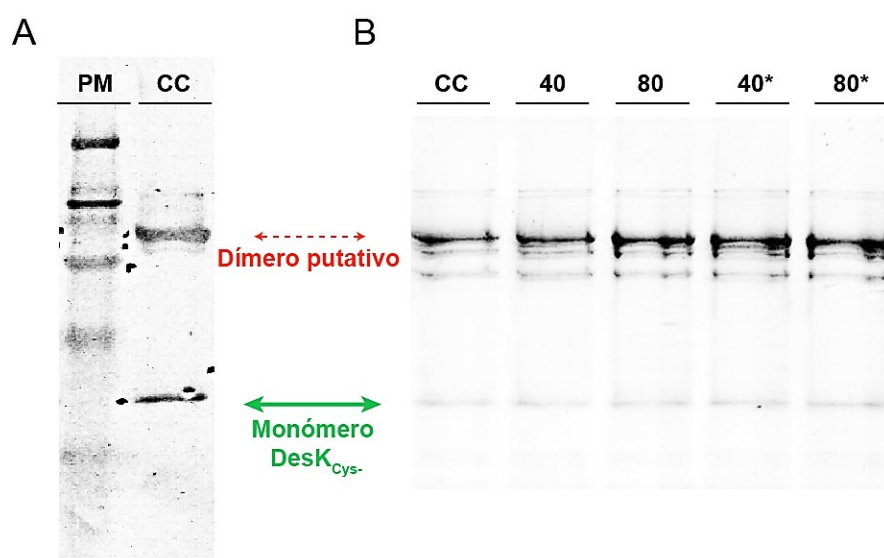


Figura 26: Las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad a níquel se juntaron y se concentraron con un concentrador VIVASPIN de 100 kDa de tamaño de poro (CC). A) Se utilizaron anticuerpos anti-His para identificar DesK por inmunodetección. B) Para romper el dímero putativo en sus monómeros constituyentes se incubó la muestra concentrada durante 1 hora con urea 2M y DTT 40 mM (40), o con urea 2 M y DTT 80 mM (80). En cada caso se incubaron a temperatura ambiente y a 37 °C (*). El patrón de bandas es igual en todas las muestras, tratadas y sin tratar.

En función de estos resultados, decidimos identificar las proteínas que co-purifican

junto con DesK_{Cys-} recurriendo al análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Para esto, se juntaron las fracciones eluidas en 11 ml y 12 ml de la cromatografía SEC, y se concentraron utilizando un concentrador VIVASPIN de 100 kDa de tamaño de poro. La muestra concentrada se analizó por SDS-PAGE, a partir del cual se cortaron las bandas de las proteínas a identificar (Figura 27). Las muestras fueron analizadas en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA). Este análisis confirmó que la banda de 42 kDa corresponde a DesK_{Cys-}, y permitió identificar a las principales contaminantes. Por otro lado, se estableció que la banda de 80 kDa corresponde a una putativa epimerasa/dehidratasa dependiente de NAD (74 kDa), y la banda de 60 kDa corresponde a la chaperona GroEL (52 kDa). Analizando las secuencias de las proteínas contaminantes observamos que contienen residuos de histidina. En particular, la epimerasa/dehidratasa presenta 26 histidinas, con segmentos de 3 histidinas entre 6 residuos consecutivos, lo cual podría explicar el reconocimiento inespecífico de los anticuerpos anti-His (Figura 26A). Por otro lado, estas proteínas poseen residuos de cisteína, por lo cual podrían marcarse con la sonda de spin interfiriendo en las mediciones de EPR. Por este motivo nos centramos en mejorar la estrategia de purificación con el fin de alcanzar la homogeneidad de las proteínas, requerida para marcarlas con la sonda de *spin*.

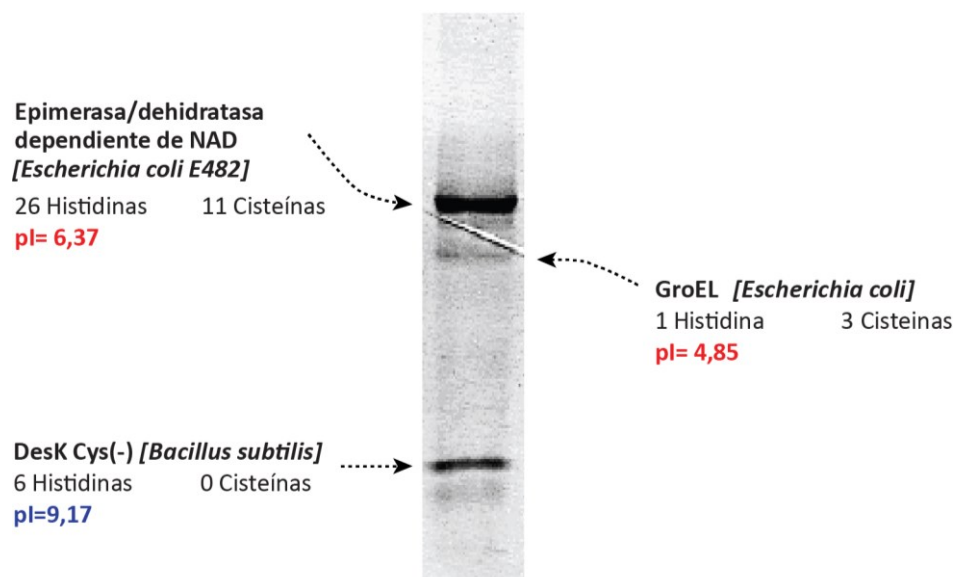


Figura 27: La muestra eluida de la cromatografía de afinidad a níquel se sembró en un gel de poliacrilamida y las bandas reveladas por tinción con azul brillante de coomassie se cortaron del gel y se enviaron al servicio de análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa CEQUIBIEM-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

17. Estrategias alternativas de expresión y purificación de DesK y sus variantes.

Considerando que no se pudo purificar DesK_{Cys-} a homogeneidad aplicando una cromatografía de afinidad a níquel seguida de una cromatografía SEC, procedimos a generar construcciones plasmídicas que permiten aplicar estrategias alternativas de purificación. En la Figura 28 se muestran mapas de algunos de los plásmidos construidos para la expresión de DesK salvaje y DesK_{Y28C}. En todas estas construcciones se utilizaron, vectores de alto número de copias y promotores fuertes e inducibles por IPTG. En particular pET15b y pET22b permiten fusionar una cola de 6His en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína de interés, respectivamente. Por otra parte, el vector pWALDO-GFPd, derivado del vector pET28a, permite expresar la proteína de interés fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) y una cola de 8His en el extremo C-terminal. La principal característica de los plásmidos pEMI17, pEMI20 y pEMI24 (Figura 28) es la presencia del sitio de corte para la proteasa del virus del tabaco (TEV), lo cual permitiría cortar la cola de histidinas de la proteína de interés. Luego de escindir la misma, la proteína en estudio podría purificarse en una segunda cromatografía de afinidad en la que eluiría en el volumen no retenido (V_0), mientras que las contaminantes quedarían unidas a la resina como en la primer columna de afinidad.

En las siguientes secciones describimos las pruebas realizadas con estas construcciones para optimizar la expresión y purificación de DesK y sus variantes.

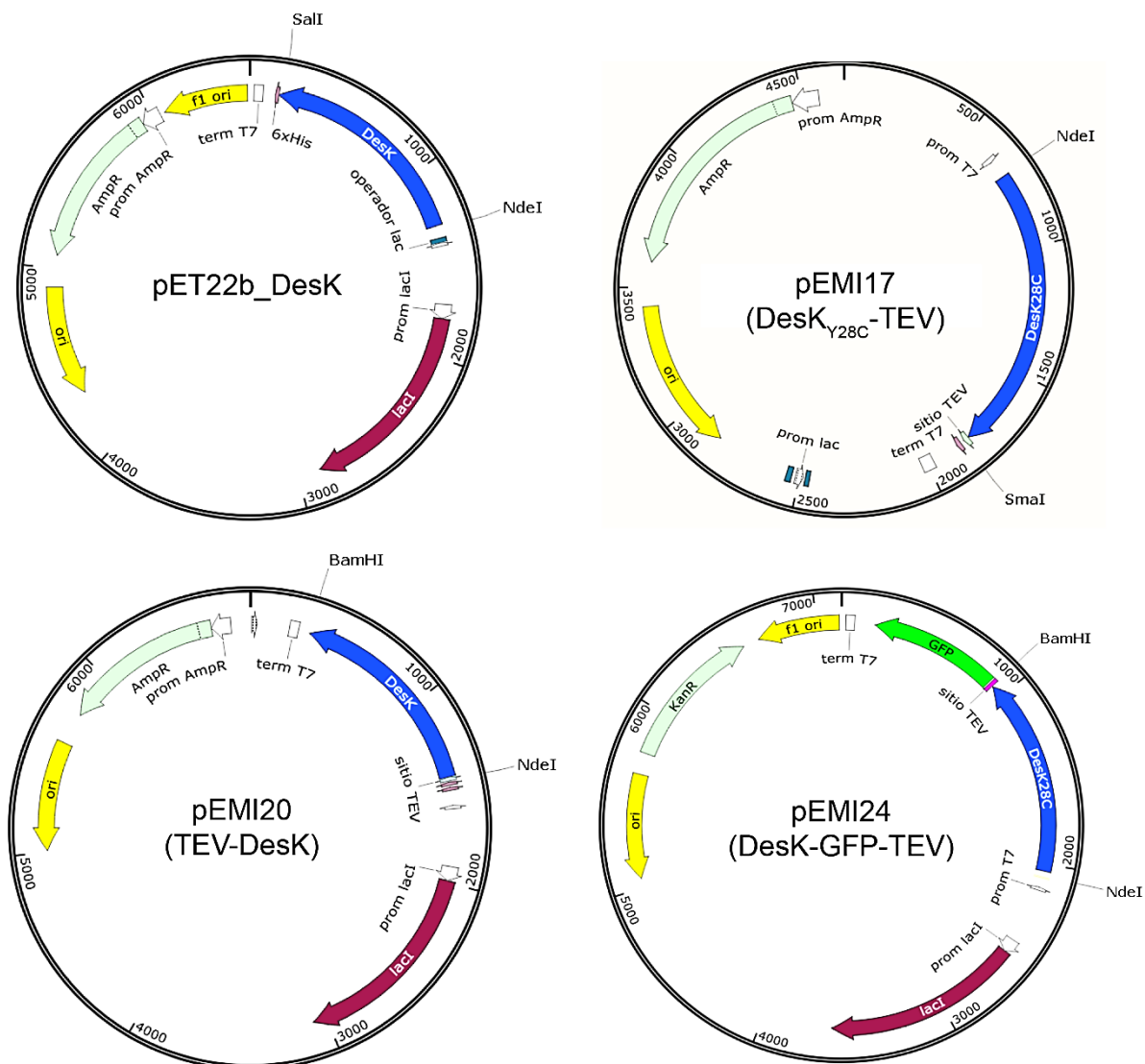


Figura 28: Mapas de las construcciones plasmídicas que permiten expresar DesK salvaje y DesK_{Y28C} con diferentes fusiones.

17.1. Optimización de crecimiento de cultivos bacterianos e inducción de la expresión proteica

El plásmido pET22b_DesK se utilizó para transformar células de la cepa BL21 de *E. coli*, mientras que con plásmidos pEMI17 y pEMI20 se transformaron células de la cepa C41/pDIA17 de *E. coli*. La cepa C41 es derivada de la cepa BL21 y se ha reportado que permite sobreexpresar proteínas tóxicas [141]. Además, el plásmido pDIA17 permite incrementar la eficiencia de transformación de estas células con los plásmidos derivados del vector pIVEX2.3d (ver Materiales y Métodos). Posteriormente evaluamos los niveles de

expresión de las proteínas recombinantes al cultivar las transformantes en medios de cultivo *Luria-Bertani* (LB) o *Terrific Broth* (TB), a 20 °C o 37 °C durante toda la noche, post inducción con IPTG 0,2 mM (Tabla VI). En todos los casos determinamos la expresión de las proteínas por SDS-PAGE e inmunodetección con anticuerpos anti-DesKC. De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla VI), el medio de cultivo TB y la inducción a 20 °C durante toda la noche permiten obtener un mayor número de células, y a la vez una buena expresión proteica con cualquiera de los vectores y proteínas ensayados. Por lo tanto, utilizamos estas condiciones para todos los ensayos de expresión y purificación posteriores.

Tabla VI: Prueba de crecimiento de las células de la cepa BL21 transformadas con el plásmido pET22b_*desK*, o las células de la cepa C41/pDIA17 transformadas con los plásmidos pEMI17 y pEMI20. Las cepas se crecieron en los medios de cultivo LB y TB, y se evaluó la expresión de las proteínas a 20 °C y 37 °C. La DO₆₀₀ se midió al momento de cosechar las células. En el ensayo de inmunodetección se sembró la misma cantidad de células por calle de acuerdo a la DO₆₀₀, y se utilizó un suero anti-DesKC. Se destaca la condición que permitió obtener la mayor cantidad de células y una buena expresión de la proteína recombinante con cada plásmido.

Medio de Cultivo	Cepa transformada	Plásmido	Proteína recombinante	IPTG mM	T (°C)	DO ₆₀₀	Western-blot
LB	C41/pDIA17	pEMI17	DesK _{Y28C} -TEV	-	37	0,8	
LB	C41/pDIA17	pEMI17	DesK _{Y28C} -TEV	0,2	37	3,0	
LB	C41/pDIA17	pEMI17	DesK _{Y28C} -TEV	0,2	20	3,7	
TB	C41/pDIA17	pEMI17	DesK _{Y28C} -TEV	-	37	4,94	
TB	C41/pDIA17	pEMI17	DesK _{Y28C} -TEV	0,2	20	4,81	
LB	C41/pDIA17	pEMI20	TEV-DesK _{Y28C}	0,2	20	2,02	
TB	C41/pDIA17	pEMI20	TEV-DesK _{Y28C}	0,2	20	5,29	
LB	BL21 (λDE3)	pET22b_ <i>desK</i>	DesK salvaje	0,2	37	3,6	
LB	BL21 (λDE3)	pET22b_ <i>desK</i>	DesK salvaje	0,2	20	3,6	
TB	BL21 (λDE3)	pET22b_ <i>desK</i>	DesK salvaje	-	37	5,9	
TB	BL21 (λDE3)	pET22b_ <i>desK</i>	DesK salvaje	0,2	20	6,3	

17.2. Optimización de la solubilización de membranas

Uno de los pasos críticos en el proceso de purificación de proteínas de membrana es la extracción de las mismas de la bicapa lipídica mediante la solubilización con detergentes. La elección del detergente apropiado, que permita maximizar la proporción de proteínas

solubilizadas, puede asociarse directamente con el éxito o el fracaso de la purificación de la proteína de membrana de interés.

En este trabajo en particular, además del grado de pureza, nos interesa que DesK y sus variantes mantengan la funcionalidad en detergente, lo cual suma otro condicionamiento para la elección del mismo. En general, los detergentes que permiten una mayor solubilización también producen la desnaturalización de las proteínas. En el protocolo 1 de aislamiento de membranas (Materiales y Métodos), aplicado en las purificaciones de DesK_{Cys-}, DesK_{T15C} y DesK_{Y28C}, se emplea Brij58 2 %. La selección de este detergente se basó en resultados previos que muestran que DesK posee mayor actividad auto-quinasa en Brij58 respecto a otros, tales como n-Dodecil-β-D-maltosido (DDM), polietilen-glicol P-1,1,3,3-tetrametil-butilfenil-eter (Tritón X-100), polioxietilen-sorbitan-monolaurato 20 (Tween 20), 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) y óxido de laurildimetilamina (LDAO) [142].

Con estas consideraciones, evaluamos la solubilización de las proteínas de membrana en Brij58, LDAO y DDM como se describe en Materiales y Métodos. Brevemente, las membranas celulares, recuperadas por centrifugación de los extractos crudos a 200.000 g, se resuspendieron y solubilizaron con cada uno de estos detergentes en la concentración deseada, y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con balanceo suave. En cada caso se recuperó la fracción soluble conteniendo las proteínas de membrana solubilizadas mediante centrifugación a 200.000 g. Las mismas se analizaron por SDS-PAGE junto con las proteínas de membranas totales. A partir de estos geles se cuantificaron las proteínas totales y solubilizadas mediante densitometría, y se calculó el porcentaje solubilizado en cada detergente (Tabla VII).

Tabla VII: Pruebas de solubilización de proteínas de membrana con detergentes puros y mezclas de Brij58 y DDM en diferentes proporciones. Las membranas se homogeneizaron en la solución *buffer* B (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 300mM, β-mercaptoetanol 5mM, glicerol 5%) y se les agregó el detergente en la concentración final indicada. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C con balanceo suave. La fracción soluble se recuperó por centrifugación a 200.000 g. Las muestras de proteínas de membranas totales y solubilizadas se analizaron por SDS-PAGE y las proteínas totales de cada calle se cuantificaron por densitometría. Se calculó el porcentaje de proteínas solubilizadas en función de las proteínas totales.

Detergente (concentración final %)	Proteínas solubilizadas (%)
Detergentes puros	
LDAO (1%)	87
DDM (1%)	80
Brij58 (2%)	50
Mezclas de detergentes	
[proporción de mezclas]	
Brij58 (2%) + DDM (0,1%) [20:1]	76
Brij58 (2%) + DDM (0,5%) [4:1]	68
Brij58 (2%) + DDM (1%) [2:1]	67

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla VII, al evaluar detergentes puros, se observa una mejor solubilización de membranas con LDAO 1% (87) y con DDM 1% (80), respecto al Brij58 2%. Por lo tanto, los dos primeros serían los indicados para extraer la mayor cantidad de proteínas de las membranas celulares. No obstante, de acuerdo a resultados previos, el detergente DDM en concentración 0,15% inhibe completamente la actividad auto-quinasa de DesK [142]. Respecto a LDAO, evaluamos su efecto sobre la actividad de la porción catalítica DesKC. El agregado de LDAO 0,5% inhibió completamente la fosforilación *in vitro* de DesKC (resultados no mostrados).

En vista de estos resultados, optamos por evaluar la solubilización de membranas con mezclas de Brij58 y DDM en proporciones 2:1; 4:1 y 20:1. Como se muestra en la Tabla VII, la mezcla de Brij58 y DDM, en cualquier proporción, mejora el rendimiento de solubilización de las proteínas respecto al Brij58 por sí solo.

En base a estos resultados, intentamos mejorar la estrategia de purificación modificando el protocolo de obtención de membranas (protocolo 2 de aislamiento de membranas, en Materiales y Métodos), solubilizando las mismas con una mezcla de Brij58 2% y DDM 0,1%. Luego se purificó DesK mediante una cromatografía de afinidad a níquel, obteniéndose entre dos y tres veces más de proteína (~1 mg total) que en las purificaciones previas en las que se aplicó el protocolo 1, que utiliza sólo Brij58 (~0,4 mg total).

Por otra parte, para evitar el efecto inhibitorio del DDM sobre la actividad de DesK

se realizó un intercambio de detergentes durante la cromatografía de afinidad a níquel, para lo cual los lavados de la resina y las eluciones de las proteínas se realizaron con soluciones que contienen únicamente Brij58 0,1%. De este modo, la cantidad remanente de DDM en las fracciones eluidas sería ínfima. Aun así, para comprobar si el remanente de DDM afecta la funcionalidad de DesK, procedimos a evaluar la actividad auto-quinasa *in vitro* de esta proteína luego de haber sido solubilizada con la mezcla de Brij58 2 % – DDM 0,1 %, y de haber removido el DDM en la cromatografía de afinidad a níquel. Como se muestra en la Figura 29, la actividad específica de DesK purificada en estas condiciones es similar a la actividad de la misma habiendo sido solubilizada sólo con Brij58 ($7,3 \times 10^6$ UA/mg.min). Por lo tanto, es posible utilizar el detergente DDM junto con Brij58 para solubilizar las proteínas de membrana, eliminándolo luego en los lavados, sin que se afecte la actividad de DesK.

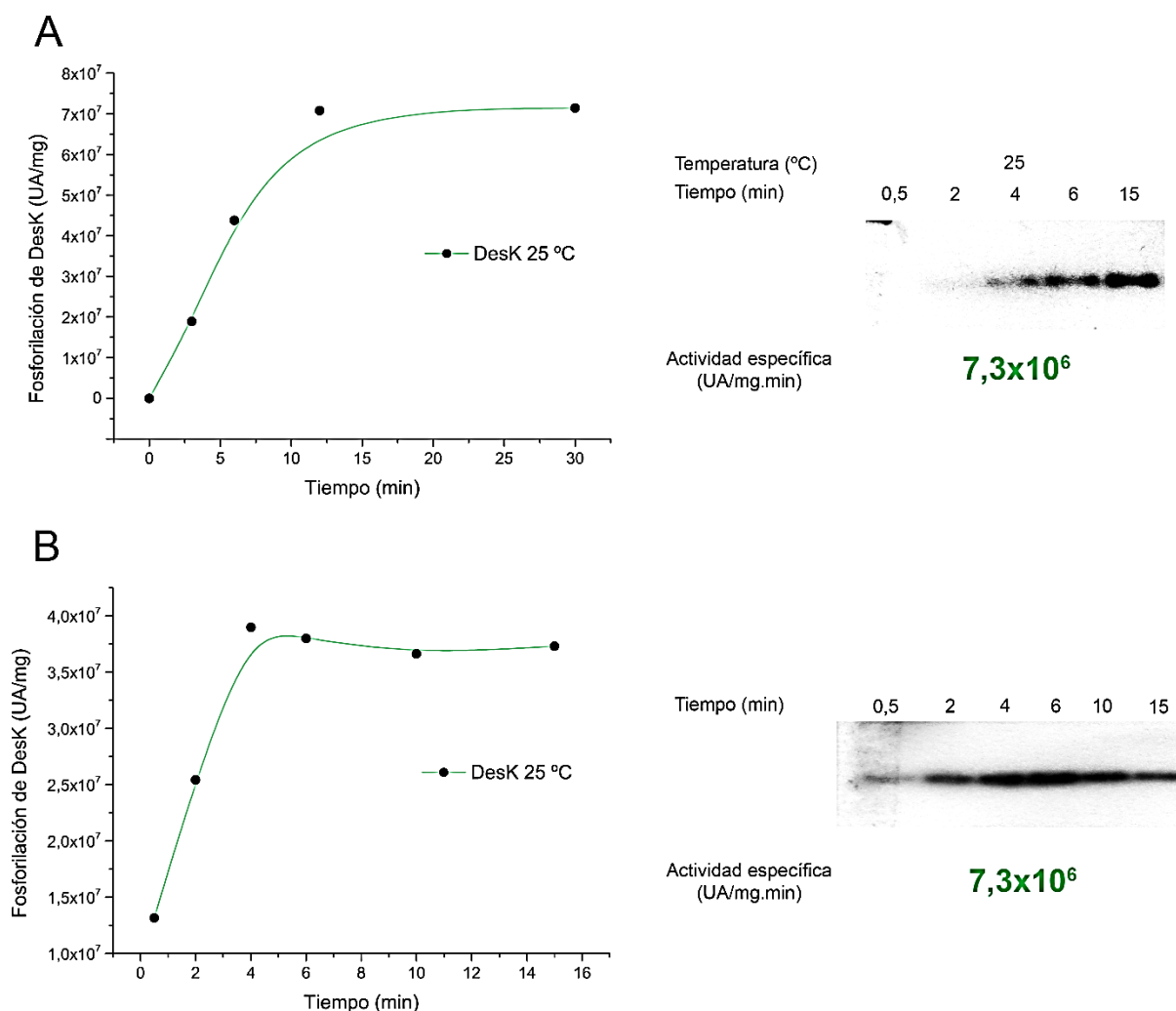


Figura 29: Fosforilación *in vitro* de DesK salvaje solubilizada sólo con Brij58 2% (A) o con una mezcla de Brij58 2% – DDM 0,1% (B). Se purificó DesK salvaje con una cromatografía de afinidad a níquel en la cual las soluciones de lavado y de elución no contienen DDM. Las fracciones eluidas se utilizaron para medir la actividad auto-

quinasa de DesK salvaje *in vitro*. El agregado de DDM 0,1% para solubilizar las membranas no afecta la actividad de DesK si el mismo es eliminado durante la cromatografía de afinidad.

17.3. Optimización de la purificación de DesK

Luego de haber optimizado las condiciones de crecimiento bacteriano, expresión de proteínas y solubilización de membranas nos enfocamos en mejorar la purificación de DesK. Como mostramos más arriba, algunas proteínas contaminantes que eluyen junto a DesK en la cromatografía de afinidad a níquel, también migran junto a DesK en la cromatografía SEC (Figura 25). Por este motivo, nos propusimos incrementar la pureza de las muestras antes de aplicar la cromatografía SEC, la cual se utilizaría como último paso de purificación y análisis de homogeneidad. Además, considerando que en las cromatografías SEC las muestras se diluyen, es indispensable contar con muestras de alta concentración proteica antes de este paso. Sin embargo, incrementar la concentración de las proteínas de membrana sin provocar su precipitación o desnaturalización no es trivial. El uso de tubos concentradores con membranas semipermeables es un método que permite controlar el proceso de concentrado y llevarlo a cabo sin modificar el pH u osmolaridad de la muestra, y sin aditivos precipitantes. Estas condiciones permiten mantener la funcionalidad de las proteínas. Sin embargo, la eficiencia de este proceso con proteínas de membrana es variable dependiendo de la proteína en particular y del detergente utilizado, ya que los detergentes no dializables, como Brij58, pueden unirse o concentrarse cerca de la membrana semipermeable, alterando la concentración de sales y de la proteína en esa zona y en muchos casos provocando la precipitación de la misma. Utilizando este método, en este trabajo sólo se logró incrementar la concentración de las proteínas de interés hasta 2 veces antes de observar la formación de precipitados. Considerando este limitante, resulta fundamental mejorar el paso inicial de purificación, es decir la cromatografía de afinidad a níquel, para obtener las proteínas con la máxima pureza y concentración posible antes de llevar a cabo la cromatografía SEC.

Con esta premisa aplicamos diversos protocolos a las diferentes proteínas de fusión como se detalla a continuación.

17.3.1. DesK_{Y28C}_TEV

A continuación, para intentar mejorar la pureza y concentración de la muestra antes de la SEC, trabajamos con el plásmido pEMI17 (Tabla IV) que expresa DesK_{Y28C} fusionada

a una cola de 6His en el extremo C-terminal y un sitio de corte para la proteasa TEV. Como se mencionó más arriba, la proteólisis controlada con TEV luego de la cromatografía de afinidad a níquel, permitiría separar DesK de la cola 6His y recuperarla con mayor pureza en el volumen no retenido (V_0) de una segunda cromatografía de afinidad.

Así, purificamos DesK_{Y28C}_TEV mediante una primera cromatografía de afinidad a níquel, en la cual la proteína eluyó principalmente con imidazol 100 mM. Al igual que en purificaciones anteriores (por ejemplo en la Figura 24) en la misma fracción eluyeron muchas proteínas contaminantes (Figura 30A). Esta fracción se incubó con TEV en una proporción 1:1 (TEV:DesK_{Y28C}_TEV) durante toda la noche a 4°C y posteriormente se volvió a sembrar en una columna de afinidad a níquel. El análisis de las eluciones de esta segunda cromatografía muestra que no hubo proteólisis por TEV, ya que DesK_{Y28C} no eluyó en V_0 sino que quedó unida a la resina de níquel y eluyó junto con las proteínas contaminantes al lavar la columna con imidazol 500 mM (Figura 30B).

Considerando una posible deficiencia en la proteólisis debido a la temperatura de incubación o a la proporción de TEV, volvimos a incubar las muestras con exceso de proteasa, 10:1 (TEV: DesK_{Y28C}_TEV), a 15°C y 25°C (Figura 30C). Nuevamente, en ninguna de las muestras observamos una banda de menor peso molecular que corresponda a la proteína sin la cola 6His. En base a estas evidencias es posible que el sitio reconocido por TEV no esté accesible cuando se expresa en el extremo C-terminal de DesK.

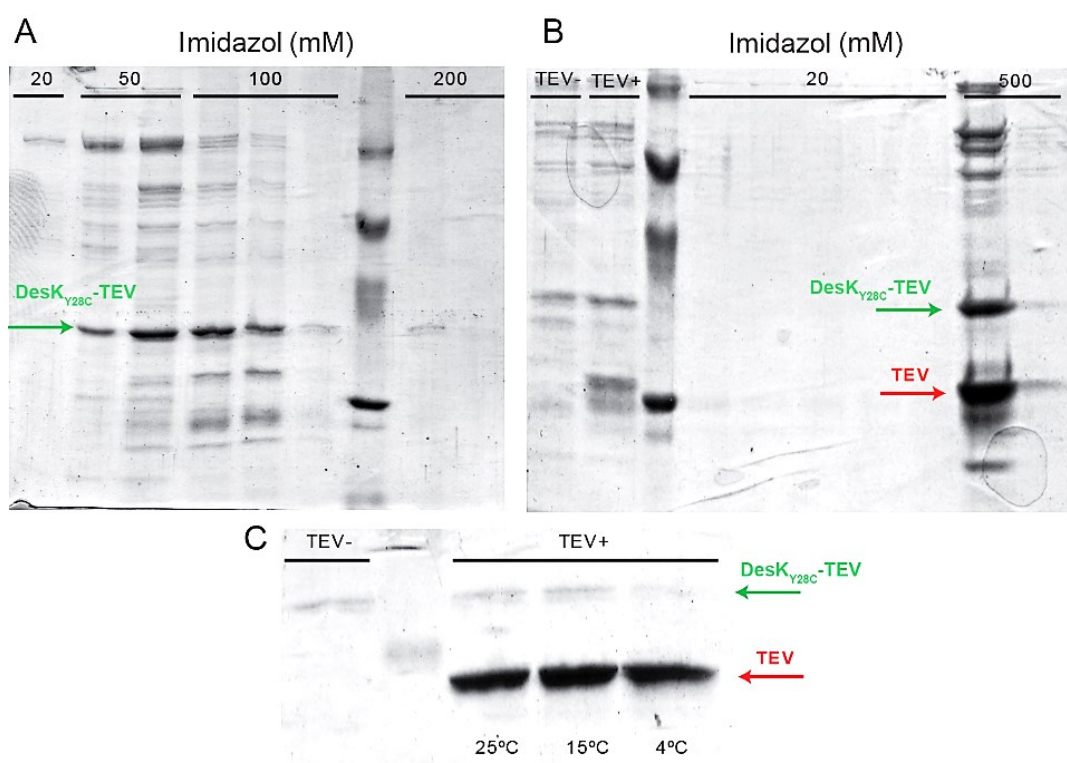


Figura 30: Análisis de la purificación de DesK_{Y28C}_TEV por SDS-PAGE. A) DesK_{Y28C}_TEV eluye de la resina de níquel principalmente a 50 mM y 100 mM de imidazol. B) La incubación de estas fracciones con TEV en proporción 1:1 (TEV: DesK_{Y28C}_TEV) durante toda la noche a 4 °C no logró escindir la cola 6His, por lo cual en la segunda cromatografía DesK_{Y28C}_TEV interacciona fuertemente con la resina y eluye junto con las demás proteínas contaminantes con 500 mM de imidazol. C) Se evaluó la proteólisis de la proteína de fusión con TEV en proporción 10:1 (TEV: DesK_{Y28C}_TEV) incubando toda la noche a 4 °C, 15 °C y 25 °C pero no se observó la escisión de la cola 6His en ninguno de los casos. TEV- y TEV+ indican muestras sin tratar y tratadas con TEV, respectivamente.

En este punto, en el cual no logramos cortar la cola de 6His para intentar mejorar la pureza de la muestra, volvimos a analizar las proteínas contaminantes identificadas por espectrometría de masas, buscando algún indicio que nos permita diseñar una estrategia para eliminarlas. En este análisis observamos que los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas contaminantes (pI < 7) difieren significativamente del pI calculado para DesK (pI = 9,17). De acuerdo a esto, en una solución de pH=8 DesK tendría carga neta positiva mientras que las proteínas contaminantes tendrían carga neta negativa. Por este motivo, decidimos evaluar la purificación de DesK_{Y28C}_TEV mediante una cromatografía de intercambio aniónico. En esta cromatografía DesK_{Y28C}_TEV debería eluir en el volumen no retenido mientras que las proteínas contaminantes quedarían unidas a la resina.

Para este fin, utilizamos las muestras de DesK_{Y28C}_TEV eluidas en la segunda cromatografía de afinidad a níquel que previamente habían sido incubadas con TEV (Figura 30B). La misma se sembró en una columna de intercambio aniónico (Q *Sehparose*), equilibrada con solución A (Tris 20 mM pH=8, NaCl 20 mM, Brij58 0,1 %), y las proteínas unidas a la resina se eluyeron con concentraciones crecientes de NaCl de 100 mM a 500 mM. Acorde a lo esperado, DesK_{Y28C}_TEV eluyó principalmente en el volumen no retenido en la columna y sin más contaminantes que una pequeña proporción de TEV (Figura 31). Dado que las muestras recuperadas de la cromatografía de intercambio iónico poseen una concentración proteica muy baja, esta cromatografía debería realizarse sobre una muestra inicial conteniendo a la proteína de interés en alta concentración y sin ser tratada previamente con TEV.

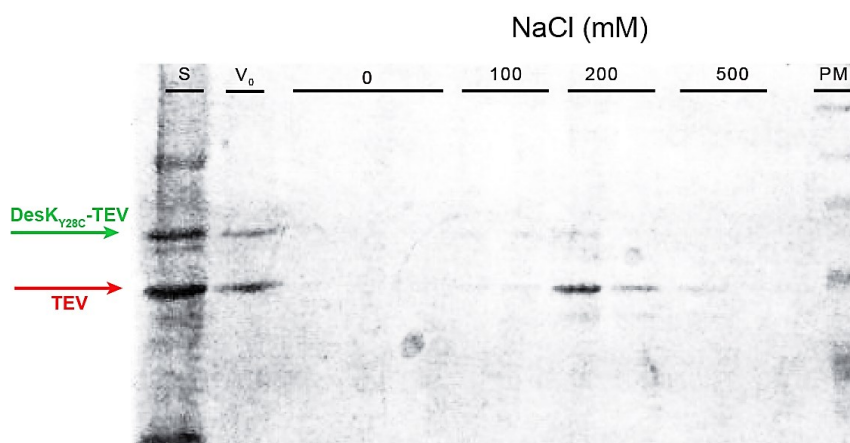


Figura 31: Análisis de la cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose). Siembra (S); volumen excluido (V_0); concentración de NaCl (0, 100, 200, 500 mM); marcador de peso molecular (PM). DesK_{Y28C}_TEV eluye diluida en V_0 junto con una fracción de TEV, mientras que las proteínas contaminantes se unen a la resina y eluyen principalmente con NaCl 200 mM.

17.3.2. TEV_DesK_{Y28C}

Como mencionamos más arriba, es posible que el sitio proteolizable por TEV no sea accesible cuando se expresa en el extremo C-terminal de DesK. Entonces, construimos el plásmido pEMI20 para expresar DesK_{Y28C} con el sitio proteolizable por TEV y la cola 6His en el extremo N-terminal. Al igual que en las purificaciones anteriores, la mayor proporción de TEV_DesK_{Y28C} eluyó de la primer cromatografía de afinidad con imidazol 100 mM junto con la mayoría de las proteínas contaminantes (Figura 32A). Sin embargo, en este caso también se recuperó una gran proporción de TEV-DesK_{Y28C} en las fracciones eluidas con imidazol 250-500 mM, y con mayor pureza que la fracción de imidazol 100 mM. Las fracciones eluidas con 250-500 mM fueron incubadas con TEV durante toda la noche a 23 °C, y posteriormente analizadas por SDS-PAGE. En este caso, observamos una banda que correspondería a DesK_{Y28C} sin la cola 6His (Figura 32B). Por lo tanto, esta muestra se sembró en una columna de afinidad a níquel para recuperar DesK_{Y28C} en el volumen no retenido. Como se observa en la Figura 32C, la cantidad de DesK_{Y28C} en la muestra tratada con TEV es menor que en la muestra sin tratar, lo que podría deberse a la degradación o precipitación de TEV_DesK_{Y28C} durante la incubación con TEV a 23 °C. De todas formas, esta estrategia permitió recuperar DesK_{Y28C} en el volumen no retenido de la cromatografía de afinidad y podría aplicarse a una mayor cantidad inicial de proteína obtenida por ejemplo a partir de un mayor volumen de cultivo bacteriano.

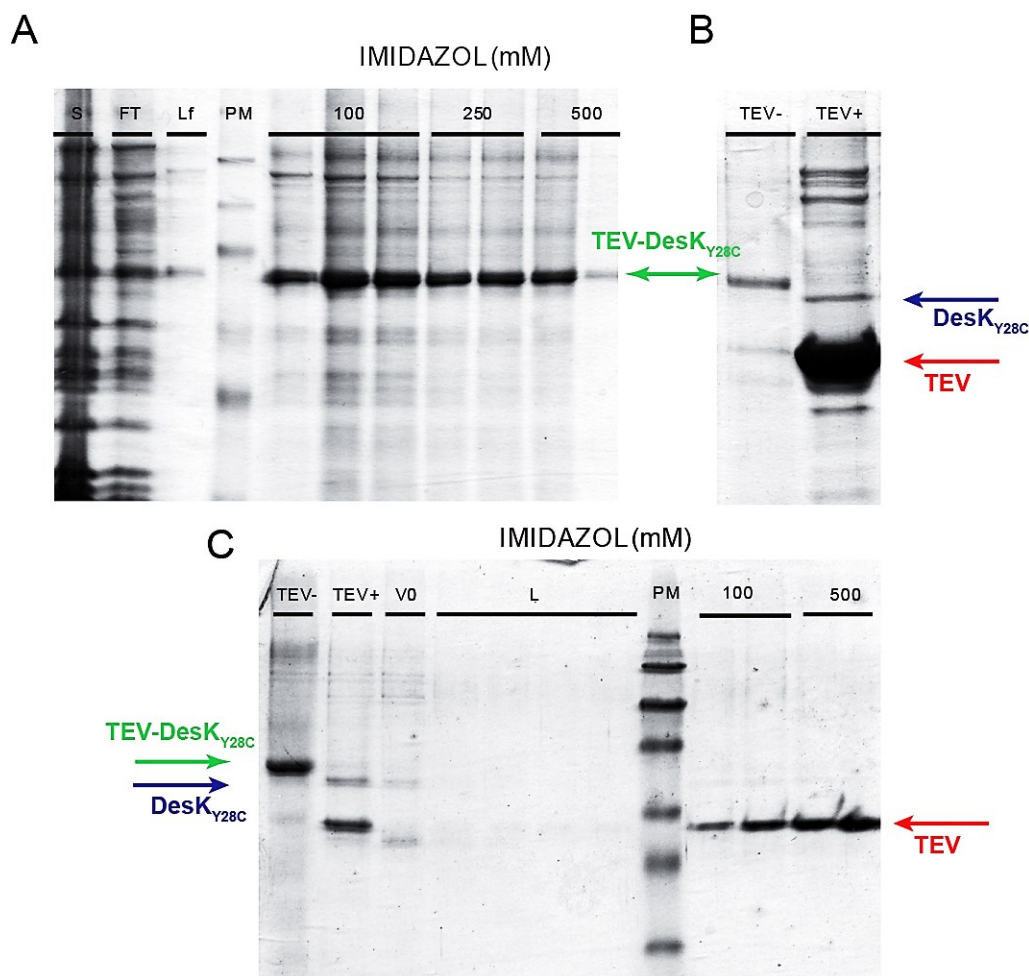


Figura 32: Análisis de la purificación de TEV_DesK_{Y28C}. Siembra (S), Volumen no retenido (FT), lavado final (Lf), marcadores de peso molecular (PM), muestra sin TEV (TEV-), muestra con TEV (TEV+). (A) TEV_DesK_{Y28C} eluye de la resina de níquel principalmente a 100 mM y 250 mM de imidazol, aunque con 500 mM eluye más pura. (B) Las fracciones 250-500 mM se incubaron con TEV durante toda la noche a 23°C permitiendo obtener DesK_{Y28C} sin la cola 6His. (C) Luego del corte con TEV se realizó una cromatografía de afinidad a níquel y se observó la elución de DesK en el volumen no retenido. A 100 mM y 500 mM de imidazol eluyó la mayor proporción de TEV.

17.3.3. DesK_{Y28C}_TEV-GFP

Con el fin de continuar evaluando posibles estrategias para optimizar la pureza de DesK decidimos utilizar el vector de expresión pWALDO-GFPd, el cual permite expresar DesK fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). La detección de GFP por fluorescencia facilita el seguimiento de la proteína en cada etapa de la purificación mediante la observación a simple vista de color verde. Además, este vector incorpora un sitio proteolizable por TEV entre DesK y GFP, y una cola de 8His en el extremo C-terminal de la

proteína de fusión que permite una mayor interacción con la resina de níquel en comparación a la cola 6His. Como se observa en la Figura 33A y 32B, la unión a la resina con 8His efectivamente incrementa la pureza de DesK_{Y28C}_TEV-GFP ya que la misma eluye principalmente con imidazol 500 mM, es decir, 5 veces superior a la concentración necesaria para eluir a las proteínas con 6His. Posteriormente, estas fracciones se incubaron con TEV y se analizó la proteólisis mediante SDS-PAGE y revelado por fluorescencia observándose la desaparición de la banda correspondiente a DesK_{Y28C}_TEV-GFP, lo cual se correspondería con un corte proteolítico efectivo (Figura 33C). No obstante, al analizar las mismas muestras por inmunodetección con anticuerpos anti-DesKC, sólo se observa la disminución de la banda que corresponde a la proteína de fusión y no se observa la aparición de la banda correspondiente a DesK_{Y28C} (Figura 33D). Esto podría deberse a la degradación de la proteína durante el tiempo de incubación con TEV, principalmente a 20°C y 25°C.

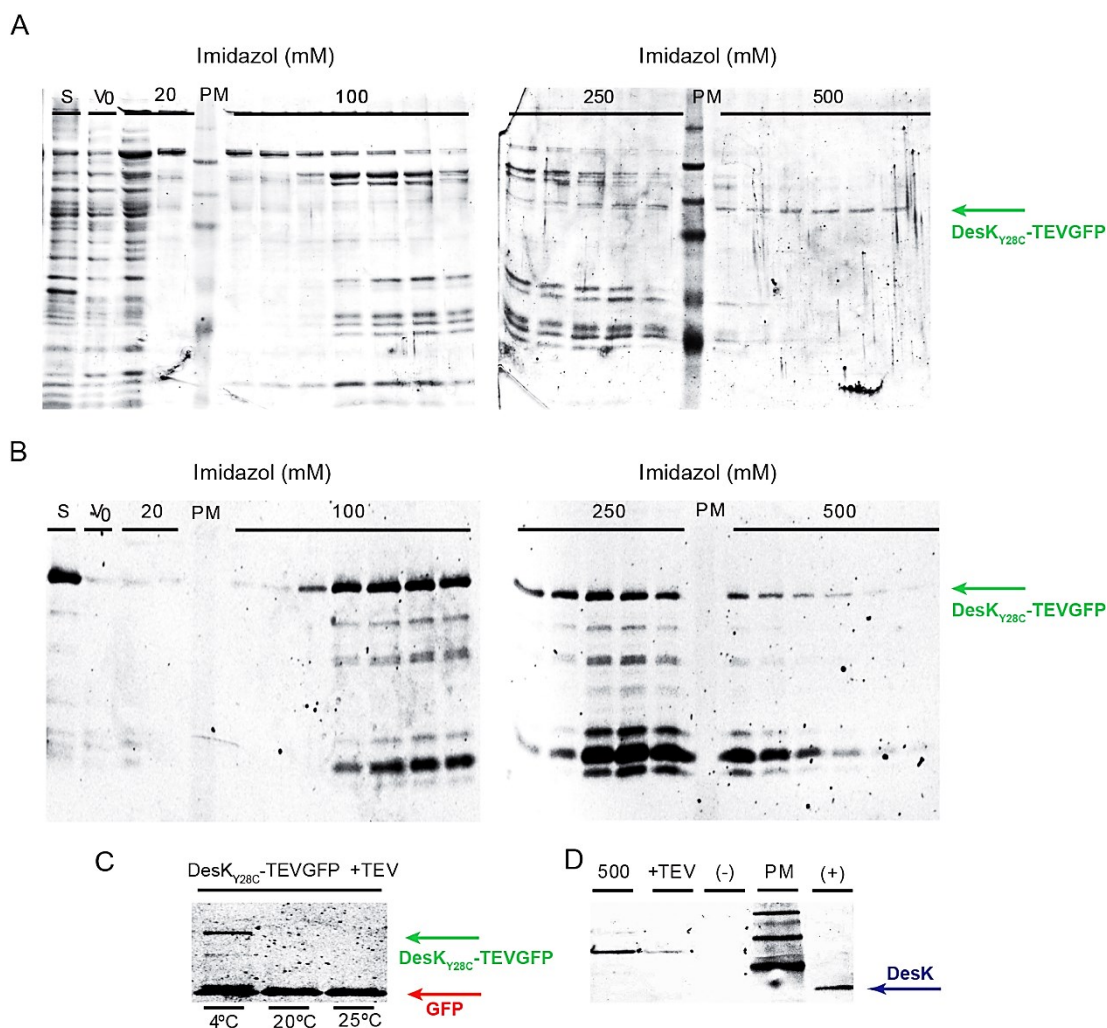


Figura 33: Análisis de la purificación de DesKY28C-TEV-GFP. (A) Tinción con coomassie. DesKY28C-TEV-GFP eluye de la resina de níquel con altas concentraciones de imidazol (500 mM) (B) Revelado por fluorescencia.

Se corrobora lo observado con la tinción de azul brillante de coomassie. (C) Revelado por fluorescencia de la proteólisis por TEV. La banda correspondiente a DesKY28C-TEV-GFP no desaparece al incubar con TEV a 4°C, pero sí lo hace al incubar con TEV a 20 °C y 25 °C. (D) Inmunodetección con anticuerpos anti-DesKC. La intensidad de la banda correspondiente a DesKY28C-TEV-GFP disminuye luego del tratamiento proteolítico con TEV pero no se observa la aparición de la banda correspondiente a la proteína escindida.

18. Integración de DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en liposomas

Como mostramos en la introducción, las proteínas de membrana se adaptan al entorno lipídico cambiando su conformación. Sumado a esto, es sabido que las proteínas de membranas solubilizadas en detergente pueden sufrir cambios conformacionales y funcionales que las alejan de su estado nativo en membranas lipídicas [140,143]. Con estas consideraciones, y en paralelo con las pruebas de purificación en detergente, decidimos reconstituir a las proteínas DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en liposomas de lípidos de *E. coli* (Figura 34). Para esto, previamente purificamos DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en micelas de Brij58, recuperando las membranas plasmáticas mediante el protocolo 2 (Materiales y Métodos) y una posterior cromatografía de afinidad a níquel.

El protocolo de integración se basa en la preparación de liposomas vacíos y la posterior incorporación de las proteínas previamente purificadas en micelas de detergente. Para favorecer la integración, el detergente se elimina utilizando cuentas de poliestireno adsorbentes. Este intercambio de un ambiente micelar a uno de bicapa favorece la integración de las proteínas más hidrofóbicas y restringe la integración del resto de las proteínas. Luego, un paso de centrifugación en gradiente de sacarosa permite separar los proteoliposomas de las proteínas no integradas, lo cual incrementa notablemente la pureza de las muestras. Como se observa en la Figura 34, las muestras de proteínas purificadas en detergente mediante una cromatografía de afinidad a níquel contienen muchas proteínas contaminantes (Figura 34A), que no se presentan en las muestras de proteoliposomas (Figura 34B). Una centrifugación final permite resuspender los proteoliposomas en el volumen necesario para alcanzar la concentración proteica deseada. De acuerdo a estos ensayos, la integración en liposomas podría permitir obtener muestras proteicas homogéneas, lo cual aún debemos corroborar por cromatografía SEC.

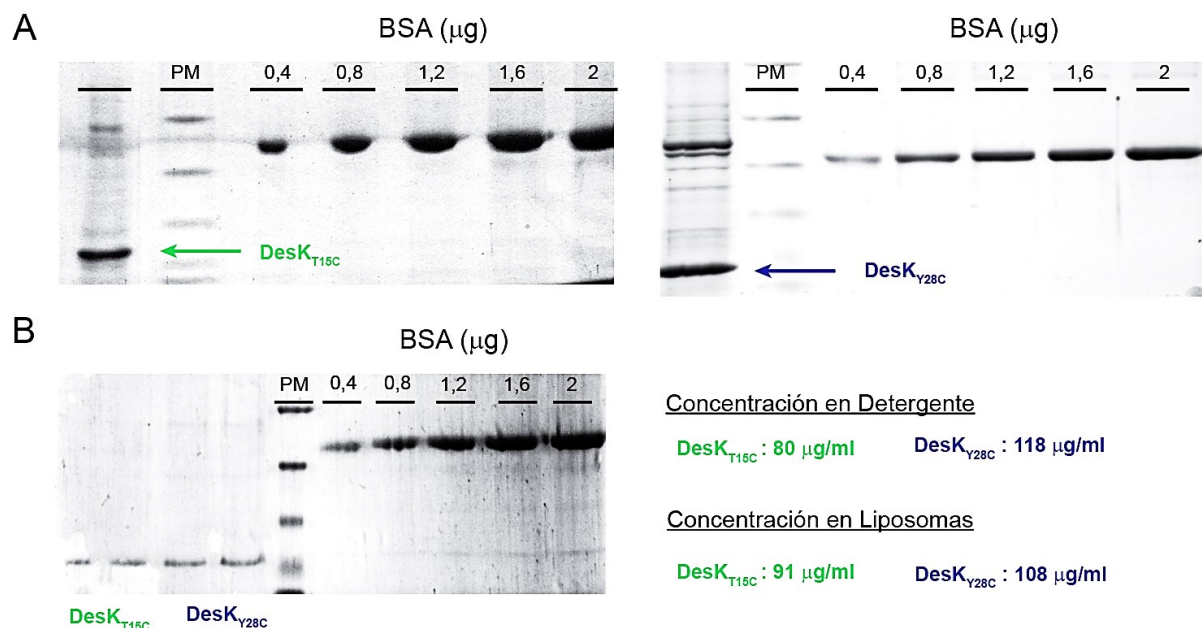


Figura 34: SDS-PAGE de DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} purificadas en detergente (A) y posteriormente reconstituidas en liposomas (B). Las muestras se sembraron en un mismo gel con albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones crecientes, y las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando las concentraciones de BSA para construir una curva de calibración. El proceso de reconstitución en liposomas permite que se integren principalmente las variantes de DesK, restringiendo la mayor parte de las proteínas contaminantes a la fracción soluble. La intensidad de las bandas correspondientes a DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en el panel B es menor que en el panel A debido a que se sembró menos volumen de muestra.

19. Actividad auto-quinasa de DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en liposomas

Luego de reconstituir DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} en liposomas, evaluamos la actividad auto-quinasa *in vitro* utilizando el mismo protocolo empleado con las proteínas en detergente. Como se observa en la Figura 35, ambas proteínas muestran actividad auto-quinasa regulada por temperatura.

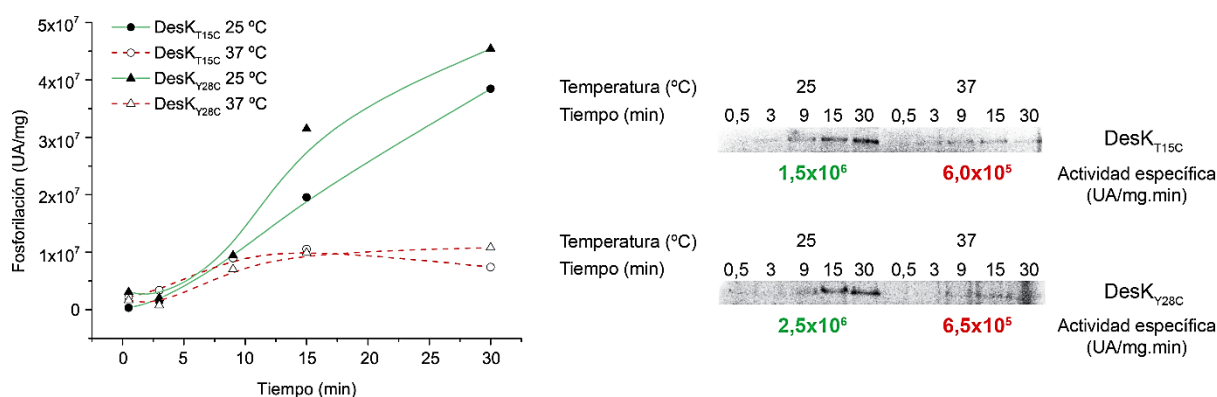


Figura 35: Fosforilación *in vitro* de DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} insertadas en liposomas formados con lípidos de *E. coli*. Los proteoliposomas se incubaron con [³²P-γ] ATP a 25 °C o 37 °C, se tomaron alícuotas de las reacciones a distintos tiempos, y las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior auto-radiografía (derecha). Las bandas se cuantificaron por densitometría, y los valores expresados en unidades arbitrarias por miligramo de proteína (UA/mg) se graficaron en función del tiempo. La actividad específica (UA/mg.min) se determinó a partir de la pendiente inicial de las curvas (izquierda). DesK_{T15C} y DesK_{Y28C} poseen actividad auto-quinasa, y ésta es regulada en función de la temperatura, siendo entre 2,5 veces (DesK_{T15C}) y 3,5 veces (DesK_{Y28C}) mayor a 25 °C que a 37 °C.

Considerando los niveles de pureza de las variantes de DesK y las medidas de actividad de las mismas, el protocolo de purificación de estas proteínas en micelas de Brij58 mediante una cromatografía de afinidad a níquel y la posterior reconstitución en liposomas brindaría, en principio, las condiciones requeridas para continuar con los estudios biofísicos con el fin de comprender la estructura y dinámica de los segmentos TM durante la detección de la señal mediante marcación de *spin* sitio-dirigida y CW-EPR.

20. Análisis informático de covariancia de residuos de aminoácidos

Como mencionamos más arriba, en vista de realizar los experimentos de EPR, es importante utilizar una estrategia que permita seleccionar las posiciones a marcar con la sonda dentro de los segmentos TM de DesK, de manera tal de obtener la mayor información estructural y dinámica posible con el menor número de proteínas marcadas, es decir con el menor número de variantes de DesK. Recientemente, mediante un análisis informático de covariancia de residuos se logró identificar y validar pares de aminoácidos que se encuentran cercanos en la estructura cuaternaria de complejos proteicos, tales como EnvZ-OmpR, BruC-BtuF y BtuC-BtuD, entre otros [144,145]. Este análisis se basa en la identificación de cambios evolutivos relacionados en la secuencia de aminoácidos, es decir, posiciones de

residuos que evolucionan a la par, utilizando apilamientos de secuencias de proteínas relacionadas evolutivamente [145]. A partir de estos análisis también sería posible identificar pares de residuos de distintos dominios que interactúan en una misma proteína, y cuya interacción podría ser relevante para la estructura y/o función de la misma.

Por lo tanto, con el fin de obtener información sobre las posibles interacciones entre residuos del dominio TM de DesK, que nos permita dirigir los futuros experimentos de EPR hacia posiciones particulares, utilizamos esta herramienta de análisis de covariancia de residuos provista por el servidor *evfold* (<http://evfold.org/evfold-web/evfold.do>). De acuerdo a este análisis, en DesK las interacciones más probables se producirían entre residuos que se localizan principalmente en la interface lípido-agua extracelular de los segmentos TM2-TM3 (Ser75-Ser51), TM4-TM5 (Glu128-Ser122, Glu128-Asn120 y Thr132-Lys126), y TM3-TM5 (Ser143-Ser83) (Figura 36).

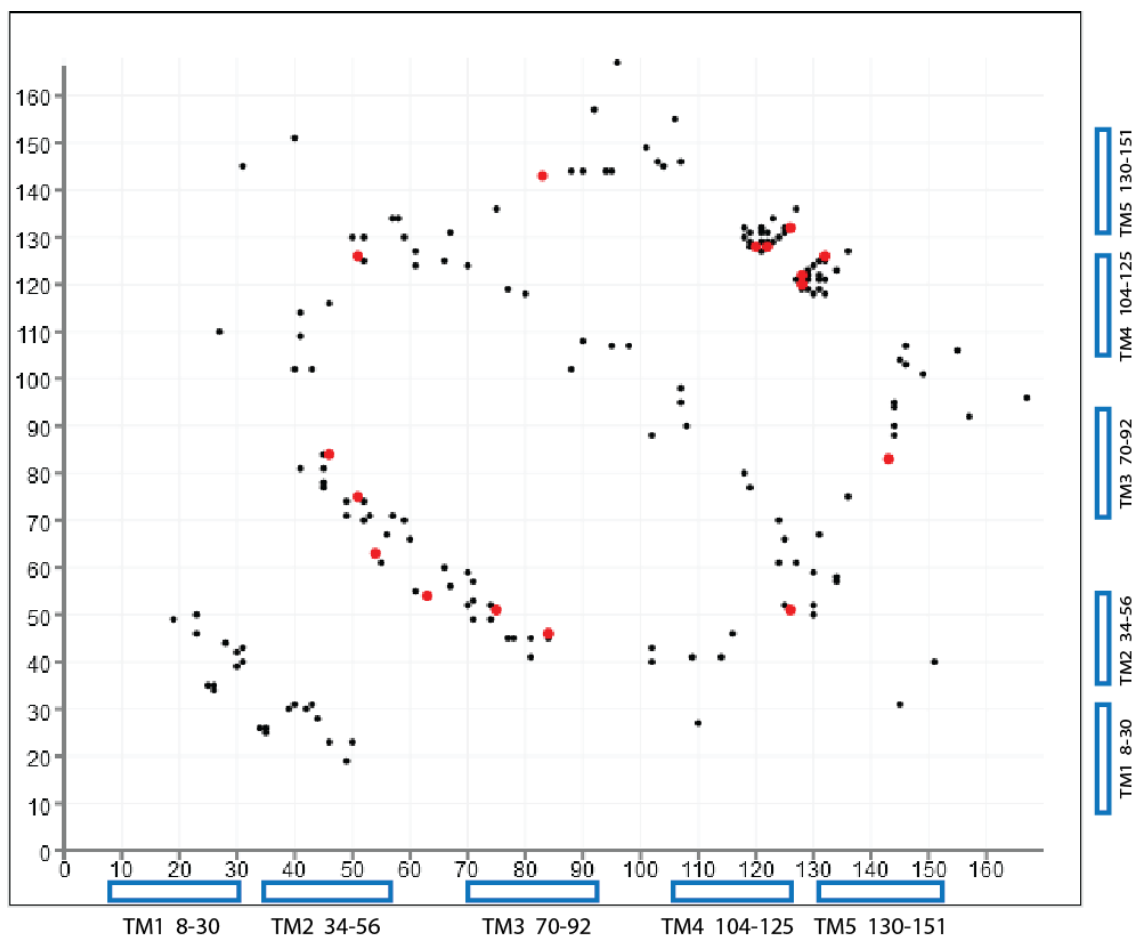


Figura 36: Gráfico de covariancia de residuos arrojado por el servidor *evfold.org*. Los ejes corresponden al número de residuo de la secuencia de DesK. Los puntos negros indican posibles interacciones con baja probabilidad. Los puntos rojos indican posibles interacciones por enlaces de hidrógeno con alta probabilidad.

Abajo y a la derecha se marcan los residuos que forman los segmentos transmembrana (TM1: 8-30, TM2: 34-56, TM3: 70-92, TM4:104-125 y TM5: 130-151).

En función de estos resultados de covariancia, próximamente generaremos variantes de DesK mediante mutaciones puntuales de los residuos Ser51, Ser75, Ser83, Asn120, Ser122, Lys126, Glu128, Thr132 y Ser143, reemplazándolos por residuos de cisteínas para el estudio por marcación de *spin* sitio-dirigida y CW-EPR. Las mismas deberían sobreexpresarse, purificarse en micelas de detergente, marcarse con la sonda de *spin* y luego insertarse en liposomas para las posteriores mediciones por EPR. La información estructural que podría obtenerse a partir de estos ensayos sería fundamental para la comprensión del mecanismo de acción de los segmentos TM de DesK durante el sensado de temperatura.

21. Discusión

En este trabajo nos propusimos estudiar los eventos moleculares transcurridos en los segmentos transmembrana del termosensor DesK de *B. subtilis* durante la detección de la señal que activa el sistema, utilizando técnicas de marcación de *spin* sitio-dirigida y EPR. Esta técnica requiere de proteínas marcadas con una sonda de *spin*. El proceso de marcación de *spin* sitio-dirigida con la sonda MTSSL, que se une a residuos de cisteína mediante la formación de enlaces disulfuro, requiere ciertos estándares que pueden ser difíciles de alcanzar. En primer lugar, en la secuencia aminoacídica de la proteína en cuestión debe haber un único residuo de cisteína ubicado en la posición en que se desea introducir la sonda de *spin*, lo cual puede requerir la sustitución de varios residuos en la secuencia salvaje y por lo tanto se deben seleccionar reemplazos que no afecten la estructura o funcionalidad de la proteína en estudio. Además, las proteínas a marcar deben purificarse a homogeneidad para evitar la marcación de proteínas contaminantes que podrían interferir en las mediciones por EPR. Alcanzar dichos estándares no es trivial y en particular con proteínas de membrana el uso de detergentes, necesarios para solubilizar las mismas, puede generar mayores complicaciones.

La dificultad de trabajar con proteínas de membrana se evidencia en el número de estructuras conocidas. De acuerdo a las bases de datos existen 115804 estructuras de proteínas (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), de las cuales 2671 corresponden a proteínas de membrana (PDBTM: <http://pdbtm.enzim.hu/>), y sólo 587 de éstas son estructuras únicas (*Membrane Proteins of Known 3D Structure:*

<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>), es decir que sólo el 2% de las estructuras proteicas conocidas corresponde a proteínas de membrana.

Con la intención de purificar DesK y sus variantes para los posteriores estudios por EPR, se ensayaron diversas técnicas cromatográficas y se optimizaron los pasos previos de expresión y solubilización de membranas, de modo tal de maximizar la pureza y la cantidad de proteína recuperada. De acuerdo a estos estudios, sería factible en principio establecer un protocolo para purificar DesK y sus variantes a homogeneidad en micelas de detergente que aún nos resta verificar. En este protocolo, las proteínas expresadas a partir de células transformantes, BL21 o C41, se crecerían en el medio de cultivo TB a 20 °C durante 14-16 hs post inducción con IPTG 0,2 mM. A partir de estos cultivos bacterianos se recuperarían las membranas plasmáticas por disrupción celular y posterior centrifugación a 200.000 g, y se solubilizarían las mismas con una mezcla de detergentes Brij58 2 % – DDM 0,1 %. Luego, las membranas solubilizadas se sembrarían en una columna de afinidad a níquel. Las fracciones eluidas con imidazol enriquecidas en la proteína de interés se sembrarían en una columna de intercambio aniónico (*Sepharose Q*) en la cual DesK y sus variantes eluirían en el volumen no retenido. Con esta muestra, se aplicaría una cromatografía SEC como último paso de purificación y análisis de homogeneidad.

Por otra parte, la reconstitución en proteoliposomas de DesK_{T15C} y DesK_{Y28C}, previamente purificadas en micelas de Brij58 mediante una cromatografía de afinidad a níquel, permitió incrementar la pureza de las mismas. Además, estas variantes de DesK insertadas en liposomas formados por lípidos de *E. coli* poseen actividad auto-quinasa regulada por temperatura, de manera similar a DesK salvaje. Si bien aún resta analizar la homogeneidad de estas muestras mediante una cromatografía SEC, de acuerdo a lo observado en los análisis de los proteoliposomas por SDS-PAGE y la funcionalidad de las proteínas en estas muestras, sería posible en principio aplicar el mismo protocolo para otras variantes de DesK con el fin de continuar con la marcación de *spin* y las mediciones por EPR.

Hasta el momento, los estudios *in vitro* de DesK completa requerían la utilización de un sistema de expresión *in vitro* libre de células [119,142]. Aunque estos sistemas fueron muy útiles para determinar la actividad de DesK asociada a liposomas, los mismos son muy costosos para ser usados de forma rutinaria. Por el contrario, el protocolo de purificación en detergentes y posterior reconstitución en liposomas optimizado durante este trabajo de Tesis, permite obtener a DesK a partir de cultivos bacterianos en concentración y pureza suficientes para estudios biofísicos posteriores y a costos sensiblemente menores que los requeridos para

integrar DesK en liposomas por métodos *in vitro*.

Capítulo II

*Mecanismos de sensado y transmisión de la señal de
temperatura en DesK*

22. Estructura y predicciones del dominio conector de DesK

Las estructuras cristalográficas del núcleo catalítico de DesK (DesKC) en diferentes estados funcionales, proveyeron información clave respecto a la regulación de las actividades catalíticas de la proteína. DesKC presenta la estructura homodimérica característica observada en otras proteínas de la familia. Cada monómero de DesKC consiste en un dominio N-terminal antiparalelo en forma de horquilla (hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$), que contiene la histidina fosforilable, conectado mediante un *loop* a un dominio C-terminal de unión a ATP (ABD). Las horquillas de los dos monómeros interactúan entre sí formando un paquete de 4 hélices (4-HB) conocido como dominio de dimerización y fosforilación de histidina, DHp. En cada monómero el extremo N-terminal de la hélice $\alpha 1$ se extiende más allá del 4-HB, conectando el núcleo catalítico con el dominio TM sensor a través de un conector helicoidal.

La comparación de las estructuras cristalográficas de DesKC permite identificar tres estados conformacionales diferentes (fosfatasa, auto-quinasa y fosfotransferasa). La estructura de DesKC en el estado fosfatasa muestra una conformación más rígida y compacta que el estado auto-quinasa, debido a interacciones intramoleculares que permiten una unión fuerte DHp-ABD en cada monómero. Además, en el estado fosfatasa se reconoce un motivo de hélices enrolladas 2-HCC que continúa el 4-HB hacia el dominio TM, y que no se observa en la conformación auto-quinasa.

Predictores de motivos CC basados en las secuencias aminoacídicas (COILS, PCOILS [146,147]), sugieren consistentemente que el 2-HCC se extendería completamente desde el 4-HB hasta el extremo C-terminal del quinto segmento transmembrana (TM5) (Figura 37). Más aún, predicciones de estructura secundaria sugieren que la estructura helicoidal continúa de la misma forma a través de la membrana en todo el TM5. Para cumplir esta predicción, las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos se ubicarían apuntando hacia las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, mientras que los pocos residuos polares se localizarían en el núcleo del CC escondiéndose del entorno hidrofóbico e interactuando entre sí. Es decir, el arreglo de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos del segmento TM es inverso al del 2-HCC en el citoplasma (Figura 38).

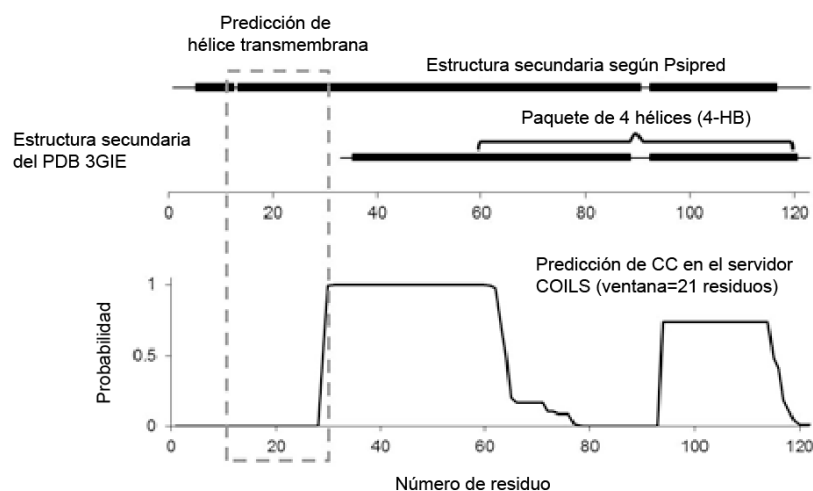


Figura 37: Resumen de predicciones basadas en la secuencia de los primeros 120 residuos de TM5-DesK: Elementos de estructura secundaria predichos por Psipred y observados en las estructuras cristalográficas, y gráficos de probabilidad de motivos CC generados por el servidor COILS con una ventana de 21 residuos. La probabilidad de CC baja a cero en la zona transmembrana porque este algoritmo de predicción no considera las regiones transmembrana, es decir que los cambios de polaridad de residuos son necesarios para la formación de CC en un entorno hidrofóbico. Sin embargo, la predicción de conformación helicoidal no se altera en esta región.



Figura 38: Representación de los TM5 y el 2-HCC. Se destacan los residuos hidrofílicos (azul) e hidrofóbicos (cobre) del 2-HCC incluyendo el TM5. En la porción TM los residuos hidrofóbicos se encontrarían en el exterior del CC hacia las colas hidrocabonadas de los fosfolípidos de membrana, y los residuos hidrofílicos interaccionarían entre sí en el núcleo del CC. En la porción citoplasmática la organización sería inversa, con los residuos hidrofílicos en el exterior del CC y los hidrofóbicos en el núcleo del CC protegidos del entorno polar.

En la secuencia aminoacídica de DesK (Figura 39) se reconocen las repeticiones de héptadas que conforman el CC resuelto en la estructura cristalográfica, con las posiciones hidrofóbicas ocupadas por Leu160 (*d*), Leu164 (*a*), Ala167 (*d*), Ile171 (*a*), Leu174 (*d*) y Leu177 (*g*). A partir de la secuencia también pueden inferirse las héptadas que prolongarían el 2-HCC hasta la interface con la membrana, ubicando los residuos Arg157, Ser154 y Ser150 en las posiciones (*a*), (*d*) y (*a*) respectivamente.

```

MIKNHFTFQKLNIGITPYIWTIFFILPFYFIWKSSSTFVIIVGIIITLLFFSVYRFAFVSKGWTIYLWGF
LLIGISTASITLFSYIYFAFFIAYFIGNIKERVPPFHILYVHLISAAVAANFSLVLKKEFFLTQIPFVITL
  a  d  a  d  a  d  a  d
ISAILLPFSIKSRKERERLEEKLEDANERIAELVKLEERQRIARDLHDTLGQKLSLIGLKSDDLARKL
  150 153 157          167 171 174
IYKDPEQAARELKSVQQTARTSLNEVRKIVSSMKGIRLKDDELINIKQILEAADIMFIYEEEEKWPENI
SLLNENILSMCLKEAVTNVVKHSQAKTCRVDIQQLWKEVVITVSDDGTFKGEENSFSKGGHLLG
MRERLEFANGSLHIDTENGTKLTMAIPNNSK
  
```

Figura 39: Secuencia aminoacídica de DesK. Se resaltan i) el dominio sensor, incluyendo los cinco segmentos transmembrana (fondo amarillo); ii) Los residuos resueltos en las estructuras cristalográficas de DesK_{CH188V} (fondo verde); iii) el conector entre el dominio TM sensor y el dominio citoplasmático catalítico (fondo rojo). Las letras de color denotan los residuos reemplazados en DesK_{STA} (letras verdes) y DesK_{DEST} (letras rojas). Las letras *a* y *d* en minúscula marcan las posiciones de las héptadas repetidas del CC. Las cajas grises señalan los residuos del TM1 y TM5 de DesK fusionados para formar el segmento TM único de MS-DesK. MS-DesK también incluye los residuos 1 a 5 del N-terminal.

Por otra parte, la estructura cristalográfica de DesK_C correspondiente a un estado auto-quinasa (PDB 3GIE), muestra que las hélices del motivo 2-HCC se separan hacia el extremo N-terminal. La comparación de las estructuras cristalográficas de estos estados funcionales permite hipotetizar un posible mecanismo de transmisión de la señal, en el cual el motivo CC estaría presente en el estado fosfatasa y se desestabilizaría en el estado auto-quinasa, implicando que la regulación catalítica de DesK estaría directamente ligada a la estabilización/desestabilización del 2-HCC.

23. El motivo 2-HCC tiene un rol clave en la regulación de las actividades de DesK *in vivo*

Para evaluar el rol del 2-HCC en la regulación de las actividades de DesK, recientemente se diseñaron dos variantes de esta proteína en las cuales se reemplazaron

residuos de las posiciones *a* y *d* de las héptadas que conforman el 2-HCC, por residuos de mayor o menor hidrofobicidad, con la intención de favorecer o impedir la formación de este motivo, respectivamente. Así, en la variante denominada DesK_{DEST} se introdujeron residuos polares y neutros para romper las interacciones hidrofóbicas y desestabilizar el 2-HCC (Ala167Arg, Ile171Gly, Leu174Gly), mientras que en la variante denominada DesK_{STA} se introdujeron residuos altamente hidrofóbicos en las héptadas putativas (Ser150Ile, Ser153Leu, Arg157Ile), ubicadas en la región donde el TM5 sale de la membrana hacia el dominio citoplasmático (no se observaron en la estructura cristalográfica), con el fin de prolongar y estabilizar el 2-HCC (Figura 39) [126].

Las dos variantes de DesK se expresaron en las cepas DAK3 y AKP20 de *Bacillus subtilis*, diseñadas para determinar la actividad auto-quinasa y fosfatasa respectivamente, utilizando un ensayo reportero sensible a los cambios de actividad de DesK *in vivo* [120,121,148,149]. Brevemente, el promotor del gen *des*, el cual se activa sólo cuando hay flujo de fosfato desde DesK hacia DesR, se fusionó al gen reportero *lacZ* y se determinó el nivel de expresión de *lacZ* en función a la actividad β -galactosidasa [120,150]. Estos resultados mostraron que *in vivo* DesK_{DEST} tiene actividad auto-quinasa exacerbada y desregulada con la temperatura, alcanzando hasta 12 veces la actividad de DesK salvaje, y que a su vez no presenta actividad fosfatasa, tanto a 25°C como a 37°C. Por otra parte, se estableció que DesK_{STA} no muestra actividad auto-quinasa a ninguna temperatura *in vivo*, pero es capaz de frenar la transcripción de *des* a 37°C en niveles similares a DesK salvaje [126].

24. Efecto de la temperatura sobre las actividades de DesK_{STA}

Las medidas de actividad β -galactosidasa *in vivo* indican claramente que DesK_{DEST} se encuentra bloqueada en un estado auto-quinasa dominante, tanto a 37°C como a 25°C [126]. Sin embargo, estas medidas no permiten establecer con claridad la actividad de DesK_{STA} a 25°C, ya que i) el ensayo de actividad β -galactosidasa fue negativo a 25 °C y a 37 °C [126], y ii) la actividad fosfatasa se evaluó únicamente a 37°C, debido a que los altos niveles de AGIs $\Delta 5$ sintetizados por la cepa AKP20 [54], promueven la actividad fosfatasa de DesK [120]. Por lo tanto, procedimos a estudiar la regulación por temperatura de DesK_{STA} y DesK salvaje *in vitro*, purificando las proteínas sobreexpresadas en células de *E. coli* mediante el protocolo establecido en el capítulo I de esta tesis y detallado en la sección Materiales y Métodos.

24.1. Actividad de DesK_{STA} en micelas de Brij58

Una vez purificadas DesK salvaje y DesK_{STA} en micelas del detergente Brij58, medimos la actividad auto-quinasa incubando las muestras con [³²P-γ] ATP. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se analizó el nivel de fosforilación por SDS-PAGE y autoradiografía (ver Materiales y Métodos) (Figura 40). De acuerdo a los resultados obtenidos *in vivo*, esperábamos que DesK_{STA} mostrara niveles de fosforilación mucho menores a DesK salvaje tanto a 25 °C como a 37 °C. Sin embargo, llamativamente DesK_{STA} mostró una mayor capacidad de auto-fosforilación que DesK salvaje a las dos temperaturas ensayadas. Incluso DesK_{STA} mostró ser más activa a 37 °C ($6,9 \times 10^6$ UA/mg.min) que a 25 °C ($1,9 \times 10^6$ UA/mg.min) (Figura 40).

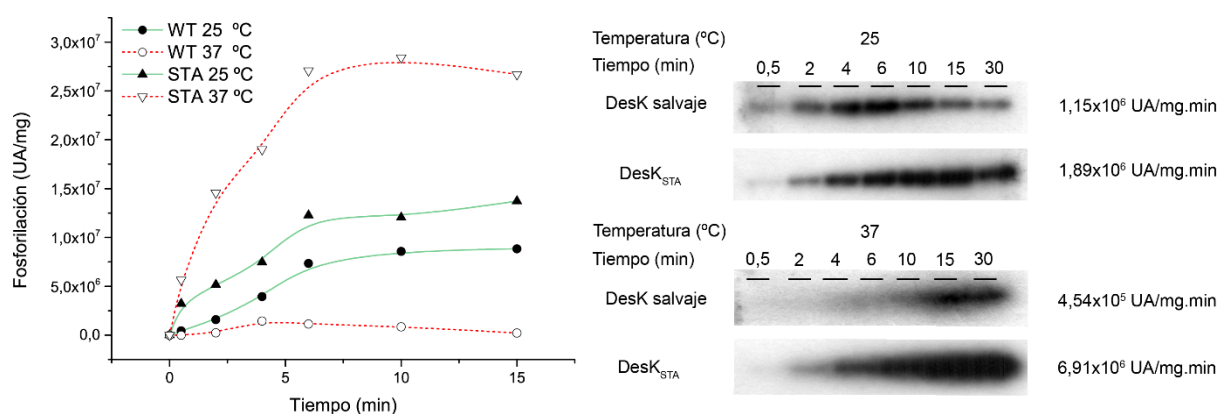


Figura 40: Fosforilación *in vitro* de DesK salvaje y DesK_{STA} en micelas de Brij58. Las proteínas se incubaron con [³²P-γ]ATP a 25 °C o 37 °C, se tomaron alícuotas a distintos tiempos y las muestras se sembraron en SDS-PAGE y se revelaron por auto-radiografía (derecha). Las bandas se cuantificaron por densitometría. Los valores expresados en unidades arbitrarias por miligramo de proteína (UA/mg) se graficaron en función del tiempo, y la actividad específica se obtuvo a partir de la pendiente inicial de las curvas (izquierda). DesK_{STA} muestra mayor actividad que DesK salvaje y pierde la regulación por temperatura.

Así, los resultados obtenidos *in vitro*, con DesK asociada a micelas de detergente, se contradicen con las medidas de actividad *in vivo*. La metodología utilizada para medir la actividad auto-quinasa *in vivo*, implica una medición indirecta, ya que se determina la actividad β-galactosidasa dependiente de los niveles de transcripción de *lacZ*, que se encuentra bajo el control del promotor de *des*, y por lo tanto los niveles de transcripción dependen de la fosforilación de DesR. Entonces, si no se detecta actividad β-galactosidasa,

no necesariamente implica que la HQ no tenga actividad auto-quinasa, sino que podría auto-fosforilarse correctamente pero podría no haber transferencia del grupo fosforilo al RR. Por este motivo, para evaluar si en realidad lo que estaba sucediendo era que las mutaciones introducidas en DesK_{STA} permiten la auto-fosforilación pero afectan la fosforilación de DesR, realizamos ensayos de fosfotransferencia *in vitro* (Figura 41).

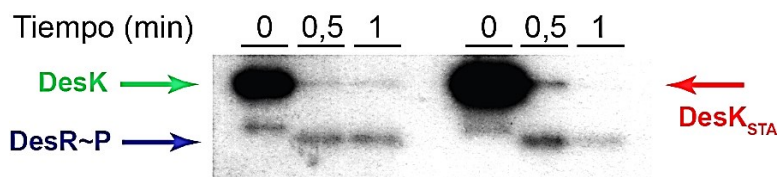


Figura 41: Fosfotransferencia de DesK salvaje y DesK_{STA} a DesR. Las proteínas purificadas en micelas de Brij58 se auto-fosforilaron por incubación con [32P- γ] ATP a 25 °C durante 10 minutos (tiempo 0). En este momento se agregó DesR en concentración equimolar. Se tomaron alícuotas de la reacción a distintos tiempos y las mismas se analizaron por SDS-PAGE y auto-radiografía.

De acuerdo a estos ensayos, tal como se observa en la Figura 41, DesK salvaje y DesK_{STA} son igualmente capaces de realizar la fosfotransferencia, y por lo tanto de interaccionar con DesR. Entonces, debe existir otra causa por la cual la actividad de DesK_{STA} *in vivo* es radicalmente opuesta a la observada *in vitro*. Es posible que DesK_{STA} adopte distintas conformaciones en un ámbito de bicapa y en uno micelar, cambiando su actividad fosfatasa a auto-quinasa al pasar de un entorno a otro. Por el contrario, los resultados muestran (Figura 40) que DesK salvaje no sufriría el mismo efecto por el cambio de entorno lipídico, y por lo tanto podría inferirse que los residuos introducidos en DesK_{STA} estarían directamente ligados a este fenómeno.

Para evaluar esta hipótesis procedimos a reconstituir DesK salvaje y DesK_{STA} en liposomas de lípidos de *E. coli*, de manera tal de evaluar sus actividades en un entorno de bicapa lipídica.

24.2. Actividad catalítica de DesK_{STA} en liposomas

Tal como se mencionó en la introducción, es sabido que DesK responde a cambios en la fluidez de la membrana, activando la transcripción de *des* cuando la fluidez disminuye. Por este motivo decidimos utilizar liposomas constituidos por lípidos de *E. coli*, ya que éstos

sufren un cambio de estado reversible de un arreglo fluido ($L\alpha$) a uno no fluido ($L\beta$) de las cadenas de ácidos grasos cuando la temperatura desciende de 37 °C a 25 °C, lo cual resulta funcional al análisis propuesto [142]. Las muestras proteicas, previamente obtenidas en detergente, se utilizaron para insertar DesK salvaje y DesK_{STA} en liposomas pre-formados, utilizando el protocolo descrito en el capítulo I de este trabajo. Con los proteoliposomas generados procedimos a determinar la actividad auto-quinasa de DesK salvaje y DesK_{STA}.

Como se muestra en la Figura 42, la actividad auto-quinasa de DesK_{STA} es mucho menor que la de DesK salvaje tanto a 37 °C como a 25 °C, exhibiendo a 25 °C niveles de actividad auto-quinasa comparables a los de DesK salvaje a 37 °C. Estos datos concuerdan con los ensayos *in vivo*, indicando que en una bicapa lipídica la actividad auto-quinasa de DesK_{STA} está inhibida.

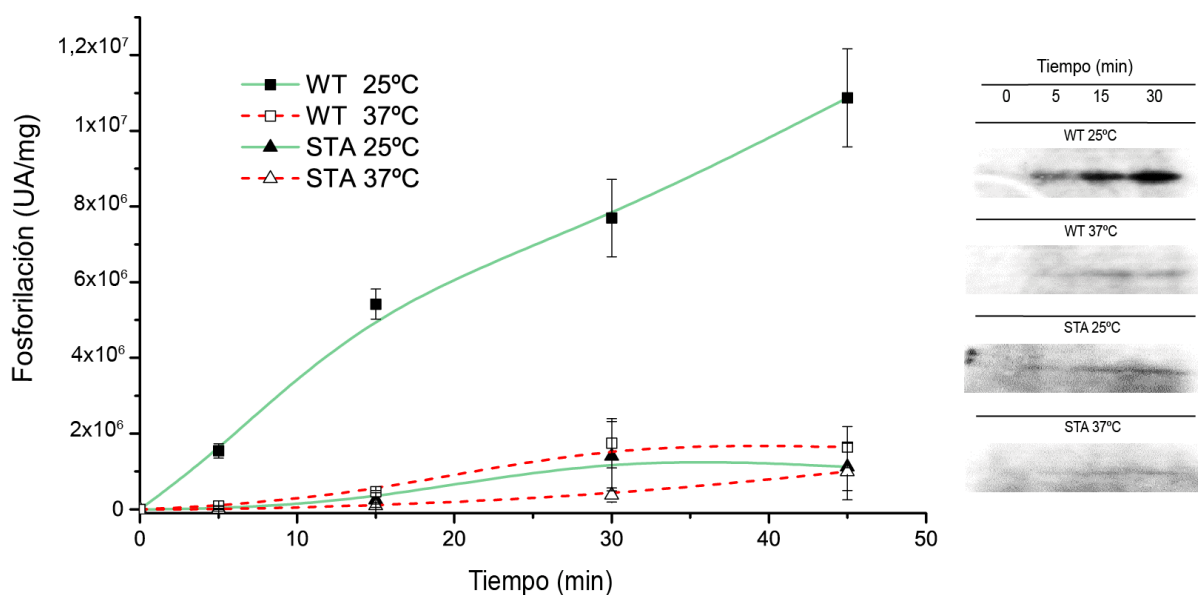


Figura 42: Fosforilación *in vitro* de DesK salvaje y DesK_{STA} insertadas en liposomas. Las proteínas se incubaron con [³²P-γ] ATP a 25 °C o 37 °C. Se tomaron alícuotas de la reacción a distintos tiempos y las mismas se analizaron por SDS-PAGE y auto-radiografía (derecha). Las bandas se cuantificaron por densitometría, y los valores expresados en unidades arbitrarias por miligramo de proteína (UA/mg) se graficaron en función del tiempo. Al insertar las proteínas en liposomas de lípidos de *E. coli* se observa el mismo patrón de actividad determinado *in vivo*, es decir, DesK_{STA} muestra actividad auto-quinasa muy baja, con niveles a 25 °C comparables a DesK salvaje a 37 °C, los cuales son insuficientes para activar la expresión de *des*.

Luego, medimos la actividad fosfatasa de las proteínas insertadas en liposomas. Para esto, incubamos proteoliposomas de DesK salvaje y DesK_{STA} con DesR~P. Seguidamente, tomamos alícuotas a distintos tiempos y analizamos las fracciones por SDS-PAGE y

posterior auto-radiografía. Estos resultados muestran que DesK_{STA} es capaz de defosforilar DesR~P con mayor eficiencia que DesK salvaje, tanto a 25 °C como a 37 °C. Este último resultado es consistente con la propuesta de que DesK_{STA} se encuentra en un estado fosfatasa dominante (Figura 43). Estos resultados, en conjunto con el análisis *in vivo*, proveen fuertes evidencias sugiriendo un modelo en el cual la formación reversible del motivo estructural 2-HCC regula el balance de las actividades fosfatasa y auto-quinasa de DesK. Es así que proponemos que cuando el 2-HCC es estable la proteína adquiere una conformación fosfatasa dominante mientras que al desestabilizarse el 2-HCC, DesK adquiere un estado auto-quinasa dominante.

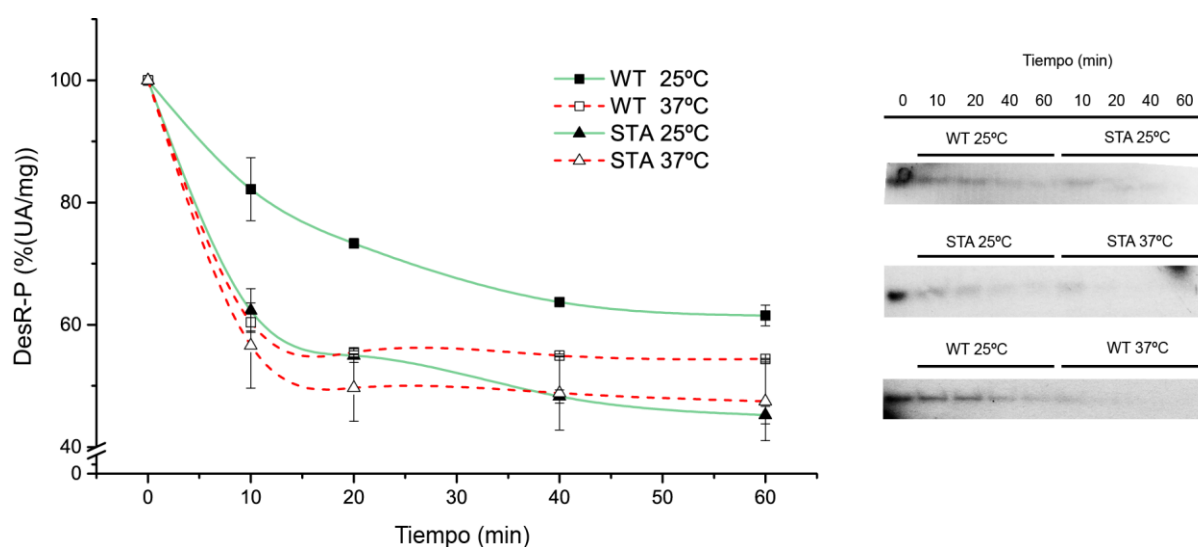


Figura 43: Defosforilación de DesR~P a 25 °C y 37 °C por DesK salvaje y DesK_{STA} insertadas en liposomas. Las proteínas se incubaron con DesR~P y se detuvo la reacción a distintos tiempos. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se revelaron por auto-radiografía (derecha). Las bandas de DesR~P se cuantificaron por densitometría. Los valores expresados en porcentaje de unidades arbitrarias por miligramo de proteína (%UA/mg) se graficaron en función del tiempo, tomando el tiempo 0 como 100% de DesR~P.

25. ¿Qué fuerzas llevan a la estabilización y desestabilización del 2-HCC?

Con el fin de investigar en mayor profundidad los eventos moleculares involucrados en la transmisión de la señal a través del 2-HCC, iniciamos una colaboración con el grupo del Dr. Mateo Dal Peraro del Laboratorio de Modelado Biomolecular del Instituto Suizo de Bioinformática. Dicho laboratorio posee una amplia y profunda experiencia en el estudio de moléculas biológicas por modelado y dinámica molecular.

En función de la escasa información existente sobre la organización de los segmentos

TM de DesK en la bicapa lipídica, se construyeron modelos atómicos *in silico* de la proteína conteniendo únicamente el TM5 (TM5-DesKC, Figura 44B), como así también de las dos variantes con mutaciones en el 2-HCC [(TM5-DesKC_{STA} y TM5-DesKC_{DEST}, (Figura 44A y 44C respectivamente)]. Los modelos se insertaron en membranas atomísticas de 1,2-di-(9Z-octadecenoyl)-sn-glicero-3-phosphocholine (DOPC), rodeados de moléculas explícitas de agua, y se relajaron durante ~55 ns de simulaciones de dinámica molecular (DM).

Debido al diseño experimental, al comienzo de las simulaciones los tres modelos comparten exactamente la misma conformación del esqueleto peptídico, es decir, el de un 2-HCC perfecto. Luego de equilibrar los modelos a 27 °C (~1 ns) se produce un quiebre en Pro148 debido a impedimentos estéricos entre las grandes cadenas laterales de Leu146 y Leu147 de ambos monómeros. En TM5-DesKC salvaje y TM5-DesKC_{DEST}, esto produce una pequeña apertura en el 2-HCC (recuadros en Figura 44B y 43C) permitiendo que algunas moléculas de agua interactúen con los residuos polares del segmento 146-157 que incluye a Ser150, Ser153 y Arg157 (Figura 44B y 43C). Este estado hidratado se mantiene durante los 50 ns de ambas simulaciones. Contrariamente, como se muestra en la Figura 44A, no se observa ninguna molécula de agua penetrando en el 2-HCC de la variante TM5-DesKC_{STA}, durante los 50 ns de la simulación, lo cual es consistente con la introducción de residuos hidrofóbicos en estas posiciones que generan una superficie impermeabilizada que estabiliza el 2-HCC.

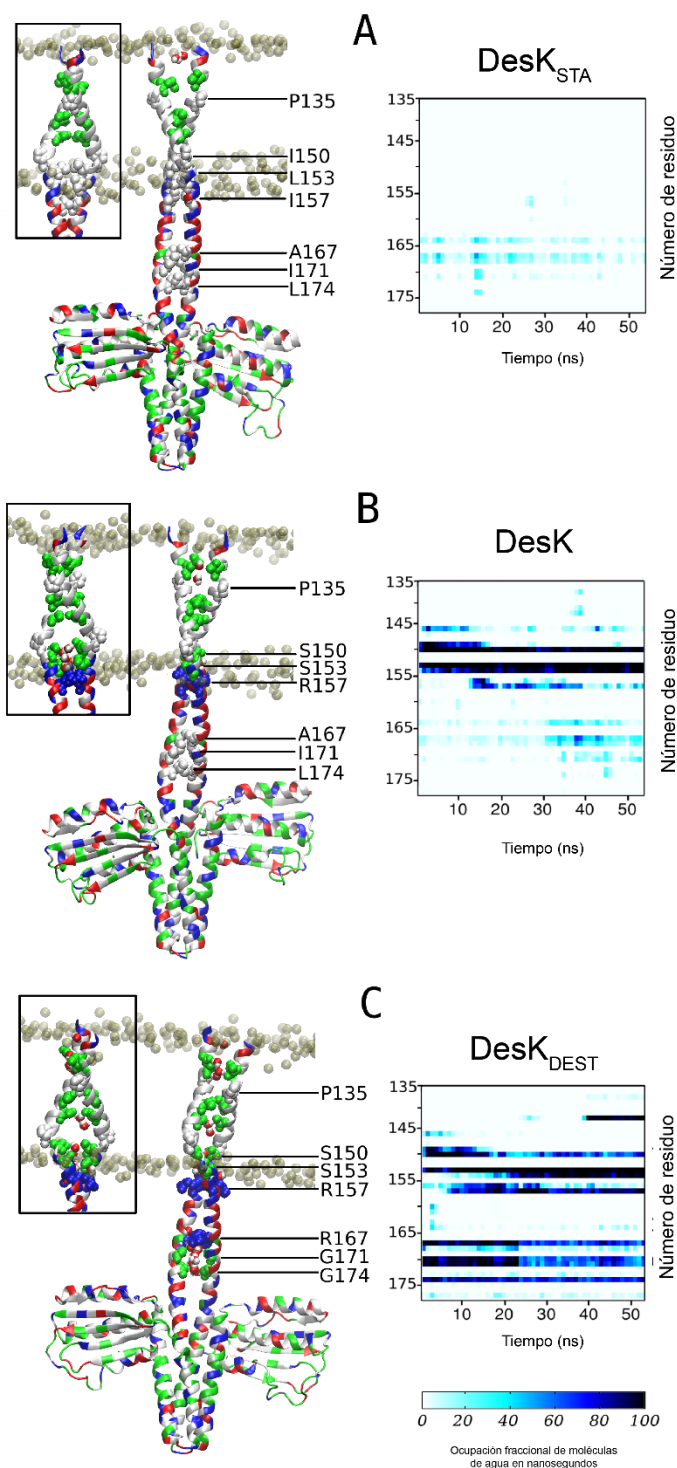


Figura 44: Estabilidad de DesK salvaje y las variantes DesK_{STA} y DesK_{DEST}. Los modelos de estas variantes (A: TM5-DesK_{STA}, B: TM5-DesK, C: TM5-DesK_{DEST}) se insertaron en membranas de DOPC con moléculas de agua explícitas, y se simularon por dinámica molecular. A la izquierda se muestran fotos de las simulaciones con el esqueleto proteico representado en modo *cartoon*, y residuos particulares como esferas. Los colores identifican el tipo de residuo como lo define el programa VMD (gris: hidrofóbicos; verde: polares no cargados; rojos: cargados negativamente; azul: cargados positivamente). Los recuadros muestran la sección transmembrana girada 90°. A la derecha se muestran gráficos de progresión de la hidratación del 2-HCC a lo largo de las simulaciones, considerando moléculas de agua contactan simultáneamente las dos hélices del 2-HCC (ocupación fraccional de moléculas de agua en nanosegundos).

En TM5-DesK_{DEST}, los reemplazos Ala167Arg, Ile171Gly y Leu174Gly llevan también a la hidratación del segmento 167-174, el cual en TM5-DesK salvaje y TM5-DesK_{STA} permanece deshidratado (Figura 44C). Estos resultados apoyan el diseño inicial de mutaciones y la hipótesis de que fuerzas de compactación estabilizan el 2-HCC, sugiriendo además que la estabilización/desestabilización del mismo está relacionada con el estado de hidratación de la región en la cual DesK se inserta en la membrana (justo hacia el

C-terminal de Pro148).

26. Modelado del 2-HCC en el contexto de una proteína minimalista completamente funcional.

Los resultados presentados hasta aquí muestran que la estabilización/desestabilización del 2-HCC de DesK es esencial para la detección de frío. Sin embargo, la falta de estructuras o modelos de DesK completa, es decir con todos los segmentos TM, no permite conectar los resultados de modelado con las evidencias funcionales disponibles. Es así, que la falta de conocimiento estructural de la proteína madura dificulta ampliar las interpretaciones y especulaciones sobre cómo se inducen y se transmiten los re-arreglos del dominio TM hacia el 2-HCC. Por lo tanto, se recurrió a la proteína quimérica minimalista de DesK, denominada MS-DesK [117]. Dada la simpleza de un único segmento TM, se procedió a modelar MS-DesK *in silico*.

Resultados previos, en los cuales DesK mostró mayor actividad auto-quinasa en bicapas de lípidos de mayor largo de cadena [151] y menor actividad en membranas con alta proporción de ácidos grasos de cadena corta [149], sugieren que DesK detecta cambios en el espesor de la membrana. Considerando estos resultados, se construyeron modelos de MS-DesK en los estados fosfatasa y auto-quinasa-competentes, y se relajaron por ~120 ns de simulaciones de DM (Figura 45) en membranas de DOPC o DEPC (1,2-dierucoil-sn-glicero-3-fosfocolina), teniendo esta última ~4.5 Å más de espesor [152–154]. Al modelar estas estructuras se consideró que cada hélice del 2-HCC se extiende de manera continua en la región TM de acuerdo a las predicciones de estructura secundaria, interrumpidas sólo por Gly13 y Pro16. Además, se tuvo en cuenta que las dos hélices requieren del apareamiento de sus residuos polares en la región TM de manera de esconderlos de la porción hidrofóbica de la membrana [155].

El modelado de MS-DesK en el estado fosfatasa se hizo de forma similar al de TM5-DesKC, extendiendo el 2-HCC observado en la estructura cristalográfica (PDB 3EHJ) con la secuencia del sensor minimalista y los parámetros de un CC canónico. En una membrana de DOPC, la estructura se relaja en un 2-HCC estable a través de la región citoplasmática y la mayor parte del TM, con una pequeña hidratación del segmento 146-157, como se describió para los modelos de TM5-DesKC salvaje y TM5-DesKC_{DEST} (Figura 45). Además, Gly13 ubicada una vuelta de hélice sobre Pro16, actúa como bisagra permitiendo que el segmento N-terminal mínimo se hidrate totalmente al exponer los residuos polares al

solvente (Figura 45Ai). Por el contrario, en la membrana compuesta de DEPC, un fosfolípido que posee cadenas aciladas de mayor largo que DOPC, no se observa apertura de la región N-terminal y el 2-HCC permanece formado incluso en la primera mitad de la región TM (Figura 45Aii).

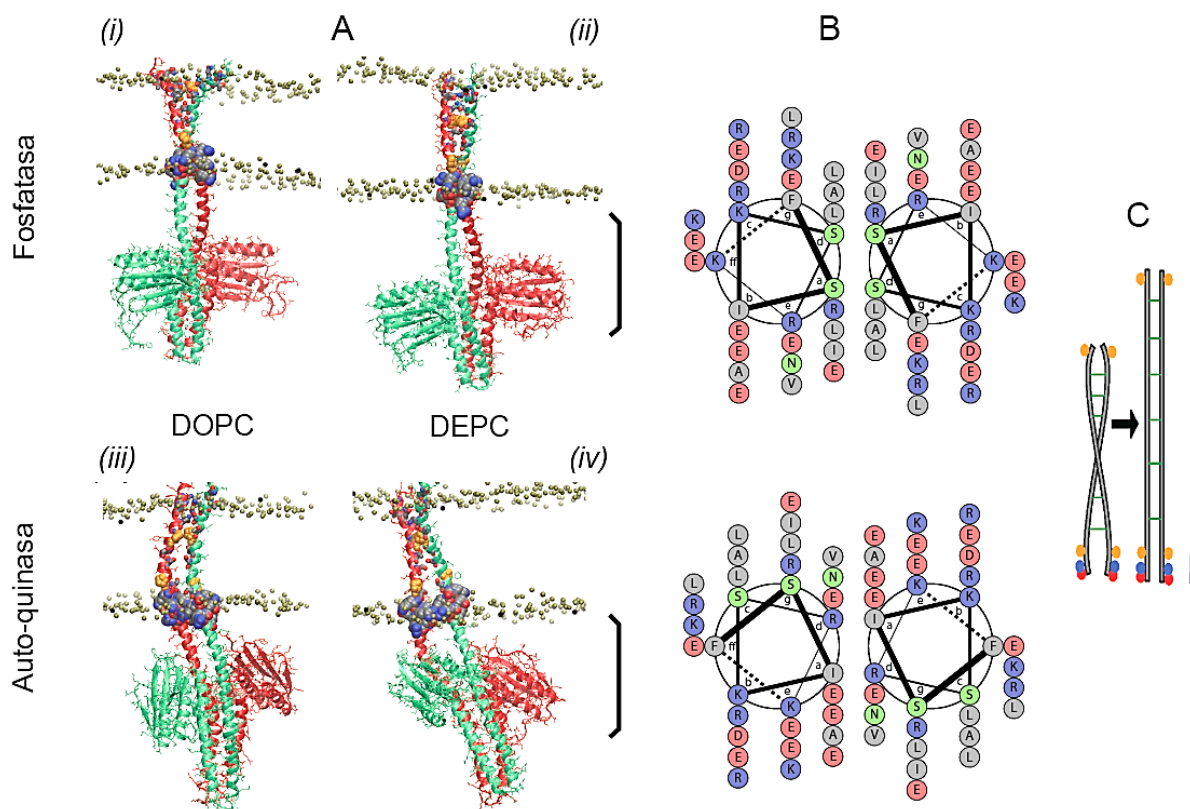


Figura 45: Modelos de MS-DesK en los estados fosfatasa y auto-quinasa relajados en dos membranas de distinto espesor. Los modelos se construyeron a partir de las estructuras cristalográficas de DesKC en los estados fosfatasa y auto-quinasa (PDB 3EHJ y 3GIE, respectivamente) extendiendo las hélices hacia el extremo N-terminal respetando la secuencia de MS-DesK. Cada modelo se relajó por 120 ns de DM en membranas de DOPC y DEPC, en solvente explícito. Los átomos pesados del segmento KERER se grafican en esferas azules, rojas y grises (N, O y C, respectivamente) mientras que los átomos pesados de las prolina del segmento TM se grafican en anaranjado. El panel (B) muestra diagramas de ruedas helicoidales [156] entre Phe149 y el 4-HB, con residuos polares no cargados en verde, residuos negativos en rojo y residuos positivos en azul. El panel (C) representa el modelo en el que frente al ensanchamiento de la membrana se produce el desenrollado del 2-HCC que resulta en la rotación de las hélices entre los dos residuos Pro (en anaranjado). Además se destaca que el segmento KERER (esferas rojas y azules) no se mueven a lo largo del eje normal a la membrana cuando ésta se ensancha.

El modelado de MS-DesK en el estado auto-quinasa competente fue más complicado debido a que el segmento resuelto del 2-HCC en la estructura inicial (PDB 3GIE) muestra

muchas interacciones no canónicas debido a desplazamientos y rotaciones de las hélices respecto a la forma fosfatasa. Estas características pueden relacionarse con mecanismos de activación de DHp, tales como movimientos de tijera, rotaciones e inclinaciones de las hélices [157,158]. Bajo la restricción de que los residuos polares localizados en el segmento hidrofóbico de las hélices (Thr140 y Ser143) deben aparearse en la porción transmembrana [155], el modelo termina adoptando hélices TM estiradas y casi paralelas, en lugar de un arreglo de hélices enrolladas tipo CC (Figura 45A). Este estadio conformacional es similar al observado en las dos estructuras casi completas de HQs en sus formas quinasa-competentes [159,160]. Frente a la relajación en cualquiera de las dos bicapas de diferente espesor, este modelo experimenta distorsiones asimétricas y el quiebre de una de las hélices del 2-HCC en la región cercana al 4-HB, reflejando una conformación dinámica del 2-HCC en este estado activo, como fue propuesto recientemente en otras HQs [159–163].

A partir de los contactos observados entre subunidades para residuos de los modelos de MS-DesK en los estados auto-quinasa y fosfatasa se compusieron diagramas de ruedas helicoidales (*helical wheel diagrams*, [156]) que resumen las principales características y diferencias del 2-HCC en los dos estados (Figura 45B). Estos diagramas representan los segmentos Phe149-Arg180, entre el final de la porción hidrofóbica del TM5 y el inicio del 4-HB. En la forma fosfatasa, el residuo de fenilalanina se encuentra en la posición “g” del patrón de héptadas, tal como se predice a partir de la secuencia (Figura 45B). Las dos primeras vueltas de hélice, las cuales están inmediatamente antes de la salida del TM5 de la membrana, se estabilizan por puentes hidrógeno inter-monoméricos donde participan residuos de serina (Ser143, Ser150). Luego, hacia el extremo C-terminal, en la región polar de la membrana y en el citoplasma, el 2-HCC es estabilizado por contactos hidrofóbicos internos mientras que todos los residuos cargados permanecen expuestos al solvente. Por el contrario, en la forma auto-quinasa la rotación de cada hélice, de aproximadamente 90°, resulta en la exposición de varios residuos hidrofóbicos y el enterramiento de residuos con cadenas grandes y cargadas dentro del CC, lo cual se opone a lo esperado para proteínas en solución, implicando una conformación no relajada. El patrón de héptadas se desplaza una posición, y Phe149 se ubica en la posición “f” la cual se encuentra a un cuarto de vuelta de hélice, es decir $\sim 90^\circ$.

Finalmente, cabe destacar que la relajación de los modelos insertados en las membranas muestra que el segmento altamente cargado K₁₅₅ERERLE que se ubica en el extremo C-terminal adyacente a la región TM permanece (en los cuatro modelos simulados), anclada al lado polar citoplasmático de la membrana. Este ancla provocaría que, frente al

ensanchamiento de la membrana, los segmentos TM sufran un estiramiento que llevaría a que se desenrollen quedando paralelos (Figura 45C).

27. Discusión

Los resultados de actividad *in vitro* de DesK salvaje y DesK_{STA}, muestran cómo las proteínas pueden responder de forma diversa a un mismo entorno. Mientras que DesK salvaje exhibe el mismo patrón de actividades tanto *in vivo* como en micelas de Brij58, la variante DesK_{STA} no presenta actividad auto-quinasa *in vivo* mientras que en micelas de Brij58 posee actividad auto-quinasa exacerbada, mayor a 37 °C que a 25 °C. Por el contrario, cuando DesK_{STA} se inserta en liposomas de *E. coli* su actividad auto-quinasa es casi nula, mientras que su actividad fosfatasa a 25 °C y 37 °C es similar a la de DesK salvaje a 37 °C.

¿Por qué las diferencias estructurales de las micelas de Brij58 y las bicapas lipídicas afectan más la regulación de las actividades de DesK_{STA} que de DesK salvaje? Los efectos del detergente y las membranas lipídicas sobre las proteínas de membrana han sido estudiados por dinámica molecular para GlpF (acuagliceroporina que cataliza la difusión de glicerol en *E. coli*) en micelas de octil-glucósido (OG) [164] y para OmpA (proteína A de membrana externa de *E. coli*) en micelas de dodecilsulfocolina (DPC) [165]. En ambos casos se observó que en las micelas de detergente la región transmembrana de estas proteínas posee mayor flexibilidad y se produce una mayor perturbación de los *loops* que conectan los segmentos transmembrana, que cuando se encuentran en una bicapa lipídica. El modelado de TM5-DesK_{STA} embebida en una membrana de DOPC mostró que los residuos hidrofóbicos introducidos en esta mutante se ubican en la región donde el 2-HCC ingresa a la membrana provocando que las hélices se cierren. A diferencia del modelo TM5-DesK donde esta zona permite el ingreso de algunas moléculas de agua, el cierre de las hélices en TM5-DesK_{STA} impide la hidratación de la misma. Sin embargo, si DesK_{STA} se encuentra en un entorno micelar, es posible que las moléculas de detergente se sitúen alrededor de los residuos hidrofóbicos introducidos, interaccionando con los mismos, provocando la apertura y desestabilización del 2-HCC y promoviendo así la actividad auto-quinasa de DesK_{STA}. En DesK salvaje, la ausencia de residuos altamente hidrofóbicos en el segmento en cuestión, impediría que el detergente desestabilice el 2-HCC y por lo tanto no se produciría la activación exacerbada de la actividad auto-quinasa de la proteína.

Otro aspecto sobre el funcionamiento de DesK abordado en este trabajo, y que aún no se ha dilucidado, se refiere a establecer cuáles son los cambios producidos en la membrana y que

DesK detecta cuando varía la temperatura. En la introducción de esta tesis describimos diversos mecanismos mediante los cuales las membranas pueden afectar la conformación y actividad de las proteínas, tales como curvatura, presiones laterales, desajuste hidrofóbico y transición de fase (secciones 1.3 a 1.6). A bajas temperaturas las cadenas acilo de los ácidos grasos se empaquetan en un arreglo ordenado (estado gel), en el cual los movimientos moleculares están restringidos [37,166]. Al aumentar la temperatura, la membrana sufre una transición endotérmica y es mucho más permeable a moléculas pequeñas que las bicapas en estado gel [167]. Los lípidos fluidos en el estado líquido cristalino permanecen en una estructura lamelar, pero la bicapa es más delgada porque las cadenas acilo se encuentran menos tiempo en su conformación totalmente extendida. El área promedio ocupada por cada molécula de fosfolípido aumenta con la fluidez, de $\sim 0,47 \text{ nm}^2$ a $\sim 0,67 \text{ nm}^2$, y la distancia entre grupos polares a través de la bicapa disminuye de 4,7 nm a 4,2 nm [168,169]. Dada la correlación fuerte entre temperatura y área por lípido es probable que una disminución en la temperatura produzca un incremento en el espesor de la membrana, generando un desajuste hidrofóbico entre DesK y los lípidos que la rodean. Por este motivo, se hipotetizó que estas perturbaciones en la bicapa producidas por la temperatura podrían regular el estado de señalización de DesK. Cuando DesK salvaje [151] y MS-DesK [117] se reconstituyeron en liposomas de fosfatidilcolina con cadenas de ácidos grasos de distinto largo en la fase líquido cristalina, cuanto más largas eran las cadenas acilo (es decir, más gruesa la bicapa), mayor fue la actividad auto-quinasa registrada [117,151]. Además, experimentos *in vivo* muestran que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos por el agregado de cerulenina, un inhibidor potente de la sintasa de ácidos grasos tipo II [68,170], resulta en mayores niveles de ácidos grasos de cadena corta en los fosfolípidos de membrana, estimulando la actividad fosfatasa de DesK [149]. Más aún, la reducción en la síntesis de fosfolípidos por inactivación condicional de la aciltransferasa PlsC que cataliza la acilación de acil-glicerol fosfato [167,170], incrementa la incorporación de ácidos grasos de cadena larga a las membranas, induciendo la expresión constitutiva del gen *des* [149]. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la regulación de DesK está ligada a los cambios en el espesor de la membrana. No obstante, no puede descartarse la posible influencia de otras propiedades de la membrana como la curvatura, las presiones laterales o la permeabilidad. Sin embargo, diferenciar las contribuciones de cada una de estas propiedades sobre la conformación y actividad de DesK puede ser difícil, ya sea a través de experimentos o simulaciones. Recientemente, se observó que la actividad auto-quinasa de DesK disminuye significativamente cuando se inserta en liposomas de DOPC:DOPE (2:1) o DOPG:DOPE (2:1) respecto a la actividad detectada en liposomas puros de DOPC o DOPG [151]. Los tres tipos

de lípidos poseen cadenas acilo con 18 átomos de carbono y un doble enlace, por lo cual sólo difieren en el grupo polar. Mientras que PE y PC son neutros, PG posee carga negativa a pH fisiológico. Además PE contiene aminos reactivas que pueden formar puentes hidrógeno, y PC es relativamente grande lo cual afecta su acomodamiento en bicapas lipídicas con otras especies lipídicas. Entonces, la disminución de la actividad auto-quinasa de DesK en liposomas mixtos de DOPC:DOPE o DOPG:DOPE, respecto a liposomas puros de DOPC o DOPG, puede deberse a defectos en el empaquetamiento de la bicapa producidos por la diferencia de tamaños de los grupos polares, a interacciones electrostáticas entre residuos y lípidos de PG, o a la formación de puentes hidrógeno con lípidos de PE. De igual manera, no puede descartarse que estos efectos alteren el perfil de presiones laterales disminuyendo la presión entre los grupos polares [18,34], o modifiquen la permeabilidad disminuyendo la acumulación de moléculas de agua en la interface lípido-agua de la bicapa [171,172].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y a partir de los resultados presentados en este capítulo, propusimos un modelo para la detección y la transmisión de la señal de temperatura por DesK. De acuerdo al mismo, una disminución en la temperatura resulta en el ensanchamiento de la membrana lo que llevaría al cierre del 2-HCC en su extremo N-terminal, del lado externo de la membrana. A medida que la membrana se ensancha, el segmento TM es estirado desde sus extremos. Este estiramiento induce el desenrollamiento del 2-HCC y una rotación gradual de sus hélices, la cual se incrementa hacia el extremo C-terminal, alcanzando los 90° en el segmento KERER donde el 2-HCC abandona la membrana. La rotación de 90° se transmite al 2-HCC introduciendo residuos grandes y cargados hacia el interior del mismo, forzando su desestabilización y la separación de sus hélices. Las rotaciones de las hélices y la resultante separación de las mismas se transmiten al 4-HB, el cual ahora esconde los residuos que estaban formando una gran superficie de interacción con los ABDs, liberando a estos últimos y promoviendo el estado auto-quinasa.

Además de la evidencia obtenida con las mutaciones estabilizantes/desestabilizantes del 2-HCC, experimentos previos realizados en el laboratorio también apoyan, o pueden ser reinterpretados, de acuerdo al mecanismo propuesto en este trabajo. La apertura/cierre o hidratación/deshidratación del extremo N-terminal de MS-DesK fue postulada independientemente a partir de evidencias obtenidas con mutantes de MS-DesK [117], y ahora pueden explicarse en función de los modelos, por el cruce de las hélices TM producido por la bisagra formada por Gly13-Pro16. Así mismo, reemplazos de neutralización de cargas en el segmento K₁₅₅ERERLE, del lado citoplasmático, mostraron que al remover residuos cargados positivamente (reemplazando Arg o Lys por Ala) favorece la actividad auto-

quinasa de MS-DesK, mientras que el reemplazo de residuos negativos (Glu por Gln) la inhibe [173]. En el contexto de nuestros modelos y el mecanismo propuesto, al reemplazar residuos negativos por glutamina se formarían varios enlaces del tipo puente hidrógeno estabilizando el 2-HCC, lo cual disminuye la actividad auto-quinasa de DesK. En cambio, cuando se reemplazan los residuos cargados positivamente por alanina, la región adquiere una carga neta negativa sin cargas positivas cercanas que la neutralicen, lo cual desestabiliza el 2-HCC promoviendo el estado auto-quinasa de DesK. Finalmente, se comunicó que mutaciones puntuales de los tres residuos Ser de la región TM por Ala (Ser143, Ser150 y Ser153, de las cuales las dos últimas están en la última vuelta de hélice final antes de salir de la membrana) disminuyen la actividad auto-quinasa de MS-DesK [174]. Este efecto se interpretó originalmente en función de un modelo de cierre de serinas. Nuestros modelos son consistentes con esa propuesta, pero de manera que las serinas se cierran en el estado fosfatasa y se abren (alejándose por rotación) en el estado quinasa (Figura 46). En este contexto, el efecto de sustituir estos residuos de Ser, especialmente Ser150 y Ser153, por Ala, es similar al de la mutante DesK_{STA} en la que se estabiliza el 2-HCC (debido a la mayor hidrofobicidad de Ala respecto a Ser) y por lo tanto se favorece el estado fosfatasa. Incluso, el modelo propuesto explica por qué los reemplazos Ser150Ala y Ser153Ala inhiben la actividad auto-quinasa a lo observado para DesK_{STA}, ya que los reemplazos individuales y la menor hidrofobicidad de Ala respecto a Leu e Ile resultaría en un 2-HCC menos compacto [126,174].

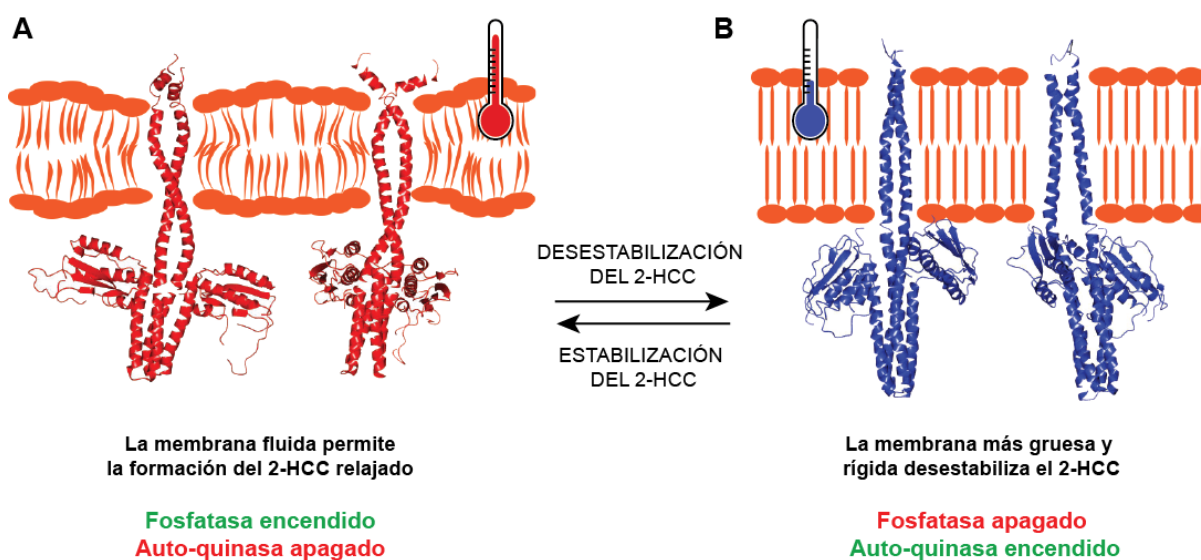


Figura 46: Mecanismo para la detección y transducción de la señal por DesK. Las altas temperaturas promueven membranas delgadas y fluidas permitiendo que DesK adopte una conformación caracterizada por la formación

del 2-HCC a lo largo del TM5 completo y sus extensiones citoplasmáticas hacia el 4-HB, además de las interacciones fuertes entre los ABDs y el DHp correspondientes a la estructura característica del estado fosfatasa. Frente a una disminución de la temperatura la membrana se ensancha, estirando los segmentos TM, induciendo el desenrollado del 2-HCC y una rotación gradual de sus hélices hasta aproximadamente 90°, llevando residuos grandes y cargados hacia el interior del 2-HCC y forzando su desestabilización. Estas rotaciones se transmiten al 4-HB, el cual ahora esconde los residuos que generaban las interacciones fuertes con los ABDs, induciendo su liberación para alcanzar la conformación auto-quinasa.

En conjunto, estas observaciones concuerdan con la idea de la existencia de un delicado balance en la superficie del 2-HCC, el dominio de transmisión de la señal, para permitir la transición conformacional frente a un cambio en la temperatura ambiental [111,175]. Un 2-HCC estabilizado o desestabilizado podría transformar a DesK en un sensor refractario a la señal de temperatura favoreciendo un estado fosfatasa o auto-quinasa tal como se observa con las variantes DesK_{STA} y DesK_{DEST}.

Conclusiones

Se estableció un protocolo que permitiría purificar a DesK a homogeneidad en micelas de detergente y luego reconstituirla en liposomas.

En función a análisis informáticos y de las estructuras cristalográficas de DesKC se identificó un motivo de dos hélices paralelas enrolladas (2-HCC), y se diseñaron las variantes DesK_{STA} y DesK_{DEST} en las cuales se estabiliza y desestabiliza el 2-HCC, respectivamente.

Las mediciones de actividad *in vitro* de DesK_{STA} purificada en micelas de detergente no se corresponden con las mediciones de actividad *in vivo*. Este efecto se revirtió al reconstituir a DesK_{STA} en liposomas formados con lípidos de *E. coli*, reflejando la relación entre el entorno lipídico en el que se inserta DesK_{STA} y la regulación de sus actividades.

Las mediciones de actividad *in vivo* de DesK_{STA} y DesK_{DEST}, junto con las mediciones *in vitro* de DesK salvaje y DesK_{STA} insertadas en liposomas, mostraron que la estabilización del 2-HCC promueve un estado fosfatasa dominante de DesK, mientras que la desestabilización del 2-HCC promueve un estado auto-quinasa dominante.

Se construyeron modelos atómicos de DesK salvaje, DesK_{STA} y DesK_{DEST}, embebidos en membranas de DOPC, que permitieron validar la estabilización y desestabilización del 2-HCC en función de las mutaciones introducidas en DesK_{STA} y DesK_{DEST} respectivamente. Además, se propuso que las hélices del TM5 podrían continuar formando un 2-HCC a través de toda la membrana en el estado fosfatasa, y que la hidratación del 2-HCC podría favorecer la apertura del mismo durante la transición al estado auto-quinasa.

Se construyeron modelos atómicos de la proteína quimérica MS-DesK a partir de las estructuras cristalográficas de DesKC en los estados fosfatasa y auto-quinasa. Se realizaron ensayos de dinámica molecular de estos modelos embebidos en membranas de distinto espesor, a partir de los cuales se propuso un mecanismo de detección y transmisión de la señal de temperatura por DesK.

En función de los resultados presentados como parte de esta Tesis, así como a los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, propusimos un mecanismo de detección y transmisión de la señal de temperatura por MS-DesK (Figura 46). En este modelo, a 37 °C la membrana se encuentra fluida y delgada, y DesK adopta una conformación fosfatasa competente, caracterizada por el enrollamiento de las hélices TM formando un 2-HCC que se prolonga hacia el dominio citoplasmático. Los residuos polares del extremo N-terminal del segmento TM se encuentran hidratados debido a la apertura del 2-HCC generada por la bisagra formada entre Gly13 y Pro16 promoviendo la interacción de los ABDs con el DHp. Frente a una disminución de la temperatura, se disminuye la fluidez de la membrana y la

misma se ensancha, generando un movimiento de tijera en el extremo N-terminal de los segmentos TM, favoreciendo la deshidratación de los residuos polares. En consecuencia, los segmentos TM sufren un estiramiento debido al cierre del extremo N-terminal y al segmento citoplasmático KERER, el cual permanece anclado en la interface lípido-agua citoplasmática. Este estiramiento promueve la rotación de las hélices que a su vez provoca el desenrollamiento de los segmentos TM y del 2-HCC. El desenrollamiento estaría favorecido por la hidratación de los residuos polares que se orientan hacia el núcleo del CC. Esta rotación se transmite al DHp, que ahora esconde los residuos hidrofóbicos que le permitían interactuar con los ABDs, y estos últimos quedan libres favoreciendo el estado auto-quinasa competente.

El modelo de transmisión de la señal por estabilización/desestabilización del 2-HCC sería compartido por DesK salvaje y MS-DesK. Sin embargo, el mecanismo de detección de la señal de frío de DesK salvaje por sus 5 segmentos TM aún es desconocido. Aunque es tentador especular que los mecanismos moleculares observados en el extremo N-terminal de MS-DesK son válidos para la proteína salvaje, esta hipótesis aún debe validarse.

En función de esto, nuestros futuros estudios se concentrarán en intentar dilucidar estos aspectos. Para ello se aplicarán las técnicas de marcación de *spin* sitio-dirigida y CW-EPR inicialmente propuestos para este trabajo de tesis, y se continuará con ensayos de cristalización y difracción de rayos X.

Referencias bibliográficas

- [1] J.C.M. Holthuis, A.K. Menon, Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis., *Nature*. 510 (2014) 48–57. doi:10.1038/nature13474.
- [2] M. Luckey, *Membrane structural biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*, Cambridge University Press, 2008. <http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/molecular-biology-biochemistry-and-structural-biology/membrane-structural-biology-biochemical-and-biophysical-foundations-2nd-edition>.
- [3] E. Wallin, G. Von Heijne, Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein Sci.* 7 (1998) 1029–1038. doi:10.1002/pro.5560070420.
- [4] M. Bienvenüe, J. Sainte Marie, Modulation of Protein Function by Lipids, *Curr. Top. Membr.* 40 (1994) 319–354. doi:10.1016/S0070-2161(08)60986-7.
- [5] W. Dowhan, Molecular Basis For Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There So Many Lipids?, *Annu Rev Biochem.* 66 (1997) 199–232. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.199.
- [6] J.C.M. Holthuis, G. Van Meer, Lipid microdomains , lipid translocation and the organization of intracellular membrane transport (Review), *Mol. Membr. Biol.* 20 (2003) 231–241. doi:0988768031000100768.
- [7] A.G. Lee, Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1612 (2003) 1–40. doi:10.1016/S0005-2736(03)00056-7.
- [8] A.G. Lee, How lipids affect the activities of integral membrane proteins., *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 62–87. doi:10.1016/j.bbamem.2004.05.012.
- [9] R.N. Mcelhaney, The Influence of Membrane Lipid Composition and Physical Properties of Membrane Structure and Function in *Acholeplasma Laidlawii*, *Crit. Rev. Microbiol.* 17 (1989) 1–32. doi:10.3109/10408418909105720.
- [10] A.A. Spector, M.A. Yorek, Membrane lipid composition and cellular function, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 1015–1035.
- [11] O.S. Andersen, R.E. Koeppe, Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 107–30. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132643.
- [12] M.P. Sheetz, S.J. Singer, Biological Membranes as Bilayer Couples . A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71 (1974) 4457–4461.
- [13] O.G. Mouritsen, M. Bloom, Mattress model of lipid-protein interactions in membranes, *Biophys. J.* 46 (1984) 141–153. doi:10.1016/S0006-3495(84)84007-2.

- [14] S.M. Gruner, Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition : A role for nonbilayer lipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 3665–3669.
- [15] H.W. Huang, Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime, *Biophys. J.* 50 (1986) 1061–1070. doi:10.1016/S0006-3495(86)83550-0.
- [16] D.R. Fattal, A. Ben-shaul, A Molecular Model for Lipid-Protein Interaction in Membranes : the Role of Hydrophobic Mismatch, *Biophys. J.* 65 (1993) 1795–1809. doi:10.1016/S0006-3495(93)81249-9.
- [17] D. Mitchell, M. Straume, J. Miller, B. Litman, Modulation of metarhodopsin formation by cholesterol-induced ordering of bilayer lipids., *Biochemistry.* 29 (1990) 9143–9149.
- [18] R.S. Cantor, The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia., *Biochemistry.* 36 (1997) 2339–44. doi:10.1021/bi9627323.
- [19] S.M. Bezrukov, Functional consequences of lipid packing stress, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5 (2000) 237–243.
- [20] J.A. Lundbaek, P. Birn, J. Girshman, A.J. Hansen, O.S. Andersen, Membrane stiffness and channel function., *Biochemistry.* 35 (1996) 3825–30. doi:10.1021/bi952250b.
- [21] J.A. Lundbaek, A.M. Maer, O.S. Andersen, Lipid bilayer electrostatic energy, curvature stress, and assembly of gramicidin channels., *Biochemistry.* 36 (1997) 5695–701. doi:10.1021/bi9619841.
- [22] M.F. Brown, Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer., *Chem. Phys. Lipids.* 73 (1994) 159–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001180>.
- [23] M.W. Tate, E.F. Eikenberry, D.C. Turner, E. Shyamsunder, S.M. Gruner, Nonbilayer phases of membrane lipids., *Chem. Phys. Lipids.* 57 (1991) 147–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2054901>.
- [24] R.B. Gennis, *Biomembranes*, Springer New York, New York, NY, 1989. doi:10.1007/978-1-4757-2065-5.
- [25] S.M. a. Davies, R.M. Epan, R. Kraayenhof, R.B. Cornell, Regulation of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase Activity by the Physical Properties of Lipid Membranes: An Important Role for Stored Curvature Strain Energy, *Biochemistry.* 40 (2001) 10522–10531. doi:10.1021/bi010904c.
- [26] G.S. Attard, R.H. Templer, W.S. Smith, a N. Hunt, S. Jackowski, Modulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by membrane curvature elastic stress., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9032–6. doi:10.1073/pnas.160260697.
- [27] A. Holt, J.A. Killian, Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models., *Eur. Biophys. J.* 39 (2010) 609–21. doi:10.1007/s00249-009-0567-1.
- [28] N. Kučerka, M.P. Nieh, J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of

- commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 2761–2771. doi:10.1016/j.bbamem.2011.07.022.
- [29] N. Kucerka, J.F. Nagle, J.N. Sachs, S.E. Feller, J. Pencer, A. Jackson, et al., Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data., *Biophys. J.* 95 (2008) 2356–2367. doi:10.1529/biophysj.108.132662.
- [30] R.S. Cantor, The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria., *Chem. Phys. Lipids.* 101 (1999) 45–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810924>.
- [31] D. Marsh, Lateral pressure in membranes., *Biochim. Biophys. Acta.* 1286 (1996) 183–223. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982283>.
- [32] D. Marsh, Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes., *Biophys. J.* 93 (2007) 3884–99. doi:10.1529/biophysj.107.107938.
- [33] J.M. Seddon, R.H. Templer, Polymorphism of Lipid-Water Systems, en: R. Lipowsky, E. Sackmann (Eds.), *Handb. Biol. Phys.*, Elsevier Science B.V., 1995: pp. 97–160.
- [34] E. van den Brink-van der Laan, J.A. Killian, B. de Kruijff, Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile., *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 275–88. doi:10.1016/j.bbamem.2004.06.010.
- [35] R.S. Cantor, Size distribution of barrel-stave aggregates of membrane peptides: influence of the bilayer lateral pressure profile., *Biophys. J.* 82 (2002) 2520–5. doi:10.1016/S0006-3495(02)75595-1.
- [36] E. Perozo, D.C. Rees, Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 432–442. doi:10.1016/S0959-440X(03)00106-4.
- [37] D. de Mendoza, A. Klages Ulrich, J.E. Cronan, Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2098–101.
- [38] L. Vigh, B. Maresca, J.L. Harwood, Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 369–374. doi:10.1016/S0968-0004(98)01279-1.
- [39] J.D. Pilot, J.M. East, A.G. Lee, Effects of phospholipid headgroup and phase on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*., *Biochemistry.* 40 (2001) 14891–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732909>.
- [40] S. Phadtare, M. Inouye, The cold shock response, *EcoSalPlus.* (2008). doi:10.1128/ecosalplus.5.4.2.
- [41] P. Graumann, K. Schroder, R. Schmid, M.A. Marahiel, Cold Shock Stress-Induced

- Proteins in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4611–4619.
- [42] P.L. Graumann, M.A. Marahiel, P. Marburg, Cold Shock Response in *Bacillus subtilis* Further Reading, 1 (1999) 203–209.
- [43] P. Graumann, T.M. Wendrich, M.H.W. Weber, K. Schroder, M.A. Marahiel, A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures, *Mol. Microbiol.* 25 (1997) 741–756.
- [44] C.O. Gualerzi, A.M. Giuliodori, C.L. Pon, Transcriptional and Post-transcriptional Control of Cold-shock Genes, 2836 (2003) 527–539. doi:10.1016/S0022-2836(03)00732-0.
- [45] J.E. Cronan, G.P. Roughan, Fatty Acid Specificity and Selectivity of the Chloroplast sn-Glycerol 3-Phosphate Acyltransferase of the Chilling Sensitive Plant, *Amaranthus lividus*, *Plant Physiol.* 83 (1987) 676–680.
- [46] T. Kaneda, Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance, *Microbiol. Rev.* 55 (1991) 288–302.
- [47] A. Cossins, R. Raynard, Adaptive responses of animal cell membranes to temperature, *Symp Soc Exp Biol.* 41 (1987) 95–111.
- [48] N. Murata, H. Wada, Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria., *Biochem. J.* 308 (1995) 1–8.
- [49] I. Nishida, N. Murata, Chilling Sensitivity in Plants and Cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1996) 541–568.
- [50] H.R. Morbidoni, D. de Mendoza, J.E. Cronan, *Bacillus subtilis* acyl carrier protein is encoded in a cluster of lipid biosynthesis genes., *J. Bacteriol.* 178 (1996) 4794–800. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=178259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [51] D. de Mendoza, Temperature Sensing by Membranes., *Annu. Rev. Microbiol.* (2014) 101–116. doi:10.1146/annurev-micro-091313-103612.
- [52] W. Klein, M.H.W. Weber, Cold Shock Response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-Dependent Switch in the Fatty Acid Branching Pattern for Membrane Adaptation to Low Temperatures †, 181 (1999) 5341–5349.
- [53] T. Kaneda, Fatty Acids of the Genus *Bacillus*: an Example of Branched-Chain Preference ′, *Bacteriol. Rev.* 41 (1977) 391–418.
- [54] S.G. Altabe, P. Aguilar, G.M. Caballero, D. De Mendoza, The *Bacillus subtilis* Acyl Lipid Desaturase Is a $\Delta 5$ Desaturase, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 3228–3231. doi:10.1128/JB.185.10.3228.
- [55] K. Choi, R.J. Heath, C.O. Rock, β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Is

- a Determining Factor in Branched-Chain Fatty Acid Biosynthesis, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 365–370.
- [56] P.S. Aguilar, J.E. Cronan, D. de Mendoza, A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase., *J. Bacteriol.* 180 (1998) 2194–200.
- [57] J. Shanklin, J.E. Whittle, B.G. Fox, 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 (1994) 12787–12794.
- [58] J. Parkinson, E. Kofoid, Communication modules in bacterial signaling proteins, *Annu Rev Genet.* 26 (1992) 71–112.
- [59] J.B. Stock, a J. Ninfa, a M. Stock, Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria., *Microbiol. Rev.* 53 (1989) 450–490.
- [60] R. Heermann, M. Lippert, K. Jung, Domain swapping reveals that the N-terminal domain of the sensor kinase KdpD in *Escherichia coli* is important for signaling, *BMC Microbiol.* 12 (2009) 1–12. doi:10.1186/1471-2180-9-133.
- [61] B. Magasanik, Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes, *TIBS.* 13 (1988) 475–479.
- [62] I. Martínez-Argudo, J. Martín-Nieto, P. Salinas, R. Maldonado, M. Drummond, A. Contreras, Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 169–178.
- [63] A. Nakata, M. Amemura, K. Makino, H. Shinagawa, Genetic and biochemical analysis of the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli*, en: *Phosphate Metab. Cell. Regul. Microorg.*, 1987: pp. 150–155.
- [64] S. Forst, J. Delgado, G. Ramakrishnan, M. Inouye, Regulation of *ompC* and *ompF* Expression in *Escherichia coli* in the Absence of *envZ*, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 5080–5085.
- [65] M. David, M. Daveran, J. Batut, A. Dedieu, O. Domergue, J. Ghai, et al., Cascade Regulation of *nif* Gene Expression in *Rhizobium meliloti*, *Cell.* 54 (1988) 671–683.
- [66] V. Stewart, B.L. Berg, Influence of *nar* (Nitrate Reductase) Genes on Nitrate Inhibition of Formate-Hydrogen Lyase and Fumarate Reductase Gene Expression in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 4437–4444.
- [67] J.B. Stock, M.G. Surette, M. Levit, P. Park, Two-component signal transduction systems: structure-function relationship and mechanism of catalysis, en: *Two-Component Signal Transduct.*, 1995: pp. 25–51.
- [68] F. Trajtenberg, D. Albanesi, N. Ruétalo, H. Botti, A.E. Mechaly, M. Nieves, et al.,

- Allosteric Activation of Bacterial Response Regulators: the Role of the Cognate Histidine Kinase Beyond Phosphorylation, *MBio.* 5 (2014) e02105–14. doi:10.1128/mBio.02105-14.Editor.
- [69] L.A. Pratt, T.J. Silhavy, Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction, *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 565–573.
- [70] J.F. Barrett, J.A. Hoch, Two-Component Signal Transduction as a Target for Microbial Anti-Infective Therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 1529–1536.
- [71] J. Li, R. V Swanson, M.I. Simon, R.M. Weis, The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA., *Biochemistry.* 34 (1995) 14626–14636. doi:10.1021/bi00045a003.
- [72] J.L. Appleby, J.S. Parkinson, R.B. Bourret, Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled, *Cell.* 86 (1996) 845–848.
- [73] a M. Stock, V.L. Robinson, P.N. Goudreau, Two-component signal transduction., *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 183–215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183.
- [74] E.G. Ninfa, M.R. Atkinson, E.S. Kamberov, A.J. Ninfa, Mechanism of Autophosphorylation of Escherichia coli Nitrogen Regulator II (NRI, or NtrB): trans-Phosphorylation between Subunits, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7024–7032.
- [75] S. Cai, M. Inouye, Spontaneous Subunit Exchange and Biochemical Evidence for Trans-autophosphorylation in a Dimer of Escherichia coli Histidine Kinase (EnvZ), *J. Mol. Biol.* 329 (2003) 495–503. doi:10.1016/S0022-2836(03)00446-7.
- [76] P. Casino, V. Rubio, A. Marina, Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction., *Cell.* 139 (2009) 325–36. doi:10.1016/j.cell.2009.08.032.
- [77] G.R. Peña-Sandoval, D. Georgellis, The ArcB Sensor Kinase of Escherichia coli Autophosphorylates by an Intramolecular Reaction, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 1735–1739. doi:10.1128/JB.01401-09.
- [78] T. Mascher, J.D. Helmann, G. Udden, Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 910–38. doi:10.1128/MMBR.00020-06.
- [79] H. Aiba, S. Fujimoto, N. Ozaki, Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for E. coli cAMP receptor protein, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 1345–1361.
- [80] G.S. Anand, P.N. Goudreau, A.M. Stock, Activation of Methyltransferase CheB: Evidence of a Dual Role for the Regulatory Domain, *Biochemistry.* (1998) 14038–14047.
- [81] T.L. Mayover, C.J. Halkides, R.C. Stewart, Kinetic Characterization of CheY Phosphorylation Reactions: Comparison of P-CheA and Small-Molecule Phosphodonors, *Biochemistry.* 38 (1999) 2259–2271.

- [82] H. Park, S.K. Saha, M. Inouye, Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 (1998) 6728–6732.
- [83] S.C. Schuster, R. V Swanson, L.A. Alex, R.B. Bourret, M.I. Simon, Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance., *Nature.* 365 (1993) 343–7. doi:10.1038/365343a0.
- [84] M. Inouye, R. Dutta, *Histidine Kinases in Signal Transduction*, 2003. doi:10.1016/B978-012372484-7/50006-0.
- [85] M.M. Igo, a. J. Ninfa, J.B. Stock, T.J. Silhavy, Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor., *Genes Dev.* 3 (1989) 1725–1734. doi:10.1101/gad.3.11.1725.
- [86] L. Brandon, S. Dorus, W. Epstein, K. Altendorf, K. Jung, Modulation of KdpD phosphatase implicated in the physiological expression of the Kdp ATPase of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 38 (2000) 1086–1092. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02219.x.
- [87] M.K. Dahl, T. Msadek, F. Kunst, G. Rapoport, The phosphorylation state of the degU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 14509–14514.
- [88] L. Shi, W. Liu, F.M. Hulett, Decay of Activated *Bacillus subtilis* Pho Response Regulator, PhoP~P, Involves the PhoR~P Intermediate, *Biochemistry.* 38 (1999) 10119–10125.
- [89] M.E. Castelli, E. García Vescovi, F.C. Soncini, The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 22948–22954. doi:10.1074/jbc.M909335199.
- [90] a. F. Lois, M. Weinstein, G.S. Ditta, D.R. Helinski, Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4370–4375.
- [91] P. Jiang, A. Pioszak, M.R. Atkinson, J.A. Peliska, A.J. Ninfa, New Insights into the Mechanism of the Kinase and Phosphatase Activities of *Escherichia coli* NRH (NtrB) and Their Regulation by the PII Protein, en: *Histidine Kinases Signal Transduct.*, 2003: pp. 144–162.
- [92] Y. Zhu, L. Qin, T. Yoshida, M. Inouye, Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7808–7813. doi:10.1073/pnas.97.14.7808.
- [93] W. Hsing, F.D. Russo, K.K. Bernd, T.J. Silhavy, Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ., *J. Bacteriol.* 180 (1998) 4538–46.

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=107465&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [94] J. Spizizen, Transformation of Biochemically Deficient Strains of *Bacillus Subtilis* By Deoxyribonucleate., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44 (1958) 1072–1078. doi:10.1073/pnas.44.10.1072.
- [95] M.R. Atkinson, a J. Ninfa, Mutational analysis of the bacterial signal-transducing protein kinase/phosphatase nitrogen regulator II (NRII or NtrB)., *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7016–23.
- [96] K.M. Ottemann, W. Xiao, Y.-K. Shin, D.E.K. Jr., A Piston Model for Transmembrane Signaling of the Aspartate Receptor, *Science* (80-.). 285 (1999) 1751–1754. doi:10.1126/science.285.5434.1751.
- [97] O. Kwon, D. Georgellis, E.C.C. Lin, Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13192–13195. doi:10.1074/jbc.M210647200.
- [98] O. Kwon, D. Georgellis, a. S. Lynch, D. Boyd, E.C.C. Lin, The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: Genetic exploration of the transmembrane region, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 2960–2966. doi:10.1128/JB.182.10.2960-2966.2000.
- [99] P.M. Steed, B.L. Wanner, Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: Evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 6797–6809.
- [100] a M. Stock, E. Martinez-Hackert, B.F. Rasmussen, a H. West, J.B. Stock, D. Ringe, et al., Structure of the Mg(2+)-bound form of CheY and mechanism of phosphoryl transfer in bacterial chemotaxis., *Biochemistry.* 32 (1993) 13375–80. doi:10.1021/bi00212a001.
- [101] E. Huala, F.M. Ausubel, The Central Domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD Functions Independently To Activate Transcription, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 1428–1431.
- [102] M. Suutari, S. Laakso, Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation, *Crit. Rev. Microbiol.* 20 (1994) 285–328.
- [103] A.M. Stock, A.H. West, Response Regulator Proteins and Their Interactions with Histidine Protein Kinases, en: *Histidine Kinases Signal Transduct.*, 2003: pp. 238–262.
- [104] F.H.C. Crick, The packing of [alpha]-helices: simple coiled-coils, (1953). doi:10.1107/S0365110X53001964.
- [105] A.N. Lupas, M. Gruber, The structure of alpha-helical coiled coils., *Adv. Protein Chem.* 70 (2005) 37–78. doi:10.1016/S0065-3233(05)70003-6.
- [106] M. Hulko, F. Berndt, M. Gruber, J.U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, et al., The HAMP

- domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling., *Cell*. 126 (2006) 929–40. doi:10.1016/j.cell.2006.06.058.
- [107] J.S. Parkinson, Signaling Mechanisms of HAMP Domains in Chemoreceptors and Sensor Kinases, (2010). doi:10.1146/annurev.micro.112408.134215.
- [108] J.J. Falke, G.L. Hazelbauer, Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors., *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 257–65. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2895674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [109] J.J. Falke, A.H. Erbes, The Piston Rises Again, *Structure*. 17 (2010) 1149–1151. doi:10.1016/j.str.2009.08.005.The.
- [110] V. Anantharaman, S. Balaji, L. Aravind, The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins., *Biol. Direct*. 1 (2006) 25. doi:10.1186/1745-6150-1-25.
- [111] V. Anantharaman, S. Balaji, L. Aravind, The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins., *Biol. Direct*. 1 (2006) 25. doi:10.1186/1745-6150-1-25.
- [112] G.S. Lukat, W.R. McCleary, a M. Stock, J.B. Stock, Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors., *PNAS*. 89 (1992) 718–22.
- [113] D.A. Sanders, B.L. Gillece-Castro, A.M. Stock, A.L. Burlingame, D.E. Koshland Jr., Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY, *J Biol Chem*. 264 (1989) 21770–21778.
- [114] J.F. Hess, K. Oosawa, N. Kaplan, M.I. Simon, Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis., *Cell*. 53 (1988) 79–87. doi:10.1016/0092-8674(88)90489-8.
- [115] J. Zapf, M. Madhusudan, C.E. Grimshaw, J.A. Hoch, K.I. Varughese, J.M. Whiteley, A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site, *Biochemistry*. 37 (1998) 7725–7732. doi:10.1021/bi9729615.
- [116] K. a Borkovich, N. Kaplan, J.F. Hess, M.I. Simon, Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent activation of phosphate group transfer., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 1208–1212. doi:10.1073/pnas.86.4.1208.
- [117] L.E. Cybulski, M. Mart'in, M.C. Mansilla, A. Fernandez, D. De Mendoza, M. Martín, et al., Membrane Thickness Cue for Cold Sensing in a Bacterium, *Curr. Biol*. 20 (2010) 1–6. doi:10.1016/j.cub.2010.06.074.
- [118] D. Albanesi, M.C. Mansilla, D. De Mendoza, The Membrane Fluidity Sensor DesK of

- Bacillus subtilis* Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator, *Society*. 186 (2004) 2655–2663. doi:10.1128/JB.186.9.2655.
- [119] D. Albanesi, M. Martín, F. Trajtenberg, M.C. Mansilla, A. Haouz, P.M. Alzari, et al., Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 16185–90. doi:10.1073/pnas.0906699106.
- [120] P.S. Aguilar, a M. Hernandez-Arriaga, L.E. Cybulski, a C. Erazo, D. de Mendoza, Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*., *EMBO J.* 20 (2001) 1681–91. doi:10.1093/emboj/20.7.1681.
- [121] L.E. Cybulski, D. Albanesi, M.C. Mansilla, S. Altabe, P.S. Aguilar, D. de Mendoza, Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase., *Mol. Microbiol.* 45 (2002) 1379–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207704>.
- [122] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Third Edit, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- [123] D.E. Drew, G. von Heijne, P. Nordlund, J.W. de Gier, Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*., *FEBS Lett.* 507 (2001) 220–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684102>.
- [124] J. Rogé, J.-M. Betton, Use of pIVEX plasmids for protein overproduction in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Fact.* 4 (2005) 18. doi:10.1186/1475-2859-4-18.
- [125] H. Munier, A. Gilles, P. Glaser, E. Krin, A. Danchin, R. Sarfati, et al., Isolation and characterization of catalytic and calmodulin-binding domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase, *Eur. J. Biochem.* 196 (1991) 469–474.
- [126] E.A. Saita, L. a. Abriata, Y.T. Tsai, F. Trajtenberg, T. Lemmin, A. Buschiazzo, et al., A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK, *Mol. Microbiol.* 98 (2015) 258–271. doi:10.1111/mmi.13118.
- [127] S. Van Den Berg, P.-A. Lofdahl, H. Berglund, Improved solubility of TEV protease by directed evolution, *J. Biotechnol.* 121 (2006) 291–298. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.08.006.
- [128] G. Grogoryan, W.F. DeGrado, Probing Designability via a Generalized Model of Helical Bundle Geometry, *J. Mol. Biol.* 405 (2012) 1079–1100. doi:10.1016/j.jmb.2010.08.058.Probing.
- [129] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters, *PROTEINS Struct. Sci. Bioinforma.* 65 (2006) 712–725. doi:10.1002/prot.
- [130] S. Jo, T. Kim, W. Im, Automated Builder and Database of Protein / Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations, *PLoS One.* (2007) e880. doi:10.1371/journal.pone.0000880.

- [131] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, Software News and Updates CHARMM-GUI : A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865. doi:10.1002/jcc.
- [132] M.A. Lomize, A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, H.I. Mosberg, OPM : Orientations of Proteins in Membranes database, *Bioinforma. Appl. Note.* 22 (2006) 623–625. doi:10.1093/bioinformatics/btk023.
- [133] A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, M.A. Lomize, H.I. Mosberg, Positioning of proteins in membranes : A computational approach, *Protein Sci.* 15 (2006) 1318–1333. doi:10.1110/ps.062126106.Thousands.
- [134] E. Perozo, L. Cuello, C. DM, Y. Liu, P. Sompornpisut, EPR approaches to ion channel structure and function, *Novartis Found Symp.* 245 (2002) 146–168.
- [135] V. Vásquez, M. Sotomayor, J. Cordero-Morales, K. Schulten, E. Perozo, A Structural Mechanism for MscS Gating in Lipid Bilayers, *Science* (80-.). 321 (2008) 1210–1214. doi:10.1126/science.1159674.
- [136] O. Dalmas, L.G. Cuello, V. Jogini, D.M. Cortes, B. Roux, E. Perozo, Structural Dynamics of the Magnesium-bound Conformation of CorA in a lipid bilayer, *Structure.* 18 (2010) 868–878. doi:10.1016/j.str.2010.04.009.Structural.
- [137] J.F. Cordero-Morales, L.G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D.M. Cortes, B. Roux, et al., Molecular determinants of gating at the potassium- channel selectivity filte, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 311–318. doi:10.1038/nsmb1069.
- [138] J. Dong, G. Yang, H.S. Mchaourab, Structural Basis of Energy Transduction in the Transport Cycle of MsbA, *Science* (80-.). 308 (2005) 1023–1028. doi:10.1126/science.1106592.
- [139] G.E. Fanucci, K. a. Cogshall, N. Cadieux, M. Kim, R.J. Kadner, D.S. Cafiso, Substrate-induced conformational changes of the periplasmic N-terminus of an outer-membrane transporter by site-directed spin labeling, *Biochemistry.* 42 (2003) 1391–1400. doi:10.1021/bi027120z.
- [140] L. Yu, W. Wang, S. Ling, S. Liu, L. Xiao, Y. Xin, et al., CW-EPR studies revealed different motional properties and oligomeric states of the integrin b1a transmembrane domain in detergent micelles or liposomes, *Sci. Rep.* 5 (2014) 1–11. doi:10.1038/srep07848.
- [141] L. Dumon-Seignovert, G. Cariot, L. Vuillard, The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3)., *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 203–6. doi:10.1016/j.pep.2004.04.025.
- [142] M. Martín, D. Albanesi, P.M. Alzari, D. de Mendoza, Functional in vitro assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK., *Protein Expr. Purif.* 66 (2009) 39–45. doi:10.1016/j.pep.2009.02.006.

- [143] S.S. Labeling, G.E. Fanucci, N. Cadieux, C.A. Piedmont, R.J. Kadner, D.S. Cafiso, Structure and Dynamics of the α -Barrel of the Membrane Transporter BtuB by Site-Directed Spin Labeling, *Biochemistry*. 41 (2002) 11543–11551.
- [144] T. a Hopf, L.J. Colwell, R. Sheridan, B. Rost, C. Sander, D.S. Marks, 3D structures of membrane proteins from genomic sequencing, *Cell*. 149 (2012) 1607–1621. doi:10.1016/j.cell.2012.04.012.3D.
- [145] T. a. Hopf, C.P.I. Schärfe, J.P.G.L.M. Rodrigues, A.G. Green, C. Sander, A.M.J.J. Bonvin, et al., Sequence co-evolution gives 3D contacts and structures of protein complexes, *Elife*. (2014) 1–17. doi:10.1101/004762.
- [146] A. Lupas, M. Van Dyke, J. Stock, Predicting coiled coils from protein sequences, *Science* (80-.). 252 (1991) 1162–4.
- [147] a Lupas, Coiled coils: new structures and new functions., *Trends Biochem. Sci*. 21 (1996) 375–382. doi:10.1016/S0968-0004(96)90126-7.
- [148] P.S. Aguilar, P. Lopez, D. de Mendoza, Transcriptional control of the low-temperature-inducible des gene, encoding the delta5 desaturase of *Bacillus subtilis*., *J. Bacteriol*. 181 (1999) 7028–33. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=94178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [149] L. Porrini, L.E. Cybulski, S.G. Altabe, M.C. Mansilla, D. de Mendoza, Cerulenin inhibits unsaturated fatty acids synthesis in *Bacillus subtilis* by modifying the input signal of DesK thermosensor., *Microbiologyopen*. 3 (2014) 213–24. doi:10.1002/mbo3.154.
- [150] L.E. Cybulski, G. Del Solar, P.O. Craig, M. Espinosa, D. De Mendoza, *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity, *J. Biol. Chem*. 279 (2004) 39340–39347. doi:10.1074/jbc.M405150200.
- [151] M. Martín, D. de Mendoza, Regulation of *Bacillus subtilis* DesK thermosensor by lipids., *Biochem. J*. 451 (2013) 269–75. doi:10.1042/BJ20121825.
- [152] J.C. Mathai, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, M.L. Zeidel, Structural determinants of water permeability through the lipid membrane., *J. Gen. Physiol*. 131 (2008) 69–76. doi:10.1085/jgp.200709848.
- [153] Q. Xu, M. Kim, K.W.D. Ho, P. Lachowicz, G.E. Fanucci, D.S. Cafiso, Membrane Hydrocarbon Thickness Modulates the Dynamics of a Membrane Transport Protein, *Biophys. J*. 95 (2008) 2849–2858. doi:10.1529/biophysj.108.133629.
- [154] C. Muhle-goll, S. Hoffmann, S. Afonin, S.L. Grage, A.A. Polyansky, D. Windisch, et al., Hydrophobic Matching Controls the Tilt and Stability of the Dimeric Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) B Transmembrane Segment, 287 (2012) 26178–26186. doi:10.1074/jbc.M111.325555.

- [155] S.-Q. Zhang, D.W. Kulp, C.A. Schramm, M. Mravic, I. Samish, W.F. DeGrado, The Membrane- and Soluble-Protein Helix-Helix Interactome: Similar Geometry via Different Interactions, *Structure*. 23 (2015) 527–541. doi:10.1016/j.str.2015.01.009.
- [156] G. Grigoryan, A.E. Keating, Structural specificity in coiled-coil interactions, *Curr Opin Struct Biol*. 18 (2008) 477–483. doi:10.1016/j.sbi.2008.04.008.Structural.
- [157] K.S. Molnar, M. Bonomi, R. Pellarin, G.D. Clinthorne, G. Gonzalez, S.D. Goldberg, et al., Cys-Scanning Disulfide Crosslinking and Bayesian Modeling Probe the Transmembrane Signaling Mechanism of the Histidine Kinase, PhoQ, *Structure*. 22 (2014) 1239–1251. doi:10.1016/j.str.2014.04.019.
- [158] T. Lemmin, C.S. Soto, G. Clinthorne, W.F. Degrado, M.D. Peraro, Assembly of the Transmembrane Domain of E . coli PhoQ Histidine Kinase : Implications for Signal Transduction from Molecular Simulations, *PLoS Comput. Biol*. 9 (2013) e1002878. doi:10.1371/journal.pcbi.1002878.
- [159] R.P. Diensthuber, M. Bommer, T. Gleichmann, A. Möglich, Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and modulators, *Structure*. 21 (2013) 1127–1136. doi:10.1016/j.str.2013.04.024.
- [160] C. Wang, J. Sang, J. Wang, M. Su, J.S. Downey, Q. Wu, et al., Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains., *PLoS Biol*. 11 (2013) e1001493. doi:10.1371/journal.pbio.1001493.
- [161] A.E. Dago, A. Schug, A. Procaccini, J. a Hoch, M. Weigt, H. Szurmant, Structural basis of histidine kinase autophosphorylation deduced by integrating genomics, molecular dynamics, and mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 109 (2012) E1733–E1742. doi:10.1073/pnas.1201301109.
- [162] P. Casino, L. Miguel-romero, A. Marina, Visualizing autophosphorylation in histidine kinases, *Nat. Commun*. 5 (2014) 1–11. doi:10.1038/ncomms4258.
- [163] A.E. Mechaly, N. Sassoon, J.-M. Betton, P.M. Alzari, Segmental helical motions and dynamical asymmetry modulate histidine kinase autophosphorylation., *PLoS Biol*. 12 (2014) e1001776. doi:10.1371/journal.pbio.1001776.
- [164] G. Patargias, P.J. Bond, S.S. Deol, M.S.P. Sansom, Molecular Dynamics Simulations of GlpF in a Micelle vs in a Bilayer : Conformational Dynamics of a Membrane Protein as a Function of Environment, *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 575–582.
- [165] P.J. Bond, M.S.P. Sansom, Membrane Protein Dynamics versus Environment : Simulations of OmpA in a Micelle and in a Bilayer, *J. Mol. Biol*. 329 (2003) 1035–1053. doi:10.1016/S0022-2836(03)00408-X.
- [166] J.E. Cronan, E.P. Gelmann, Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation., *Bacteriol. Rev*. 39 (1975) 232–56.
- [167] Y.-M. Zhang, C.O. Rock, Membrane lipid homeostasis in bacteria., *Nat. Rev. Microbiol*.

- 6 (2008) 222–33. doi:10.1038/nrmicro1839.
- [168] J.L. Ranck, L. Letellier, E. Shechter, B. Krop, P. Pernot, A. Tardieu, X-ray analysis of the kinetics of *Escherichia coli* lipid and membrane structural transitions., *Biochemistry*. 23 (1984) 4955–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6388638>.
- [169] E. Sackmann, *Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes : Physics of Vesicles*, en: *Handb. Biol. Phys.*, 1995: pp. 213–303.
- [170] J.B. Parsons, C.O. Rock, *Bacterial Lipids: Metabolism and Membrane Homeostasis*, *Prog. Lipid Res.* 52 (2014) 249–276. doi:10.1016/j.plipres.2013.02.002.Bacterial.
- [171] L. Perera, U. Essmann, M.L. Berkowitz, Role of Water in the Hydration Force Acting between Lipid Bilayers, *Langmuir*. 7463 (1996) 2625–2629.
- [172] A.G. Lee, Ca²⁺-ATPase structure in the E1 and E2 conformations: mechanism , helix–helix and helix–lipid interactions, *Biochim. Biophys. Acta*. 1565 (2002) 246–266.
- [173] M.E. Inda, M. Vandenbranden, A. Fernández, D. de Mendoza, J.-M. Ruyschaert, L.E. Cybulski, A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 3579–84. doi:10.1073/pnas.1317147111.
- [174] L.E. Cybulski, J. Ballering, A. Moussatova, M.E. Inda, D.B. Vazquez, T. a. Wassenaar, et al., Activation of the bacterial thermosensor DesK involves a serine zipper dimerization motif that is modulated by bilayer thickness, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 6353–6358. doi:10.1073/pnas.1422446112.
- [175] J. Liu, J. Yang, J. Wen, Y. Yang, X. Wei, X. Zhang, et al., Mutational analysis of dimeric linkers in peri- and cytoplasmic domains of histidine kinase DctB reveals their functional roles in signal transduction, (2014).