



**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas**  
**Universidad Nacional de Rosario**

**Tesis de Doctorado**

**“Estudio del Mecanismo de termodetección de DesK, una  
histidina quinasa termosensora de Bacillus subtilis”.**

**Presentada por Lic. María Eugenia Inda**  
**Rosario, Argentina**

**2014**

Estudio del Mecanismo de termodetección de DesK, una histidina  
quinasa termosensora de *Bacillus subtilis*.

María Eugenia Inda

Lic. En Biotecnología. Universidad Nacional de Rosario.

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Microbiología, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario IBR-CONICET, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 18 de septiembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Larisa E. Cybulski y co-dirección del Dr. Diego de Mendoza.

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

Dra. Larisa Cybulski  
Directora .....

Dr. Diego de Mendoza  
Codirector .....

Dr. Francisco Gonzalez Flecha  
Miembro del Jurado .....

Dr. José M. Delfino  
Miembro del Jurado .....

Dr. Fernando Soncini  
Miembro del Jurado .....

Defendida: .....

## Agradecimientos

---

*“Todas mis fuentes están en Tí.”*

Salmos 87.7

Llegado este momento quería agradecerles a todos aquellos que contribuyeron enormemente en mi formación profesional y me ayudaron a transitar este largo camino.

**A** Lara, gracias por su dirección en este trabajo de tesis. Por contagiarme su entusiasmo en el proyecto, por su predisposición a la discusión de experimentos y resultados, por la libertad otorgada a la hora del aprendizaje y haberme alentado a la incursión experimental. Gracias por enseñarme a hacer ciencia y, a divertirme haciéndolo; por su trato tan humano y su consideración constante.

**A** Dr. Diego de Mendoza, gracias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por contribuir a mi formación científica estableciendo colaboraciones que permitieron mi desarrollo científico, por compartir su experiencia, consejos y por su constante estímulo a ir por más.

**A** la Dra. Silvia Altabe, gracias por su disposición a ayudarme siempre y por sus consejos profesionales y a veces, tan maternos.

**A** mis compañeros del lab 6, por los buenos momentos compartidos, por las rondas de mates y las risas compartidas, por estar y por ayudar aún cuando no estaban... En particular, a Emi por “préstamos” de material, por toda su ayuda y por compartirme sus experiencias científicas. A Celi, gracias por su preocupación permanente por el bienestar de todos, por su amistad y empatía. Un agradecimiento especial para Lore, básicamente por su compañía, por esas charlas tan amenas, por sus consejos y su amistad. Y a Lucía, por su sincera amistad y buen humor, siempre.

**A** Cecilia y Daniela gracias por sus consejos y ayuda cuando la he necesitado.

**A** Inés, Viviana y Claudia, gracias por las charlas compartidas en la mañana y su simpatía, por ocuparse afanosamente en el mantenimiento y orden de materiales de uso común que nos facilita a todos la vida y nos ahorra tanto tiempo.

**A** todas aquellas personas del IBR con las que he tenido oportunidad de interactuar, que desinteresadamente me brindaron su ayuda y consejos.

**A** mis compañeros de trincheras, Fer y Ro, especialmente, a Flor, Germán, Meli, Tati, Robert, Juli, Pablito y Ale, gracias por los buenos momentos compartidos. Gracias por permitirme conocerlos. Porque pude ver gente capaz de dejarlo todo por consolar a una amigo, a gente capaz de dar ánimo después de haberlo sufrido todo, sacar fuerzas de dónde no las tenían, ser maravillosamente simples teniendo una capacidad extraordinaria, de darlo todo sin buscar nada a cambio; gracias porque me enseñaron a no dejarme llevar por las primeras impresiones, por enseñarme que lo importante no es ganar sino haber corrido, gracias a todos ellos por ser así. Gracias porque por ellos puedo decir que caminé entre grandes, grandes en humildad, en comprensión y en amor, grandes de alma y de corazón.

**A** mi familia, gracias por su apoyo constante. A mamá por ser mi ejemplo viviente de mujer virtuosa, a papá por estimularme a esforzarme siempre un poco más, a mi hermano Ramiro, por enseñarme tantas cosas de la vida y a Mauri, por ser como es. A mi abuela, gracias por todo el cariño de siempre.

**A** los amigos, gracias por estar siempre en los buenos y malos momentos, en especial a Flor, Gene y Naty, por su amor sincero e incondicional.

**A** todos ellos, gracias por regalarme parte de su tiempo, porque quizá sin saberlo, me han regalado una porción de sus vidas. De todos, un poco me llevo conmigo.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido presentados en las siguientes presentaciones y reuniones científicas:

### **PUBLICACIONES:**

- Inda, M.E., Vandenbranden M., Fernández A., de Mendoza, D., Ruyschaert J.M. Cybulski, L.E. (2014). A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 3579-84.
- Najle, S. R., Inda, M.E., de Mendoza, D., & Cybulski, L.E. (2009). Oligomerization of *Bacillus subtilis* DesR is required for fine tuning regulation of membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1238–1243.

### *Críticas sobre trabajos realizados*

- *Nature Chemical Biology* 10, 240-240 (2014)  
*Research Highlights*, “Cell biology: Too hot to handle”, on: Inda M.E., et al. A lipid-mediated conformational switch modulates the thermosensing activity of DesK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 3579-84 (2014)

### *Manuscritos en preparación*

- Cybulski L.E., Ballering J., Inda M.E., de Mendoza D., Killian A. Model for the mode of action of a bacterial thermosensor.
- Inda, M.E., de Mendoza, D., Ruyschaert J.M., Cybulski, L.E. A struggle between H-bonds and electrostatic interactions define the signaling state of a thermosensor DesK.
- Inda, M.E., Oliveira, R., Cybulski, L.E, de Mendoza, D. Temperature- dependent membrane thickness changes define MS-DesK signaling state.

### **PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES**

- 55th Annual Meeting Biophysical Society. Meeting. Baltimore, United States. Marzo 2011. *Thermosensor DesK Measures Membrane Thickness*. Cybulski, Larisa; Inda, Ma. Eugenia; Martín, Mariana; de Mendoza, Diego.
- III Latin American Protein Society Meeting. Encuentro. Salta, Argentina. Octubre 2010. *¿How does thermosensors detect cold? Characterization of the chimerical thermosensor DesK-SM integrated in liposomes*. Inda, María Eugenia; Larisa E.; de Mendoza, Diego.

## PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS NACIONALES

- XLII Sociedad Argentina de Biofísica. Buenos Aires, Argentina. Diciembre 2013. *Cool adaptation: an electrostatic switch defines the signaling state of thermosensor DesK*. Inda, Ma. Eugenia; Vandenbranden, Michell; de Mendoza, Diego; Ruyschaert, Jean Marie; Cybulski Larisa E.
- XL Sociedad Argentina de Biofísica. Buenos Aires, Argentina. Diciembre 2011. *¿How can a thermosensor detect cold?* Poster. Inda, Ma. Eugenia; Zaballa, Ma. Eugenia; Cybulski, Larisa E.; Vila, Alejandro; de Mendoza Diego.
- 1er Workshop argentino de Biofísicoquímica de Proteínas. Workshop. Córdoba, Argentina. Mayo, 2011. *¿How can the thermosensor DesK sense cold?* Poster. Inda, Ma. Eugenia; Cybulski, Larisa E.; de Mendoza, Diego.
- XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Congreso. Tucuman, Argentina. Noviembre, 2009. *in vitro reconstitution of the chimerical termosensor MS-DesK*. Inda, María Eugenia; Cybulski, Larisa E.; de Mendoza, Diego.
- XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Congreso. Tucumán, Argentina. Noviembre, 2009. *in vitro reconstitution of the chimerical termosensor MS-DesK*. Poster. Inda, María Eugenia; Cybulski, Larisa E.; de Mendoza, Diego.
- XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Congreso. Carlos Paz, Noviembre 2008. *Fine tuning of des transcriptional regulation*. Najle, Sebastián R.; Inda, María Eugenia; de Mendoza, Diego; Cybulski, Larisa E.
- 90ª Reunión Nacional de Física (AFA). Congreso. La Plata, Argentina. Noviembre 2005. *Determination of temperature coeficient of potential of fruit batteries*. Inda M. E., Bertoluzzo M. G., BertoluzzoS. M., Rigatuso R. O., y Corchs J. L.
- 89ª Reunión Nacional de Física (AFA). Congreso. Bahía Blanca, Argentina. Noviembre, 2004. *Potential difference in fruits*. Bertoluzzo S.M., Bertoluzzo M.G., Rigatuso R., Inda M.E., Barber P., Bichara D.

¿Por qué las cosas son como son y no de otra manera?

Johannes Kepler (1571-1630)

# INDICE

	Pags.
<b>I. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	
<b>II. LENGUAJE ESPECIAL</b>	
<b>III. SUMMARY</b>	
<b>IV. RESUMEN</b>	
<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1. Temperatura y vida	1
1.2. Respuestas al descenso en la temperatura.	3
1.3. <i>B. subtilis</i> : un organismo modelo	4
1.4. Genes en acción: regulación transcripcional	6
1.5. Sistema de dos componentes	7
1.6. Percepción de estímulos en bacterias mediados por histidina quinasa transductoras de la señal.	11
1.7. La membrana lipídica es un fluido bidimensional dinámico que también se regula.	13
1.8. Vía aeróbica de desaturación de ácidos grasos.	16
1.9. El estrés bacteriano no se resuelve en el diván sino en la mesada.	16
1.10. ¿Cómo se restaura la homeostasis?	20
1.11. Un modelo estructural para la catálisis de DesK.	22
1.12. Un modelo para la señalización de DesK.	22
1.13. Tras un modelo molecular de termosensado.	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	29
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	30
3.1. Cepas bacterianas, Plásmidos y Oligonucleótidos	30
3. 2. Medios y condiciones de cultivo	31
3. 3. Condiciones de crecimiento	31
3. 4. Transformación de células competentes	
3. 5. Manipulación de ADN	32
3. 5. 1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	32
3. 5. 2. Digestión de ADN con enzimas de restricción	32
3. 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
3. 7. Extracción de ácidos nucleicos. Preparación de ADN plasmídico	33

3. 8. Purificación de lípidos de <i>Bacillus subtilis</i>	33
3. 9. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes	33
3.10. Dosaje de proteínas	34
3. 11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	34
3.13. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa	35
3.13.1. Determinación cualitativa	35
3.13.2. Determinación cuantitativa	35
3.14. Ensayos de transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)	36
3.15. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .	36
3.16. Preparación de liposomas e integración de la proteína DesK-SM	37
3.17. Ultracentrifugación del gradiente de sacarosa	37
3.18. Los péptidos sintéticos.	38
3.19. Liposoma-Péptido Complejos.	38
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. CAPITULO I. Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del MS-DesK y sus variantes a nivel de la interfaz lípido-agua.	39
4.1.1. Introducción al Capítulo I	
4.1.1.1. El espesor hidrofóbico de la bicapa y su efecto sobre la función de las proteínas integrales de membrana	39
4.1.1.2. Respuesta de péptidos TM al mismatch hidrofóbico.	39
4.1.1.3. ¿Qué es el efecto “snorkeling” y “anti-snorkeling”?	41
4.1.1.4. La forma en que la naturaleza mide cambios de espesor.	42
4.1.2. Resultados del Capítulo I	45
4.1.2.1. Puesta a punto de la integración de MS-DesK <i>in vitro</i> .	45
4.1.2.2. Caracterización funcional de MS-DesK integrada en liposomas	49
4.1.2.3. Estudio <i>in vitro</i> de mutantes en el segmento transmembrana de MS-DesK.	52
4.1.2.4. La activación de DesK implica un motivo de dimerización de serinas que es modulada por el espesor de la membrana	54
4.1.2.5. Determinación del espesor de la membrana de <i>B.subtilis</i>	59
4.1.3. Discusión del Capítulo I	60
4.1.3.1. El cambio en el espesor de la bicapa modula la actividad de MS- DesK	60
4.1.3.2. Interacciones diméricas entre los STM regulan la actividad de DesK	61
4.1.3.3. La membrana como regulador alostérico de la función de DesK	63

4.2. CAPITULO II. Un switch conformacional dependiente de la interacción lipídica modula la actividad termosensora de DesK.	65
4.2.1. Introducción al Capítulo II	65
4.2.2. Resultados del Capítulo II	65
4.2.2.1. Los residuos cargados del linker son críticos para la señalización de DesK.	65
4.2.2.2. El linker se une a lípidos de membrana.	66
4.2.2.3. ¿Cambia la conformación del linker durante la activación de DesK?	69
4.2.2.4. Las interacciones electrostáticas membrana-linker juegan un rol importante en la activación de DesK	72
4.2.2.5. La interacción linker-membrana disminuye la actividad quinasa	73
4.2.2.6. ¿Puede la conformación del linker re-dirigir la transmisión de la señal?	73
4.2.3. Discusión del Capítulo II	77
4.2.3.1. Redirigiendo la información transmembrana	77
4.2.3.2. La naturaleza dual de la interacción linker-membrana	77
4.2.3.3. Un modelo de trabajo para el termosensor DesK.	77
4.3. CAPITULO III. Una lucha entre puentes hidrógeno e interacciones electrostáticas definen el estado de señalización de DesK.	81
4.3.1. Introducción al Capítulo III	81
4.3.1.1. El competidor electrostático	81
4.3.1.2. El competidor Puente H	81
4.3.2. Resultados del Capítulo III	82
4.3.2.1. El competidor electrostático	82
4.3.2.2. El competidor Puente H. Validando la interacción por puente H.	86
4.3.2.3. Puente hidrógeno vs interacciones electrostáticas: ¿quien gana la lucha en definir el estado de señalización del MS?	86
4.3.3. Discusión del Capítulo III	87
4.3.3.1. Propuesta de Modelo de termosensado	87
<b>5. CONCLUSIONES</b>	92
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	94

## Abreviaturas y Símbolos

---

ADN	ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos Grasos
Amp	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina 5´trifosfato
BCIP	5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato
°C	grados centígrados
Ci	Curie
Cm	cloranfenicol
C-terminal	Carboxilo terminal
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Em	eritromicina
Fig	figura
h	hora(s)
HK	Histidin Quinasa
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kan	kanamicina
LB	medio de Luria Bertani
min	minutos(s)
MLS	macrólidos
M&M	Materiales y Métodos
MS-DesK	MíniSensor de DesK
NBT	cloruro de tetrazolio nitro-azul
Ni-NTA	níquel-ácido nitrilotriacético
nm	nanómetros
NTPs	nucleótidos trifosfatos
N-terminal	Amino terminal
OD	Densidad Óptica

ONPG	O-nitrofenil-galactopiranosido
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción de la polimerasa en cadena
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	revoluciones por minuto
RR	Regulador de Respuesta
SDC	Sistema de Dos Componentes
SDS	dodecil sulfato de sodio
Seg	segundo
STM	Segmento Transmembrana
Spc	espectinomicina
TM	Transmembrana
Tris	N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	unidades
UM	unidades Miller
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosido
Xil	xilosa

## Lenguaje Especial

---

<b>Switch</b>	Interruptor, utilizado a semejanza para otros dispositivos que permiten alternar entre dos estados, generalmente apagado y encendido.
<b>Linker</b>	Secuencias cortas de aminoácidos existentes en las proteínas para separar múltiples dominios en una misma proteína.
<b>Random Coil</b>	Es una conformación de un polímero, donde los monómeros subunidades están orientadas aleatoriamente, mientras que todavía está unido a unidades adyacentes.
<b>Coiled coils</b>	Ramillete de $\alpha$ -hélices que se enrollan en estructuras superhelicoidales.
<b>Mismatch</b>	Desajuste entre el largo hidrofóbico de una proteína y el espesor de la membrana.
<b>Snorkeling</b>	Capacidad de ciertos residuos como la Lisina de ubicar la carga de manera de bucear fuera de la membrana, estando ella inserta
<b>Kink o flexing</b>	Doblez de una hélice
<b>Cluster</b>	Grupo de aminoácidos, moléculas o átomos con ciertas características comunes.

## SUMMARY

---

Environmental temperature variations affect most biological reactions, so cells must adapt accordingly. One such example is the fine-tuned regulation of membrane fluidity and its impact on the performance of a large array of cell physiological processes. Bacteria can remodel the fluidity of their membrane bilayer precisely via the incorporation of proportionally more unsaturated fatty acids as growth temperature decreases, this disrupts the order of the lipid bilayer and optimize fluidity. But, how do cells “sense” membrane fluidity? The histidine kinase DesK from *Bacillus subtilis* is the paradigmatic example of a polytopic membrane-bound thermosensor suited to remodel membrane fluidity when the temperature drops below 30°C providing, thus, a tractable system for investigating the mechanism of TM-mediated input-output control of thermal adaptation. So, what is the mechanism by which DesK is able to sense temperature changes and how can it turn this external physical signal into biological inner response?

This thesis focuses on how thermal information is integrated, processed, and transduced to control gene expression; how membrane-mediated structural changes of the cold sensor are accomplished; and the intriguing possibility that temperature-induced deformations of the cell membrane act as allosteric regulators of protein function.

We found that temperature sensing involves a built-in instability caused by a group of hydrophilic residues located near the N terminus of the first transmembrane segment, presumably just below the lipid/water interface. These residues buried in the lipid phase at low temperature are able to snorkel to the aqueous phase, stabilizing the position of the transmembrane segment as a buoy. At the C-terminus of the transmembrane part another boundary-sensitive beacon was detected: a Serine Zipper motif. Membrane thickness controls the signaling state of the sensor by dictating the hydration level of this metastable hydrophilic spot. Our results revealed that DesK functions as a dimer, in which the N-terminal buoy motif acts together with the C-terminal hydrophilic motif to cause a reorientation of the helices in response to changes in membrane thickness, leading to the activation of the protein.

Nevertheless, the core question remained still poorly understood: How is the information sensed by the transmembrane region converted into a rearrangement in the cytoplasmic catalytic domain to control DesK activity? Here, we also identify a “linker region” that connects the TM sensor domain with the cytoplasmic catalytic domain involved in signal transmission. The linker adopts two conformational states in response to temperature-

dependent membrane thickness changes: (i) random coiled and bound to the phospholipid head groups at the water-membrane interface, promoting the phosphatase state or (ii) unbound and forming a continuous helix spanning a region from the membrane to the cytoplasm, promoting the kinase state. Our results uphold the view that the linker is endowed with a helix/ random coil conformational duality that enables it to behave like a transmission switch, with helix disruption decreasing the kinase/ phosphatase activity ratio, as required to modulate the DesK output response. Because many sensors contain similar domains, the mechanism we describe here could prove a general theme.

## RESUMEN

---

El cambio en la temperatura ambiental afecta a las reacciones biológicas y las células deben adaptarse. Un ejemplo de ello es la regulación de la fluidez de la membrana. Las bacterias pueden remodelar la fluidez de la bicapa con precisión a través de la incorporación de una mayor proporción de ácidos grasos insaturados cuando la temperatura de crecimiento disminuye, esto altera el ordenamiento de la bicapa lipídica y optimiza la fluidez. Pero, ¿cómo pueden las células "sensar" la fluidez de la membrana? La histidina quinasa DesK de *Bacillus subtilis* es el ejemplo paradigmático de un sensor térmico capaz de remodelar la fluidez de la membrana cuando la temperatura cae por debajo de 30 ° C, proporcionando un sistema para investigar el mecanismo de adaptación térmica. Entonces, ¿cuál es el mecanismo por el cual DesK es capaz de detectar cambios de temperatura y cómo puede convertir esta señal física externa en una respuesta biológica interna?

Esta tesis estudia cómo la información térmica se integra, procesa y transduce para controlar la expresión génica y la intrigante posibilidad de que las deformaciones inducidas por la temperatura en la membrana celular actúen como reguladoras alostéricas.

Como responsable del control por temperatura, encontramos una inestabilidad incorporada al sistema causada por un grupo de residuos hidrofílicos situados cerca del extremo N-terminal del primer segmento transmembrana, presumiblemente justo debajo de la interfase lípido/agua. Estos residuos enterrados en la fase lipídica a baja temperatura son capaces de bucear a la fase acuosa, estabilizando la posición del segmento transmembrana como una boya. En el extremo C-terminal de la parte transmembrana se detectó otro motivo sensible a la temperatura: el Cierre de Serina. El grosor de la membrana controla el estado de señalización del sensor al dictar el nivel de hidratación de este motivo hidrofílico metaestable. Nuestros resultados revelaron que DesK funciona como un dímero, en el que el motivo boya N-terminal actúa junto con un motivo hidrófilo C-terminal para causar una reorientación de las hélices en respuesta a cambios en el espesor de la membrana, dirigiendo la activación proteica.

Sin embargo, la pregunta subyacente aún se mantiene: ¿Cómo puede la información detectada por la región transmembrana convertirse en un reordenamiento en el dominio catalítico citoplasmático para controlar la actividad de DesK? Aquí, identificamos una "región linker" implicada en la transmisión de la señal que conecta el transmembrana con el dominio citoplasmático. El linker adopta dos estados conformacionales en respuesta a los cambios de

espesor de la membrana dependientes de la temperatura: (i) random coil, unido a las cabezas de los fosfolípidos, promoviendo el estado de la fosfatasa o (ii) no unido, formando una hélice continua que atraviesa la región de la membrana hasta el citoplasma, promoviendo así el estado quinasa. Nuestros resultados sostienen la idea de que el linker está dotado de una dualidad conformacional hélice/random coil que permite que se comporte como un interruptor de transmisión, con una discontinuidad en la hélice disminuyendo la relación de actividad quinasa/fosfatasa, como se requiere para modular la respuesta de DesK.

## Introducción

---

### 1.1. Temperatura y vida

Sobre la superficie de la Tierra las temperaturas varían enormemente, desde los 240°C de las fuentes termales del Parque Nacional de Yellowstone hasta el interior de la Antártida, donde pueden bajar hasta -80°C (*Purves y col, 2003*). Debido a que el calor siempre se mueve desde un objeto más caliente hacia otro más frío (transferencia de calor), cualquier cambio de la temperatura ambiente afecta la temperatura corporal de los organismos que viven en ese ambiente. Los organismos poiquilotérmicos son aquellos que no regulan su propia temperatura corporal (plantas, insectos, peces, levaduras y bacterias), de manera que deben reorganizar el organismo completo en función de la nueva temperatura. Los animales endotérmicos, en cambio, para lograr independizarse de las variaciones externas deben invertir energía vital para mantener una temperatura constante.

Las células funcionan sólo en un rango estrecho de temperaturas. Si las células se enfrían debajo de 0°C,

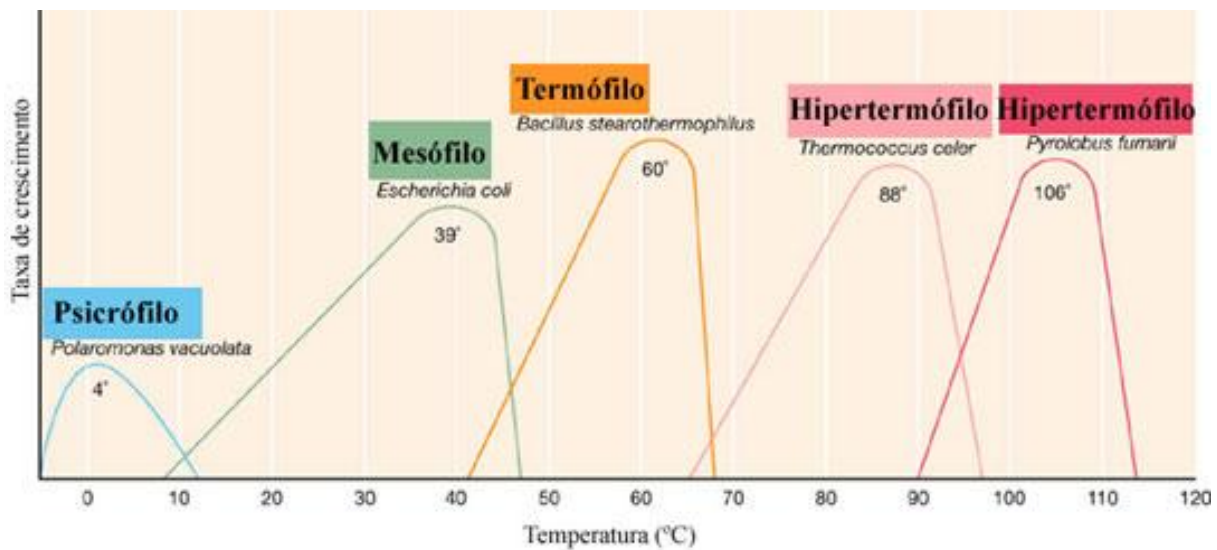
los cristales de hielo dañan sus estructuras de manera fatal. Algunos animales, por ejemplo, tienen adaptaciones como moléculas anticongelantes (azúcares y proteínas) en la sangre que los ayudan a resistir el congelamiento (*Purves y col, 2003*). La temperatura superior límite es de aproximadamente 45°C para la mayoría de las células. Si bien algunas algas especializadas pueden crecer en fuentes termales a 70°C y algunas archae pueden desarrollarse a temperaturas cercanas a los 100°C, en general, las proteínas comienzan a desnaturalizarse y pierden su función a medida que las temperaturas se aproximan a 45°C. En este marco, la velocidad de las reacciones químicas y las propiedades físicas de las biomoléculas cambian dramáticamente, de manera tal que los organismos son sólo capaces de crecer dentro de un rango termal limitado. La mayoría de las funciones celulares están limitadas a un intervalo entre 0°C y los 45°C, temperaturas consideradas como límites compatibles con la vida (*Purves y col, 2003*). Sin embargo, una especie particular suele presentar límites mucho más estrechos.

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 (*Grauman y col., 1996*). Esto ha llevado a la clasificación

Calor: Es una forma de energía transmitida desde un cuerpo a otro, en razón de la diferencia de temperaturas.

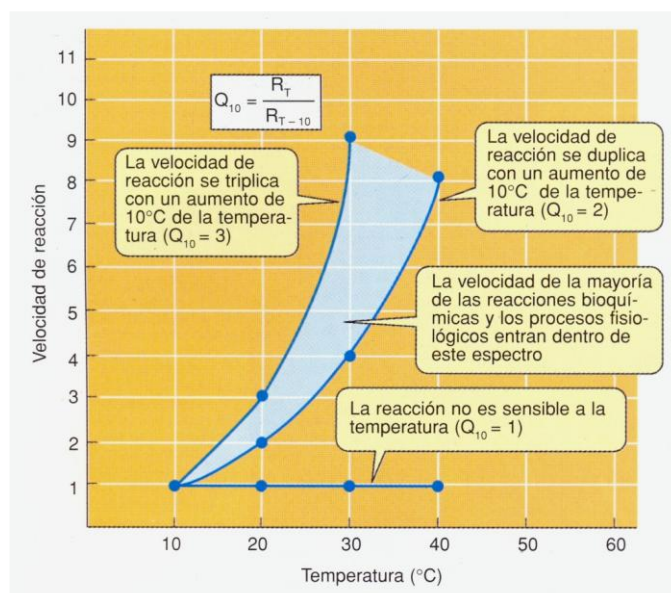
Temperatura: habilidad de un cuerpo para dar o absorber calor, habiéndose desarrollado escalas arbitrarias para medirla (Fahrenheit y Centígrada) (*Esmay, 1969*).

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) (Fig.1.1).



**Figura 1.1. Relación entre la temperatura y las velocidades de crecimiento de psicrófilos, mesófilos, termófilos y dos hipertermófilos diferentes.** En cada caso, se indican las temperaturas óptimas de microorganismos representativos. Adaptado de Brock Biología de los Microorganismos.

Aún dentro del margen entre 0°C a 45°C, los cambios en la temperatura pueden ser muy nocivos para el funcionamiento de los organismos ya que crean problemas para la mayoría de los procesos biológicos, generalmente acelerándose a temperaturas mayores. La sensibilidad térmica de una reacción bioquímica puede describirse en términos del  $Q_{10}$ , un cociente calculado dividiendo la velocidad de una reacción a una cierta



**Fig. 1.2.  $Q_{10}$  y velocidad de reacción.** Cuanto mayor es el valor de  $Q_{10}$  más rápido será el aumento de la velocidad de la reacción.

temperatura,  $R_T$ , sobre la velocidad de esa misma reacción a una temperatura 10°C menor,  $R_{T-10}$  ( $Q_{10} = R_T / R_{T-10}$ ). La mayoría de los valores biológicos de  $Q_{10}$  oscilan entre 2 y 3, lo que implica que la velocidad de la reacción se duplica o triplica a medida que la temperatura aumenta 10°C (Fig.1.2). El problema de esto radica en que no todas las reacciones componentes poseen el mismo  $Q_{10}$ . Las reacciones individuales con diferente  $Q_{10}$  se

relacionan entre si en redes complejas que llevan a cabo procesos fisiológicos (*Purves y col, 2003*). Los cambios térmicos modifican la velocidad de algunas reacciones más que la de otras, lo que altera el equilibrio y la integración que requieren los procesos. Para mantener la homeostasis, los organismos deben ser capaces de reajustar la maquinaria bioquímica para contrarrestar los efectos de la temperatura. En este trabajo de tesis, estudiaremos los efectos del descenso en la temperatura.

### 1.2. Respuestas al descenso en la temperatura.

El frío representa un estrés de tipo físico que modifica drásticamente todos los parámetros físico-químicos de una célula viva, a) la membrana se vuelve menos fluida (*Graumann y col, 1999*), b) la velocidad de difusión de solutos disminuye (*Gualerzi y col, 2003*), 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, f) las estructuras secundarias en el ARN son más propensas a formarse y por lo tanto afectan la iniciación de la traducción y g) la densidad de superenrollamiento del ADN es demasiado elevada para la apertura de la doble hélice (*Graumann y col, 1999*). Por lo tanto, la capacidad de percibir y responder a cambios en la temperatura es un asunto de vital importancia para todo organismo.

Cuando un cultivo de fase exponencial de organismos mesófilos, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, es transferido de 37°C a temperaturas menores a 20°C repentinamente (choque frío), el crecimiento celular se detiene durante lo que se ha denominado período de aclimatación, antes de reiniciar el crecimiento. Durante la aclimatación ocurre una reprogramación radical de la expresión génica, en la cual la velocidad de síntesis de un conjunto de proteínas de choque frío (“Cold shock proteins” o Csps) incrementa transitoriamente mientras que la síntesis del resto de proteínas se mantiene reprimida.

Durante el choque frío, *E. coli* induce la expresión de 26 proteínas, que tienen la particularidad de ser proteínas de unión a los ácidos nucleicos, entre las que se encuentran CspA, CspB, CspC, CspD, TF (“trigger factor”), DnaA, H-NS y GyrA entre otras (*Gualerzi y col, 2003*).

En el caso de *B. subtilis*, una amplia variedad de proteínas se sintetiza en mayores cantidades luego de una disminución de la temperatura de 37°C a 15°C (*Graumann y col, 1996*). Entre ellas se encuentran CheY, Hpr, las proteínas ribosomales S6 y L7/L12, la peptidil-prolil cis/trans isomerasa, la cisteína sintasa, la cetoácido reducto-isomerasa, la gliceraldehído

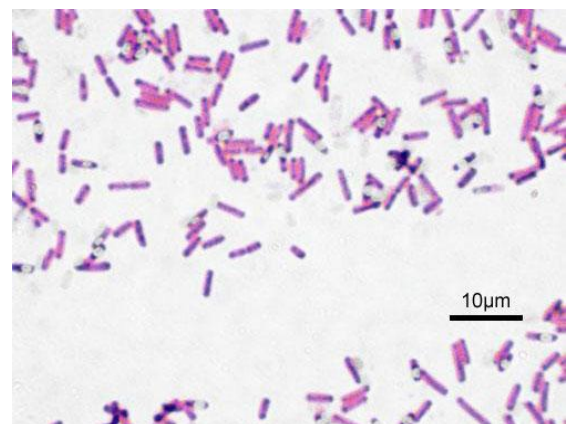
deshidrogenasa y la triosafosfato isomerasa. De manera similar a *E. coli*, en *B. subtilis* también se identificó, una familia de proteínas de bajo peso molecular involucradas en la respuesta al frío: CspB, CspC y CspD. Estas 3 proteínas en conjunto parecen ser necesarias para un crecimiento óptimo a 37°C, la adaptación a bajas temperaturas y la supervivencia en fase estacionaria (Graumann y col, 1997). Las CSPs son proteínas generales de unión al ARN, que junto a las helicasas inducidas por frío (cold induced RNA helicases o CSHs) participarían en la prevención de estructuras secundarias en el ARNm facilitando la traducción a bajas temperaturas (El-Sharoud WM, 2007, Jiang y col, 1997).

La mayoría de las proteínas que se inducen por frío en *B. subtilis* han sido identificadas a través de estudios de electroforesis bidimensional por Graumann y colaboradores, en 1997. Estudios de macro y microarreglos de ADN (Beckering y col., 2002 y resultados no publicados de nuestro laboratorio) muestran que el gen que más se induce por un choque frío en *B. subtilis* es el gen *des*, del cual hablaremos en breve.

El estudio de la adaptación a bajas temperaturas resulta de excepcional interés, dado que la comprensión de los mecanismos de supervivencia al frío es fundamental para el mejoramiento de la tolerancia de plantas y microorganismos de utilidad industrial a bajas temperaturas, tales como las del género *Lactobacillus*, utilizadas en la industria láctea. Cuando se trata de bacterias contaminantes de alimentos, en cambio, esta adaptabilidad resulta peligrosa ya que permite a las mismas sobrevivir a los procesos de refrigeración comúnmente utilizados para su conservación. Uno de estos ejemplos es el patógeno oportunista *Listeria monocytogenes* causante de la listeriosis, una enfermedad que afecta principalmente a mujeres embarazadas, neonatos y pacientes inmunodeprimidos (Phadtare y col, 2000).

### 1.3. *B. subtilis*: un organismo modelo

Entre las populares especies del género *Bacillus*, se destaca *B. subtilis*. Es uno de los procariotas más estudiados, considerado como el equivalente Gram-positivo de *Escherichia coli*. Y no ha defraudado: investigaciones basadas en *B. subtilis* han estado a la vanguardia de la biología molecular y la citología bacteriana. Actualmente, se ha constituido en el paradigma para el análisis de la fisiología de los organismos Gram-positivos, estudios de regulación proteína-gen y sobre todo de esporulación, que es un



ejemplo simplificado de la diferenciación celular bacteriana (*Priest y col., 1993*). ¿Por qué se utiliza a *B. subtilis* como sistema de estudio?

1. Tiene muchas cualidades que le hacen un organismo plástico para la práctica del laboratorio. Su tamaño relativamente grande fue aprovechado por los avances en la microscopía fluorescente para conseguir una visión increíble de la estructura dinámica de la célula. Pueden aislarse fácilmente del suelo, por ej. hirviendo la muestra por 30 minutos, de manera tal que sólo sobreviven las cepas capaces de generar esporas resistentes, a partir de las cuales se obtienen colonias en placas que se analizan en búsqueda de las características de la especie. Fácilmente cultivable en condiciones de laboratorio. Las especies del género *Bacillus* crecen bien en medios definidos utilizando variadas fuentes de carbono, con una concentración salina relativamente alta (*Madigan y col., 2004*). Posee tiempos de duplicación de 40-200 minutos según el medio (*Paulton R. J. L., 1970*), lo que permite estudiar muchas generaciones en poco tiempo. No es una bacteria patógena, lo que simplifica su uso en el laboratorio.
2. Es muy dócil para la manipulación genética ya que es naturalmente susceptible de transformación por ADN, resultando ser una valiosa herramienta genética y molecular.
3. La disponibilidad de gran cantidad de información. En 1997 se completó el proyecto de secuenciación del genoma completo de *B. subtilis* (*Kunst y col., 1997*)<sup>i</sup>(<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/>), lo que facilitó la identificación de numerosos genes y funciones asociadas.

¿Por qué es *B. subtilis* nuestro organismo de elección?

*B. subtilis* es una bacteria mesofílica, de vida libre cuyo hábitat natural es la superficie del suelo (*Trun & Trempy, 2004*). Su nicho ecológico determina que se encuentre sujeta a condiciones que cambian frecuentemente y de manera transitoria. *B. subtilis* es único en que puede elegir entre al menos tres programas genéticos diferentes cuando los recursos vitales se vuelven escasos, las condiciones se vuelven adversas o cuando la densidad celular alcanza niveles umbrales críticos:

-Bajo depleción de nutrientes y otros tipos de estrés, *B. subtilis* es capaz de diferenciarse en esporas resistentes metabólicamente inactivas en aproximadamente 7 horas (*Stragier & Losick, 1996*).

-Las células pueden entrar en fase estacionaria, caracterizada por células aisladas con movilidad a través de flagelos peritricos (las células en crecimiento exponencial son inmóviles, creciendo en cadenas) lo que les permitiría buscar una ubicación más favorable.

-Volverse competentes y captar ADN del entorno en un intento extremo por adquirir material genético nuevo que le aporte la información necesaria para adaptarse.

Cualquiera sea la decisión, diferentes programas genéticos son encendidos para guiar a la célula por el proceso adaptativo. Los mecanismos moleculares por los cuales *B. subtilis* responde a distintas situaciones de estrés han sido intensamente estudiadas y la mayoría de las respuestas específicas está mediada por sistemas de dos componentes.

#### 1.4. Genes en acción: regulación transcripcional

Las células regulan transcripcionalmente la expresión de sus genes principalmente por razones de economía, expresando sólo los genes que precisa en un ambiente particular o como

Regulación transcripcional:  
Regulación génica a nivel de la cantidad de ARNm que se sintetiza.

parte de su proceso de desarrollo (como ocurre durante la esporulación) (*Snyder & Champness, 1997*). Tiene sentido regular la expresión a este nivel, ya que poner en marcha toda

la maquinaria transcripcional de un gen cuya expresión será bloqueada en una etapa posterior, sería un despilfarro energético.

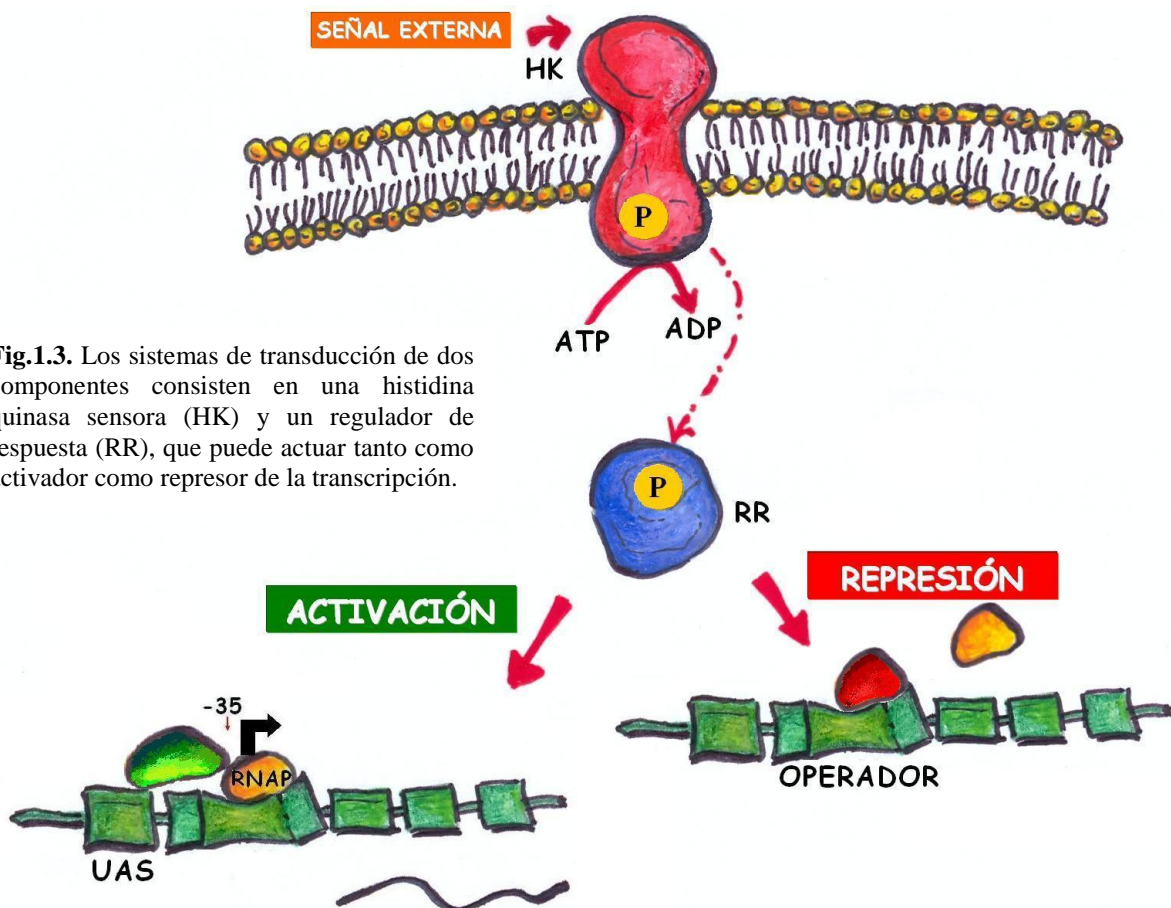
La regulación de la transcripción generalmente ocurre en el sitio de inicio de la transcripción, en el promotor. La expresión de un gen depende del promotor que porte. La regulación de la transcripción puede ser positiva o negativa, según se utilice un activador o un represor transcripcional, respectivamente. Un represor se une al ADN en una secuencia operadora, cercana o aún que se superpone con la del promotor, de manera tal de impedir que la RNA polimerasa utilice la secuencia promotora (Fig.1.3). Generalmente esto ocurre obstruyendo físicamente el acceso de la RNA polimerasa al promotor o por unirse directamente a éste, compitiendo por el lugar que debería ocupar la polimerasa. Un activador, en cambio, se une corriente arriba del promotor en un sitio “upstream activation site” (UAS), desde dónde puede ayudar a la RNA Polimerasa a unirse al promotor o para ayudar a abrir el promotor luego que la RNA polimerasa se una (Fig.1.3). Algunas proteínas regulatorias unen pequeñas moléculas llamadas efectoras, que afectan su estabilidad. Estos efectores suelen ser moléculas que pueden ser usadas por la célula para encender un operón o un metabolito esencial que no necesita ser sintetizado por la célula si está presente en el medio. Las biomoléculas regulatorias pueden ver su actividad modificada siendo fosforilada por otra proteína de la célula en respuesta a ciertas condiciones ambientales, cambiando su actividad, como sucede en los sistemas de regulación de dos componentes (*Snyder & Champness, 1997*).

### 1.5. Sistema de dos componentes

La vida en el mundo microbiano está caracterizada por una interacción continua entre la célula bacteriana y su ambiente. La habilidad de la bacteria de monitorear parámetros ambientales, incluyendo actividad osmótica y fuerza iónica, pH, temperatura y concentración de nutrientes, así como también compuestos dañinos para la célula, es una cuestión de supervivencia. Para este fin, las bacterias presentan sistemas que captan la señal por módulos sensoriales y la canalizan en respuestas intracelulares. Un mecanismo de regulación de la expresión génica que actualmente es el modelo de las respuestas adaptativas en bacterias, lo constituyen los sistemas reguladores de dos componentes (SDC).

Ejemplos de diversos procesos fisiológicos regulados por SDC, incluyen la quimiotaxis en *E. coli*, virulencia en *Salmonella* y la esporulación en *Bacillus* (que posee un sistema de regulación complejo). Se estima que tan solo en *B. subtilis* operan unos 30 sistemas de dos componentes diferentes.

El sistema de transducción de dos componentes consiste en al menos dos proteínas: la proteína que detecta la señal, histidina quinasa sensora (HK) y su correspondiente efector, el regulador de respuesta (RR) (Fig.1.3). El paradigma de los SDC propone que la proteína sensora percibe un cambio en el medio ambiente y lo comunica al regulador de respuesta, modificando la actividad del mismo mediante fosforilación. El regulador fosforilado reconoce



**Fig.1.3.** Los sistemas de transducción de dos componentes consisten en una histidina quinasa sensora (HK) y un regulador de respuesta (RR), que puede actuar tanto como activador como represor de la transcripción.

sitios específicos en el ADN y estimula la transcripción dependiendo de su estado de fosforilación (CheB~P y CheY~P son excepciones, ya que afectan la maquinaria quimiotáctica) (White, 2000). En general, la quinasa sensora se localiza en la membrana, atravesándola, de tal manera de exponer una región al entorno y la otra porción en contacto con el citoplasma. Esta orientación espacial, permite que señales externas puedan ser sensadas por la porción de la proteína sensora que se extiende fuera de la célula, para retransmitir la información sensada a su regulador de respuestas, localizado dentro de la célula.

Los sistemas de dos componentes permiten respuestas adaptativas a una gran variedad de estímulos ambientales, basados en un sistema modular simple. Ambas proteínas consisten en al menos dos dominios: La HK alberga un dominio de entrada N terminal que sensa un estímulo específico (ej por unión o por un estímulo físico). La información es transducida a través de cambios conformacionales intramoleculares, resultando en la activación del dominio citoplasmático transmisor. El transmisor, sucesivamente, activa el dominio N terminal (receptor) de su correspondiente regulador de respuesta. El regulador de respuesta da lugar a la respuesta celular apropiada, la cual es mediada por el dominio efector C terminal del RR por interacción proteína- proteína (ej. quimiotaxis) o interacciones proteína-ADN llevando a la expresión diferencial de genes. Típicamente, los genes estructurales para la HK y su correspondiente RR están organizados en operones.

Autofosforilación: reacción en la que una proteína quinasa une covalentemente el grupo  $\gamma$ -fosforil del ATP.

El estado funcional de estos dos componentes está controlado por tres reacciones de fosfotransferencia:

1. La autofosforilación en una histidina específica conservada en el dominio transmisor de la quinasa sensora utilizando ATP intracelular.
2. La fosfotransferencia del grupo fosfato a un aspartato conservado en el dominio receptor del RR (por actividad del RR). La fosforilación del aspartato produce un acil-fosfato de alta energía que puede ser usada para producir un cambio conformacional que active al RR (Stock y col, 2000). Ahora sí, el regulador de respuesta está en condiciones de encender o apagar genes. Otros activan alguna otra función celular; como decíamos, CheY modula el movimiento flagelar (White, 2000).
3. Defosforilación del RR para restablecer el sistema al estado pre estimulado. La fosfatasa puede ser una propiedad intrínseca (autofosfatasa) del RR o una actividad fosfatasa de la quinasa hacia el regulador. Fosfatasas externas también son

Fosfatasa: actividad de una histidina quinasa que estimula la defosforilación de su correspondiente regulador de respuesta.

comunes. Inclusive, algunas HKs muestran actividades autofosfatasa significativas hacia su propio grupo His-fosfato. Alternativamente, algunos RR catalizan también significativamente la retro transferencia del grupo fosfato a la correspondiente His quinasa.

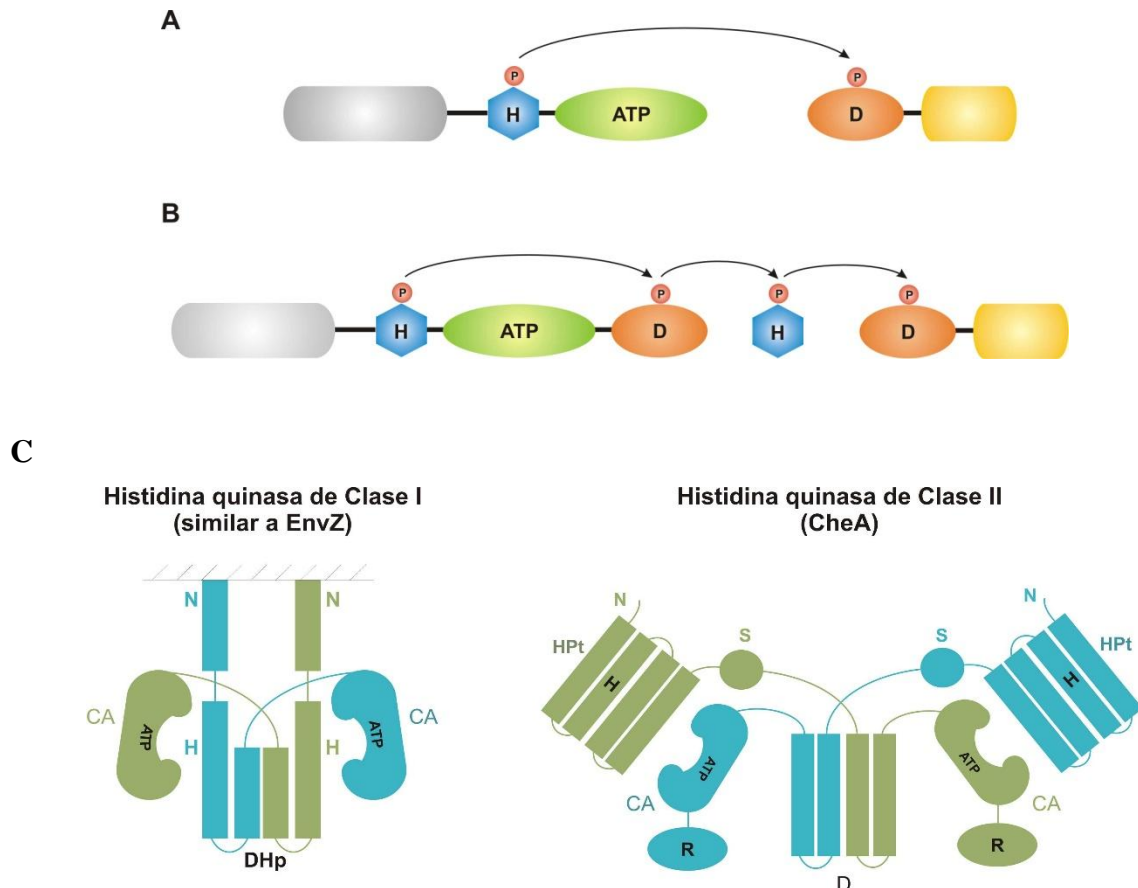
Las quinastas de los SDC pueden ser **mono** o **bifuncionales**: Si la quinasa defosforilada, incrementa la velocidad de defosforilación del regulador, se denomina bifuncional, mientras que si carece de esta propiedad, se la denomina monofuncional. ¿Qué sentido tiene esta mayor complejidad? El RR también puede ser fosforilado por dadores de grupo fosfato, tales como el acetil fosfato, o por quinastas de otros sistemas de dos componentes. Este último mecanismo es denominado comunicación cruzada y ha sido demostrado *in vitro*, aunque su relevancia fisiológica es cuestionada; se piensa que en algunos casos la comunicación cruzada es indeseable y debería ser minimizada, para lo que utilizan quinastas bifuncionales, que eliminan el grupo fosfato a través de la actividad fosfatasa. Contrariamente, cuando es necesario coordinar varias señales para integrar procesos complejos, las adecuadas son las quinastas monofuncionales, que solo poseen actividad quinasa.

En este mecanismo de transducción de señales predominan dos arquitecturas básicas:

A) Los sistemas de dos componentes **clásicos** utilizan una vía de transferencia del fosfato que involucra una sola HQ y un único RR. Ocurre una transferencia del fosfato en un único paso His→Asp, entre la His~P de la HQ y el residuo de Asp (D) del RR correspondiente (Fig. 1.4.A).

B) Los elementos básicos de un sistema de dos componentes clásico pueden combinarse para producir un **fosforelay**. Este mecanismo más complejo involucra dominios de fosfotransferencia, que contienen histidinas y reguladores que contienen residuos de aspartato adicionales. Así, el fosfato es transferido en tres etapas en el sentido His→Asp→His→Asp (Fig 1.4.B). En el primer fosforelay descrito, utilizado para iniciar el proceso de esporulación en *B. subtilis*, todos los componentes (o dominios) residían en proteínas diferentes (*Burbulys y col., 1991*). Sin embargo, los fosforelays descubiertos posteriormente en bacterias, hongos y plantas utilizan proteínas compuestas donde la quinasa, el primer dominio RR y a veces el dominio histidina fosfotransferasa (HPt), están contiguos dentro de una única cadena polipeptídica (Fig 1.4.B) (*Appleby y col., 1996*). Su complejidad ofrece múltiples puntos de control y etapas regulatorias para la activación de la vía y permitiría potencialmente integrar múltiples señales en el paso intermedio. A su vez, la HPt intermediaria posibilitaría la integración de dos, o más vías de fosforelay distintas mediante un mecanismo de regulación cruzada (*Mizuno y col., 2003*).

Los sistemas de fosfotransferencia clásicos son más comunes en procariotas mientras que los fosforelays, involucrados en general en procesos metabólicos y de desarrollo complejos, predominan en los eucariotas. Los fosforelays se encuentran involucrados en procesos tales como la osmoregulación en *Saccharomyces cerevisiae* (Maeda y col., 1994), la esporulación de *B. subtilis* y la respuesta de *E. coli* a condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas (Tsuzuki y col., 1995). Incluso se ha descrito la existencia de fosforelays en plantas superiores como *Arabidopsis* (Suzuki y col., 1998).



**Fig. 1.4. Arquitectura de los dominios en los sistemas de dos componentes.** A. Las HQs sensoras generalmente consisten en un dominio sensor transmembrana (gris) que está acoplado a un dominio central autoquinasa que a su vez puede subdividirse en el dominio de dimerización que contiene la histidina (H) y el dominio catalítico y de unión a ATP. El RR está constituido por el dominio regulatorio (aceptor del fosfato) N-terminal (D) y el dominio efector (gris claro). B. En el ejemplo de fosforelay mostrado en la figura se utiliza una HQ híbrida, que contiene tanto un dominio HQ clásico y un dominio regulatorio típico de los RRs, un dominio HPT separado y un RR. En los distintos fosforelays pueden encontrarse diferentes arreglos. C. Modelo para la organización de los dominios en las HQs de Clase I (similares a EnvZ) y clase II (similares a CheA). Los dos monómeros de la HQ se distinguen con diferentes tonos, claro y oscuro. La zona rayada indica la membrana plasmática. El dominio DHp de las HQs de clase I forma el dominio de dimerización. El mismo es a su vez el sitio de trans-autofosforilación. Por el contrario en las HQs de clase II, la trans-autofosforilación ocurre en el dominio HPT y la dimerización se lleva adelante por un dominio separado. D: dominio de dimerización, S: sitio de unión al sustrato, R: dominio regulatorio. Adaptada de Dutta y col, 1999.

En base a la organización de sus dominios las HQs han sido agrupadas en dos clases (Bilwes y col. 1999): clase I, representadas por EnvZ y clase II, representada por CheA; esta clasificación se basa en la posición de la región conservada que contiene la histidina respecto

al dominio quinasa, según esté cercano o apartado del dominio catalítico, respectivamente (Fig 1.4C).

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. La planaridad de la membrana limita el movimiento que las hélices transmembrana puedan realizar durante la transducción de la señal a los siguientes tipos: en el plano de la membrana (asociación/disociación), perpendicular a la membrana (movimiento pistón), rotación alrededor de un eje paralelo (movimiento pivote) o perpendicular a la membrana (*M. Hulko y col., 2006*).

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *B. subtilis*, ha permitido estudiar los genes que codifican para posibles SDC en esta bacteria. Estudios de mutagénesis dirigida de estas proteínas han demostrado que solo el SDC YycG-YycF es esencial para el crecimiento. Mutaciones nulas de los otros reguladores de respuesta no han afectado notablemente la morfología de las colonias, el crecimiento o la esporulación (*Fabret y col., 1999*). Estos estudios sugieren que la regulación a través de sistemas de dos componentes está destinada a incrementar la versatilidad de la respuesta de un organismo a estímulos ambientales a través de la regulación de genes que normalmente no se expresan.

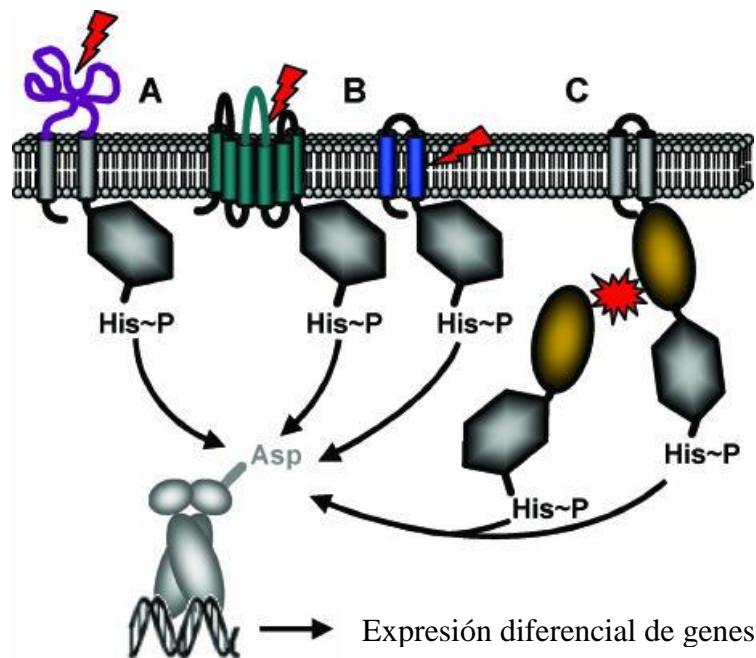
Los sistemas de dos componentes que se han estudiado en profundidad en *B. subtilis* regulan procesos tales como la competencia a través de ComP-ComA (*Ansaldi y col, 2004.*), activación de genes por anaerobiosis a través de ResE-ResD (*Ul'ianova y col, 2008*), regulación de los niveles de fosfato, a través de PhoR-PhoQ (*Abdel-Fattah y col, 2005*), la esporulación a través del phosphorelay Spo (*Stephenson y col, 2002*), y la adaptación a bajas temperaturas a través del sistema de dos componentes DesK-DesR, que ha sido identificado en nuestro laboratorio (*Aguilar y col, 2001*) y del que hablaremos en breve.

### **1.6. Percepción de estímulos en bacterias mediados por histidina quinasa transductoras de la señal.**

Con el objeto de clasificar el gran número de HKs según aspectos funcionales, los sensores son agrupados en base a la arquitectura de sus dominios.

Del análisis de 4,500 secuencias de quinasa sensoras de la base de datos SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y los resultados publicados allí sobre la percepción de la señal, la gran mayoría de las HKs pueden clasificarse en tres grupos principales:

(A) El grupo más numeroso, las HKs periplasmáticas (o extracelulares)-sensoras, incluye proteínas con un dominio extracelular sensor enmarcado por al menos dos hélices TM (Fig. 1.5A). La quinasa está localizada en el citoplasma (como sucede en todo el resto de HKs). Entonces, dominios sensores y quinasa están localizados en dos compartimentos celulares diferentes, separados por una membrana, siendo necesario la transducción de la señal transmembranal. Este tipo de topologías de membrana es típico para sentido de solutos y nutrientes.



**Fig. 1. 5. Representación esquemática de tres mecanismos diferentes de percepción de los estímulos.** (A) HKs de sentido periplasmático. (B) HKs con mecanismos de sentido asociado a regiones transmembrana: la percepción de la señal puede ocurrir tanto por las hélices que atraviesan la membrana solas o por la combinación de regiones transmembrana y loops extracelulares cortos. (C) HKs citoplasmáticas sensoras, tanto solubles como proteínas ancladas a la membrana. El estímulo es representado por una flecha o por una estrella. Las partes de la proteína involucrada en la percepción del estímulo están de otro tono. (Adaptado de Mascher y col., 2006.)

(B) El segundo grupo contiene HKs con mecanismos de sentido asociado a hélices que se extienden dentro de la membrana. La característica que unifica este grupo tan diverso de HKs sensoras es la presencia de 2 a 20 segmentos transmembranales (STM) implicados en la percepción de la señal. Estos STM están conectados por linkers muy cortos intra- o extracelulares, es decir, estos sensores carecen de dominio extracelular de entrada obvio (Fig. 1.5 B). De esta manera, el estímulo sentido está asociado a la membrana u ocurre directamente en la interfaz de la membrana. El estímulo desde dentro de la membrana involucra propiedades de la envoltura celular (como la turgencia o estrés mecánico) o es derivado de enzimas unidas a membrana u otros componentes integrales de membrana.

Otros estímulos relacionados a la membrana incluyen gradientes iónicos o electroquímicos, procesos de transporte y la presencia de compuestos que afectan la integridad de la envoltura. La mayoría de los quorum sensing de las bacterias gram positivas caen en esta categoría. Para este último grupo, dos de estos STM están conectados por un pequeño (20 a 50 residuos de aminoácidos) linker intracelular o

extracelular, el cual parece estar involucrado en la percepción del estímulo. La transferencia de la señal ocurre desde la membrana al dominio citoplasmático catalítico.

(C) El tercer (y segundo más grande) grupo de quinasas sensoras, las HKs citoplasmáticas, que incluyen tanto proteínas solubles como ancladas a membrana con su dominio entrada dentro del citoplasma (Fig. 1.5C). Esta clase de proteínas sensoras detectan la presencia de solutos citoplasmáticos, de proteínas señalizadoras del metabolismo, de estado de desarrollo de la célula o del ciclo celular. Otras respuestas citoplasmáticas responden a estímulos difusibles o internos, tales como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> o estímulos transmitidos por otros TM sensores.

### **1.7. La membrana lipídica es un fluido bidimensional dinámico que también se regula.**

La membrana citoplasmática bacteriana consiste en una bicapa laminar de fosfolípidos, una superficie de dos dimensiones prolongada de dos monocapas opuestas (*Zhang y col., 2008*).

Al ser esta una barrera selectiva que separa al interior celular de su entorno, tiene un rol fundamental en la homeostasis celular. Esta estructura supramolecular, actúa como una barrera hidrofóbica de contención, previniendo el movimiento descontrolado de moléculas polares y permitiendo la acumulación y retención de iones, metabolitos y enzimas valiosas. Los lípidos también proporcionan un entorno adecuado para el buen funcionamiento de los complejos de proteínas de membrana que participan en la bioenergética y funciones biosintéticas.

La fluidez de las membranas celulares es biológicamente importante para las funciones fisiológicas, entre las que se encuentran quimiotaxis, movilidad, síntesis de ADN, transporte de nutrientes, etc. (*Cronan y col., 1996*). Algunos procesos de

<p><u>Fluidez de la membrana:</u> grado de desorden y movimiento molecular dentro de una bicapa lipídica.</p>
---

transporte y algunas actividades enzimáticas, por ejemplo, pueden detenerse cuando la viscosidad de la bicapa se incrementa más allá de un nivel umbral. Las funciones de la membrana citoplasmática dependerán en gran medida del estado físico de las bicapas, por lo que es susceptible a los cambios en la temperatura ambiental. De hecho, se ha establecido que la función normal de las células requiere bicapas de lípidos de membrana en gran medida fluidas. La principal vía por la cual las bacterias mantienen una membrana funcional a distintas temperaturas es cambiando la composición de los ácidos grasos mediante la adaptación homeoviscosa (*de Mendoza and Cronan 1983; Vigh et al., 1993*).

Adaptación Homeoviscosa: mecanismo de homeostasis de la membrana lipídica que ayuda a mantener sus propiedades biofísicas (tales como la viscosidad y la permeabilidad de la bicapa fosfolípida) para reducir al mínimo el gasto de energía y optimizar el rendimiento de un gran número de procesos fisiológicos a la nueva temperatura. Sin esta regulación, organismos incapaces de mantener la homeostasis térmica, al pasar a una baja temperatura, tendrían membranas lipídicas con una fluidez subóptima, resultando en funciones deficientes de la membrana.

Aunque en el mundo bacteriano hay una diversidad considerable de estructuras de fosfolípidos, la mayoría de los fosfolípidos de la membrana son glicerolípidos que contienen dos cadenas de ácidos grasos (AGs) (Zhang y col., 2008).

Normalmente una de los AGs presenta uno o más dobles enlaces *cis* (es decir, es insaturada) mientras que la otra normalmente no tiene dobles enlaces (es decir, es saturada). Una bicapa sintética producida a partir de un único tipo de fosfolípido, pasa de un estado líquido a un estado cristalino rígido (o gel) en un punto de congelación característico, registrado como Transición de

Transición de fase (Tc): cambio de estado que sufren las membranas lipídicas como consecuencia de los cambios de temperatura del entorno.

fase (Tc). La temperatura a la que se produce la Tc es más baja (es decir, la membrana resulta más difícil de congelar) si las cadenas hidrocarbonadas tienen dobles enlaces *cis* (Alberts y col., 2002). Como se muestra en la fig.1.5, estos dobles enlaces *cis* generan una suave curvatura en la cadena. El grado de saturación entre las colas hidrocarbonadas es importante porque afecta la capacidad de las moléculas de fosfolípidos para empaquetarse una contra otra y, por lo tanto, afectan la fluidez de la membrana.

Las bacterias, entre otros organismos poiquilotermos, controlan la composición de los ácidos grasos de sus lípidos de membrana para mantener la fluidez relativamente constante; el mecanismo de adaptación homeoviscosa parece ocurrir a través de la incorporación de proporcionalmente más AGIs (o ácidos grasos con propiedades análogas) a medida que disminuye la temperatura. Este mecanismo de regulación parece ser una respuesta de adaptación universalmente observada. Esto disrumpe el ordenamiento cada vez más empaquetado de las membranas que ocurriría al disminuir la temperatura de crecimiento.

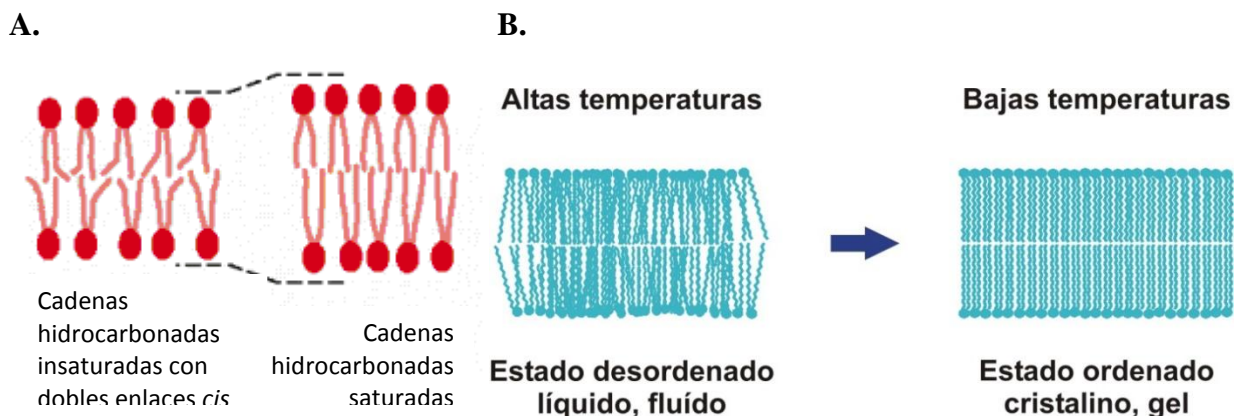
Ácidos Grasos Ramificados (AGRs): ácidos grasos que contienen ramificaciones con grupos metilo en el penúltimo carbono (iso) o antepenúltimo átomo de carbono (anteiso).

Para *E. coli* y las cianobacterias, los AGIs son esenciales. *B. subtilis*, en cambio, tiene la capacidad de crecer en medio rico a bajas temperaturas (20°C) sin AGIs, lo que se atribuye a la naturaleza de los ácidos grasos saturados (AGSs) de este organismo. *Bacilli* está provisto de un mecanismo de adaptación a la disminución en la temperatura adicional además de los

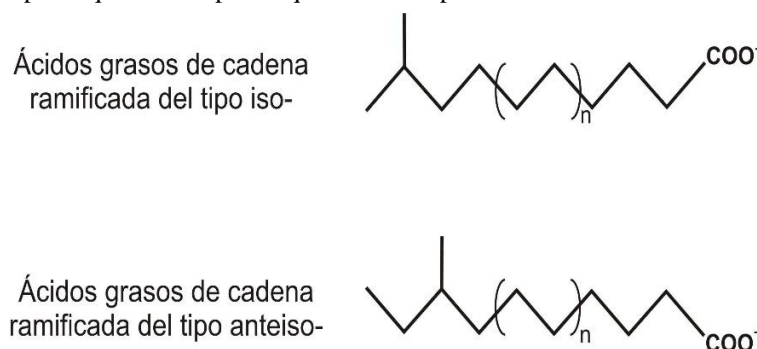
ácidos grasos insaturados: en lugar de tener cadenas de AGS rectas, como los sintetizan la mayoría de los organismos, *bacilli* incrementa la síntesis de ácidos grasos con ramificaciones anteiso-metiladas (Fig.1.6) (*Klein 1999, de Cybulski 2002, Mansilla & de Mendoza, 2005*).

Los ácidos grasos anteiso-de cadena ramificada (ai-AGRs) promueven una membrana más fluida que los ácidos grasos iso-de cadena ramificada (Figura 1.6), porque el grupo metil está más lejos del extremo de la ácido graso, impidiendo el empaquetamiento desde más adentro de la membrana. Estas ramificaciones anteiso de los ácidos grasos comparten con los dobles enlaces la capacidad de disrumpir el empaquetamiento cerrado de las cadenas acilo de los fosfolípidos y disminuyen la temperatura de transición de fase, esencial para el funcionamiento normal de la membrana.

La producción de AGIs puede mediar por sí sola la protección de la membrana al choque frío sin necesidad de variar el patrón de ramificaciones anteiso de las cadenas laterales (*Mansilla & de Mendoza, 2005*). Este aumento en la fracción de AGIs por desaturación de las cadenas de acilo con la disminución de la temperatura forma parte del mecanismo de regulación llamado **control térmico de la síntesis de ácidos grasos** del que hablaremos en breve.



**Fig. 1.5.** A. Influencia de los dobles enlaces *cis* en las cadenas hidrocarbonadas. La presencia de dobles enlaces hace más difícil el empaquetamiento de las cadenas, logrando que la bicapa lipídica cueste más congelar. Además, como las cadenas de ácidos grasos de lípidos insaturados están más separadas, las bicapas que las contienen son más delgadas que las bicapas formadas exclusivamente de lípidos saturados. B. A temperaturas fisiológicas la membrana plasmática se encuentra en un estado altamente fluido desordenado mientras que ante un descenso en la temperatura adquiere un arreglo ordenado cristalino, tipo gel, de las cadenas de acilo de los lípidos que las componen que no es compatible con sus funciones biológicas.

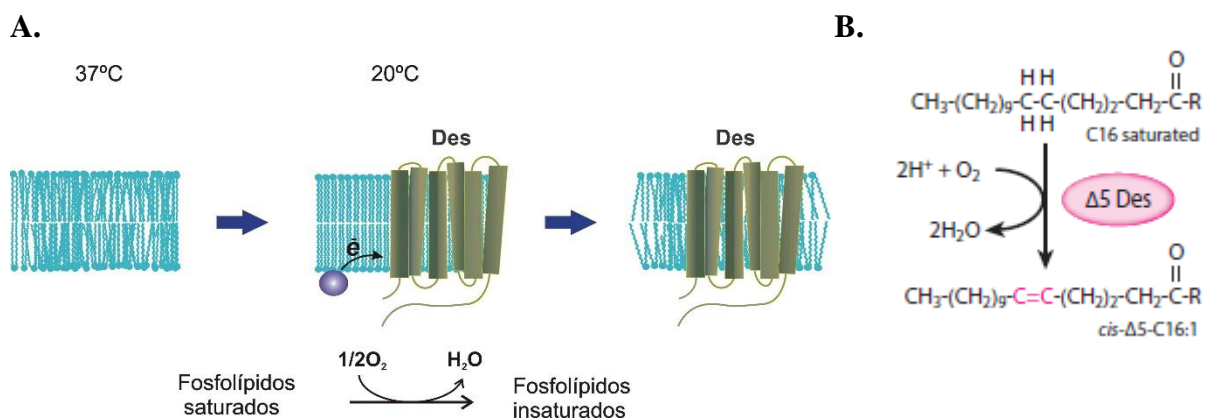


**Fig. 1.6.** Esquema de la estructura general de los AGRs del tipo iso- (AGRs-i) y anteiso (AGRs-ai). La ramificación con el grupo metilo interfiere en la interacción lateral de las cadenas de ácidos grasos otorgándole mayor fluidez a las membranas que los contienen. Debido a la posición de esta ramificación, la temperatura de fusión de los AGRs-ai es menor que la de los AGRs-i.

### 1.8. Vía aeróbica de desaturación de ácidos grasos.

La vía de síntesis de AGIs en eucariotas y en ciertas bacterias, tales como Cianobacterias, *B. subtilis* o *B. megaterium* es catalizada por un sistema de desaturación que depende de  $O_2$ , a diferencia de *E. coli*, en el que es anaeróbico (Fig.1.7). En esta vía el doble enlace se introduce postbiosintéticamente en ácidos grasos saturados. Enzimas desaturasa realizan reacciones de deshidrogenación que resultan en la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos a través de un mecanismo dependiente de energía iniciado al quitar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. Para lograr esto, enzimas desaturasa reclutan y activan el oxígeno molecular con el uso de un cluster de dihierro situado en sus sitios activos.

Estas desaturasa incorporadas a la membrana, que introducen el doble enlace de los ácidos grasos esterificados a glicerolípidos, se nombran acil-lípido desaturasa. Estas enzimas utilizan equivalentes reductores obtenidos a partir de una cadena de transporte de electrones y son capaces de introducir el doble enlace de una manera quimio-, regio- y estereoselectiva. En cuanto a la regioselectividad para estas desaturasa se han observado de diferentes tipos, en particular las  $\Delta x$  desaturasa introducen un enlace doble x carbonos desde el extremo carboxilo, reflejando las diferencias en la posición del centro activo en relación con bolsillo de unión al sustrato asociados con el reconocimiento de sustrato. Por todo esto, la desaturasa de nuestro sistema de estudio se la llama  $\Delta 5$ -acil-lípido desaturasa (Altabe y col., 2003).



**Fig. 1.7. Síntesis de ácidos grasos insaturados en *B. subtilis*.** **A.** Cuando un cultivo mantenido a 37°C es transferido a 20°C, es inducida la síntesis de los ácidos grasos mono-insaturados en una reacción que involucra una actividad desaturasa,  $O_2$  y una cadena transportadora de electrones. **B.** Desaturación postsíntesis de un ácido graso mediada por la acil lípido desaturasa,  $\Delta 5$ -Des. El grupo R es el resto 1-acil- lisofosfolípido de un fosfolípido de membrana.

### 1.9. El estrés bacteriano no se resuelve en el diván sino en la mesada.

Así lo demostraron científicos que eligieron hacer ciencia estudiando la regulación del metabolismo de lípidos en bacterias Gram-positivas. Al contrario de lo que sucede con la

respuesta a aumentos de temperatura, la cual ha sido extensamente estudiada en organismos que van desde las bacterias hasta los humanos, la respuesta a un descenso brusco en la

temperatura sólo captó la atención de los científicos hace relativamente unos pocos años.

Bloch y colaboradores fueron los primeros en describir la existencia de una **vía oxidativa** (sección 1.8) para la biosíntesis de AGIs de cadena larga en microorganismos, iniciando así el estudio de desaturasas bacterianas (Scheuerbrandt y col, 1962). Fulco contribuyó con Bloch demostrando la desaturación en varias bacterias, incluyendo *Bacillus megaterium* (Fulco y col., 1962, 1964). Uno de los hallazgos más significativos de estos investigadores, al menos para la comprensión de cambios en las propiedades de

1962	Bloch	-Descubren la existencia de una <b>vía oxidativa</b> para la biosíntesis de AGIs (sección 1.5).
1977	Fuji y Fulco	-Proponen el modelo “on/off” de <b>regulación transcripcional</b> de la síntesis de la desaturasa (sección 1.4). -En <i>Bacillus megaterium</i> , la desaturación sólo ocurre a bajas temperaturas. -Proponen ausencia de ARNm codificante de la desaturasa a 37°C.
1993	de Mendoza y Grau	-La síntesis de AGI es inducible por frío en <i>B. Subtilis</i> .
1998	de Mendoza y Aguilar	-Aísla el gen para $\Delta 5$ -Des, <i>des</i> -La transcripción del gen <i>des</i> aumenta con la disminución de la temperatura.
1999	Aguilar	-El aumento del transcrito de <i>des</i> es producido por inducción del promotor y no por estabilización a bajas temperaturas.
2001	Aguilar	-Estudia la expresión del gen <i>des</i> en el tiempo. -El SDS DesK/DesR regula la expresión del gen <i>des</i> (sección 1.5), Cuadro I. -Los AGIs inhiben la transcripción de <i>des</i> como parte de la <b>retroalimentación negativa</b> (sección 1.12).
2002	Cybulski	-Caracteriza al sistema <i>des</i> como un detector de <b>fluidez</b> más que de temperatura (sección 1.7).
2003	Altabe	- <i>B. subtilis</i> tiene sólo una desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa, Cuadro I..
2004	Cybulski	-DesR se fosforila en su Asp54 conservado, estabilizando el tetrámero.
2004	Albanesi	-DesK es una enzima <b>bifuncional</b> (sección 1.5, quinasa/fosfatasa). -DesK se autofosforila en su His188 conservada. -DesKC se comporta como quinasa constitutiva independientemente de la temperatura o la proporción de AGIs.

la membrana termosensible, fue el notable descubrimiento de la dependencia de la temperatura de la reacción de desaturación en *B. megaterium*. Presumiblemente, esta relación inversa entre la temperatura y la desaturación funcionaba en la regulación de la fluidez de la membrana en respuesta a las fluctuaciones de temperatura de crecimiento, pero el mecanismo era totalmente desconocido.

En 1977, Fujii y Fulco trabajando *in vivo* en *Bacillus megaterium*, encontraron que sólo a bajas temperaturas ocurre la desaturación de palmitato radioactivo a  $\Delta 5$ -hexadecenoato. Continuando con la caracterización de esta respuesta adaptativa, observaron que el nivel de desaturación de los cultivos crecidos a 37°C y transferidos a 20°C era mucho mayor que el observado en cultivos crecidos a 20°C. Ellos entendieron entonces, que a *B. megaterium* le

era necesario iniciar la transcripción de una proteína moduladora cuya síntesis procedía al bajar la temperatura. Propusieron, entonces, que la incapacidad de su organismo de estudio, crecido 35°C de desaturar ácidos grasos se debería a la ausencia del ARNm que codifica para la desaturasa (Fujii y Fulco, 1977). Por lo tanto, la rápida desaturación que tiene lugar en las células expuestas al choque por frío pronto sería moderado a un nivel de insaturación estacionaria a esa nueva temperatura. Sin embargo, la evidencia experimental para sostener este modelo era muy pobre.

Años más tarde, Grau y de Mendoza demostraron que la síntesis de AGIs en *B. subtilis* también es un proceso inducible por frío, viendo que el cultivo crecido a 37°C sintetizaban casi exclusivamente AGSs, pero al transferirlo a 20°C, se inducía la síntesis de insaturados, comparable al comportamiento de *B. megaterium*. Al igual que con *B. megaterium*, el sistema de desaturación de *B. subtilis* requiere la síntesis de novo de ARN y proteínas, dado que es completamente abolido por rifampicina o cloranfenicol (Grau y de Mendoza, 1993).

Sin embargo, no fue hasta fines de los 90's, que el gen que codifica para la  $\Delta 5$ -Des de *B. subtilis* pudo ser aislado e identificado por el Dr. de Mendoza, en el laboratorio del Dr. Cronan, Illinois. Para ello, se utilizaron mutantes de *E. coli* incapaces de sintetizar AGIs, las cuales fueron complementadas con una biblioteca genómica de *B. subtilis*. Los clones que fueron capaces de crecer en ausencia de AGIs en condiciones aeróbicas, llevaban un plásmido que incluía al gen *des* (Aguilar, 1998). Este hallazgo, sentó un nuevo paradigma que guía ahora la actividad de nuestra investigación.

El gen *des* codifica para la única desaturasa de *Bacillus subtilis*, la **acil lípido desaturasa,  $\Delta 5$ -des** (Fig.1.9) (sección 1.8) (Aguilar y col., 1998; Altabe y col., 2003). Esta enzima politópica, cataliza la introducción de un doble enlace *cis* en la posición  $\Delta 5$  de un amplio rango de ácidos grasos saturados existentes en los fosfolípidos de membrana (Altabe y col., 2003) utilizando ferredoxina o flavodoxina como donadores de electrones (Chazarreta y col., 2011), Cuadro I. La transcripción del gen *des* aumenta en respuesta a una descenso en la temperatura (Aguilar y col., 1998; Kaan y col., 2002).

¿Cómo podía la transcripción del gen *des* estar regulado por el choque frío? Mientras que el transcripto *des* es apenas detectable a 37°C por Northern blot, su producción se induce en forma transiente con la disminución en la temperatura (Aguilar y col., 1999; Kaan y col., 2002). Sin embargo, la inducción del ARNm de *des* se lleva a cabo en ausencia de síntesis *de novo* de proteínas, lo que indica que la transcripción se inicia con recursos ya existentes en el momento del choque por frío. En cianobacterias se habían reportado aumentos del nivel de los

transcritos de desaturasa que eran causados tanto por una transcripción aumentada como por la estabilización de su ARNm a bajas temperaturas. ¿Podía ser esto aplicable a nuestro sistema? Estudios de estabilidad del ARNm de *des* comparado con la del resto de ARNm mostraron entonces que la inducción de *des* ocurre exclusivamente a nivel de la transcripción en forma dependiente del promotor y no está causada por la estabilización de *des* ARNm, como se ha reportado para la mayoría de los genes inducibles por frío en las bacterias (Aguilar y col., 1999; Gualerzi y col., 2003). Esto explicaría por qué, análogo a *B. megaterium*, el nivel de AGIs sintetizadas por *B. subtilis* durante el primer ciclo de división fue mucho más alta que las de cultivos crecidos durante varias generaciones a 20 °C.

Una combinación de inactivación de genes por mutagénesis y un poco de suerte permitieron identificar luego la histidina quinasa (DesK) y su correspondiente regulador de respuesta (DesR), en un operón corriente arriba de *des*. Juntos regulan la expresión de *des*, participando en un sistema de regulación **clásico** de dos componentes (Aguilar y col., 2001) (Sección 1.5). La histidina quinasa sensora DesK contiene cinco hélices transmembrana (TM) y una larga cola citoplasmática C-terminal, que alberga el dominio quinasa DesKC (Fig.1.8A, Cuadro I.). Experimentos *in vitro*, demuestran que DesKC contiene la His capaz de autofosforilarse. En presencia de ATP, se autofosforila en su His188 conservada, que es el residuo elegido por las proteínas HK como blanco para su actividad autoquinasa (Albanesi y col., 2004) (Fig.1.8B). La quinasa fosforilada transfiere luego el fosfato al Asp54 conservado del efector dimérico DesR, dividido en dos dominios, el receptor de la señal, N-terminal, y el dominio efector C-terminal. La transfosforilación del dominio regulatorio del DesR dimérico promueve la estabilización de la forma activa capaz de unirse al ADN en dos sitios adyacentes, no idénticos situados dentro del promotor *des* (Fig.1.8C). A partir de allí, el tetrámero recluta la ARN polimerasa activando así la transcripción y síntesis de la  $\Delta 5$ -desaturasa, cómo lo demuestran los experimentos realizados *in vitro* (Cybulski y col., 2004) (Fig.1.8D). Esta enzima se incorpora a la membrana lipídica e introduce específicamente un doble enlace en la posición  $\Delta 5$  de las cadenas acilo pre-existentes de los lípidos de membrana (Aguilar y col., 1998, Altabe y col., 2003). Los ácidos grasos insaturados (AGI $\Delta 5$ ) recientemente modificados disminuyen la temperatura de transición de fase de los fosfolípidos, restituyendo la fluidez e inhiben la actividad transcripcional de *des*, presumiblemente favoreciendo la actividad fosfatasa de DesK (Fig.1.8E). Esto resulta en la hidrólisis de DesR fosforilado y la atenuación de la transcripción de *des*. Esta vía metabólica genera por lo tanto un circuito regulatorio que optimiza la fluidez de la membrana (Albanesi y col., 2004). Este circuito regulatorio que

detecta cambios en la fluidez y responde manteniendo la homeostasis de la membrana en *B. subtilis* se denominó la vía Des, controlada únicamente por el sistema DesK-DesR (Aguilar y col., 2001).

Evidencias genéticas y bioquímicas sugieren que del balance entre dos actividades antagonicas de la quinasa **bifuncional** (sección 1.5), DesK, se determina el estado de fosforilación de DesR: actuando DesK como dador de fosfato para con DesR y actividad fosfatasa para con DesR-P (Mansilla and de Mendoza, 2005). Como la actividad de DesR como activador transcripcional está modulada por su estado de fosforilación, la señal de transducción de la vía DesK-DesR depende de la tasa de actividades quinasa/fosfatasa de DesK. El balance entre estas actividades puede verse regulado recíprocamente por cambios en la temperatura los cuales, a su vez, dictan cambios en la fluidez de los lípidos de membrana.

**Sistema *des* en números:**

1. La actividad máxima de autofosforilación de DesK integrada en membrana se alcanza a los 5 min (M.Martin, 2009, L.Cybulski y col., 2010).
2. La fosforilación de DesR alcanza niveles máximos a los 30 seg. (Albanesi y col., 2004)
3. DesR-P tiene un tiempo medio de hidrólisis de 51 minutos en ausencia de DesK (Albanesi y col., 2004).
4. DesKC defosforila a DesR-P en 40 seg por actividad fosfatasa con la formación transiente de DesKC-P seguido de la completa defosforilación de ambas a los 30 min (Albanesi y col., 2004).
5. La expresión de *des* a 20°C es 10-15 veces mayor que a 37°C (Aguilar y col., 2001).
6. El transcripto *des* alcanza los máximos niveles 2-3hs de la inducción (Aguilar y col., 2001).
7. La máxima actividad  $\beta$ -galactosidasa para la fusión transcripcional Pdes-lacZ se alcanza a las 6 hs de inducido el cultivo, luego disminuye (Aguilar y col., 1999).
8. DesR se defosforila completamente luego de crecido el cultivo 12hs a 25°C (Aguilar y col., 2001).

**Fig. 1.8. Modelo de la regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados en *Bacillus subtilis*.** DesK podría asumir diferentes estados de señalización en respuesta a los cambios en la fluidez de la membrana. Un aumento en el orden de las cadenas de acilo de lípidos de membrana promueve del estado fosfatasa (A) al estado-quinasa dominante de DesK, que se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a DesR (B). La fosforilación de DesR, mediada por DesK, permite la interacción del dímero de DesR-P con el promotor de la ARN polimerasa (C), lo que resulta en la activación transcripcional de *des* (D)  $\Delta 5$ -Des es sintetizada y, una vez insertada en la membrana, desatura las cadenas acilo de los fosfolípidos de membrana (E). Estos AGIs recién sintetizadas causan una disminución en el orden de los lípidos de membrana que favorecen un estado-fosfatasa dominante de DesK, conduciendo a desfosforilación de DesR, apagando así la transcripción. Ver ilustración en la página siguiente.

### 1.10. ¿Cómo se restaura la homeostasis?

La desaturación de ácidos grasos es también parte de la retroalimentación negativa que mantiene la homeostasis. Los AGIs, productos de la  $\Delta 5$ -desaturasa, actúan como señal negativa para la transcripción de *des*. Esta regulación por el producto final se evidencia en mutantes incapaces de sintetizar AGIs luego de incubaciones prolongadas a bajas temperaturas en las que la transcripción del promotor de la desaturasa nunca se detiene.

Asimismo, la adición de AGIs al medio de cultivo de células previamente sometidas al choque frío inhibe específicamente la inducción (Aguilar y col., 2001).

Casualmente, se descubrió que *B. subtilis* produce un aumento significativo de AGIs a 37°C en cepas crecidas en ausencia de isoleucina (Weber y col., 2001). *B. subtilis* tiene una ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BKDH) que produce precursores de cadena ramificada anteiso-acyl-CoA a partir de isoleucina. Como mencionamos, los ácidos grasos anteiso ramificados (Fig.1.6), sintetizados a partir de cetoácidos derivados de isoleucina, disminuyen la temperatura de transición de los fosfolípidos de membrana porque poseen ramificaciones en la posición anteiso, siendo entonces importantes para mantener la fluidez apropiada. A partir de esta observación experimental se pensó que disminuyendo el contenido de ácidos grasos derivados de isoleucina, por limitar el suministro de este aminoácido, se podrían simular los efectos del choque frío a temperatura constante. Al crecer las células en ausencia de isoleucina se reduce dramáticamente la cantidad de AGR-ai de las membranas, permitiendo así el mayor ordenamiento de los lípidos *in vivo* en condiciones isotérmicas, por lo que se activa la transcripción de *des* a 37°C.

Los resultados obtenidos proveen evidencia que es la fluidez de la membrana, más que la temperatura de crecimiento, la que controla la transcripción del gen *des* (Cybulski y col., 2002). Más aún, una disminución en la temperatura en ausencia de isoleucina tiene efectos aditivos en la expresión del gen de la desaturasa. Entonces, una disminución en el contenido de la membrana de ácidos grasos derivados de isoleucina simula el choque frío, siendo ambos estímulos inductores de la síntesis de AGIs.

De todo esto se interpreta que la transcripción de *des* es inducida por la habilidad de DesK de sensor una disminución en la fluidez de la membrana generada tanto por un descenso de la temperatura como por una depleción de precursores de ácidos grasos de bajo punto de fusión a la misma temperatura (Cybulski y col., 2002).

Estos resultados experimentales plantean un interrogante novedoso: ¿Cómo puede DesK sensor un cambio físico en la fluidez de la membrana para traducirlo en una señal química de activación?

Uno o más de las cinco hélices TM en DesK podrían sufrir un cambio conformacional inducido por un cambio en el estado físico de la bicapa lipídica, y transmitir esta información al dominio citoplasmático de DesK, alternando su actividad. Pero, ¿cómo puede ocurrir esto a nivel molecular? ¿Cuáles son los rearrreglos estructurales que le permiten a DesK alternar entre el estado quinasa y fosfatasa?

### 1.11. Un modelo estructural para la catálisis de DesK

Recientemente se elucidó por rayos X un set de estructuras del core catalítico de DesK (DesKC, Fig 1.9, Cuadro I). Estas estructuras proveyeron una valiosa visión estructural en la regulación de las actividades catalíticas de la proteína (Albanesi y col., 2009). DesKC muestra una estructura homodimérica característica también observada en otras quinasas (Varughese y col., 1998). Cada monómero consiste en un hairpin N-terminal de dos hélices antiparalelo (hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) que incluye la histidina fosforilable (H-188), conectada por una corta región linker al dominio de unión a ATP C-terminal. Los hairpins helicoidales de los dos monómeros interactúan uno con el otro para formar el dominio central “four-helix-bundle” (4-HB), conocido como dominio DHP (dimerization and histidine phosphotransfer). En cada monómero, el extremo N-terminal de la hélice  $\alpha 1$  se extiende más allá del 4-HB, conectando el core catalítico con el dominio TM sensor. La comparación de todas las estructuras de DesKC identifica tres estados conformacionales distintivos de la proteína (quinasa, fosfatasa y fosfotransferasa), que difieren significativamente en la organización cuaternaria y en la flexibilidad interna. Las estructuras difieren en el empaquetamiento interhelicoidal del dominio DHP y la movilidad y orientación relativas de los “ATP Binding Domains” (ABDs), dominios de unión de ATP. Estos estudios estructurales, sugirieron que el termosensor es activado por frío por un rearrreglo interhelicoidal específico en el dominio central 4-HB. Este dominio helicoidal tiene una plasticidad remarcable que influencia las diferentes actividades catalíticas, tanto por modificación de la movilidad de los dominios de unión a ATP, requeridos para la actividad autoquinasa, o al modular la unión de su correspondiente regulador de respuesta, crucial para el mantenimiento de las actividades fosfotransferasa y fosfatasa.

Four-helix bundle (4-HB): estructura proteica estabilizada principalmente por interacciones de empaquetamiento entre las caras hidrofóbicas de las hélices anfifílicas.

### 1.12. Un modelo para la señalización de DesK

El reemplazo de la H-188 por valina provee un modelo apropiado para el estado fosfatasa-competente de DesK porque DesK<sub>H188V</sub> ha mostrado que retiene actividad fosfatasa específica hacia el DesR-P a niveles comparables a los alcanzados por DesK salvaje, tanto *in vivo* como *in vitro* (Albanesi y col., 2009). DesK<sub>H188V</sub> tiene una conformación más compacta y rígida que el estado quinasa-competente de DesKC (Fig 1.9a, estado fosfatasa). Esto es debido a interacciones intramoleculares extendidas que involucran tanto una interacción más estrecha entre los dominios DHP y ABD en cada monómero (Fig 1.9a, estado fosfatasa), como la

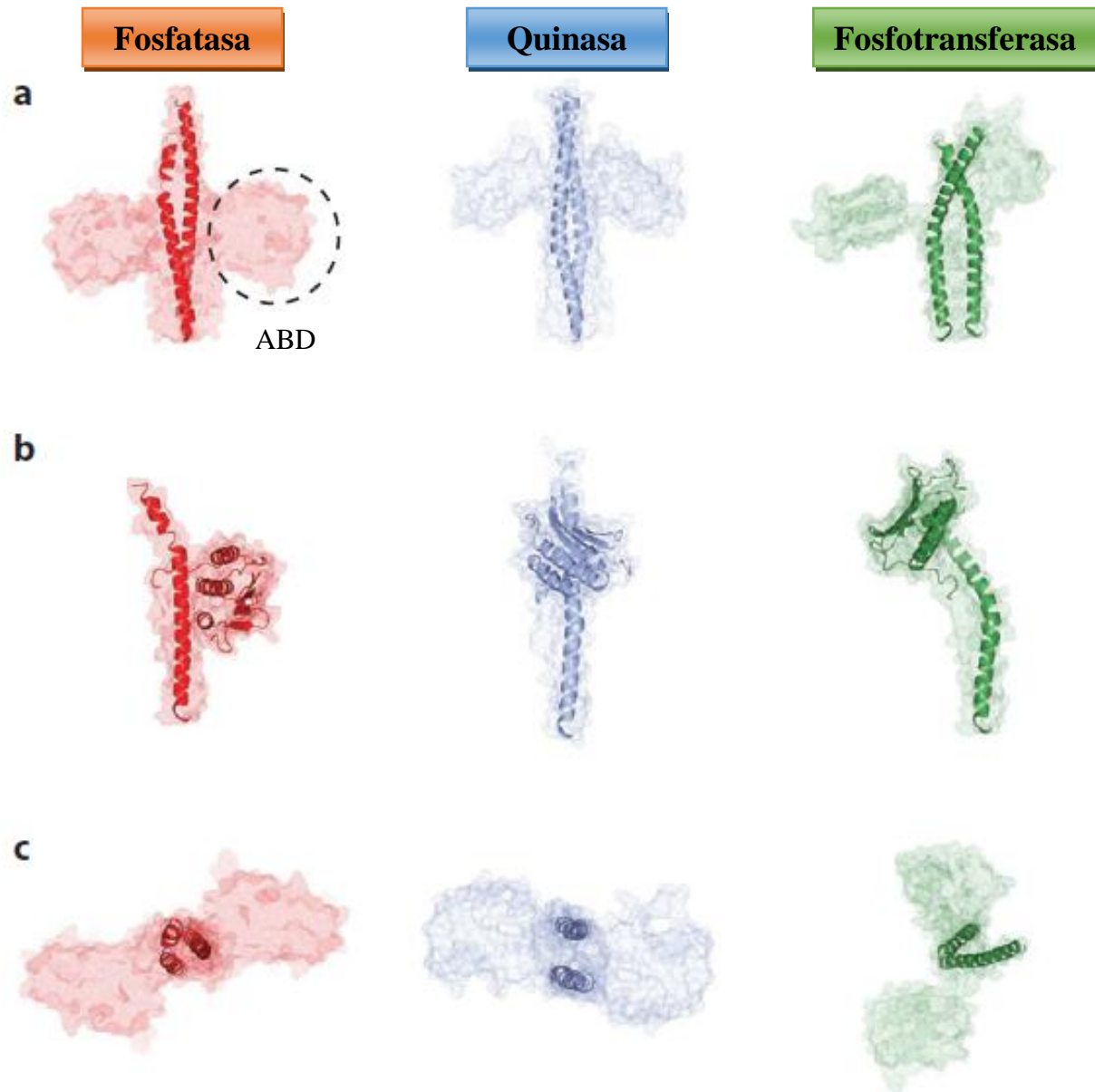
formación del coiled coil de dos hélices, que continúa el 4-HB hacia el dominio TM (Fig 1.9c, estado fosfatasa); en la estructura del estado quinasa-competente de DesKC, en cambio, el dominio ABD se encuentra libre y flexible (Fig 1.9c, estado quinasa).

La comparación de los estados fosfatasa y quinasa (Fig 1.9a-c) sugiere que los contactos vistos entre el dominio DHP y el ABD, así como el coiled-coil de dos hélices paralelo, mantienen una asociación lábil para liberarse por la autofosforilación y mantener la actividad fosfatasa bajo el control del dominio sensor. Entonces, en una membrana fluida el dominio TM estabilizaría la conexión coiled coil y el core catalítico en una conformación rígida con los ABDs unidos al dominio DHP (Fig 1.9a-c, estado fosfatasa). Esta conformación inhibe la actividad autoquinasa, y la superficie DHP es competente para interactuar con fosfo-DesR. Al recibir la señal de frío, el coiled-coil paralelo de doble hélice (Fig 1.9c, estado quinasa) se disrumpiría y la reorganización estructural correspondiente liberaría el dominio de unión a ATP para la fosforilación de la histidina y produciría así el estado quinasa-encendido (Fig 1.9 a, b, estado quinasa). La fosforilación de DesKC induce una conformación asimétrica diferente con una pronunciada flexión de la hélice  $\alpha 1$ , capaz de unir y transferir el grupo fosforilo al aspartato conservado de DesR, activando su dominio de respuesta (Figura 1.9 a, b, estado fosfotransferasa).

El modelo que mejor da cuentas de las propiedades del dominio catalítico de DesK es el modelo de tres estados de señalización por enrollamiento dinámico y se puede aplicar a otros receptores procarióticos o eucarióticos de diversas actividades biológicas. En este modelo dinámico el estado correspondiente a quinasa-encendida corresponde a múltiples re arreglos helicoidales en la distribución 4-HB (Albanesi y col., 2009). Las

<p><u>Coiled-coils</u>: ramillete de <math>\alpha</math>-hélices que se enrollan en estructuras superhelicoidales.</p>
--

hélices alfa son elementos comunes de transducción de la información y para ellas se han propuesto diferentes tipos de movimiento helicoidales haciendo trabajo mecánico para coordinar las señales de input/output. Independientemente de la forma precisa en que la señal de frío alcanza a la DesK 4-HB, los datos estructurales sugieren que depende de la rotación de los segmentos TM, que en lo sucesivo fuerza las dos hélices conectoras de la membrana de manera de dejar la conformación coiled-coil favoreciendo el estado quinasa encendido de DesK (Fig 1.9 a-c).



**Fig 1.9. Bases estructurales para la regulación de la catálisis de DesK.** Las estructuras observadas de los homodímeros DesKC (mostrados como modelos de superficie con la hélice  $\alpha 1$  resaltada) están alineadas para ilustrar, desde tres visiones diferentes, cada conformación considerada competente para los estados fosfatasa, quinasa y fosfotransferasa de DesKC. Las estructuras de DesK corresponden a los files de Protein Data Bank 3HJH (izquierda), 3GIE (medio) y 3GIG (derecha). Uno de los dominios de unión a ATP (ABDs) está resaltado con un círculo punteado. Todas las estructuras están alineadas desde los residuos 180 al 211, correspondiendo al C-terminal de las hélices  $\alpha 1$ . Este alineamiento facilita la observación y la comparación de los movimientos relativos de cada dominio, mientras DesKC cambia su conformación desde un estado fosfatasa-competente a un estado quinasa-competente y fosfotransferasa. (a) El alineamiento de las estructuras muestra cómo los ABDs pierden su fuerte interacción con el dominio de 4-HB (que se muestra en el estado fosfatasa competente) a lo largo del ciclo catalítico de DesK (para una explicación detallada véase texto principal). (b) De la comparación de las estructuras se ilustra la rotación de los ABDs alrededor de un eje perpendicular a la hélice  $\alpha 1$ . Una característica notable de esta transición estructural es una curvatura pronunciada de la hélice  $\alpha 1$  sólo abajo de la H-188, que por lo tanto deja espacio para la entrada de DesR y su interacción con la H-188 fosforilada (estado-fosfotransferasa competente). (c) Las estructuras de DesKC son vistas desde la membrana, mostrando la rotación de los ABDs alrededor del eje principal de las hélices  $\alpha 1$ . La formación de un colied-coil paralelo en la extremos amino terminales de hélices  $\alpha 1$ , observada sólo en el estado de la fosfatasa, está propuesto para desempeñar un papel clave en la conformación adoptada por DesK en respuesta a los cambios en la fluidez de la membrana.

### 1.13. Tras un modelo molecular de termosensado

La estructura cristalina de toda la porción citoplásmica de DesK ha proporcionado un marco molecular para interpretar los principios mecanicistas básicos por los que la proteína sensora alterna de entre las actividades respuesta autoquinasa y fosfatasa. No obstante, dado el papel fundamental que desempeñan los lípidos de membrana en la función de DesK, surge una pregunta fundamental: ¿Cuáles son los reordenamientos de las hélices TM que subyacen a las transiciones catalíticas a lo largo de la vía de transducción de la señal?

La pregunta clave que queda por responder entonces, es cómo DesK percibe los cambios de fluidez. Las proteínas sensoras, cuyos mecanismos de señalización se han dilucidado, detectan la presencia de un químico. DesK, sin embargo, estaría detectando cambios físicos que ocurren en la membrana al variar la temperatura. Elucidar cuál es la señal que despierta la actividad quinasa en DesK, nos permitirá entender el punto de partida del mecanismo molecular nuestro sistema.

Dijimos que DesK salvaje se comporta como quinasa a 25°C y como fosfatasa a 37°C, sin embargo, si sólo se expresa el dominio DesKC soluble *in vivo*, se comporta como una quinasa constitutiva, totalmente desregulada por temperatura o presencia de AGIs (Albanesi y col., 2004). Estos resultados aportan soporte experimental de la importancia del dominio hidrofóbico transmembrana (TM). Nos preguntamos, entonces, cuál sería el rol de las hélices TM de DesK: ¿Percibir y transmitir activamente la señal del cambio de la fluidez? ¿O simplemente la de anclar el dominio catalítico para aproximarlos a la membrana y así percibir la señal? Sabemos, que existe un grupo de quinasas (las tipo III citoplasmáticas, sección 1.6) como ArcB que detecta el estado redox sólo si está anclada a la membrana, pero independientemente de la secuencia del segmento TM. Estudios genéticos de la región transmembrana desarrollados en nuestro laboratorio intentaron aclarar este dilema:

**A. Predicciones:** Por predicción de programa bioinformáticos de topología de membrana se predecían cuatro segmentos transmembrana (STM) primarios, bien definidos y un tramo anfipático N-terminal (residuos 8-30), extra, que fue propuesto como secundario STM debido a su corta longitud (Cybulski y col., 2010).

**B. En búsqueda del quinto STM.** Para verificar si el putativo STM constituye el quinto STM, se determinó la topología de DesK por el método de accesibilidad a residuos sustituidos por cisteínas utilizando el reactivo Maleimide PeoBiotina (MPB), que reacciona con estos residuos, y no atraviesa la membrana (Bogdanov y col., 2005). Reemplazos únicos de Cys fueron introducidos en posiciones 4, 32, 61, 96 y 132 a lo largo de la secuencia de DesK (Fig 1.10A). Las distintas formas de DesK fueron expresadas como proteínas con colitas histidina

en el extremo C- terminal en *E. coli* BL21 y expuestas a MPB. Este análisis confirmó la existencia de cuatro STM y el anfipático tramo predicho como STM secundario, constituye de hecho un segmento transmembrana adicional (Cybulski y col., 2010).

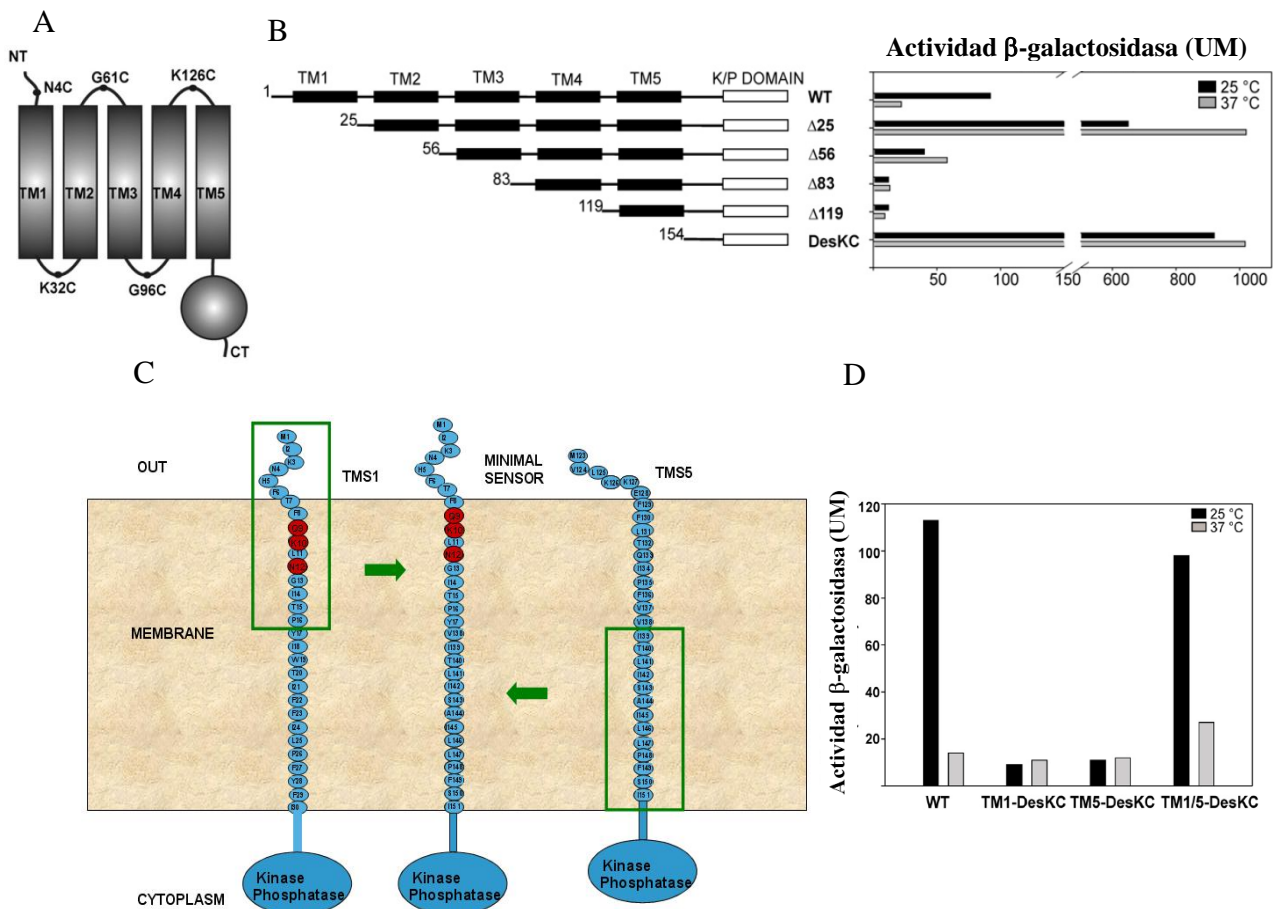
Casualmente este STM adicional es crucial para detectar cambios de fluidez, ya que la delección del mismo lleva a una pérdida total de la regulación por temperatura, dejando a DesK congelada en un estado “quinasa dominante”.

**C. Los segmentos transmembrana perciben la señal.** De manera que DesK tiene cinco segmentos que atraviesan la membrana con el N-terminal localizado del lado externo de la membrana plasmática. Pero, ¿cuál es el rol que cumplen los 5 STM en la percepción del frío? El análisis por delección de cada uno de los STM permitió monitorear el estado de señalización de cada uno de los STM predichos. Cada una de las versiones truncadas delecionadas secuencialmente fueron expresadas *in vivo* y evaluadas sus actividades por medio la actividad  $\beta$ -galactocidasa. A partir de observar el comportamiento de las cepas portadoras de las proteínas truncadas en función de la temperatura, se concluyó que delecciones sucesivas producen una pérdida de la actividad quinasa, pero mantiene la actividad fosfatasa, indicando que la integridad de las proteínas truncas no se ve afectado. Los STM serían, entonces, los responsables de percibir la señal de cambio en la fluidez, además de anclar el dominio citoplasmático de DesK a la membrana, regulando la tasa de actividades quinasa a fosfatasa en el sensado de las condiciones ambientales (Fig.1.10.B).

**D. Los últimos serán los primeros.** Sorprendentemente, la delección del primer STM, último en reconocerse como tal, llevaba a una pérdida total de la regulación por temperatura, dejando a DesK congelada en su estado quinasa, independientemente de la temperatura de crecimiento, de manera similar a como se comporta la proteína truncada soluble DesKC. Este resultado arroja la hipótesis de que en este primer segmento inicialmente inadvertido residen elementos regulatorios importantes (Fig.1.10.B).

**E. El Minisensor de DesK: sensando frío en su versión más minimalista.** Para simplificar el análisis del mecanismo por medio del cual los STM regulan la actividad de DesK, se construyó una serie de proteínas que tuvieran un solo STM y se analizó si conservaban la actividad de la proteína completa. Los segmentos TM1 y TM5 resultaban relevantes, porque TM1 es necesario para apagar la actividad quinasa bajo condiciones no estimuladas de crecimiento (Fig. 1.10.B), mientras que el TM5 esta directamente conectado al dominio catalítico via coiled coil de dos hélices, que finalmente controla el estado de señalización de DesK (Albanesi y col., 2004). ¿Podrían los movimientos inducidos por el frío del TM1 regulatorio propagarse directamente al TM5 para controlar la actividad de DesK? Se

construyó una proteína de ingeniería, TM1/5, compuesta por los primeros 17 residuos del dominio N-terminal unido peptídicamente a los últimos 14 residuos del dominio C-terminal del TM5, que se continúan con el dominio catalítico citoplasmático (Fig 1.10.C). Sorprendentemente, mientras que las proteínas de fusión TM1-DesKC y TM5-DesKC eran incapaces de estimular la activación de DesKC, la regulación térmica se recuperó con la quimera TM1/5-DesKC. De hecho, TM1/5 mantiene niveles de actividad quinasa y fosfatasa similares a la proteína politépica DesK. La minimalización de la arquitectura del sensor no ha comprometido su actividad de modo apreciable, ni su localización en la membrana plasmática; los experimentos de caracterización de la quimera demuestran que el segmento TM de paso único de 31 residuos es funcionalmente equivalente a los 151-residuos con cinco TMs de paso múltiple, DesK al menos en lo referido a su función. Tanto en el sensado como la transmisión de la señal del sensor salvaje pudieron ser capturados en la proteína transmembranal de un solo paso híbrido TM1/5, a la que llamamos “minisensor de DesK” (MS), debido a su simplicidad (Cybulski y col., 2010, Cuadro I). El descubrimiento de que tanto el sensado como la transmisión de DesK podía capturarse en un solo segmento TM quimérico, abre un nuevo camino para dilucidar por primera vez el detalle molecular por medio del cual los dominios transmembrana sensan y transmiten la información al sistema transcripcional. Esta proteína de ingeniería resulta, entonces, un modelo válido de estudio de termorregulación ya que alberga la esencia del funcionamiento del sensor biológico.



**Fig. 1.10.** A. Determinación de la topología de DesK. Cinco aminoácidos que según el análisis de hidropatía se encuentran en las regiones de los loop fueron reemplazados por cisteína en cinco construcciones diferentes: N4C, K32C, G61C, G96C, K126. Modelo de topología de DesK. Los rectángulos definen los TM. N terminal (NT) y C terminal (CT). B. Delecciones secuenciales de los segmentos hidrofóbicos de DesK. Las cajas negras rectangulares representan segmentos TM previstos y la caja blanca la región del dominio citoplasmático catalítico. Las actividades  $\beta$ -galactosidasa muestran las regiones involucradas en el sensor por temperatura. C. Construcción de las proteínas de fusión TM1-DesK, MS-DesK y TM5-DesK. Las proteínas de fusión se obtuvieron mediante la vinculación de TM1 (aminoácidos 1-31), TM5 (aminoácidos 123-151), y TM1/5 (aminoácidos 1-17 de TM1 y 138-151 de TM5) a DesKC. D. Mediciones *in vivo* de las actividades de las correspondientes proteínas de fusión.

¿Cuál es el mecanismo por medio del cual DesK es capaz de percibir los cambios de temperatura y cómo puede convertir esta señal física externa en una respuesta biológica? Para responder a estas preguntas en este trabajo de tesis utilizaremos una serie de abordajes genéticos, biofísicos, bioquímicos y estructurales utilizando como modelo al Sensor Mínimo DesK.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar a nivel biofísico-molecular el mecanismo por medio del cual DesK es capaz de percibir los cambios de temperatura y cómo puede convertir esta señal física externa en una respuesta biológica. Utilizamos como modelo de estudio al Sensor Mínimo de DesK (MS-DesK).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

#### 1- Caracterización del termosensor MS-DesK y sus residuos claves de activación.

- a. Identificar residuos claves en el mecanismo de señalización del termosensor DesK. Estudiar el comportamiento *in vitro* de mutantes puntuales en el motivo “sunken buoy” (SB) diseñados para poner a prueba la siguiente hipótesis: un grupo de aminoácidos hidrofílicos localizados en el interior hidrofóbico de la membrana constituyen el switch molecular que permite a DesK alternar entre estados quinasa y fosfatasa.
- b. Reconstituir al MS-DesK en liposomas sintéticos, así como en el entorno lipídico natural (lípidos de *Bacillus subtilis*) y caracterizar funcionalmente a los proteoliposomas como sistema simplificado de estudio de la interacción lípido-proteína en la detección de la señal (disminución de la temperatura).

#### 2- ¿Cuáles son los rearrreglos conformacionales que sufre un sensor al variar el estado de señalización?

- a. Analizar el rol de la región “linker” que conecta la región transmembrana con la región citoplasmática catalítica intracelular en la percepción y transmisión de la señal.
- b. Ensayar la hipótesis de las interacciones hélice-hélice a nivel de membrana como mecanismo de activación.
- c. Analizar cómo las propiedades de los lípidos afectan el comportamiento biofísico del segmento transmembrana (STM) y región linker y su consecuencia en la regulación (cambios en la inclinación, estado de dimerización), utilizando péptidos que corresponden al STM, a la región linker y al MS-DesK integrado en liposomas de composición definida.
- d. Establecer un modelo que integre el sensado de la señal con la transmisión y la activación de la región catalítica en función de la señal externa.

## Materiales y Métodos

---

### 3.1. Cepas bacterianas, Plásmidos y Oligonucleótidos

**Tabla I. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesina**

Cepa bacteriana	Características genotípicas relevantes	Referencia
<i>B. subtilis</i>		
<b>AKP3</b>	JH642 <i>amyE::[PdesWT-lacZ]</i>	Aguilar y col., 2001
<b>AKP21</b>	AKP3 <i>desKR::Km<sup>R</sup></i>	Aguilar y col., 2001
<b>AKP20</b>	JH642 <i>amyE::Pdes-lacZ</i> <i>desK:: Km<sup>r</sup> Pkm-desR</i>	Aguilar y col., 2001
<b>CM21</b>	( <i>desKR<sup>-</sup></i> , <i>Pdes::lacZ</i> , <i>thrC::Pxil::desR</i> ),	<i>Albanesi y col., 2004</i>
<i>E. coli</i>		
<b>DH5α</b>	<i>supE44</i> , <i>DlacU169</i> , ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> D M115), <i>hsd R17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>Thi<sup>-</sup>1</i> , <i>rel A1</i>	Colección lab.
<b>BL21</b>	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup>	Colección lab.

Km<sup>r</sup> denota cassette de resistencia a kanamicina.

**Tabla II. Plásmidos utilizados en esta tesina**

Plásmido	Característica	Referencia
<b>pET22b</b>	Vector para expresión de proteínas recombinantes bajo control del operador Lac. Porta una secuencia His-Tag N-terminal seguida por un sitio trombina y 3 sitios de clonado ( <i>Ap<sup>R</sup></i> , <i>lacI</i> ).	<i>Novagen</i>
<b>pHPKS</b>	Vector replicativo de bajo número de copias en <i>B. subtilis</i> . No posee promotor delante del SMC ( <i>Cm<sup>R</sup></i> , <i>MLS<sup>R</sup></i> ).	<i>Johansson yHederstedt,1999</i>
<b>pCM264</b>	Derivado del plásmido pHPKS que incluye el gen <i>desR</i> bajo el control de un promotor inducible con xilosa.	<i>Mansilla, com.personal</i>
<b>pLC121</b>	Derivado del plásmido pHPKS que incluye el gen <i>desK-SM</i> bajo el control de un promotor inducible con xilosa.	<i>Cybulski, com.personal</i>

### 3. 2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *B. subtilis* fueron cultivadas en los medios que se describen a continuación.

#### Spizizen (SPI) (1958)

---

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g/l
Citrato de Na	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l

Este medio salino fue suplementado con glicerol 0,5 %; triptófano 0,01 %; fenilalanina 0,01 % y casaminoácidos 0,1 % (concentraciones finales, medio SPI-CAA)

#### Medio Mínimo Spizizen (SMM)

---

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,0 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0 g/l
Citrato de Na	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l

Este medio salino fue suplementado con glucosa 0,5 %; triptófano y fenilalanina 50 µg/ml y elementos traza (*Harwood y Cutting, 1990*).

#### GMI/II (para transformación de *B. subtilis*) (*Nicholson y Setlow, 1990*)

GMI: SPI 1X suplementado con glucosa 0,5 %; extracto de levadura 0,1 %; casaminoácidos 0,025 %; triptofano y fenilalanina 0,01 % (concentraciones finales).

GMII: SPI 1X suplementado con glucosa 0,5 %; casaminoácidos 0,025 %; triptofano y fenilalanina 0,01 %; MgSO<sub>4</sub> 5 mM.

### 3. 3. Condiciones de crecimiento

Las cepas de *B. subtilis* se crecieron en medio líquido con agitación vigorosa y, en superficie, en medio sólido a 37 °C. Cuando fue necesaria la selección de marcadores plasmídicos se emplearon antibióticos en las siguientes concentraciones: Cm 5 µg/ml, Km 5 µg/ml, Em 1 µg/ml, Ln 12,5 µg/ml.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio líquido a 37 °C y con agitación. Cuando fue necesaria la selección de marcadores plasmídicos se empleó como antibiótico en la siguiente concentración: Ap 100 µg/ml.

El crecimiento de los cultivos fue monitoreado midiendo la D.O. a 525 nm y a 600 nm para *B. subtilis* y *E. coli* respectivamente, empleando un espectrofotómetro Beckman DU640.

#### **Conservación de cepas bacterianas**

Las cepas de interés fueron crecidas en la noche a partir de un inóculo de colonia simple y posteriormente, congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos crioviales con glicerol estéril al 20%.

#### **3. 4. Transformación de células competentes**

Las células competentes de *B. subtilis* fueron transformadas con ADN plasmídico usando el método de dos pasos de Dubnau y Davidoff-Abelson (1971). Células competentes de *E. coli* se obtuvieron por electroporación (Sambrook y col., 1989).

#### **3. 5. Manipulación de ADN**

##### **3. 5. 1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La técnica se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descriptas por Sambrook y col. (1989). Se emplearon geles horizontales de agarosa 1.5%. Los geles se prepararon en solución amortiguadora TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0; 10 mM EDTA). Las separaciones electroforéticas se realizaron en la misma solución amortiguadora a una intensidad de corriente de 80 a 100 mA, utilizando el sistema del tipo “submarino”. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con 0,1 volúmenes de solución de siembra (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol, 30% de glicerol, preparada en agua estéril). Una vez concluida la corrida, los geles se tiñeron con Syber Green 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las bandas de ADN fueron visualizadas empleando un transiluminador de luz UV (255 nm) y las imágenes fueron tomadas con un equipo GelDoc (BioRad, Hercules, CA, USA). Típicamente como marcadores de peso molecular se emplearon los fragmentos de ADN del fago  $\lambda$  obtenidos por digestión con el enzima de restricción *Hind* III o el marcador “Ladder 100 bp” (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina).

##### **3. 5. 2. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Se siguieron las condiciones generales descritas por Sambrook y col. (1989). Las composiciones de las soluciones y las condiciones de reacción, así como también información adicional, están disponibles en los manuales distribuidos por los laboratorios fabricantes de las enzimas de restricción.

### **3. 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Cada reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 $\mu$ l, utilizando 40 pmoles de cada oligonucleótido cebador y 20 ng de ADN molde. Se utilizó ADN polimerasa Taq las indicaciones del proveedor.

### **3.7. Extracción de ácidos nucleicos. Preparación de ADN plasmídico**

Se siguió el método de lisis alcalina y precipitación con polietilenglicol descrito por Sambrook y col. (1989) para preparar ADN plasmídico en pequeña escala. Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para las reacciones de secuenciación se obtuvieron mediante el equipo provisto por Promega (Wizard Kit, Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **3.8 Purificación de lípidos de *Bacillus subtilis***

Cultivos de *B. subtilis* fueron crecidos en LB hasta una OD=1.0. Luego se centrifugaron las células y se extrajo los lípidos por el método Bligh & Dyer (1958), consistente en extracciones clorofomo:metanol.

### **3. 9. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes**

Se utilizó la cepa BL21 ( $\lambda$ DE3) de *E. coli* portadora del plásmido pET22b (Novagen), que expresa a la proteína DesK-SM. La sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes fue realizada siguiendo procedimientos estándares (QIAGEN, Inc.): Se inocularon 500 ml de LB con 10 ml de cultivo saturado, crecido durante toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.<sub>600</sub> = 0,7 se realizó la inducción con IPTG 0,5 mM y se transfirió a una temperatura de 30°C El crecimiento se continuó durante 5 horas. Transcurrido este tiempo las células del cultivo se recuperaron por centrifugación a 7000 rpm durante 15 minutos y fueron resuspendidas en 50 mM Tris-HCl [pH8], 200 mM NaCl, con el agregado de 1mM PMSF (buffer de sonicación), de aquí en adelante se trató siempre la muestra en hielo. Luego de incubar las células 1 hora a 37° C en presencia de 10 mg/ml de lisosima, las células se rompieron por prensado con la French Press SLM Aminco a 800 psig. Para asegurarnos una eficiente ruptura células y ADN, realizamos una posterior sonicación (5 pulsos de 10 segundos a 35 % de amplitud) y tratamiento con DNAsa I 50ug/ml en presencia de MgSO<sub>4</sub> 4.2mM y CaCl<sub>2</sub> 0.5mM, 15 min a 37°C. Los restos celulares se separaron mediante centrifugación a 10.000 rpm, a 4°C. El sobrenadante fue sometido a ultracentrifugación a 45000 rpm con el rotor Ti90 durante 1 hora a 4°C. En una ultracentrífuga Beckman Coulter

Optima XL-100 (Beckman Instruments, Inc.). Las membranas obtenidas fueron solubilizadas en el buffer de sonicación. Se chequeó la inducción de la proteína de interés por SDS-PAGE en las muestras de membranas solubilizadas, el sobrenadante con el contenido citoplasmático y células sin lisar.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en columna, utilizando una resina de Ni-NTA (níquel – nitrilo triacético) (QIAGEN, Inc.). Para esto, 2 ml de suspensión de resina se equilibró con tres lavados de 10 ml de solución de sonicación, en agitación durante 5 minutos cada vez. Posteriormente se incubó la fracción de las membranas solubilizadas en Brij58 0.05%, donde se observó presencia mayoritaria de la proteína de interés, con la suspensión de resina en hielo durante 30 minutos con agitación suave. Se cargó la resina en una columna de cromatografía y se realizó un lavado con 10 volúmenes de 50 mM Tris-HCl [pH8], 200 mM NaCl, 10mM Imidazol, 0.05% Brij58 (buffer de lavado) para luego eluir DesK-SM con dos volúmenes de buffer de lavado con el agregado de concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 100, 250 y 500 mM), recogiéndose las fracciones correspondientes en tubos separados. El chequeo de las eluciones se realizó sembrando una alícuota de cada fracción en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 18 %. Las fracciones que contenían la proteína de interés se juntaron y se dializaron con el fin de eliminar el imidazol en membranas de diálisis de corte 3 kDa en solución amortiguadora de diálisis (50 mM Tris-HCl [pH8], 200 mM NaCl, 10% glicerol y 0,05 % Brij58, 1mM DTT) durante toda la noche, con agitación en dos cambios, en cámara fría (4 °C).

Finalmente, la muestra fue analizada por SDS-PAGE y concentrada por centrifugación a través del filtro Amicon Ultra-4. Luego de aumentar la concentración de glicerol a 20%, se alicuotó la preparación para conservarla a -80°C para su posterior utilización.

#### **3.10. Dosaje de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada por los métodos descriptos por Lowry y col. (1951) y Bradford (1976), usando como patrón una solución de BSA (albúmina sérica bovina), cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente utilizando un valor de  $A_{280}=0,667$  para una solución de 1 mg/ml.

#### **3.11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Las diferentes muestras proteicas fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida realizados en condiciones desnaturizantes, siguiendo el sistema desarrollado por Laemmli (1970) utilizando la celda Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad). El gel de

concentración fue preparado con 5% (p/v) de acrilamida en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM, EDTA 1,8 mM y SDS 0,1% (p/v). El gel de separación se preparó con acrilamida 12% (p/v) en solución amortiguadora Tris-HCl (pH 8,8) 375 mM, EDTA 1,8 mM y SDS 0,1 % (p/v). Las muestras se sometieron a ebullición durante 10 min en presencia de Tris:HCl pH 7,0 50 mM, ditioneitol (DTT) 0,5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 4% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,005% (p/v) y glicerol 15% (v/v), antes de sembrar en el gel. Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente a una intensidad de corriente de 30 mA por gel en solución amortiguadora Tris Base 25 mM, EDTA 1mM y SDS 0.1% p/v, Glicina 192 mM. Una vez finalizada la electroforesis los geles se fijaron con ácido acético 10%, se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 durante 30 min y se destiñeron por ebullición durante 10 min en agua destilada.

### **3.13. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa**

#### **3.13.1. Determinación cualitativa**

Para observar cualitativamente la expresión de las fusiones *Pdes-lacZ*, se realizaron estrías de las distintas cepas estudiadas en placas de SMM suplementado con los aditivos indicados para cada caso en particular, suplementadas con 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal), a una concentración final de 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . La actividad  $\beta$ -galactosidasa se evidencia por aparición de color azul.

#### **3.13.2. Determinación cuantitativa**

Las cepas de *B. subtilis* conteniendo fusiones transcripcionales al gen *lacZ* fueron cultivadas durante toda la noche en medio SPI suplementado (ver arriba) a 37°C. Se recuperaron las células por centrifugación y se diluyeron a una  $\text{DO}_{525}=0.1$  en SPI suplementado con 0.4% xilosa. Cuando el cultivo alcanzó una  $\text{DO}_{525}=0.3$ , se tomaron muestras a intervalos de 1h luego de la resuspensión incubando a 25°C y 37°C según se indica en Resultados y Discusión. Las distintas muestras fueron colectadas por centrifugación y se realizó el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa según una adaptación del método descrito por Miller (1972) en microplaca: Tres muestras de 500ul fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo volumen de solución amortiguadora Z (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$  y 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Se tomó una alícuota de 130ul, a los que se le agregaron 10  $\mu\text{l}$  de lisosima (5 mg/ml), incubando durante 30 minutos a 37°C. Luego se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de Tritón X-100 al 4% y 20  $\mu\text{l}$  de ONPG (4.5 mg/ml). La microplaca fue transferida a un baño

termostático a 30°C durante exactamente 15 minutos. La reacción se detuvo con 30 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,2 M. Las muestras se midieron en microplaca a 420 nm. La actividad específica se expresó en unidades Miller (UM) según la fórmula:

$$U.M. = \frac{D.O_{420nm} \times 66,7}{D.O_{525nm} \times vol.(ml)}$$

Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

### 3.14. Ensayos de transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)

Las proteínas de las muestras de interés se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue luego preincubado con buffer de transferencia (16 mM Tris; 120mM Gly). 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 (BioRad). El proceso de transferencia se desarrolló ON en cámara fría (4°C) a una corriente constante de 100 mA. Una vez terminado este proceso, se chequeó la presencia de proteínas en la membrana de nitrocelulosa, tiñéndola con el colorante Rojo Punzó y se verificó la eficiencia de la transferencia tiñendo el gel con azul brillante de Coomassie R-250. Luego de varios lavados con TBS 1X (10mM Tris; 150mM NaCl) incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación en TBS-leche (5 % de leche descremada en polvo) para bloquearla. Se eliminó el buffer TBS-leche mediante sucesivos lavados con TBS 1X. La membrana se incubó con una dilución 1/500 en TBS 1X de anticuerpos policlonales inmunopurificados anti-DesKC durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se lavó 3 veces durante 10 min con TBS 1X y se incubó 1 h con los anticuerpos secundarios anti-anticuerpos de conejo en una dilución 1/3000, los cuales están conjugados a fosfatasa alcalina. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS 1X y se procedió a revelar. Para ello la membrana se colocó en el buffer FA (100 mM Tris pH=9,5; 100 mM NaCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>) y se agregaron BCIP 0,15 mg/ml y NBT 0,3 mg/ml y se incubó a temperatura ambiente al reparo de la luz hasta la visualización de las bandas. Por último, la membrana se lavó con agua y fue secada a temperatura ambiente.

### 3.15. Ensayo de fosforilación *in vitro*.

Para ensayar la actividad autoquinas, DesK-SM purificada, a una concentración final de 0.5µg/ul, se incubó en buffer R (50 mM Tris pH=8, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 % glicerol, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) en presencia de 0,25 µCi/µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP a 25°C y 37°C.

La reacción se inició por el agregado de DesK-SM y se tomaron alícuotas a distintos tiempos (30s, 5min y 30min). Las reacciones se detuvieron por la adición de buffer de siembra para SDS-PAGE 5X suplementado con 10 mM EDTA y fueron mantenidas en hielo hasta finalizar el ensayo. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE el gel fue secado y expuesto para autorradiografía.

#### **3.16. Preparación de liposomas e integración de la proteína DesK-SM**

Para preparar liposomas unilamelares, 4mg de lípidos totales de *E. coli* (Avanti Polar Lipids, USA) se resuspendieron en cloroformo. Se evaporó este solvente venteando nitrógeno seco en el tubo, seguido de un secado de los lípidos por 2hs en el excicator con vacío (Rotavapor). Los lípidos son hidratados en 400 ul de buffer de hidratación (20mM Tris-HCl [pH 8.0], 250mM sacarosa y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La suspensión es incubada en un baño a 60°C por 30min, vortereando ocasionalmente. Se congeló el tubo con la muestra en una mezcla de etanol y CO<sub>2</sub> sólido (hielo seco) y descongeló luego en el baño de 60°C, repitiendo este proceso 10 veces. La suspensión fue luego extruída haciéndola pasar por un filtro de policarbonato de 0.2 um (Whatman Anotop) más de 10 veces. DesK-SM solubilizada y purificada se reconstituyó en los liposomas, incubando la proteína con los liposomas por 30 min, previamente desestabilizados por Brij58 0.05% durante 20min. El detergente se elimina por tres extracciones sucesivas, de 2hs cada una, incubando la suspensión con 160mg bolitas de poliestireno (SM2 BioBeds) por vez, previamente hidratadas en 20mM Tris-HCl [pH 8.0] y K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### **3.17. Ultracentrifugación del gradiente de sacarosa**

Para separar DesK-SM contenida en los proteoliposomas de la mezcla de reacción, se realizó un gradiente discontinuo de sacarosa por ultracentrifugación. La mezcla de reacción (1ml) se introdujo en la base del gradiente discontinuo de sacarosa (50%, 40% y 6.8% p/v de sacarosa) y se centrifugó a 30.000 rpm durante toda la noche en un rotor SW40 a 4°C. Se cosecharon luego los proteoliposomas, flotantes en la superficie del gradiente y se lavaron con Tris-HCl pH 8.0 30mM, nuevamente ultracentrifugando por 1 hora a 4°C. Finalmente, los proteoliposomas conteniendo a DesK-SM son resuspendidos en el buffer de hidratación y mantenidos a 4°C, máximo por una semana. La presencia de DesK en los proteoliposomas se confirmó por SDS-PAGE seguida de Western Blot. Asimismo, se evaluó la actividad de autofosforilación utilizando las condiciones *in vitro* descriptas anteriormente (3.15).

### **3.18. Los péptidos sintéticos.**

Los péptidos sintéticos se adquirieron en GL Biochem Ltd. Los péptidos correspondientes a la secuencia de linker KSRKERERLEEK (WT) o KSRAEAEALEEK (mutante A3) y KSRKQRQLQEK (mutante Q3) eran todos acetilados en el N-terminal, y amidado en el C-terminal, y purificado por HPLC. Su masa se confirmó por espectrometría de masas. Para los experimentos de FTIR, las muestras se diluyeron en HCl 10 mM y se liofilizó (tres veces) para eliminar las trazas de TFA.

**3.19. Liposoma-Péptido Complejos.** Diez miligramos de extracto polar de *E. coli* disuelto en cloroformo (50 mg / ml) se secaron bajo un flujo de nitrógeno y luego mantuvieron durante la noche bajo vacío en un liofilizador. La película seca se rehidrata en un buffer de 10 mM de Hepes-Na a pH 7,3 y se agitó en vórtex para formar liposomas. La suspensión turbia resultante se transfirió a un tubo de policarbonato de 1,5 ml y se sonicó en un sonicador de baño de agua (UCD-200 Bioruptor; Diagenode) para convertir liposomas multilamelares en unilamelares. Los liposomas se mezclaron con los péptidos (10 mg/ml disuelto en agua) en una relación de lípido / péptido 5:0 (peso / peso) en un volumen final de 0,1 ml. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 min, los liposomas fueron centrifugadas a 120.000 rpm en un rotor Beckman 42.2 Ti a 20 ° C durante 1 h. Cuando se utilizó la microdiálisis, los complejos de péptido de liposomas se dializaron suspendiendo una gota de muestra en un filtro de disco flotante con un punto de corte de 20 nm, lo que permite que el péptido libre permee, mientras que los liposomas fueron retenidos en el filtro. La muestra recuperada del filtro se utilizó para las mediciones ATR-FTIR.

---

## **4.1. CAPITULO I. Estudios *in vitro* e *in vivo* del MS-DesK y sus variantes a nivel de la interfaz lípido-agua.**

---

### **4.1.1. Introducción al Capítulo I**

---

#### **4.1.1.1. El espesor hidrofóbico de la bicapa y su efecto sobre la función de las proteínas integrales de membrana**

La mayoría de las proteínas de membrana atraviesan la membrana en la forma de unas o más  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas. Propiedades de membrana como la fluidez, transición de fase, viscosidad, presión lateral, o espesor hidrofóbico son responsables de los cambios de las funciones de las proteínas dependientes de lípidos. Aquí nos focalizaremos en el efecto del espesor de membrana sobre la actividad de la proteína.

El igualar el espesor del dominio transmembrana de las proteínas intrínsecas de membrana con el espesor hidrofóbico de la membrana está termodinámicamente favorecido. Esto resulta importante para la función proteica en las membranas ya que cualquier “mismatch” se esperaría que llevaría a la distorsión de la bicapa lipídica, o de la proteína, o de ambas, para minimizar el nivel energético asociado. Esto es debido al costo energético que implica exponer las cadenas acilo o aminoácidos hidrofóbicos al agua; o asimismo al costo de enterrar grupos polares en un ambiente lipídico (*Killian y col., 1998*). El “mismatch hidrofóbico” ocurre si el largo hidrofóbico de la proteína de membrana no se empareja con el espesor hidrofóbico de la membrana. Para ser más específicos, un “mismatch” positivo describe la situación con una membrana muy fina y un “mismatch” negativo la situación con membranas gruesas, comparadas con la proteína correspondiente.

#### **4.1.1.2. Respuesta de péptidos TM al mismatch hidrofóbico.**

La manera precisa en que las proteínas de membrana están embebidas en la bicapa lipídica es esencial para su estructura y función, sin embargo, las características estructurales que regulan el comportamiento de las hélices hidrofóbicas insertadas en la membrana todavía se desconoce. Factores importantes que influyen el comportamiento hidrofóbico de las hélices son la secuencia aminoacídica, el largo del segmento transmembrana, la habilidad de las hélices de empaquetarse y el posicionamiento en la interfase lípido/agua.

Además, características estructurales y dinámicas serán determinadas no sólo por propiedades intrínsecas de los segmentos transmembranas, pero también por su interacción con los lípidos del entorno. Sistemas modelo simples usando péptidos sintéticos integrados a liposomas de composición lipídica conocida han sido utilizados para estudiar el comportamiento biofísico de péptidos definidos. Varios mecanismos de reorientación de las hélices han sido identificados para la adaptación al “mismatch” hidrofóbico (*Holt & Killian, 2010* y *Cybulski & de Mendoza, 2011*) (Figura 4.1): **A) inclinación de hélice.** El segmento transmembrana se inclina en la bicapa para disminuir el largo hidrofóbico efectivo y reducir así el número de aminoácidos hidrofóbicos expuestos al agua (inclinación más marcada con bicapas más delgadas). Por ej, cuando la proteína viral U (Vpu) del SIDA es incorporada en las bicapas de di-C10:0PC/di-C18:1PG se inclina a un ángulo de 51°. Este ángulo decrece sistemáticamente con el aumento en el espesor de la bicapa a 18° en di-C18:0PC/diC18:1PG para compensar por el cambio en el grosor de la bicapa (*Cybulski & de Mendoza, 2011*). **B) Rearreglo lipídico.** Lípidos que tienen el largo de sus cadenas acilo apropiado se acomodan para rodear el dominio transmembrana, de manera de evitar el mismatch hidrofóbico. Los lípidos a su vez, podría modular el espesor de la membrana ensamblándose en otro tipo de geometría, alterando de esta manera la organización de la bicapa. También se ha demostrado experimentalmente que las cadenas acilo de los lípidos en contacto directo al péptido pueden estirarse para evitar el “mismatch”. Esto fue observado en experimentos 2H NMR en cadenas acilo deuteradas para péptidos WALP, pero no para peptidos KALP (péptidos sintéticos hidrofóbicos de alanina y leucina flanqueados por triptofano o lisina, respectivamente) (*Cybulski & de Mendoza, 2011*) **(C) autoasociación.** Los péptidos se agregan para disminuir la superficie hidrofóbica en contacto con el agua. Este comportamiento de oligomerización fue observado para WALP así como para péptidos KALP (*Cybulski & de Mendoza, 2011*). **(D) “kinking” o “flexing”.** Análisis de 2H NMR demostraron que los péptidos WALP y análogos indicaron un kink en la hélice como respuesta a bicapas muy finas. Un comportamiento similar se encontró para el primer segmento transmembrana (TM1) de la permeasa de lactosa de *E. coli*. La superficie hidrofóbica del TM1 de la permeasa de lactosa LacY, está inmersa en la membrana, pero es demasiado larga para acomodarse en la porción hidrofóbica de una bicapa lipídica típica si se orienta perpendicular a la superficie de la membrana. Por lo tanto, datos provenientes del NMR y de simulaciones de dinámica molecular muestran que el péptido sintético correspondiente al TM1 de LacY debe flexionarse además de inclinarse para satisfacer el mismatch hidrofóbico con la bicapa (*Cybulski & de Mendoza, 2011*). Otra consecuencia observada para casos de mismatch

negativo es que los péptidos pasan a un estado no-transmembrana, es decir, asociado a la superficie, estando **excluidos** de la membrana (**F**). En estos casos, los lípidos también pueden disminuir el grosor de la bicapa efectiva desordenando sus cadenas de acilo (**B**) o perturbar la organización bicapa al punto de formar una estructura no laminar invertida. Finalmente, otra posibilidad es que las hélices adapten levemente su largo hidrofóbico al cambiar la orientación de las cadenas laterales hidrofóbicas e hidrofílicas cercanas a la interfase, como detallamos a continuación.

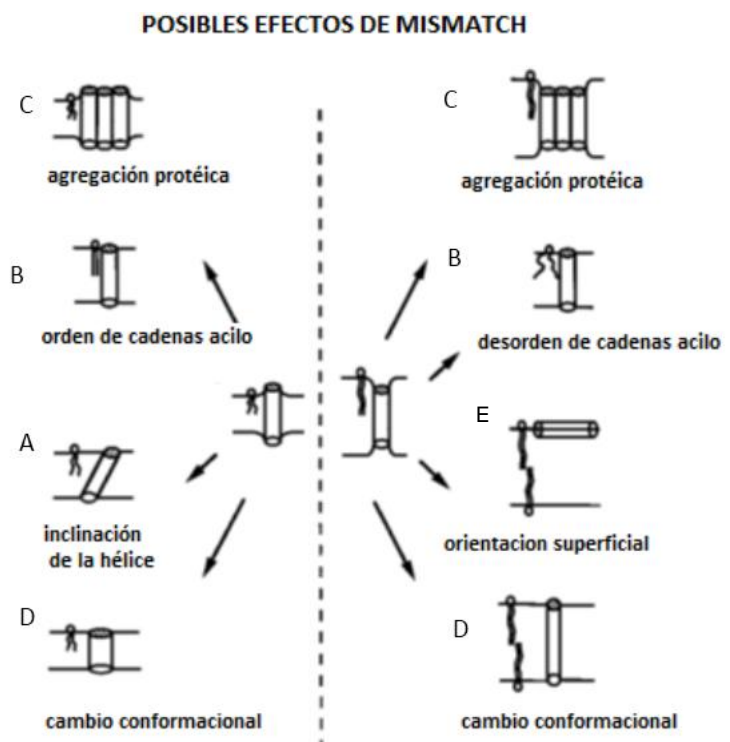
Las combinaciones de estos posibles modos de adaptación también podrían ocurrir. Además, en membranas biológicas, con una mezcla heterogénea de lípidos, este desajuste puede aliviarse mediante la interacción preferencial de proteínas con lípidos particulares en que se de una mejor relación longitud-hidrofobicidad.

#### 4.1.1.3. ¿Qué es el efecto “snorkeling” y “anti-snorkeling”?

En términos generales, los elementos hidrofóbicos de un residuo prefieren estar inmersos en el corazón hidrofóbico de la membrana, mientras que los elementos polares tienden a posicionarse en un ambiente polar. De este principio se desprenden dos términos importantes para nuestra investigación (Fig. 4.2):

**.Snorkeling:** Las cadenas laterales muy largas de los residuos polares tienden a apuntar hacia afuera del corazón hidrofóbico lipídico tanto en regiones TM como de la interfase. Esto permite que el grupo terminal, cargado resida en la región de las cabezas lipídicas

mientras que el C<sup>α</sup> del residuo se entierra más de una vuelta de hélice por debajo de la interfase membrana/ agua. En particular, las cadenas laterales de Arg y Lys son ambas muy largas, cerca de 6 Å, lo que las hace suficientemente largas como para alcanzar cinco a seis



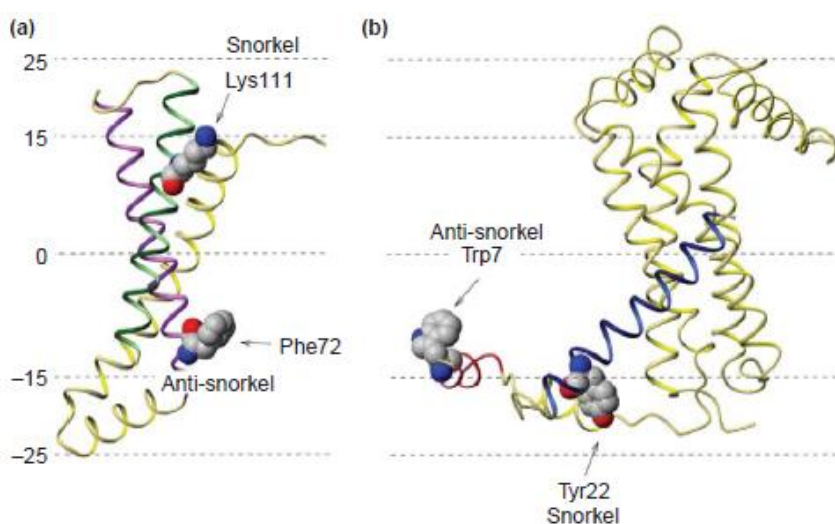
**Figura 4.1.** Representación esquemática de algunas posibles consecuencias del mismatch hidrofóbico cuando la parte hidrofóbica de la proteína es más larga (mismatch positivo, izquierda) o menor (mismatch negativo, derecha) que la bicapa hidrofóbica. (Adaptado de Killian y col., 1998)

residuos a través de la hélice (*Stopar y col., 1996*) y para permitir que el grupo amino voluminoso, cargado positivamente, en el C<sup>ε</sup> terminal de la Lys y el grupo guanidinio del C<sup>δ</sup> de la Arg interactúe con las cabezas de polares fosfolípicas y con el ambiente acuoso.

**.Anti-snorkeling:** Las cadenas laterales de residuos hidrofóbicos tienden a apuntar hacia el centro de la membrana tanto en regiones TM como de la interfase. Una cadena lateral de Phe, por ejemplo, en la región de las cabezas de los fosfolípidos está en un ambiente desfavorable, a menos que su cadena lateral aromática esté plegada hacia atrás en el interior de la membrana (*Stopar y col., 1996*).

**.Residuos anfipáticos,** como los triptófanos y las tirosinas, que contienen elementos tanto hidrofóbicos como polares en sus cadenas laterales, tienden a hacer “snorkeling” apartándose del centro cuando están localizados en una región TM, pero revierten esta dirección y hacen anti-snorkeling cuando están localizados en la región de la interfase. Este es el caso de los residuos de Trp que son más energéticamente estables en una posición donde su cadena lateral amida puede interactuar con los residuos carbonilo (*Liang y col., 2005*).

Combinando todo esto, resulta que la proteína está muy bien anclada, porque los residuos lys/arg y phe sirven como anclas hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente. En el caso en que la proteína tiende a moverse hacia arriba o hacia abajo a través de la normal a la superficie de la membrana, tanto los residuos de fenilalanina como los de lisina estarán en un ambiente desfavorable.



**Figura 4.2. Efecto Snorkeling y antisnorkeling en proteínas de membrana. A.** En la subunidad C de la succinato dehidrogenasa, SdhC. Lys 111 hace snorkeling hacia fuera del corazón hidrofóbico y la Phe 72 hace anti-snorkeling hacia dentro. **B.** En residuos anfipáticos como la tirosina y el triptófano el comportamiento snorkeling y anti- snorkeling se ilustra con los residuos Tyr22 y Trp7, respectivamente, en las subunidades del citocromo b6 y PETL del Complejo Citocromo b6f (*Liang y col., 2005*).

#### 4.1.1.4. La forma en que la naturaleza mide cambios de espesor:

El segmento transmembrana del MS-DesK tiene aminoácidos inusuales (Q9, K10, N12) agrupados en la región N-terminal próxima a la interfaz lípido-agua extracelular. Estos aminoácidos atípicos tienen un rol crucial en la señalización, ya que el reemplazo por

aminoácidos hidrofóbicos (Q9L, K10A, N12A) lleva a una pérdida de la capacidad de la quinasa para estimular la transcripción del gen *des* (Fig 4.3 B.a-e, *Cybulski y col., 2010*).

El modelo que se postuló a partir de estos resultados propone que a bajas temperaturas aumenta el espesor de la membrana debido a un incremento en el orden de los lípidos. En consecuencia este motivo hidrofílico quedaría atrapado en un ambiente hidrofóbico, generando una perturbación electrostática que podría favorecer el estado quinasa de DesK. Contrariamente, a altas temperaturas de crecimiento, los lípidos de membrana están más desordenados y en consecuencia, disminuye el espesor de la membrana. En esta condición este motivo hidrofílico alcanzaría el ambiente acuoso estabilizándose y favoreciendo la actividad fosfatasa. En base a este paradigma, se denominó a este motivo *Boya Hundida* (en inglés, *Sunken Buoy, SB*, fig 4.3A).

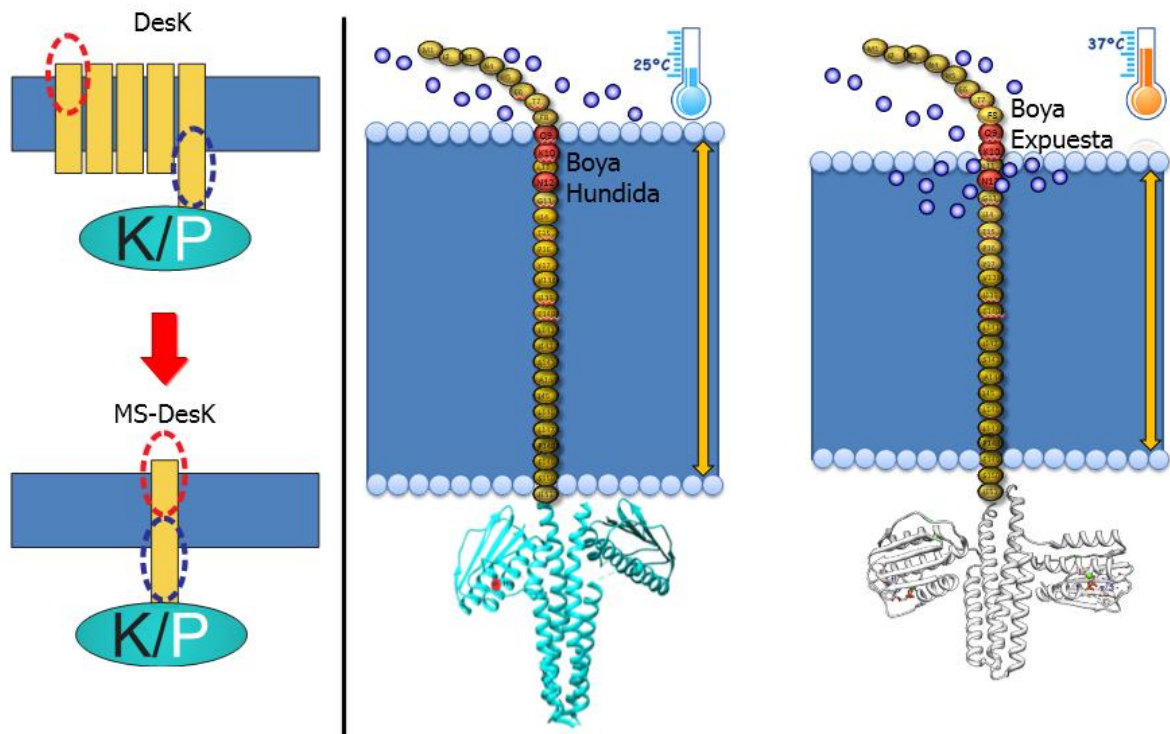
Para poner a prueba esta hipótesis, se realizaron una serie de mutaciones para aumentar el estrés hidrofílico en la región transmembrana quimérica a través de mutaciones puntuales L11K y L11K/K10L (a la que llamamos *KK*, por la doble lisina). Estas variantes mostraron tener mayor actividad quinasa que la proteína salvaje utilizando el sistema requeportero *Pdes-lacZ* (Fig 4.3 Bf-g, *Cybulski y col., 2010*), proveyendo evidencia de la importancia de este motivo en la termorregulación.

Mediante la técnica de traducción *in vitro* libre de células fue posible reconstituir al MS-DesK en una serie de fosfolípidos de distinta longitud de cadena. Este abordaje experimental permitió evaluar directamente la hipótesis de que el espesor de membrana es la señal detectada por DesK, ya que la proteína mostró mayor actividad quinasa cuando fue reconstituída en liposomas que contenían cadenas hidrocarbonadas más largas (Fig 4.4, *Cybulski y col., 2010*).

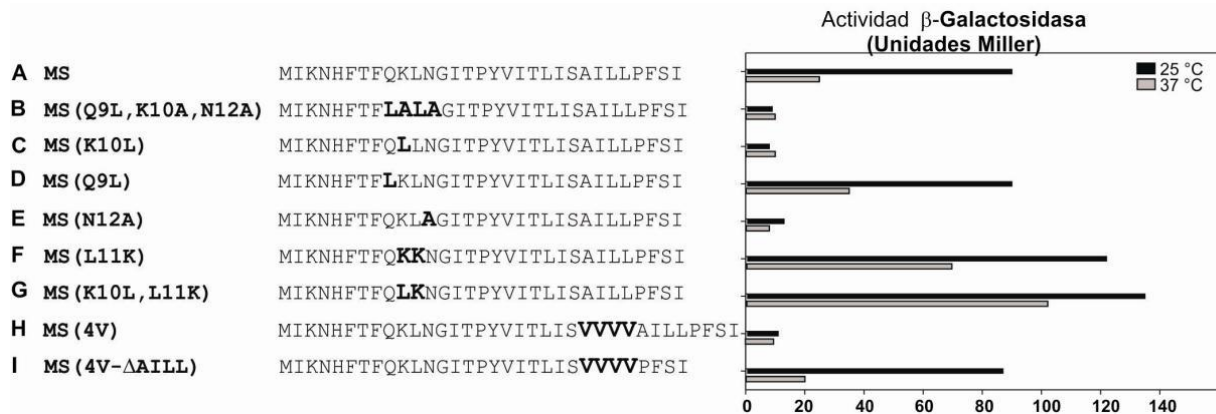
Todos estos resultados parecían validar el modelo propuesto, sin embargo, también abría un nuevo abanico de interrogantes: ¿cuán marcado es este cambio de espesor por efecto térmico? ¿cuán relevante es el SB en la activación del sensor? ¿qué diferencia de actividad puede llegar a generar la ubicación de estos residuos en la interfase? ¿cómo puede traducirse este cambio físico en los movimientos conformacionales reportados en la región catalítica?

En este capítulo intentaremos abordar estos temas, mediante una combinación de estudios bioquímicos, genéticos y biofísicos con el objetivo de dar respuestas cuantitativas a estas preguntas biológicas.

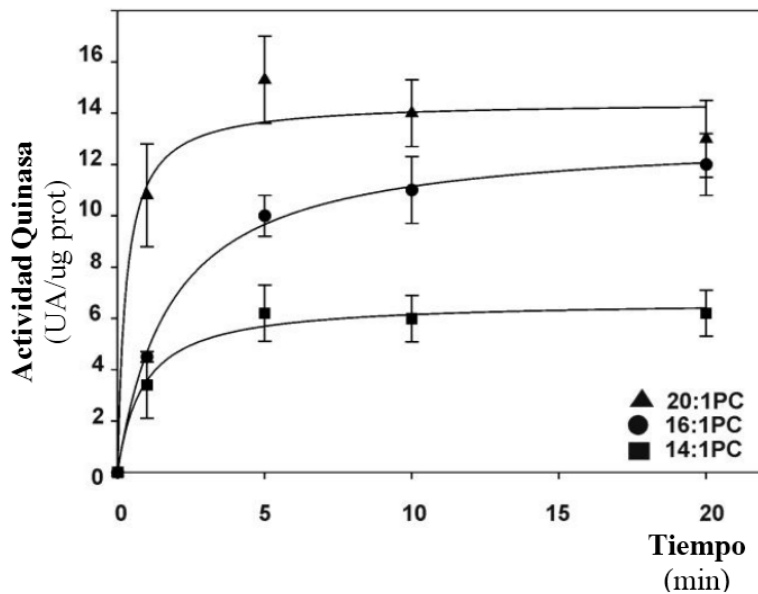
A.



B.



**Figura 4.3. El motivo SB es crucial para la transducción de señales.** A. Esquema recordatorio de la construcción de la quimera MS-DesK a la izquierda; a la derecha, modelo que explica el rol del motivo Boya (SB) en el sensado de los cambios de espesor de membrana inducidos por la variación de la temperatura. B. El reemplazo de aminoácidos hidrofílicos del motivo SB por aminoácidos hidrofóbicos resultó en una pérdida de la actividad quinasa (a, b, c, d, e). El aumento del estrés hidrofílico por sumergir aún más el residuo de lisina o por agregar un residuo de lisina adicional resulta en un incremento de la actividad quinasa (f, g). La inserción de 4 residuos de valina en el medio del STM incrementa la longitud de la región hidrofóbica del STM, de manera que el motivo SB alcanza el medio acuoso a cualquier temperatura, llevando a una pérdida de la actividad quinasa (h). La delección de 4 residuos hidrofóbicos sobre la variante 4V resulta en recuperación de la actividad.



**Figura 4.4. Efecto de la longitud de los ácidos grasos sobre la autofosforilación del MS-DesK.** El MS-DesK fue reconstituido en liposomas compuestos por 1,2-dimyristoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (14:1-PC), 1,2-dipalmitoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (16:1-PC), y 1,2-dieicosenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (20:1-PC). Para la actividad autoquinasa, los proteoliposomas fueron incubados a 25°C en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP.

#### 4.1.2. RESULTADOS

##### 4.1.2.1. Puesta a punto de la integración de MS-DesK *in vitro*.

La actividad de DesK y sus variantes fueron estudiados por muchos años en nuestro laboratorio ensayando los niveles de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa codificados por el gen reportero lacZ fusionado al promotor del gen *des*, el que es activado sólo cuando hay un flujo de fosfato desde DesK a DesR. Este ensayo es muy útil en la comparación fenotípica de mutantes, pero para estudiar las bases bioquímicas y biofísicas de la termodetección y la transducción de la señal era necesario reconstituir el sistema *in vitro* como forma de simplificar el sistema de estudio. Nos propusimos, entonces, analizar las actividades de DesK en un ambiente lipídico definido. Para ello, en el laboratorio se reconstituyó DesK en liposomas mediante un sistema de transcripción y traducción *in vitro* (Martin y col, 2009). Sin embargo, considerando los altos costos de esta técnica (que requiere “kits” comerciales importados, Roche) y las grandes cantidades de muestra que se necesitan para los estudios estructurales que queríamos realizar, era necesario reconstituir el sistema *in vitro* partiendo de la proteína purificada. Sin embargo, los intentos de reconstituir a DesK en liposomas estuvieron limitados por el cuello de botella experimental que presentan la mayoría de las proteínas integrales de membrana al momento de la sobreexpresión y solubilización. Afortunadamente, la disponibilidad de una versión simplificada del termosensor DesK con un único STM (MS-DesK) ha permitido purificarlo con alto rendimiento (5-10 mg/litro de cultivo de *E.coli*) y reconstituirlo en una forma activa, como se detalla en la figura 4.4,

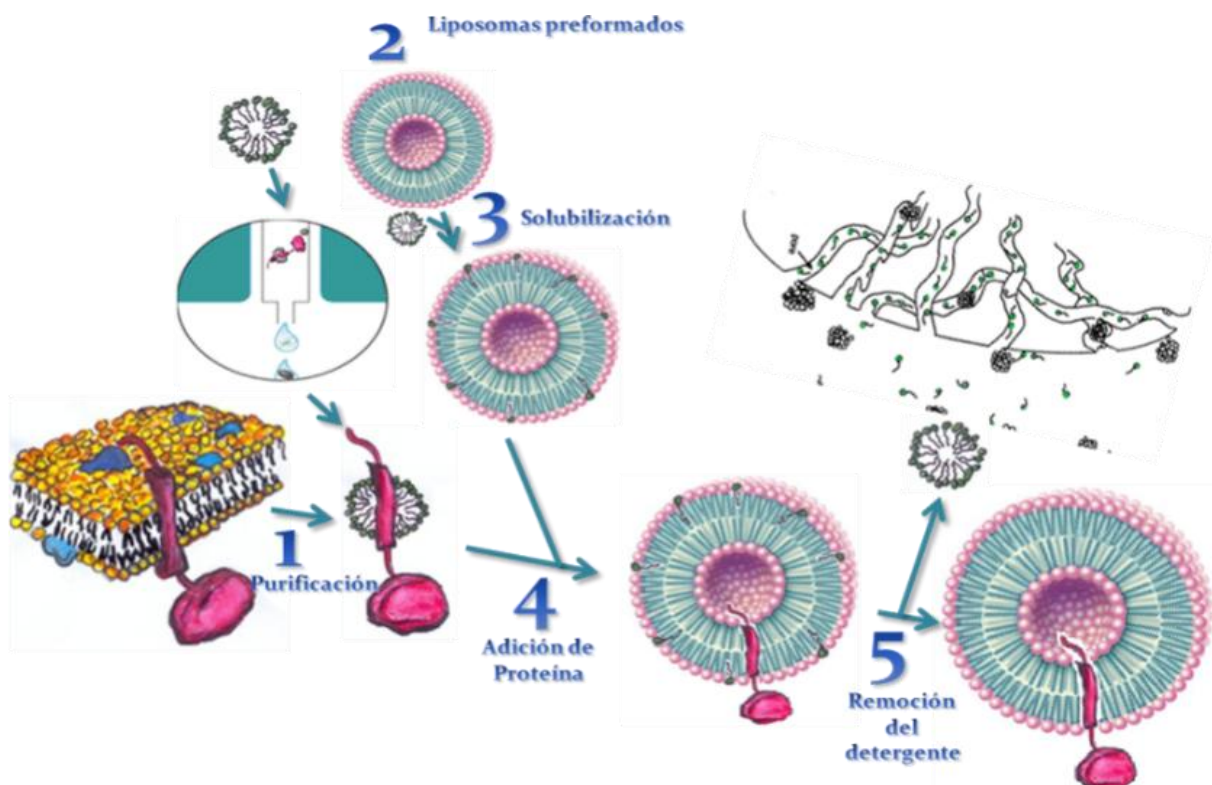
siguiendo la estrategia desarrollada por Rigaud & Levy (2003): La proteína purificada con una cola de His, en un buffer que contiene Tritón X100 y Brij 58 es incubada con liposomas preformados y previamente desestabilizados con Tritón X100. El detergente es posteriormente eliminado por adsorción con BioBeads (Biorad) y la proteína no integrada se elimina a través de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, purificando así los proteoliposomas para ser luego resuspendidos en un buffer adecuado para su posterior caracterización bioquímica (ver Materiales y Métodos).

#### a- Sobreexpresión y purificación de la proteína MS-DesK.

Se sobreexpresó la proteína quimérica MS-DesK (His<sub>6</sub>) siguiendo el protocolo de autoinducción de expresión de proteínas en el sistema T7 de Studier (*Studier & Moffatt, 1986*) y luego se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni-NTA con una posterior diálisis. Obtuvimos una concentración final de 1,0 mg/ml de proteína, con un rendimiento entre 5 a 10 mg de proteína por litro de cultivo.

#### b- Reconstitución del MS-DesK en vesículas.

Para poner a punto esta reconstitución, seguimos la estrategia detallada en la fig. 4.4. Sin embargo, para ello fue necesario determinar ciertos parámetros de integración de MS-DesK en liposomas, con sus respectivos controles:



**Fig.4.4. Estrategia utilizada para la integración funcional de MS-DesK *in vitro*.** 1. La membrana bacteriana de la cepa de expresión BL21 es solubilizada con detergente 0,5 % TritónX-100/0,5% Brij58 en la forma de micelas mixtas de lípido-proteína-detergente. Se procede a separar las micelas mixtas portadoras de la MS-DesK (His<sub>6</sub>) de las muchas otras proteínas del extracto crudo con una columna de Ni-NTA.

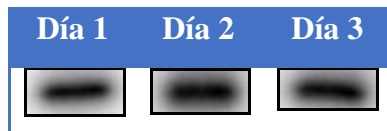
2. Se preparan los liposomas unilamelares a partir de lípidos polares de *E. coli* mediante la técnica de extrusión, utilizando filtros de policarbonato de 0,2  $\mu\text{m}$  (Avanti).

3. Se satura a los liposomas preformados con detergente para desestabilizar la estructura ordenada de la bicapa, facilitando la posterior incorporación de la proteína.

4. Se adiciona la proteína de interés purificada. Las micelas mixtas MS-DesK-lípido-detergente se mezclan con los liposomas preformados de composición fosfolipídica definida.

5. El detergente se remueve, desplazando el equilibrio hacia la integración de la proteína en los liposomas. Se producen así proteoliposomas en los cuales la proteína purificada es parte de una membrana con la composición fosfolipídica de interés. (Adaptado de Lichtenberg, 1985 “Micelles and Liposomes”).

A) Medidas de estabilidad. Para asegurarnos de que la proteína no se viera afectada durante los tres días que requiere el protocolo, medimos la actividad quinasa de MS-DesK en las condiciones de la reconstitución, corroborando que la integridad de la proteína se mantiene en el tiempo, como puede verse en la fig 4.5.

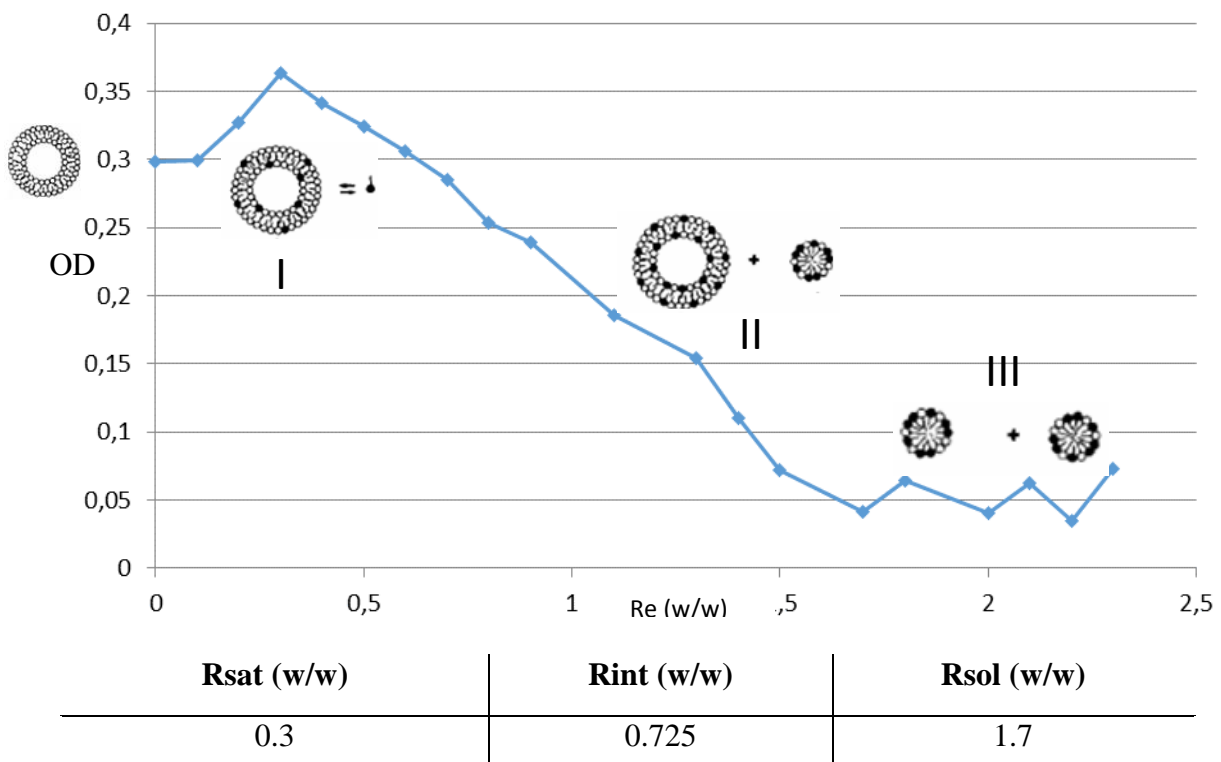


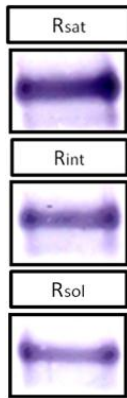
**Fig. 4.5. La proteína MS-DesK purificada no pierde actividad autoquinasa durante el período de reconstitución.** La actividad autoquinasa fue ensayada a 25°C en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP como se indica en M&M, la medición se repitió tres días consecutivos manteniendo la proteína en las condiciones establecidas por el protocolo de reconstitución.

B) Determinación de la concentración de detergente óptima para la reconstitución. Según la bibliografía consultada (*Rigaud y col., 2003*) la eficiencia en la reconstitución de diferentes proteínas de membrana es óptima a distintos niveles del proceso de solubilización de los liposomas con detergente y esto depende tanto de la naturaleza del detergente como de la estructura de la proteína. Es por esto que era necesario determinar los valores óptimos para nuestro propio sistema. Midiendo turbidimetría a 420nm seguimos la solubilización de los liposomas con cantidades crecientes de detergente. Así, pudimos determinar la relación efectiva detergente/lípido ( $R_e$ ) necesaria para alcanzar cada estadio de la transición lamela→micela (*Lichtenmberg, 1985*) en nuestro sistema, llamando: (I)  $R_{sat}$  a la relación detergente/lípido necesaria para saturar las vesículas de detergente, (II)  $R_{int}$  a la concentración de detergente intermedia capaz comenzar a solubilizar los liposomas, en la que el 75% de los liposomas saturados de detergente coexiste con el 25% restante de las micelas mixtas lípido-detergente y (III)  $R_{sol}$  a la solubilización completa de todos los liposomas convirtiéndolos en micelas mixtas lípido-detergente. Como puede verse en la gráfica I, durante la etapa I, el detergente adicionado a los liposomas preformados se particiona en la bicapa lipídica de los liposomas hasta saturarlos, induciendo leves cambios en la turbidez. El leve aumento observado al

comienzo puede explicarse por el crecimiento en el diámetro de las vesículas al incorporarse el detergente o por una fusión de las mismas. En un estadio intermedio al que llamamos etapa II, se produce una solubilización gradual de los liposomas saturados con detergente con la disrupción de los liposomas y la consiguiente formación de pequeñas micelas de lipido-detergente, lo que resulta en una gran disminución de la turbidimetría. En la etapa III se alcanza una completa solubilización de todos los liposomas hasta convertirlos en micelas mixtas lipido-detergente, dando una solución ópticamente transparente. De la gráfica I determinamos experimentalmente los parámetros de solubilización de los liposomas, como los informamos en la tabla inferior. Para determinar el valor de Re óptimo de integración de nuestra proteína, realizamos una reconstitución preliminar en los tres estadios de solubilización de los liposomas y analizamos la integración por Western Blot (Fig. 4.6). De la comparación de bandas resultó evidente una mayor integración de la proteína MS-DesK en liposomas previamente desestabilizados con un Re de 0,3 (w/w), que se corresponde con el R<sub>sat</sub>. El detergente utilizado fue el Tritón X-100, de amplio uso en protocolos de reconstitución por su forma de cuña capaz de disrumpir el ordenamiento estructurado de la membrana a fin de facilitar la inserción proteica.

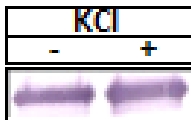
**Gráfica I. Determinación del Re (w/w), cantidad de detergente necesaria para alcanzar cada estadio.**





**Fig. 4.6. La integración se produce mayoritariamente en una relación detergente/lípido correspondiente al Rsat.** Para preparar liposomas unilamelares, lípidos totales de *E. coli* fueron preparados por extrusión (0,2 $\mu$ m) en buffer de hidratación (20mM Tris-HCl [pH 8.0], 250mM sacarosa y 100mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Los proteoliposomas se desestabilizaron con tritón X-100 en una relación efectiva detergente/lípido de 0,3, 0,725 y 1,7 que se corresponden al Rsat, Rint y Rsol, respectivamente. Para remover el detergente del sistema se utilizó el adsorbente Bio-Beads SM-2. Para separar MS-DesK contenida en los proteoliposomas del resto de la proteína no integrada, se realizó un gradiente discontinuo de sacarosa por ultracentrifugación. La mezcla de reacción (1ml) se introdujo en la base del gradiente discontinuo de sacarosa (50%, 40% y 6.8% p/v de sacarosa) en el buffer utilizado, en presencia de DTT 1mM. Luego se centrifugó a 30.000 rpm durante toda la noche en un rotor SW40 a 4°C. Se cosecharon luego los proteoliposomas, flotantes en la superficie del gradiente y se lavaron con Tris-HCl pH 8.0 30mM, DTT 1mM, nuevamente ultracentrifugando por 1 hora a 4°C. Finalmente, los proteoliposomas conteniendo a MS-DesK fueron nuevamente resuspendidos en el buffer de hidratación. La integración de MS-DesK en cada liposoma desestabilizado con cantidades crecientes de detergente fue analizada por Western blot.

- C) Remoción del detergente. Se verificó que luego de tres lavados sucesivos de ocho horas con el adsorbente hidrofóbico BioBeds SM-2 en una relación BioBed/detergente de 30 veces (w/w), se lograba eliminar todo el detergente agregado, alcanzando valores constantes de turbidez de los liposomas en el tiempo.
- D) Control de integración en liposomas. Para confirmar que MS-DesK estuviese realmente integrada en la bicapa y no simplemente asociado a la superficie lipídica por interacción electrostática, los proteoliposomas fueron repurificados en gradiente de sacarosa de alta concentración salina (0.5M KCl) y analizado por Western blot (fig. 4.7) confirmando su correcta integración en la membrana.



**Fig. 4.7. MS-DesK se encuentra integrado a los liposomas, aún a altas concentraciones salinas.** Los proteoliposomas de MS-DesK fueron repurificados en un gradiente de sacarosa en presencia (+) y ausencia (-) de KCl 0,5M y analizado por Western blot, confirmando la correcta integración en la bicapa.

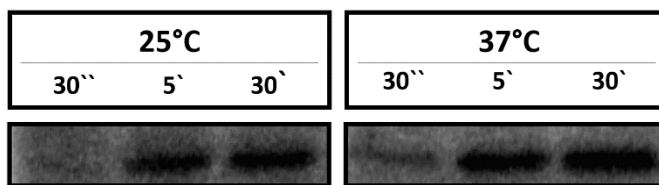
- E) Determinación de la eficiencia de reconstitución y del ratio proteína/lípido de los proteoliposomas. Se cuantificó la concentración de proteína reconstituida en los proteoliposomas por el método de Lowry. Al compararlo con la cantidad de proteína purificada agregada inicialmente se calculó un 50-60% de eficiencia de incorporación. La concentración lipídica fue cuantificada por el método de Rouser, obteniéndose una relación lípido: proteína de aproximadamente 20/1 (w/w).

#### 4.1.2.2. Caracterización funcional de MS-DesK integrada en liposomas

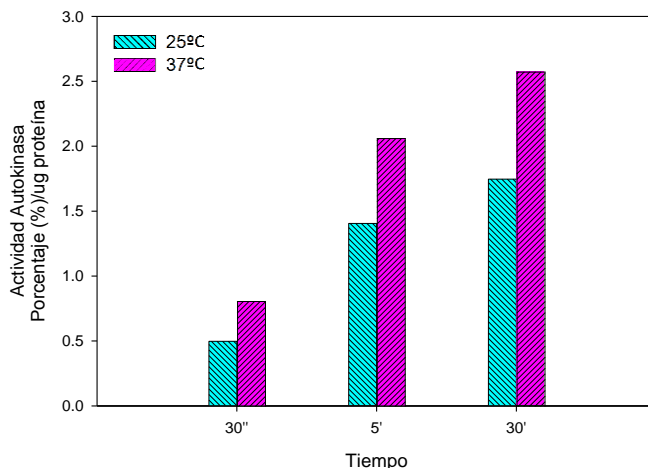
Considerando que nuestra proteína está constituida por un segmento transmembrana de apenas 24 aminoácidos hidrofóbicos y 216 aminoácidos que conforman el dominio citoplasmático, la misma se introduce dentro de la membrana por el segmento hidrofóbico N-

terminal, en una orientación dentro-fuera. Esto haría que el dominio catalítico quede expuesto al medio de reacción.

Con el objeto de caracterizar funcionalmente la integración de MS-DesK en los liposomas se procedió a evaluar su actividad autoquinasa, fosfotransferasa y fosfatasa como fue descripto para DesKC (Albanesi y col., 2004). Como puede verse en la fig. 4.9A, los proteoliposomas tienen actividad autoquinasa cuando el ensayo se realiza a 25°C. Cuando la actividad autoquinasa es ensayada a 37°C los proteoliposomas son inactivos, indicando que al igual que se observa *in vivo* (Aguilar y col. 2001), su actividad es regulada por la temperatura. Es importante destacar que cuando el ensayo de actividad se realiza con MS-DesK asociada a micelas del detergente Brij 58, al 0,5%, su actividad autoquinasa no es regulada por la temperatura (Fig.4.8), indicando que el minisensor debe estar asociado a una bicapa lipídica para que su actividad sea termoregulada.



DesK-SM Autofosforilación



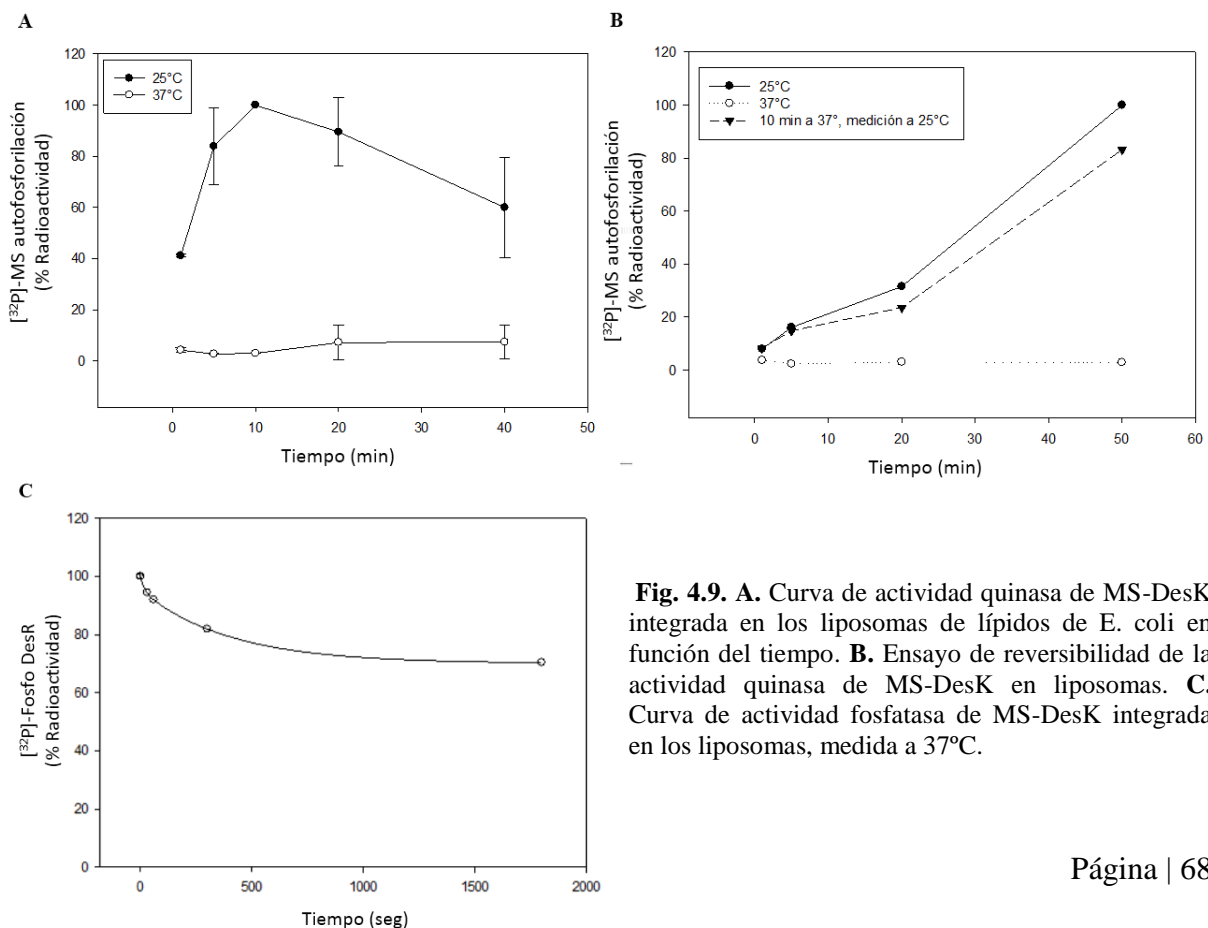
**Fig. 4.8. DesK-SM purificada en micelas de detergente se comporta como quinasa desregulada por la temperatura.** Ensayo de la actividad autoquinasa de DesK-SM en micelas de detergente Brij 58, 0,5%, medida a 25°C en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP como se indica en M&M. En el gráfico de barras inferior mostramos la cuantificación de la actividad autoquinasa de DesK-SM purificada en el tiempo.

Para asegurarnos que la disminución de la actividad quinasa de los proteoliposomas de MS-DesK medida a 37°C está regulada (Fig. 4.9A) y no representa una simple desnaturalización al incrementar la temperatura, medimos la reversibilidad de la actividad quinasa (Fig. 4.9B) de la siguiente manera: preincubamos a 37°C los proteoliposomas durante 10 min y luego volvimos a medir la actividad quinasa a 25°C. Comparando la actividad post-

precalentamiento con la actividad obtenida sin precalentar, se recupera aproximadamente un 90% de actividad, demostrando la integridad de la proteína a 37° y validando la termorregulación. Este control fue realizado en lípidos de Dimiristoyl-sn-glycerophosphocholine (14:0, DMPC).

Después, probamos la transferencia del grupo fosforilo desde MS-DesK a DesR. Para esto, a la preparación de la histidina quinasa integrada en liposomas se le permitió autofosforilarse durante 10 min a temperatura ambiente. Con el agregado de DesR, la transferencia del grupo fosforilo se da principalmente antes del minuto de incubación como fue ya publicado para DesKC (*Albanesi y col., 2004*).

Finalmente, se ensayó la actividad fosfatasa de los proteoliposomas de DesK-SM. Para esto fue necesario fosforilar con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP al regulador de respuesta DesR fusionado a GST unido a su vez a una resina de glutatión agarosa para facilitar su posterior purificación. La fosforilación la hicimos con la parte citoplasmática de DesK, gracias a su alta actividad quinasa y eficiente fosfotransferencia (*Albanesi y col, 2004*). Luego de muchos lavados para eliminar toda la proteína no unida, se expuso al DesR fosforilado a los proteoliposomas para medir la capacidad de MS-DesK de defosforilarlo. Como puede verse en la Fig. 4.9C se testeó la actividad fosfatasa, posteriormente a chequear actividad fosfotransferasa (*datos no mostrados*). DesK-MS integrado en los proteoliposomas presenta entonces, las tres actividades descritas para las HKs (*Mascher y col., 2006*).



**Fig. 4.9.** **A.** Curva de actividad quinasa de MS-DesK integrada en los liposomas de lípidos de *E. coli* en función del tiempo. **B.** Ensayo de reversibilidad de la actividad quinasa de MS-DesK en liposomas. **C.** Curva de actividad fosfatasa de MS-DesK integrada en los liposomas, medida a 37°C.

#### 4.1.2.3. Estudio *in vitro* de mutantes en el segmento transmembrana de MS-DesK.

Una vez reconstituido exitosamente el sensor mínimo en lípidos polares de *E. coli*, estábamos en condiciones de estudiar el comportamiento *in vitro* de una serie de mutantes en el motivo SB previamente ensayadas *in vivo* en su regulación por temperatura (Fig 4.3) (Cybulski y col., 2010). Dado que estos primeros estudios sobre la importancia del SB fueron realizados a través de las mediciones por  $\beta$ -galactosidasa, continuamos con los estudios de esta región a través de ensayos *in vitro*. Con proteína pura integrada en liposomas de composición definida, queríamos corroborar la importancia de este grupo de aminoácidos hidrofílicos situados en el N-terminal de DesK. Llevamos adelante, entonces, la caracterización funcional de estas mutantes en liposomas con la idea que esto nos permitiría corroborar la hipótesis de que este motivo actuaría como switch de activación del del termosensor, DesK, alternando de su conformación transcripcionalmente inactiva a activa (Fig. 4.10A).

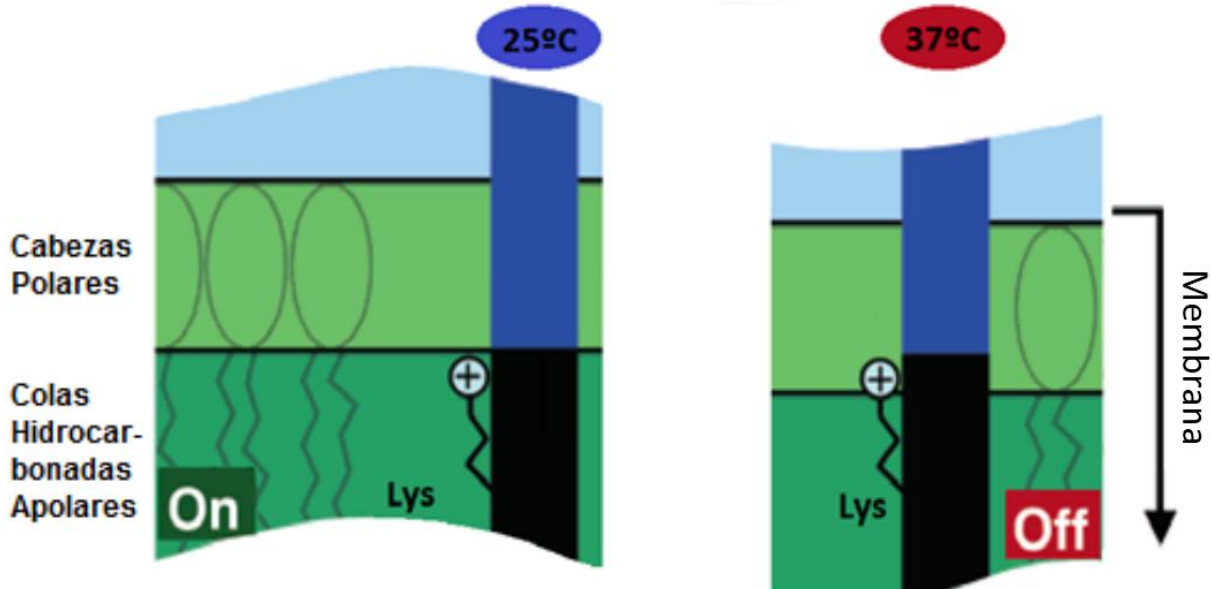
Estudiamos el efecto de mutaciones que sustituyen el motivo hidrofílico por aminoácidos hidrofóbicos en su totalidad (LALA, inactivación total, *datos no mostrados*), o dirigidamente a la lisina de la interfase, K10L-DesK-MS (K10L); mutaciones que aumentan la carga del motivo, como la doble Lys, L11K a la que llamamos KK-MS-DesK (KK) (fig. 4.10B). Se ensayaron en paralelo curvas de actividad quinasa a 25°C en función del tiempo y a partir de las pendientes se calcularon y compararon las velocidades iniciales de cada una (fig. 4.10C).

De los ensayos de comparación de actividad quinasa, se confirma la activación de la proteína KK como quinasa-dominante. Más específicamente, los proteoliposomas de KK muestran una mayor actividad que los de MS. La duplicación de carga positiva en la interfase se traduce en el triple de activación de la quinasa. Esto apoya la idea de que la lisina es la que alerta sobre los cambios de espesor. Cuando se tira de la lisina, ya sea por aumento del espesor o por ubicarse esta una posición más adentro en la membrana, se desata el cambio conformacional que activa la quinasa. La mutante que pierde la capacidad de hacer snorkelling (K10L), en cambio presenta una actividad quinasa muy disminuida, en concordancia con lo observado *in vivo* (Cybulski y col, 2010).

Asímismo, para verificar la integridad de la proteína integrada a los liposomas, así como para estudiar la actividad complementaria de las variantes del MS, se ensayo la actividad fosfatasa. Podemos ver la disminución de la actividad fosfatasa de la mutante KK respecto a la proteína salvaje, evidenciando su estado quinasa dominante independientemente de la temperatura (Fig. 4.10D). La mutante K10L en cambio, muestra mayor actividad fosfatasa que MS (Fig. 4.10D). De esto, se verifica también que todas las proteínas integradas no fueron afectadas por la reconstitución ya que demuestran una u otra actividad. Más interesnte aún, resulta en

verificar el aumento de la actividad fosfatasa de la variante K10L, confirmando la idea de que cuando la proteína no tiene “tope” que la ubique en la membrana, el STM no puede generar los cambios conformacionales necesarios para activar la quinasa.

A.



B.

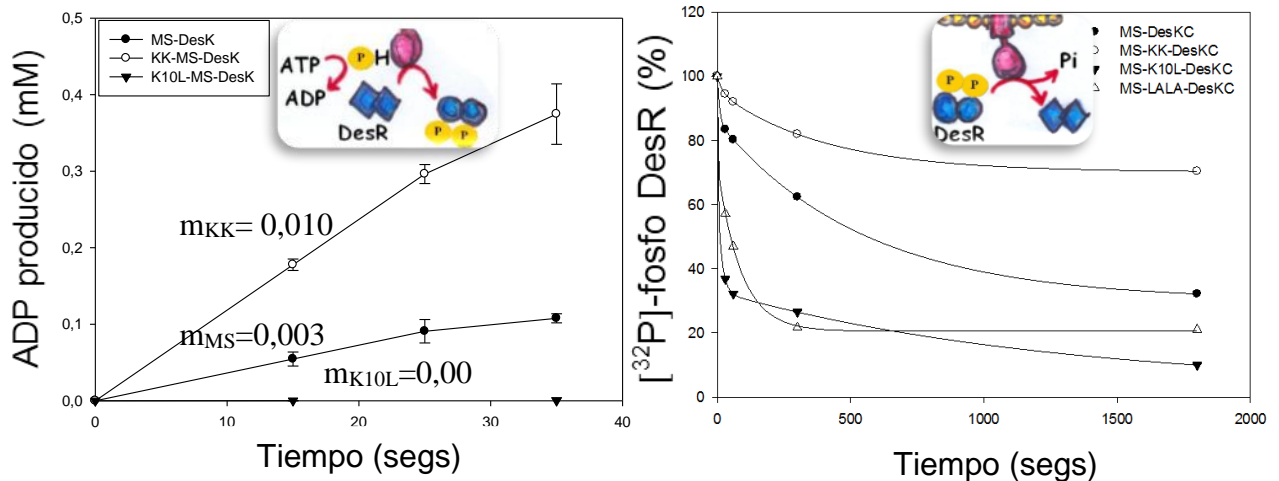
\*WT: MIKNHFTFQKLNGITPYVIT

\*K10L: MIKNHFTFQLLNGITPYVIT

\*KK: MIKNHFTFQKKNGITPYVIT

C.

D.



**Fig. 4.10. El grado de hidratación del motivo hidrofílico SB (QKLN) en la interfase externa determina *in vitro* el estado de señalización de DesK. A.** Efecto snorkeling de la lis interfásial (K10) y su función como switch molecular en la activación del thermosensor cuando cambia el espesor de membrana. A 37°C K10 puede estabilizar su carga en la región polar de las cabezas de los fosfolípidos, al bajar la temperatura, los lípidos se ordenan, aumenta el espesor de la membrana, atrapando la K10 en un entorno hidrofóbico lo que genera una perturbación electrostática que desencadena el cambio conformacional. **B.** La relevancia de la posición de la lis en la interfase en la activación es analizada por mutaciones puntuales anulando (K10L) o duplicando la carga positiva (L11K). Todas estas variaciones del MS-DesKC fueron analizadas por comparación de sus actividades *in vitro*. **C.** La actividad quinasa de los proteoliposomas que integran al MS-DesK o sus variantes fueron medidos mediante el kit comercial ADP-Glo Kinase Assay que mide los niveles de ADP producido durante la

reacción de autofosforilación. Alícuotas fueron tomadas a distintos tiempos: 15s, 25s y 35s; la actividad autoquinasa fue cuantificada a 25°C.D. Actividad fosfatasa de variantes de MS-DesK. Proteoliposomas conteniendo a las distintas variantes del MS-DesK, fueron incubados a 37°C con [<sup>32</sup>P]-fosfo-DesR-P purificado como se describe en Materiales and Métodos. Las reacciones de defosforilación fueron analizadas por SDS-PAGE seguidas de autoradiografía. Las cantidades totales de DesR-P (UA) presente en cada calle fue determinado por densitometría y la marca total de DesR-P al inicio del tiempo de reacción (0 min) fue considerado 100%. El gráfico muestra porcentaje de proteína (%) DesR-P vs tiempo. La estabilidad intrínseca de DesR-P a cada tiempo fue considerada (datos nos mostrados en este resumen).

### **4.1.2.4. La activación de DesK implica un motivo de dimerización de serinas que es modulada por el espesor de la membrana**

#### **Motivo “Cierre de Serina” dentro de la membrana**

La energía de los puentes hidrógeno (puente H) es principalmente electrostática en su naturaleza y está dominada por interacciones coulómbicas entre las cargas efectivas parciales del átomo donador y del aceptor. Esta interacción depende de la distancia de separación de las cargas así como de la constante dieléctrica efectiva del ambiente. La energía de un puente hidrógeno aislado en el vacío es típicamente de 6.0 kcal/mol. En una proteína solvatada en agua, en cambio, por la apertura de la cadena lateral al medio acuoso así como por la solvatación del puente hidrógeno por el medio, la energía del puente hidrógeno se reduce a 1,5 kcal/mol. En una membrana biológica apolar, en cambio, en donde la constante dieléctrica se aproxima a  $\epsilon = 1$ , la energía del puente H dentro de la proteína inserta en la membrana debería ser más cercana a la calculada para el puente hidrógeno en el vacío (*Sheu y col., 2009*). Consecuentemente la formación de puentes H en la bicapa fosfolipídica es esperable que sea energéticamente más estable que en solución por la constante dieléctrica efectiva baja de los lípidos y la consecuente falta de competencia del agua.

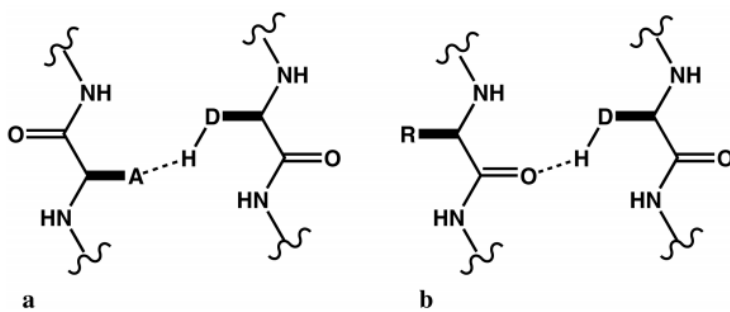
El arreglo espacial general de los clusters puente-H entre dos hélices es similar al motivo en heptada del coiled coil de los cierres de leucina. Por analogía, estos pares Ser-Ser pueden pensarse como un “cierre de serina”, que podría facilitar una asociación fuerte entre las hélices por interacción de puentes-H interhelices.

Los puentes H formados entre hélices TM pueden clasificarse en dos tipos: aquellos formados entre dos cadenas laterales (tipo SC, del inglés “side chain”) y aquellos formados entre una cadena lateral y un N u O del esqueleto carbonado (SB, del inglés “side chain-backbone”) (Fig 4.11). De los estudios realizados sobre un muestreo de proteínas de membrana realizado por Adamian & Liang (2002), ambos tipos ocurren con aproximadamente la misma frecuencia (51% de los puentes H son del tipo SC y 49% del tipo SB). Sin embargo, dentro de los puentes H tipo SB, el 90% corresponden a interacciones cadena lateral-oxígeno

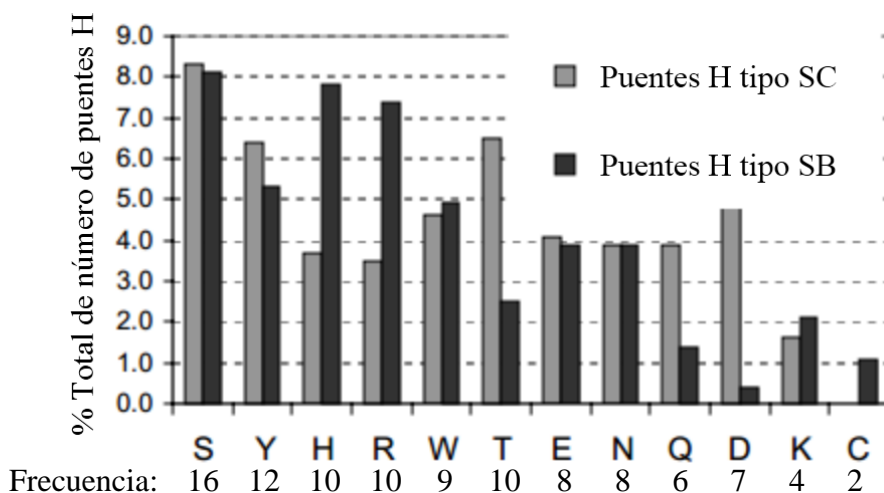
carbonílico de la cadena carbonada. Las preferencias de cada residuo de la cadena lateral por formar puente H tipo SB o SC se muestran en la fig 14.12.

Curiosamente, prestando especial atención a la región C-terminal del STM, observamos que existe un grupo de aminoácidos hidrofílicos internalizados en la membrana: Treonina 20, Serina 23, Serina 30 y Serina 33 (Fig 4.13B). Estos residuos tienen la particularidad de encontrarse a 3 o 7 residuos de distancia dentro de la secuencia, de manera de ubicarse en una misma cara cuando se los representa en un gráfico de  $\alpha$ -hélice (Fig4.13C). Proponemos interacciones por puente H del tipo SB entre pares de estos residuos hidrofílicos de manera de estabilizar el STM en un dímero.

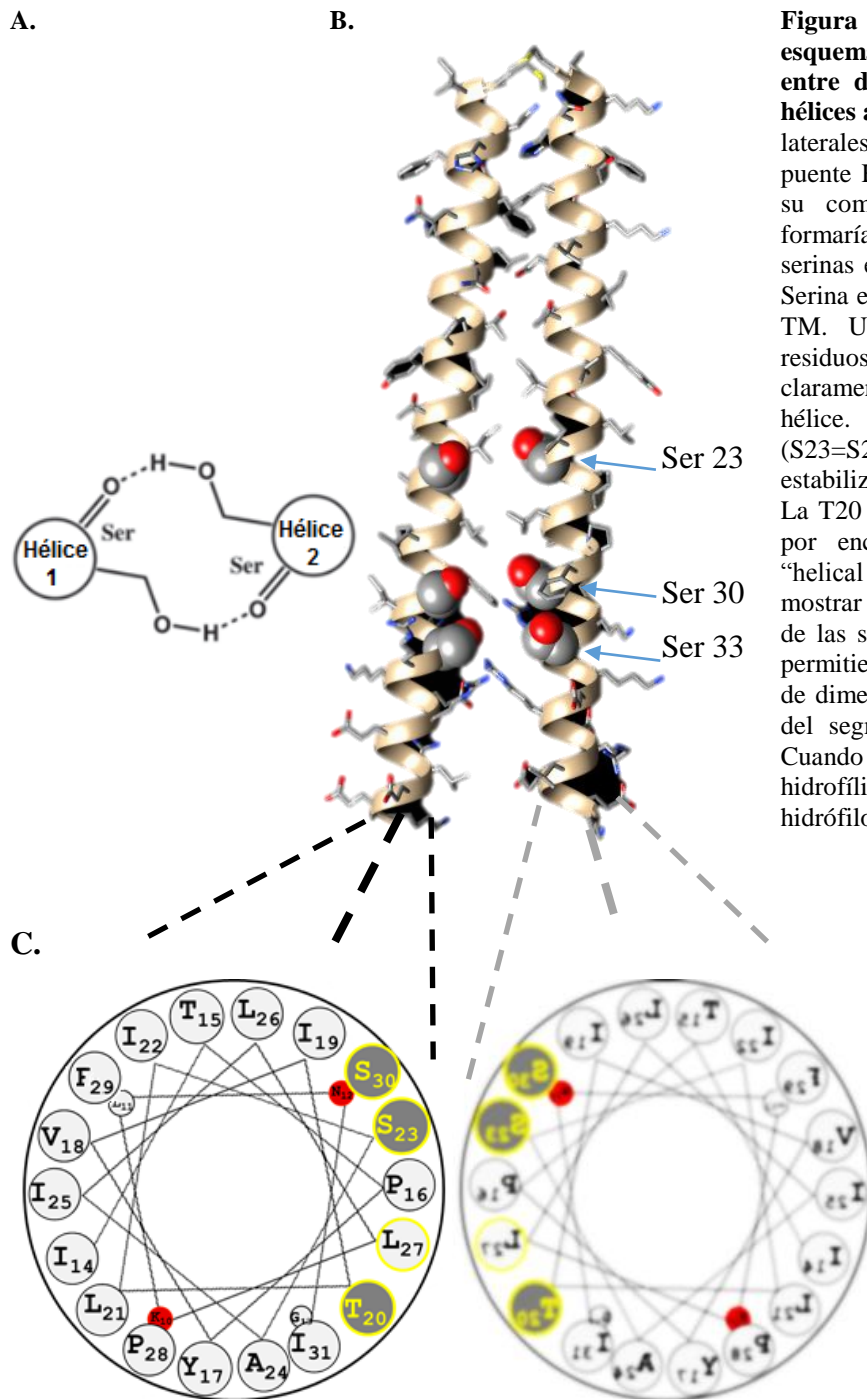
A continuación, evaluaremos el rol de este grupo de residuos hidrofílicos (T20, S23, S30, S33, ver fig 4.13B y C) en la modulación de la actividad del DesK por cambios en el espesor de membrana.



**Figura 4.11.** Dos tipos de puentes-H observados en regiones TM de proteínas de membrana. A. Tipo SC. El puente hidrógeno es formado entre cadenas de aminoácidos de hélices vecinas. Tipo SB: puentes H formados entre cadenas laterales de una hélice y el oxígeno carbonílico o hidrógeno amida del esqueleto carbonado de una hélice vecina.



**Figura 4.12.** Porcentaje de puente H de cada tipo SB y SC formados por los diferentes residuos aminoacídicos. Debajo del gráfico se resume una tabla en la que se muestra la frecuencia a la que se observan diferentes residuos involucrados en la formación de puente H dentro de la membrana. Adaptado de Adamian & Liang (2002).



**Figura 4.13.** **A.** Representación esquemática del grupo de puentes H entre dos residuos de serina de dos hélices adyacentes del MS. Las cadenas laterales de cada residuo S forman un puente H con el oxígeno carbonílico de su compañero. De esta manera, se formarían dos puentes H-por par de serinas en esta agrupación. **B.** Cierre de Serina en MS-DesK entre ambas hélices TM. Un motivo C-terminal de tres residuos de serina (S23, S30, S33) es claramente visible en un lado de la hélice. Seis puentes hidrógenos (S23=S23, S30=S30, S33=S33) estabilizarían la conformación quinasa. La T20 se ubica media vuelta de hélice por encima de la S23. **C.** Gráfico “helical wheel” del TMS-MS para mostrar la formación de la polarización de las serinas en una cara de la hélice, permitiendo proponerla como interfase de dimerización del dominio C-terminal del segmento transmembrana del MS. Cuando L27 está mutado a un residuo hidrófilo podría fortalecer este motivo hidrófilo (ver texto).

### Estudios mutagénicos dan evidencia sobre la posible dimerización de la región TM

Planteamos la hipótesis que los puentes H estabilizarían el dímero a baja temperatura, cuando la hidratación de la membrana disminuye. Estas interacciones favorecerían el estado quinasa; mientras que la desestabilización de los puentes H a mayor temperatura, cuando la membrana es más hidratada, promovería la conformación de la fosfatasa de DesK.

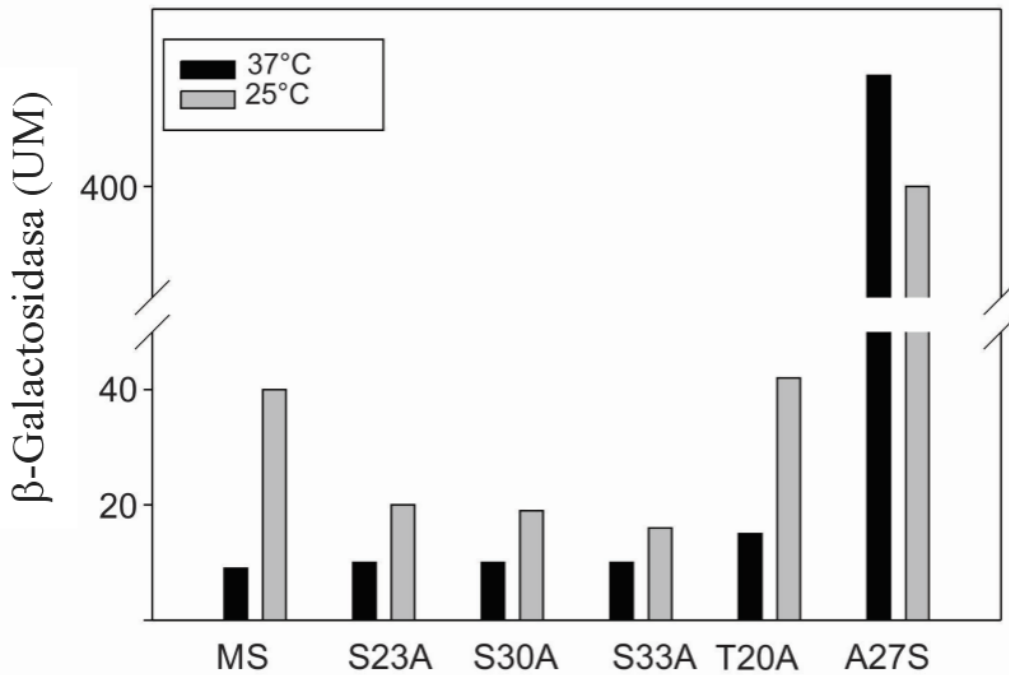
Al bajar la temperatura, la membrana estará menos hidratada, disminuyendo la constante dieléctrica del medio y esto favorecerá la formación de puentes hidrógeno intracatenarios que permitirá a este motivo dimerizar, promoviendo el estado quinasa.

Para demostrar esta idea, introdujimos una serie de mutaciones puntuales en residuos hidrofílicos que podrían ser sensibles al nivel de hidratación de la interfase: T20A, S23A, S30A y S33A. De acuerdo con el modelo, estas mutaciones favorecerían el estado fosfatasa de MS debido al debilitamiento de la fuerza motriz de rotación. Encontramos que evidentemente S23A, S30A y S33A, mutaciones que eliminan estos residuos formadores de puente hidrógeno en el C-terminal, disminuyen la actividad quinasa a 25 °C (fig. 4.14), favoreciendo el estado fosfatasa del sensor independientemente de la señal de temperatura (fig. 4.15). T20A no tiene efecto sobre la señalización de MS (Fig 4.14), posiblemente porque las interacciones son dominadas por S23, S30 y S33, como se fue reportado para otras proteínas en el trabajo de Adamian & Liang, 2002, fig 4.12.

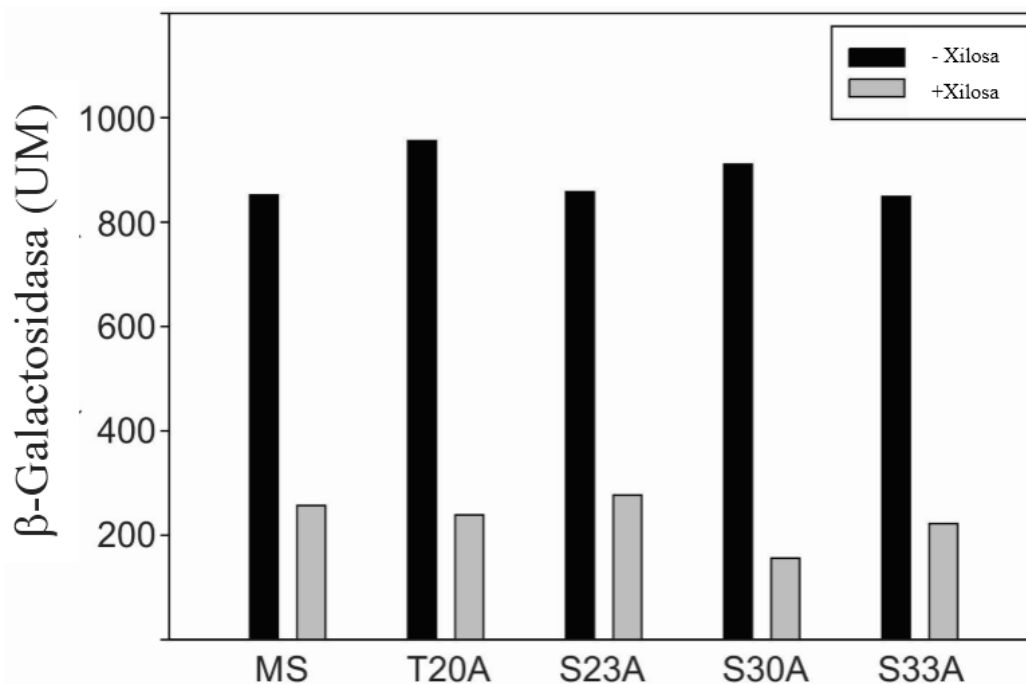
Residuos de serinas en posiciones S23, S30 y S33 del C-terminal del segmento TM son críticas para estabilizar el estado quinasa de DesK. El grupo hidroxilo de estas serinas es formador de puente hidrógeno con el carboxilo del esqueleto carbonado de la correspondiente serina contraparte, considerando que el dímero encontrado en la parte citoplasmática (*Albanesi y col., 2009*) se continúa en la membrana. De esta manera el homodímero de DesK estabilizaría la interfase de dimerización de la parte C-terminal TM requerida para activar el estado quinasa. Sin embargo, en el estado fosfatasa, cuando la membrana es delgada y más hidratada, el puente H serina-serina entrará en competencia con las moléculas de agua de la interfase, de manera que se desestabilizarán los puentes H y disrumpirá la interfase de dimerización C-terminal.

Convencidos de haber encontrado un Cierre de Serinas en nuestro sistema, quisimos explotar aún más las potencialidades del mismo, forzando una interacción más estable aún. ¿Qué sucedería si agregáramos una serina extra en la segunda vuelta de hélice que saltea el cierre? Analizamos entonces el efecto de introducir una Ser extra en posición 27 de la postulada interfaz hélice-hélice, como control adicional de nuestra hipótesis (Fig 4.14). De acuerdo al modelo esto favorecería el estado quinasa debido a la estabilización de la interfaz de dimerización ahora constituida por cuatro serinas localizadas a una vuelta de hélice: S23, S27, S30 y S33. Encontramos que este reemplazo ciertamente estabiliza fuertemente la actividad quinasa (Fig 4.14). De manera análoga, cuando la interfaz de dimerización fue modificada en la proteína DesK completa los efectos encontrados para MS-DesK son igualmente válidos (fig 4.16).

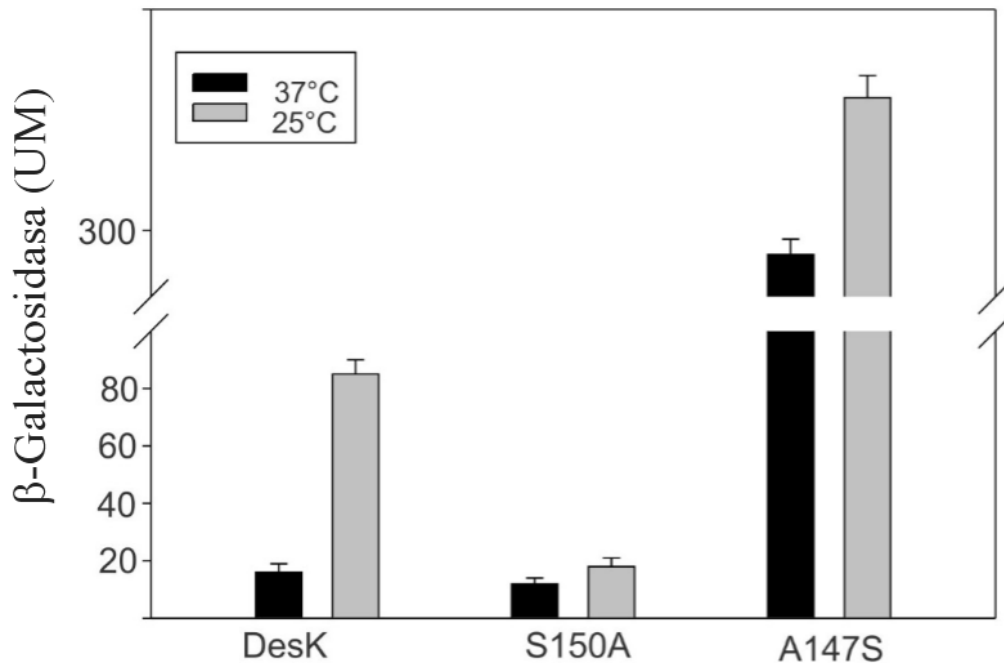
Los resultados de este capítulo en su conjunto resaltan un rol crucial para la interacción entre dos interfaces de dimerización en la señalización de DesK, como desarrollaremos en la discusión a continuación.



**Figura 4.14. Actividad de las variantes de MS-DesK con un motivo hidrofílico en el C-terminal del segmento TM alterado.** Las células de *B. subtilis* desK- que albergan cada una de las mutantes puntuales descritas fueron crecidas a 37°C hasta una OD de 0.3 a 525nm y después divididas en dos muestras. Una muestra fue transferida a 25 °C (barras grises) y la otra mantenida a 37 °C (barras negras). Las alícuotas fueron tomadas cada hora y las actividades  $\beta$ -galactosidasa fueron determinadas. Los valores mostrados son representativos de tres experimentos independientes y corresponden a 4 horas posteriores al cambio de temperatura.



**Figura 4.15. Actividad fosfatasa *in vivo* de las variantes de DesK.** La cepa AKP20 de *B. subtilis* permite medir la actividad fosfatasa de *des* (Aguilar 2001, Cybulski 2010). Este sistema está basado en la sobreexpresión de fosfo-DesR, en un entorno genético *desK*<sup>-</sup>, conduciendo llevando a una expresión constitutiva de la fusión *des-lacZ* a 37 °C. Si la cepa AKP20 es complementada con variantes de DesK que exhiben actividad fosfatasa, fosfo-DesR disminuye, reduciendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa (para una explicación más detallada ver fig 5.3B). Células AKP20 fueron transformadas con plásmidos expresando MS o sus mutantes puntuales (T20A, S23A, S30A) bajo el control del promotor inducible por xilosa *P<sub>xyl</sub>*. Se midieron las actividades  $\beta$ -galactosidasa en la cepa reportera crecida a 37°C en la presencia (barras grises) o en ausencia (barras negras) de xilosa.

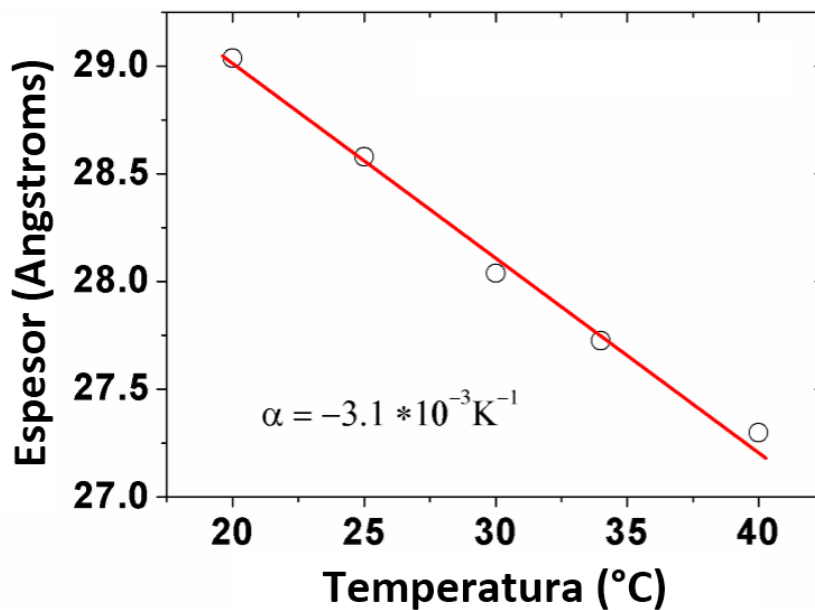


**Figura 4.16.** Células de *B. subtilis* *desK*<sup>-</sup> que albergan DesK completa o sus variantes S150A, L147S se procesaron como en Figura 1.

#### 4.1.2.5. Determinación del espesor de la membrana de *B. subtilis*

El modelo que venimos desarrollando hasta ahora, determina que a 37 °C la membrana es más delgada y la interfase de la membrana se encuentra bien hidratada. Cuando la temperatura desciende a 25 °C, la membrana se engrosa, con la consecuente deshidratación a nivel de la interfase. Sin embargo, este modelo nos lleva a preguntarnos ¿cuán marcado puede ser el cambio en el espesor inducido por el cambio de temperatura en estudio? ¿Puede este cambio ser determinante en el tremendo cambio conformacional que se desencadena en la región catalítica? Si bien estudios *in vitro* habían demostrado que al integrar al MS-DesK en liposomas formados por lípidos con ácidos grasos de longitud de cadena creciente se aumentaba la actividad quinasa (Cybulski y col., 2010, Fig 4.4), quisimos dar evidencia empírica directa de dicho cambio, midiendo el espesor de las membranas de *Bacillus subtilis* en función de la temperatura. Las mediciones fueron hechas a diferentes temperaturas por medio de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) en colaboración con el Dr. Rafael Oliveira. La ausencia de picos de difracción indica que las membranas tienen paredes simples.

Utilizando el modelo “three slab model” de la membrana, se determinó el espesor de toda la membrana así como el espesor hidrofóbico (capas acilos más la capa de los grupos metilos). De la figura 4.17 encontramos un aumento de 1.75 Å en espesor hidrofóbico cuando las membranas son incubadas a 40° y después transferidas a 20°C. Si evaluamos el rango 37° a 25°, podemos calcular una diferencia de 1,05 Å de espesor hidrofóbico.



**Figura 4.17. La membrana se engrosa a bajas temperaturas.** El espesor de la membrana fue determinado en función de la temperatura por SAXS, los datos obtenidos fueron tomados en el rango 20-40 °C.

### 4.1.3. DISCUSIÓN

#### 4.1.3.1. El cambio en el espesor de la bicapa modula la actividad de MS- DesK

A bajas temperaturas las cadenas acilo están en el empaçado estado rígido en la cual los movimientos moleculares están altamente restringidos (*Cronan y col., 1975*). Con el calentamiento, la membrana transita una transición endotérmica y aumenta la permeabilidad a las moléculas pequeñas, formándose canalículos de agua por entre las cadenas en creciente desorden. Los lípidos fundidos en el estado líquido-cristalino permanecen en estructura lamellar, pero la capa es más fina debido a que las cadenas del acilo están con menos frecuencia en su conformación completamente extendida e interdigitan. Aquí estudiamos por SAXS las variaciones en el grosor de la membrana en el rango de interés (20° a 40°C) con muestras que provenían de cultivos crecidos en medio mínimo, determinándose una diferencia de 1,75 Å. Más precisamete, evaluando el rango en estudio (de 37° a 25°C), calculamos un aumneto de 1.05 Å. Con ese descenso de temperatura el grosor de la membrana aumentará, generando una desigualdad entre las hélices hidrofóbicas de la proteína DesK y el ambiente

que la rodea. Por lo tanto, se planteamos la hipótesis de que tal perturbación en la bicapa, disparada por la temperatura podría regular el estado de señalización de DesK.

Curiosamente, el aminoácido hidrófilico K10 cerca del extremo amino terminal del primer dominio TM de DesK es crítico para su activación por frío (Cybulski y col., 2010 y resultados *in vitro* de esta tesis, fig 4.10). Es de suponer que este residuo se encuentra dentro de la región TM justo debajo de la interfaz lípido-agua. Teniendo en cuenta de que su cadena lateral debe ser capaz de bucear en la interfase agua-membrana hidrófilica, este aminoácido pueden actuar como una boya, estabilizando la posición del segmento transmembrana. Por esta razón se le ha llamado el motivo boya hundida (SB, del inglés, Sunken Buoy). El modelo de SB termosensible que plantea un estado inestable con la privación de la hidratación de la agrupación polar causado por la expansión de membrana está asociado con una actividad de la quinasa, mientras que la hidratación durante la constricción de membrana sería promover la actividad de la fosfatasa. Así, cambiando la crítica K10 una posición hacia el interior en la fase lipídica hidrofóbica (KK-MS-DesK), un cambio que aumentaría la deshidratación de SB a todas las temperaturas, aumenta la actividad de la quinasa. Por el contrario, un mutante que aumenta la longitud de la hidrofobicidad de MS por reemplazo por la Leu (K10L-MSDesK), un cambio que debe ayudar a reubicar el TM más distendido, sin restricciones electrostáticas, disminuye la actividad de autokinasa.

Los experimentos *in vivo* mostraron que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos mediante la adición de la cerulenina, un inhibidor potente y específico de la sintasa de ácidos grasos de tipo II, resulta en aumento de los niveles de ácidos grasos de cadena corta en los fosfolípidos de membrana y esto conduce a la inhibición del control térmico de DesK (sección 1.7, Porrini y col., 2014). Asimismo, experimentos *in vitro*, demuestran que cuando MS-DesK (Cybulski y col., 2010) o DesK (Martín y col., 2013) se reconstituyeron en una serie de fosfatidilcolina que contienen ácidos grasos de diferente longitud de cadena, aumentando así el grosor de la bicapa, aumentaba la actividad autokinasa. Juntos, estos estudios son consistentes con la hipótesis de que la regulación de DesK se da por los cambios en el espesor de la membrana; los que podrían desencadenar cambios conformacionales dependientes del SB en su dominio sensor TM. Sin embargo, el delicado equilibrio de la conformación de la proteína y de la comunicación entre subdominios de la proteína DesK siempre debe tenerse en cuenta.

### **4.1.3.2. Interacciones diméricas entre los STM regulan la actividad de DesK**

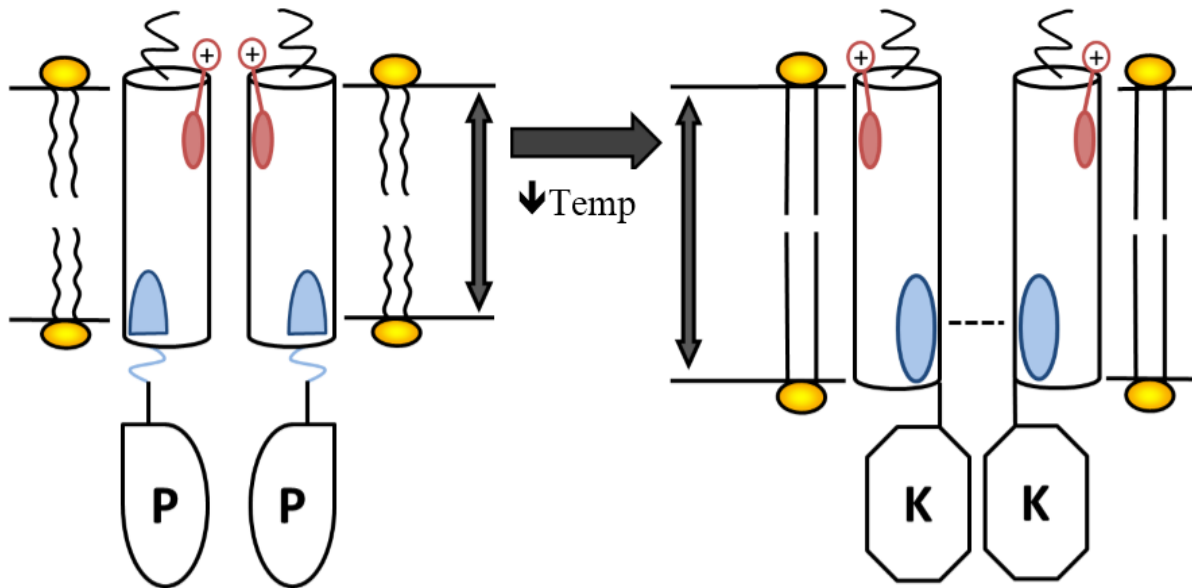
En este capítulo, encontramos un motivo de dimerización de residuos hidrófilicos (S23, S30 y S33) que es sensible al cambio en el espesor de la membrana. Mutaciones dentro de este

motivo llevan a cambios sistemáticos en la actividad del termosensor. Basados en estos resultados sugerimos un modelo para el modo de activación de MS, en el que dos interfaces de dimerización son posibles y a su vez, excluyentes: uno en el N-terminal y otro en el C-terminal del STM. El N-terminal contiene el motivo hidrofílico cargado K<sub>10</sub>N<sub>12</sub> (con carga en la fig 4.18) ya caracterizado a comienzos de este capítulo. Las cadenas laterales de estos residuos pueden hacer “snorkel” hacia la interfase hidrofílica de la membrana, de manera de limitar el movimiento vertical hacia abajo del MS-TMS. El motivo hidrofílico C-terminal del transmembrana (S<sub>23</sub>S<sub>30</sub>, gris en la fig 4.18) es claramente visible en una cara de la hélice. Según el grado de exposición del motivo hidrofílico a la fase acuosa se determina la interfaz de dimerización y por ende, la actividad del sensor (fig. 4.18). Así, de acuerdo con nuestro modelo, este motivo hidrofílico (S<sub>23</sub>, S<sub>30</sub> y S<sub>33</sub>) constituirá la interfaz de dimerización a baja temperatura (o cuando la proteína es incorporada en membranas de mayor espesor) al permitir la formación de puentes hidrógeno dentro de la membrana.

A modo de resumen, el modelo propuesto es el siguiente: en membranas más delgadas (a temperaturas altas) las hélices TM forman un dímero, en el que la región S<sub>30</sub> a S<sub>33</sub> se localiza justo fuera del núcleo hidrófobo de la membrana; estando las serinas ahora expuestas al ambiente acuoso, interaccionaría el dímero por el motivo hidrofílico N-terminal. En membranas más gruesas el TM tira de esta región C-terminal ubicándola dentro de la membrana y forzando la formación de una vuelta adicional de la hélice  $\alpha$  transmembrana, que incluye ahora las serinas S<sub>30</sub> y S<sub>33</sub>. Estas serinas, que se encuentran en la misma cara de la hélice, se dirigen ahora hacia la serina homóloga en el otro monómero, formando dos puentes H del tipo SB por par de serinas. Se forma, entonces, un cierre de enlaces de hidrógeno interhelicodal que protegen los grupos hidroxilo del núcleo hidrófobo de la membrana. La interacción de los dos STM vía puente hidrógeno fortalecería la rotación de las hélices que se continúan hacia la región citoplasmática, Esta reorientación de las hélices transmembrana podría desencadenar el cambio conformacional que conocemos del dominio citoplásmico DesKC, estabilizando la conformación quinasa del sensor (fig. 4.18).

Basados en los estudios funcionales de las mutantes del MS desarrollados en este capítulo, proponemos un mecanismo para la termo-detección en la que el motivo boya hundida N-terminal situado en la interfaz lípido-agua extracelular en coordinación con el motivo hidrófilo C-terminal situada en la interfaz intracelular, definen los bordes de un calibre molecular. Este calibre molecular responde a los cambios en el espesor de la membrana por medio de cambios en la hidratación de un motivo que consiste de tres serinas. Cuando está alojado en la membrana, este motivo favorece la formación de una nueva interfaz hélice-

hélice necesaria para activar el estado de quinasa de DesK. La estabilización del cierre de serinas entre las dos hélices del dímero podría resultar entonces en una rotación de las hélices a nivel del dominio catalítico, que favorecería la activación de DesK (Albanesi, 2009).

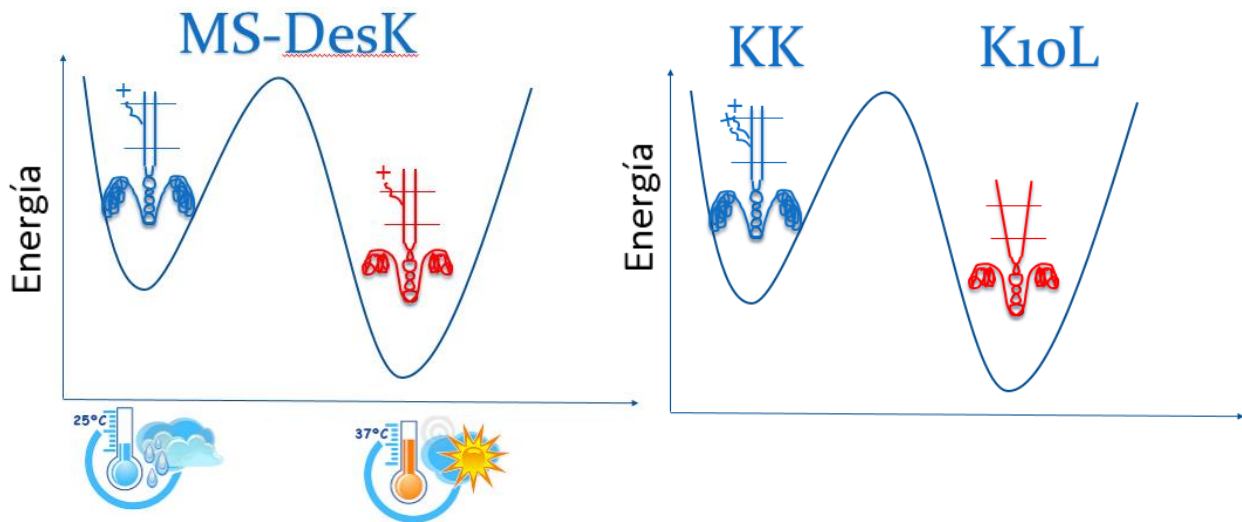


**Figura 4.18.** Representación esquemática del modo de activación de MS. El segmento transmembrana (MS-TMS) contiene dos motivos hidrofílicos cruciales para su correcto funcionamiento. El N-terminal contiene un motivo hidrofílico cargado  $K_{10}N_{12}$ . Las cadenas laterales de estos residuos pueden hacer “snorkel” hacia la interfase hidrofílica de la membrana, de manera de limitar el movimiento vertical hacia abajo del MS-TMS. El motivo hidrofílico C-terminal del transmembrana ( $S_{23}S_{30}$ , gris) es claramente visible a un lado de la hélice. Bajo condiciones de membrana fluida, el motivo hidrofílico C-terminal podrá alcanzar la interfaz e hidratarse (izquierda). Bajo condiciones de una disminución de la temperatura, la membrana se ensancha y este motivo hidrofílico queda atrapado dentro del núcleo hidrófobo de la membrana. Para compensar, los dos dominios hidrofílicos interactúan uno con el otro, de manera que la dimerización de los residuos hidrofílicos (en particular las Serinas por interacción puente hidrógeno) será favorable. La reorientación, necesaria para esta interacción, llevaría al cambio en el dominio C-terminal (DesKC) desde el estado fosfatasa al quinasa.

#### 4.1.3.3. La membrana como regulador alostérico de la función de DesK

Como vimos en este capítulo, los reemplazos puntuales de aminoácidos en el SB del MS-DesK pueden favorecer el equilibrio conformacional tanto hacia el estado quinasa (KK-MS-DesK) como el fosfatasa (K10L-MS-DesK) independientemente de la temperatura ambiental (Cybuski, 2010; Inda, resultados no publicados). Por un lado, esto significa que las energías libres de ambos estados de señalización son similares alrededor de los  $30^\circ$ , con un pequeño exceso de las poblaciones quinasa-encendido o fosfatasa-encendido a altas y bajas temperaturas, respectivamente. Por otro lado, la barrera energética que separa ambos estados de señalización se espera que sea muy alta porque el cambio asociado al cambio conformacional conlleva movimientos a gran escala en la parte más grande de la proteína (DesKC), como es evidenciado por las estructuras de Rayos X del dominio catalítico (Fig. 1.9). Entonces, es tentador especular que las deformaciones de la bicapa lipídica asociadas a los cambios en la temperatura, dirigen los cambios conformacionales por alteraciones sutiles

de sus energías libres relativas para superar la barrera global de energía libre entre las distintas conformaciones de DesK. Así, la bicapa lipídica con sus propiedades térmicas propias funcionaría como un regulador alostérico de la función de DesK (Fig.4.19).



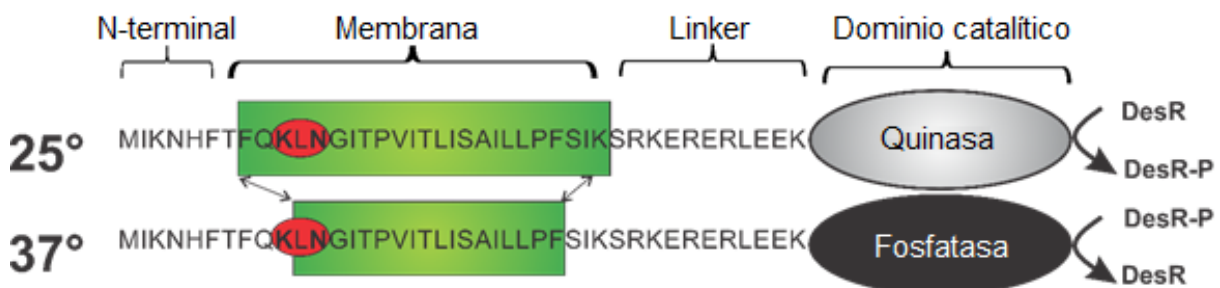
**Figura 4.19.** La membrana funcionaría como regulador alostérico de la función de DesK. Al disminuir la temperatura, los lípidos se ordenan y la membrana se engrosa. La lisina 10 queda atrapada en un ambiente hidrofóbico, hace snorkelling desde una posición internalizada en la membrana, marcando un tope o umbral a partir del cual se dispara el cambio conformacional en la región catalítica. Este efecto puede simularse posicionando una lisina una posición más adentro en la membrana (KK), mientras que cuando se quita esta restricción, la proteína no sale de su estado fosfatasa.

## 4.2. CAPITULO II. Un switch conformacional dependiente de la interacción lipídica modula la actividad termosensora de DesK.

### 4.2.1. Introducción al Capítulo II

Los resultados mostrados en el capítulo anterior aportan elementos importantes al desarrollo del modelo del mecanismo de sensado. Sin embargo, la pregunta fundamental “¿cómo la información sensada por la región transmembrana es convertida en un rearrreglo en el dominio citoplasmático catalítico para controlar la actividad de DesK?” está todavía en vigencia.

En este capítulo, evaluamos el rol de un segmento linker (KSRKERERLEEK, ver fig 5.1) que conecta el dominio transmembrana sensor con el dominio citosólico catalítico.



**Figura 5.1. Representación esquemática de MS-DesK a 25°C y 37°C.** La secuencia de la región transmembrana y el linker conector están indicados con el código de una letra. El motivo “Sunken Buoy” (SB) está resaltado con un círculo (KLN), el dominio citoplasmático catalítico está representado con un óvalo y la bicapa lipídica con un rectángulo. A 25°C la membrana es más gruesa y el motivo hidrofílico SB está enterrado en el corazón hidrofóbico de la membrana. El dominio catalítico tiene entonces actividad quinasa (óvalo gris) y fosforila a DesR. A 37°C, en cambio, la membrana es más fina y el SB flota en la interfase agua-lípido. El dominio catalítico tiene actividad fosfatasa (ovalito negro) y defosforila DesR-P.

### 4.2.2. RESULTADOS

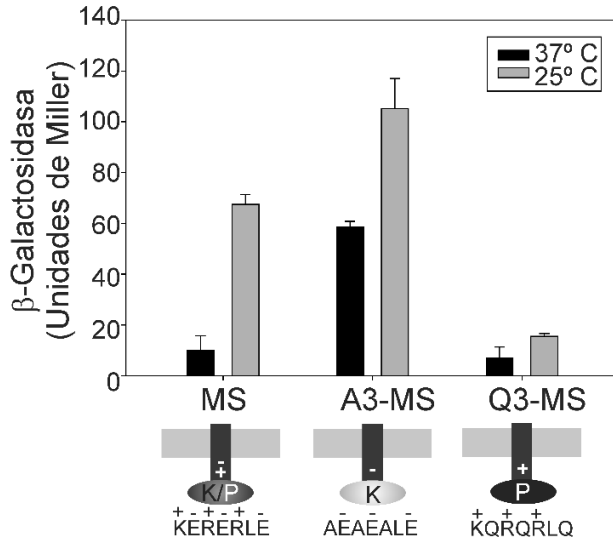
#### 4.2.2.1. Los residuos cargados del linker son críticos para la señalización de DesK.

La región linker conecta la región transmembrana con el dominio catalítico de DesK y está localizado en la proximidad de la hemicapa interna de la bicapa lipídica. Para estudiar esta región, introdujimos mutaciones puntuales en la región linker (KERERLEEK) de la versión minimizada de DesK, MS-DesK, de manera de reemplazar en un mismo péptido, 3 residuos cargados positivamente y en otro, 3 negativamente con residuos neutros: AEAEALEEK (A3) y KQRQRLQEK (Q3) respectivamente (Fig. 5.2A, panel inferior). Para evaluar el

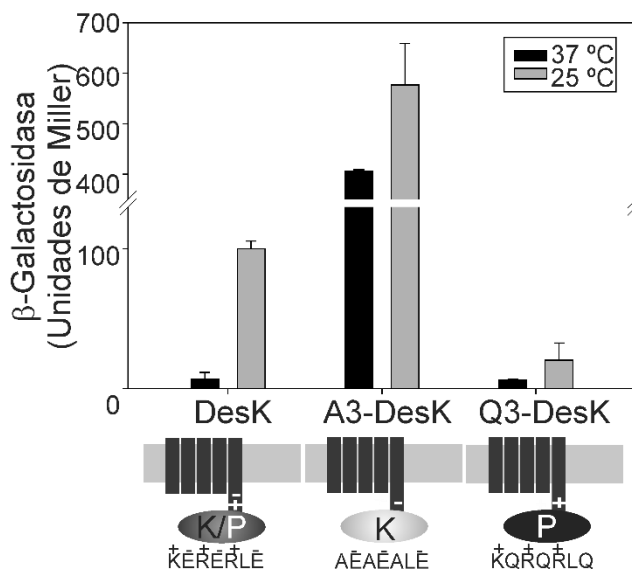
comportamiento de estas variantes de MS-DesK frente al estímulo por temperatura, las mismas fueron expresadas en una cepa *desK*<sup>-</sup> y sus respectivas actividades fueron medidas así: la activación del promotor de la desaturasa fue medido por activación del gen  $\beta$ -galactosidasa al que está fusionado (P<sub>des</sub>-lacZ) en condiciones de alta y baja fluidez de membrana (células crecidas a 37°C o crecidas a 37°C y después expuestas a choque por frío a 25°C, respectivamente). Como se muestra en la Fig. 5.2A, MS-DesK estimula la transcripción del reportero cuando la células son estimuladas por frío. Sorprendentemente, la variante del linker cargada negativamente (A3-MS) muestra una actividad quinasa constitutiva independientemente de las variaciones de la fluidez de la membrana. Por el contrario, la variante con el linker cargado positivamente (Q3-MS) impide al sensor estimular la transcripción del gen *des* a 25 o 37°C (Fig. 5.2A), aún manteniendo una alta actividad fosfatasa (Fig. 5.3A), lo que indica que la integridad de la proteína no se ve afectada (para mayor detalle de la medición de la actividad fosfatasa ver Fig. 5.3B). Todo esto es válido, no solo para MS-DesK sino también para la proteína DesK completa (Fig. 5.2B).

### 4.2.2.2. El linker se une a lípidos de membrana.

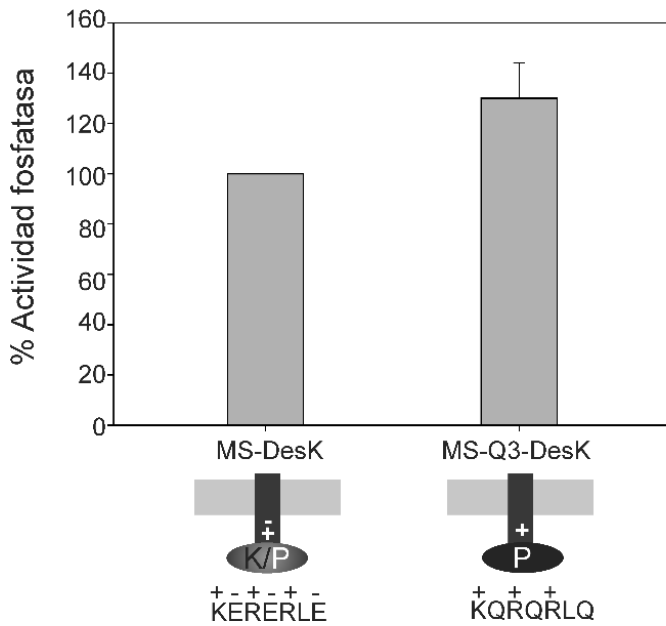
Con el objeto de analizar si las variantes del linker interactúan con la membrana fosfolipídica y caracterizar los parámetros de dicha interacción, diseñamos los 3 péptidos correspondientes a cada variante (WT, A3 y Q3, Figura 5.4A) y preparamos liposomas con lípidos de *E coli* (mezclas de fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos). Las mediciones por right-angle light scattering muestran un aumento significativo en la turbidez con la adición de los péptidos Q3 a los liposomas (Figura 5.4B). La disminución abrupta en los valores de turbidez que se ve en esta figura es debido a una floculación visible observada segundos después de la adición del péptido Q3. En contraste, no se observaron cambios en la turbidez luego de la adición del péptido de A3. Para el a péptido WT se observó un aumento leve. El aumento en la turbidez puede explicarse por el apantallamiento de cargas de los liposomas debido a la unión de los péptidos cargados positivamente (especialmente Q3) a la superficie de los liposomas cargados negativamente, disminuyendo la repulsión electrostática de los liposomas y favoreciendo la floculación de los mismos.



**Figura 5.2. A. Las cargas del linker son críticas para determinar el estado de señalización de DesK.** Células que expresan las variantes del linker de MS-DesK fueron crecidas a 37°C o crecidas a 37°C y transferidas a 25°C a una OD<sub>525</sub>=0.3. La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue ensayada cada hora en triplicados independientes. Los resultados mostrados son expresados como promedio de tres experimentos y corresponden a las 2 horas luego del choque por frío.



**B. Actividades específicas  $\beta$ -galactosidasa fueron ensayadas en células de *B. subtilis* expresando las variantes del linker al igual que en A, sólo que ahora estas variantes se introdujeron en la proteína DesK completa.**



**Figura 5.3. MS-Q3-DesK conserva actividad fosfatasa.**

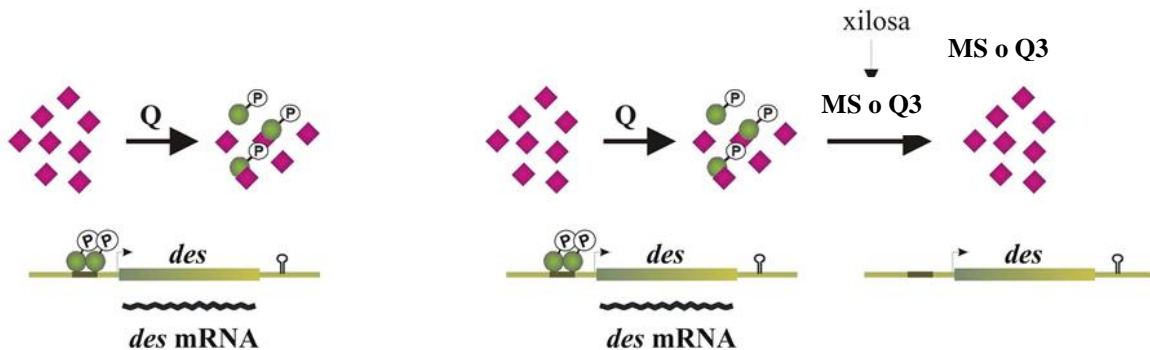
**A.** Para ensayar la actividad fosfatasa *in vivo* fue utilizada la cepa AKP20 que porta el constructo Pdes-lacZ y sobre expresa fosfo-DesR, en un contexto genético *desK*<sup>-</sup>. Esta cepa muestra expresión constitutiva del gen reportero, β-galactosidasa a 37 °C a menos que sea complementada con las variantes de DesK que presentan actividad fosfatasa (Aguilar y col., 2001). Las células AKP20 fueron complementadas con plásmidos pHPKS portadores del gen que codifica para MS-DesK tanto con el linker WT o la variante del linker Q3. Ambas fueron crecidas a 37°C en presencia o ausencia del inductor (xilosa) y la actividad β-galactosidasa fue determinada cada hora. La diferencia en la actividad β-galactosidasa en ausencia o presencia del

inductor refleja la actividad fosfatasa de cada variante. Una diferencia del 100% corresponde al MS-DesK con el linker WT. **B.** Esquema de las cepas AKP20 y sus variantes, representando a DesR, rombos; DesR fosforilado, círculos y Q, quinasas inespecíficas.

**B.**

AKP20 (*desK*<sup>-</sup> Pkan-*desR*)

MS-DesK o Q3 MS-DesK

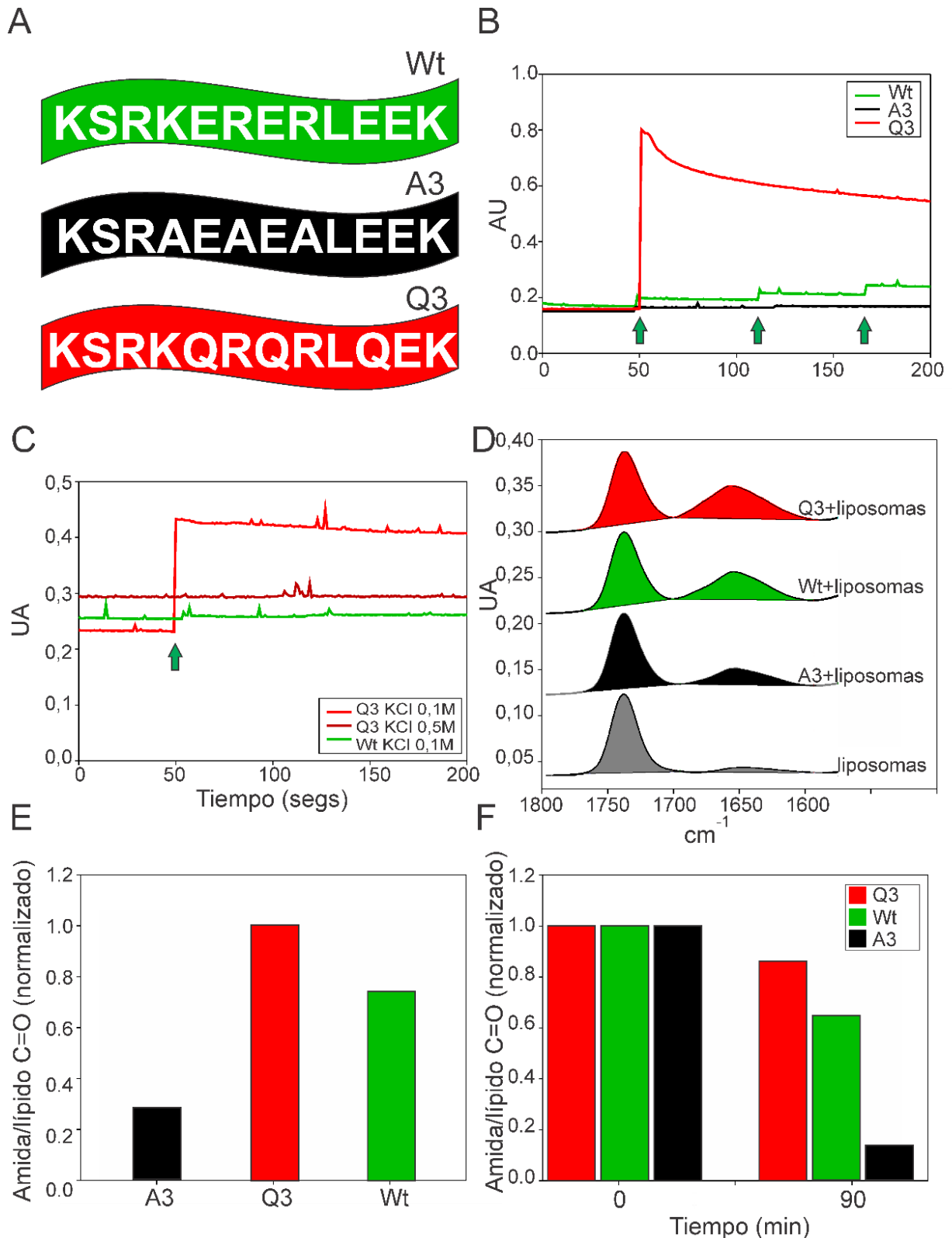


A concentraciones crecientes de sal, los péptidos WT y Q3 pierden su capacidad de aumentar la turbidez de los liposomas lo que sugiere una interacción esencialmente electrostática entre los péptidos WT o Q3 y los liposomas (Fig. 5.4C). Como el aumento de la turbidez no necesariamente significa que los péptidos interactúan cuantitativamente con los lípidos, se separaron los péptidos no unidos de las mezclas de liposoma-péptido por ultracentrifugación. Se analizó así en los pellets la presencia simultánea de lípidos y péptidos por espectroscopia ATR (Attenuated Total Reflection)-FTIR (en colaboración con el laboratorio de JM Ruyschaert) y se cuantificó el contenido de lípido y péptido. Los lípidos dan un pico a 1735 cm<sup>-1</sup> asignados a la señal C=O de las uniones éster de los lípidos y los péptidos alrededor de

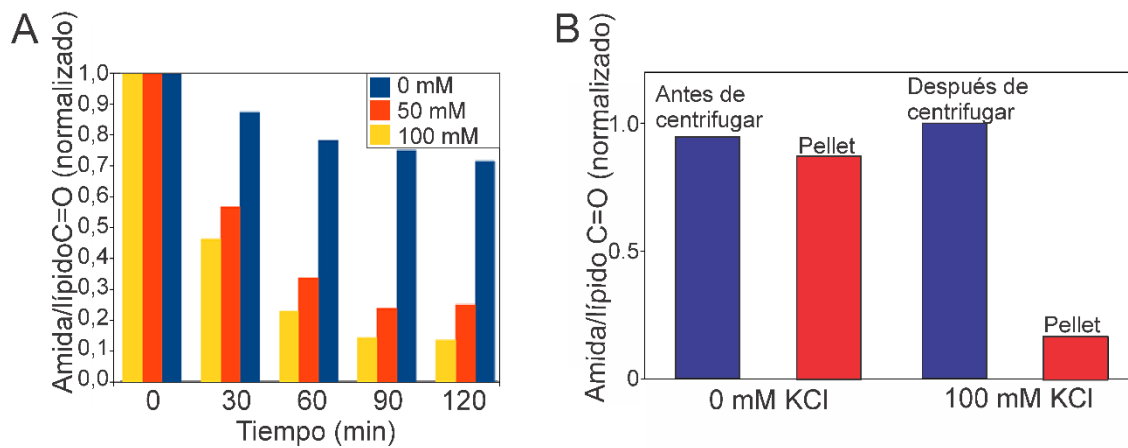
los 1650  $\text{cm}^{-1}$  asignados al enlace C=O amida (*Goormaghtigh y col., 1999*). La intensidad de la banda a 1650  $\text{cm}^{-1}$  obtenida para los 3 péptidos sigue el mismo patrón observado por turbidez (Q3>WT>A3) confirmando la capacidad de las variantes del linker cargadas positivamente de interaccionar con las cabezas polares cargadas negativamente de los lípidos (Figura 5.4D-E). Sin embargo, en los experimentos de ultracentrifugación de los complejos todavía se observa una cantidad del péptido A3 en el pellet apreciable, a diferencia de lo que se ve por light scattering (Fig 5.4B). Quizás con la ultracentrifugación, algo de péptido coprecipita con los liposomas sin que exista una verdadera interacción. Elegimos validar, entonces, este experimento dializando los complejos liposoma-péptido previamente al análisis por ATR-FTIR (Fig. 5.4F), obteniendo resultados similares pero con mayor definición entre el péptido unido del no unido. El contenido de aminoácidos básicos del linker parece esencial para la interacción con los lípidos, ya que aumentando el número de las cargas positivas (péptido mutagénico Q3) aumenta la unión, mientras que disminuyendo el número de estas cargas (péptido mutagénico A3) tiene el efecto opuesto. Para confirmar esta interacción iónica, desarrollamos ensayos de desprendimiento de péptidos por microdiálisis (Fig 5.5A) y ultracentrifugación (Fig 5.5B) de las mezclas péptido-liposoma en presencia de sal, luego analizamos los complejos por ATR-FTIR. Estos experimentos muestran que los péptidos son liberados en presencia de sal confirmando los resultados obtenidos en conjunto (Fig 5.4)

### 4.2.2.3. ¿Cambia la conformación del linker durante la activación de DesK?

Para determinar la estructura secundaria de los péptidos y detectar posibles cambios estructurales en la interacción con los liposomas se realizaron medidas de ATR-FTIR con la ayuda del Dr. Michel Vandenbranden, en el laboratorio de JM Ruyschaert. La Tabla 1 muestra el contenido de estructura secundaria según *Goormaghtigh y col., 2006*. Como puede verse al comparar el porcentaje de las distintas estructuras secundarias, para los tres péptidos se calculan una mezcla de estructuras, mayoritariamente helicoidales y random. Sin embargo, el péptido A3 presenta un mayor porcentaje de estructura helicoidal que los otros dos péptidos y Q3 es mayoritariamente random coiled (Tabla 1).



**Figura 5.4. Variantes del linker interactúan diferencialmente con membranas lipídicas.** **A.** Secuencia de péptidos. **B.** Medidas de turbidez de suspensiones liposomales con la adición secuencial de péptidos (flechas) medidos por right-angle light scattering en ausencia (**B**) o presencia de KCl (**C**). **D.** Espectro ATR-FTIR de complejos péptido-liposoma aislados por centrifugación. La región  $1800\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$  se muestra, con la banda de absorción del grupo C=O de las cadenas acilo de los lípidos ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ) y la banda amida I del péptido ( $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ). **E.** Cuantificación de las áreas sombreadas debajo de los picos en (**D**). **F.** Espectro ATR-FTIR de los complejos péptido-liposoma luego de la microdiálisis a los tiempos indicados.



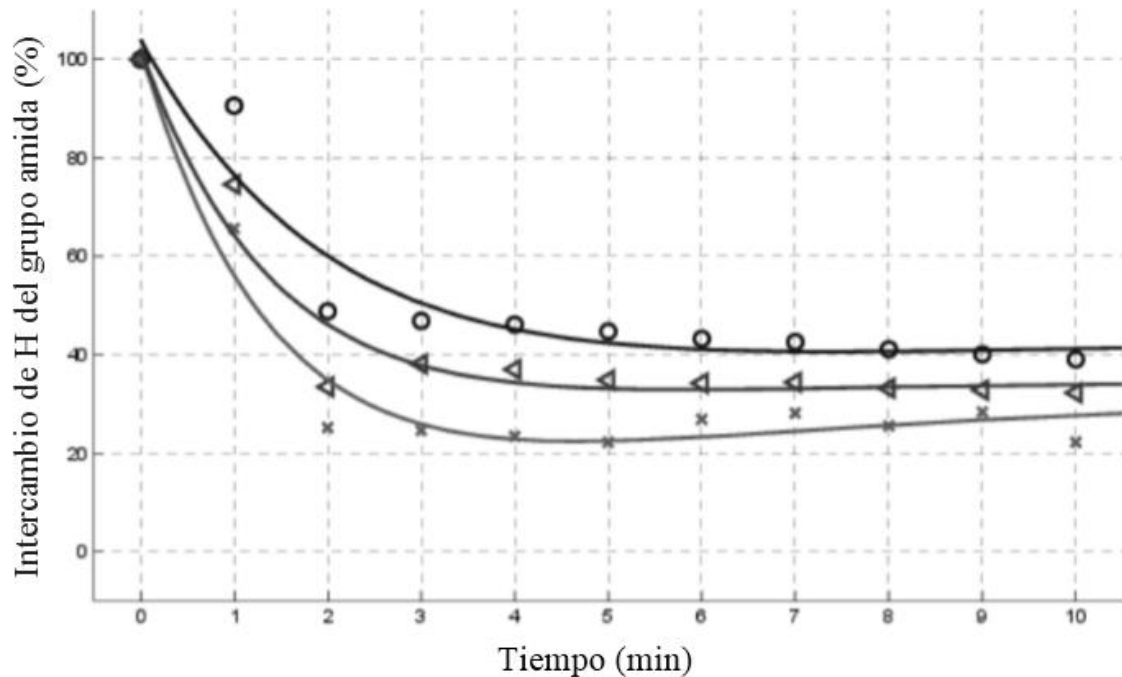
**Fig. 5.5. Efecto de las sales en la unión del péptido WT a los liposomas.** **A.** El péptido no unido es removido de los liposomas por microdiálisis con concentraciones crecientes de sal, recuperando y analizando la muestra por ATR-FTIR. **B.** Cuantificación de péptido unido luego del tratamiento por ultracentrifugación. La cuantificación de las bandas fue realizada como se describe en la Fig. 5.4.

**Tabla 1. Predicción de la estructura secundaria para las variantes del linker de DesK**

Péptido	Alfa	Beta	Turns	3-10 Helix	Random	Aumento en Random
<b>Wild Type</b>	29.1	5.8	14.5	0	32.1	
<b>Wild Type + Liposomas</b>	29.5	1.8	19.3	2	41.8	9.7
<b>A3</b>	41.3	1.5	13.5	0.1	28	
<b>A3+ Liposomas</b>	42.6	1.6	15.8	1.5	32.4	4.3
<b>Q3</b>	17.1	5.8	20.5	2.4	45.2	
<b>Q3+ Liposomas</b>	14.3	2.3	23.1	3	50.7	5.6

Cuando se incuban los péptidos en presencia de liposomas, puede observarse para los tres tipos de péptidos que se incrementa el estado random coil (Tabla 1). En particular, para el péptido WT, el aumento fue más marcado, lo que mostraría que en presencia de ambas cargas, positivas y negativas, los lípidos ejercen un efecto estabilizador que permite al péptido abrirse en una estructura más desordenada. El análisis del Dr Vandenbranden (del laboratorio del Dr. Ruyschaert) de las bandas amida I y II en la región 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$  revela un máximo alrededor de 1656  $\text{cm}^{-1}$  en la banda amida I y a 1545  $\text{cm}^{-1}$  en la región amida II, característica de una estructura alfa hélice. Sin embargo, los enlaces hidrógeno son altamente intercambiables ya que al someterlos a un flujo de vapor  $\text{D}_2\text{O}$  saturado, el pico amida I se movió rápidamente y la banda amida II, sensible al intercambio protón –deuterio del enlace amida, muestra su máximo intercambio luego de 5 minutos. Esta observación sugiere que la flexibilidad de la hélice hace al enlace-H accesible muy rápidamente y puede explicar la

propensión del péptido del linker WT de adoptar una estructura random e interactuar con los lípidos a nivel de la interfase (Fig 5.6).



**Figura 5.6. Evolución del porcentaje de intercambio de hidrógeno del grupo amida peptídico en función del tiempo de deutерación.** Los péptidos fueron incubados con liposomas de lípidos polares de *E. coli* y las mezclas fueron expuestas a un flujo continuo de nitrógeno saturado en  $D_2O$  sobre el elemento ATR. Los espectros fueron registrados cada minuto (32 escaneos promediados). El área de la banda amida II (alrededor de  $1545\text{ cm}^{-1}$ ), el cual es sensible a la deutерación del grupo amida N-H, fue monitoreada a través del tiempo y normalizada sobre el área del grupo éster C=O del lípido (alrededor de  $1735\text{ cm}^{-1}$ ). El péptido Q3 (cruz), WT péptido (triángulo) y A3 (círculo).

#### 4.2.2.4. Las interacciones electrostáticas membrana-linker juegan un rol importante en la activación de DesK

Para estudiar la relevancia de las interacciones electrostáticas linker-membrana en la regulación de las actividades del MS-DesK, éste fue reconstituido en liposomas de lípidos de *E. coli* (ver Materiales and Métodos). La actividad autoquinasa fue medida a  $25^\circ\text{C}$ , temperatura que activa la conformación quinasa, en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP y a diferentes concentraciones de sal. Consistente con la idea de que las interacciones electrostáticas afectan la interacción del linker con la membrana y modifica el estado de señalización del dominio linker, observamos que la autofosforilación de MS-DesKC fue marcadamente dependiente de la concentración de sal, con la mayor activación a  $400\text{mM}$  KCl (Fig. 5.8A). El mismo efecto fue observado cuando NaCl fue adicionado a la mezcla de reacción (Fig. 5.8B).

A  $37^\circ\text{C}$ , temperatura que desplaza el equilibrio a la conformación fosfatasa, la actividad autoquinasa es insignificante en ausencia de sal (calle 1, Fig. 5.8C). Este comportamiento, sin embargo, se revierte al incrementar la concentración de sal resultando en un aumento de la

actividad quinasa con el aumento de la concentración salina (calles 2-4, Fig. 5.8C). Una posible interpretación es que las sales disrumen la interacción del linker con la membrana lipídica favoreciendo el estado quinasa. Por el contrario, si la proteína no interactúa con lípidos (ya sea trabajando con el dominio citoplasmático DesKC o el MS-DesK solubilizado con detergente) la actividad autoquinasa no aumenta con concentraciones crecientes de sal (Fig. 5.8D). Esto apoya la hipótesis de que las interacciones electrostáticas proteína-membrana están involucradas en la transmisión de la señal.

Hasta aquí decimos que la interacción electrostática se da principalmente entre la superficie de la membrana cargada negativamente y los residuos cargados positivamente del linker. Nos preguntamos qué sucedería si reconstituimos MS-DesK en DMPC, que tiene un grupo cabeza zwitteriónico (neutro) polar. Como se esperaba según la hipótesis planteada, en estos lípidos neutros las sales no potencian la actividad quinasa (Fig. 5.8E).

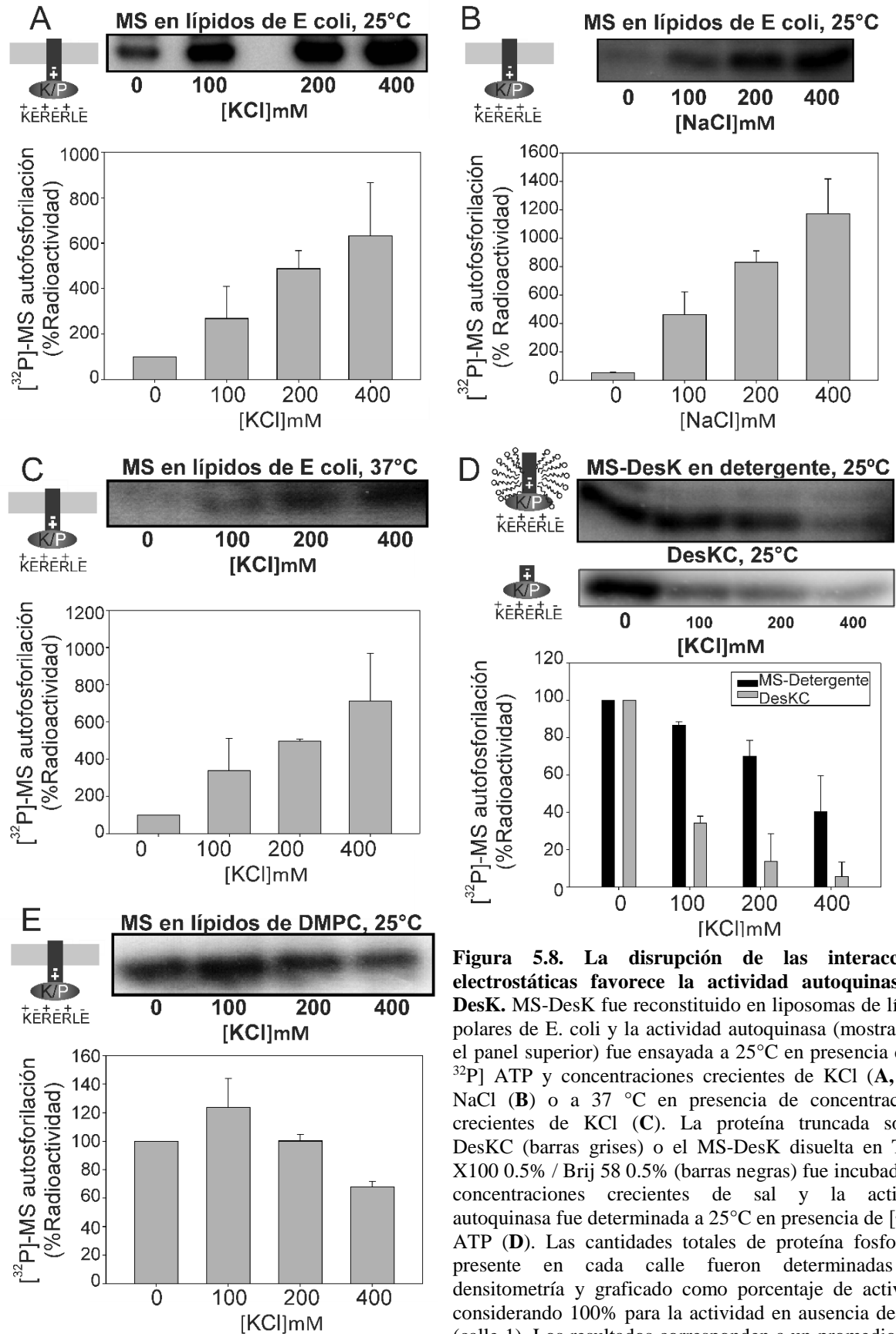
### **4.2.2.5. La interacción linker-membrana disminuye la actividad quinasa**

Para evaluar nuestra hipótesis de que el estado quinasa de DesK es favorecido cuando el linker está separado de la membrana, liposomas preparados con lípidos de *E. coli* fueron incubados con el dominio citoplasmático truncado de DesK (DesKC). DesKC incluye la región linker y, como ya explicamos antes (sección 1.13), *in vivo* muestra actividad quinasa constitutiva ya que carece del dominio TM sensor (*Albanesi y col., 2004*). La fig. 5.9A muestra que la actividad autoquinasa constitutiva de DesKC disminuye cuando es incubada con cantidades crecientes de liposomas aniónicos. Esto sugiere que en presencia de la bicapa lipídica una fracción de DesKC interactúa por medio del linker con la superficie cargada negativamente de la membrana disminuyendo la actividad quinasa. Asimismo, la actividad de DesKC truncada no está afectada por el aumento del ratio DMPC: proteína validando la interacción con los lípidos aniónicos (Fig. 5.9B).

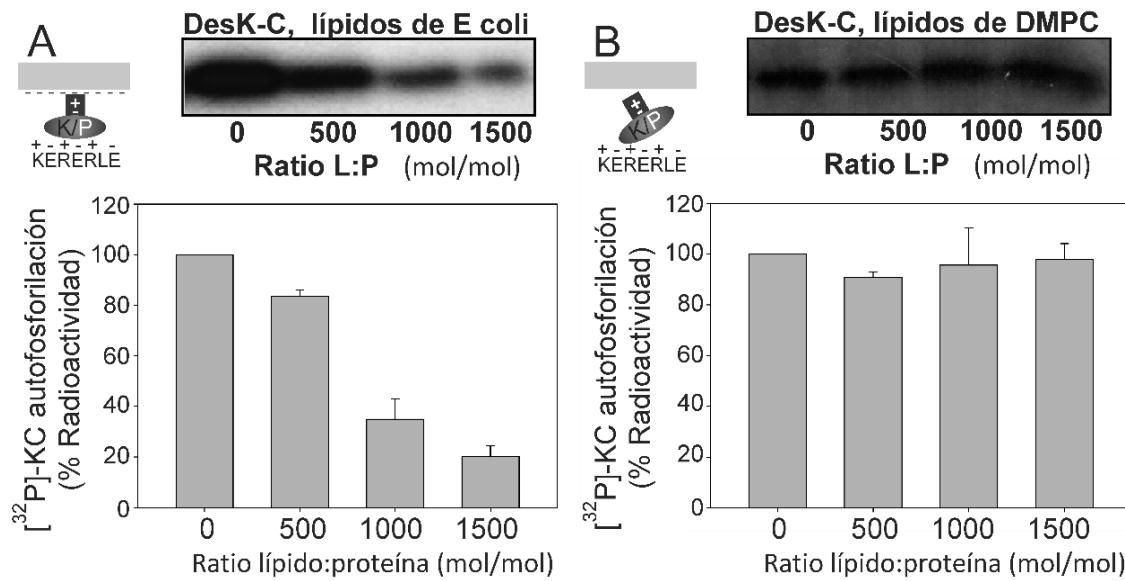
### **4.2.2.6. ¿Puede la conformación del linker re-dirigir la transmisión de la señal?**

Como se detalló en el capítulo I, la región crítica involucrada en el sensado del cambio en el espesor de membrana es el motivo “boya hundida” (SB por “Sunken buoy”) localizada en el N-terminal del segmento transmembrana de MS-DesK. Mutaciones que aumentan la hidrofiliidad de este motivo aumentan la actividad quinasa; mientras que mutaciones que disminuyen la hidrofiliidad del SB anulan esta actividad (*Cybulski y col. 2010*). Sin embargo, a este nivel nos preguntamos cuál de los dos, el motivo SB o el linker es quien dicta el estado final de señalización de DesK.

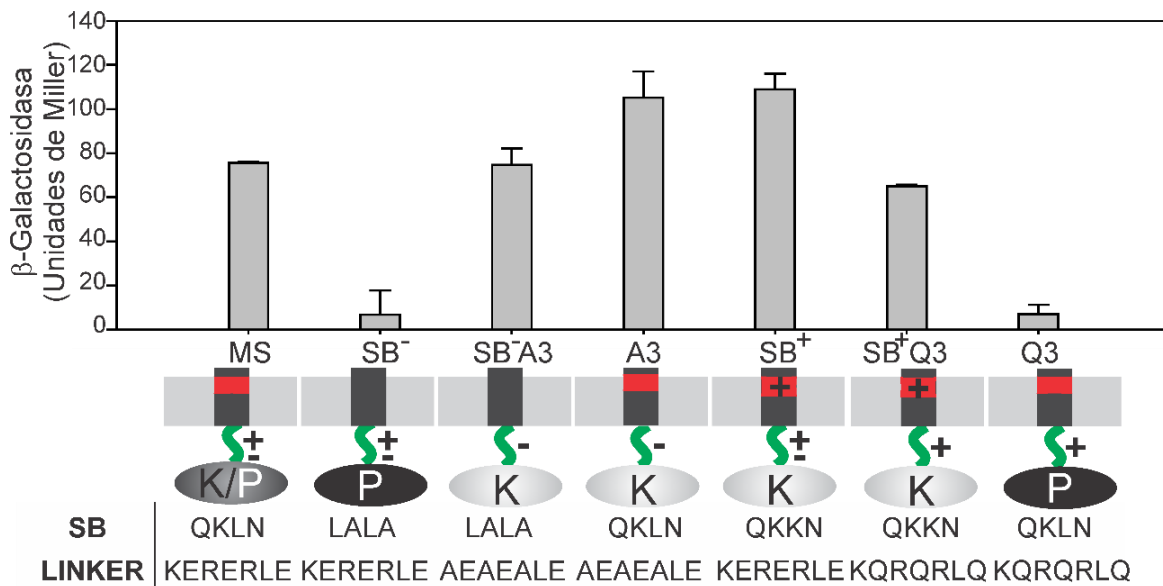
Para analizar si el linker está involucrado en la transmisión de la señal desde la membrana al citoplasma y para determinar si la conformación del linker contribuye a definir los estados de señalización de DesK, combinamos mutaciones puntuales en la región transmembrana que ha demostrado que fija a DesK en el estado quinasa o fosfatasa respectivamente, con mutaciones en el linker. La mutante inactiva en el sensado  $SB^-$  (Q9L,K10A,N12A) que muestra un estado fosfatasa constitutivo independientemente de la temperatura debido a la eliminación del motivo SB en la región transmembrana del sensor (Cybulski y col. 2010), fue combinado con la mutante en el linker A3 (quinasa constitutiva) generando  $SB^-/A3$  MS-DesK. Por otra parte, la mutante hiperactiva  $SB^+$  (L11K), que muestra actividad quinasa constitutiva debido a la presencia de una carga extra en la región de la boya (Cybulski y col.,2010), fue combinada con la mutante en el linker Q3 (fosfatasa constitutiva) generando la doble mutante  $SB^+/Q3$ . Como el linker estaría localizado corriente abajo en el mecanismo de señalización desde la membrana al dominio citoplasmático catalítico, esperamos que el fenotipo determinado por la mutación en el linker lidere en la definición del fenotipo global, de manera que la mutante  $SB^-/A3$  tuviera una actividad predominantemente quinasa y  $SB^+/Q3$  una actividad predominantemente fosfatasa, independientemente del estado de señalización dictado por la región transmembrana. Estas variantes de DesK fueron expresadas en una cepa  $desK^-$  y se cuantificaron sus actividades (Fig. 5.10). Encontramos que mutaciones en el linker que favorecen la conformación quinasa pueden rescatar las mutantes en el transmembrana fijadas en la conformación fosfatasa ( $SB^-$ ). De manera similar, el comportamiento de la doble mutante  $SB^+/Q3$  sugiere que las mutaciones en el linker que favorecen la conformación fosfatasa (Q3) pueden volver la actividad quinasa de mutantes en el transmembrana fijados en la conformación quinasa ( $SB^+$ ) a niveles de la proteína salvaje (Fig. 5.10). Todos estos resultados indican que el linker es crítico para transducir la señal y que los residuos cargados juegan un rol crucial en re direccionar la señal sensada por el dominio transmembrana hacia el dominio citoplasmático catalítico.



**Figura 5.8. La disrupción de las interacciones electrostáticas favorece la actividad autoquinasa de DesK.** MS-DesK fue reconstituido en liposomas de lípidos polares de E. coli y la actividad autoquinasa (mostrado en el panel superior) fue ensayada a 25°C en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP y concentraciones crecientes de KCl (**A**, **E**) o NaCl (**B**) o a 37 °C en presencia de concentraciones crecientes de KCl (**C**). La proteína truncada soluble DesKC (barras grises) o el MS-DesK disuelta en Tritón X100 0.5% / Brij 58 0.5% (barras negras) fue incubada con concentraciones crecientes de sal y la actividad autoquinasa fue determinada a 25°C en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP (**D**). Las cantidades totales de proteína fosforilada presente en cada calle fueron determinadas por densitometría y graficado como porcentaje de actividad, considerando 100% para la actividad en ausencia de sales (calle 1). Los resultados corresponden a un promedio de al menos tres experimentos independientes.



**Figura 5.9. Interacción de DesKC con liposomas.** La proteína truncada soluble DesKC fue incubada con cantidades crecientes de liposomas hechos de lípidos de *E.coli* (A) o DMPC (B). La actividad autoquinasa fue ensayada y cuantificada como en la Fig.5.8.



**Figura 5.10. La interacción linker- membrana dicta el estado de señalización de DesK.** Células B. subtilis desK<sup>-</sup> fueron complementadas con MS-DesK wild type, variantes de MS con mutaciones puntuales a nivel del SB (SB<sup>-</sup>, SB<sup>+</sup>) o en la región linker (A3, Q3) o variantes del MS-DesK con combinación de mutaciones tanto en el transmembrana como en la región linker (SB<sup>-</sup> A3/ SB<sup>+</sup> Q3). Se determinaron las actividades específicas β-Galactosidasa cada hora como se describe en la figura 5.2. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes obtenidos 2 horas después del choque por frío.

### 4.2.3. DISCUSIÓN

---

#### 4.2.3.1. Redirigiendo la información transmembrana

Identificamos un grupo de doce residuos cargados (K32-K43, ver Fig. 5.1) que conecta el dominio transmembrana con el dominio catalítico citoplasmático de MS-DesK. Proponemos que este motivo, altamente conservado en la mayoría de las especies del género, es crítico para la transducción de la señal. Caracterizamos dos mutantes del linker A3 y Q3, las cuales le confieren respectivamente, alta y baja actividad quinasa a DesK. El análisis estructural por infrarrojo sugiere que el linker A3 tiene una mayor tendencia a formar hélices alfa comparado con el linker wild type o la variante Q3. En contraste, el linker Q3 tiene mayor tendencia de adoptar estructura random coil, y su mayor flexibilidad conformacional le permite interactuar por medio de sus cadenas laterales cargadas con las cabezas polares de los lípidos de la membrana. Los ensayos de ATR-FTIR de las mezclas péptido-liposomas demuestran claramente que el péptido Q3 se une más fuertemente a los liposomas que el péptido A3. Esta interacción con los lípidos es también confirmada por light scattering. El análisis de las dobles mutantes sugiere que el linker está corriente abajo de la percepción del estímulo en la transducción de la percepción de la señal en DesK, ya que mutaciones en el linker son dominantes sobre mutaciones constitutivas en la región TM. La transmisión de la señal puede entonces re dirigirse para uno u otro estado (quinasa/fosfatasa) por modulación de la interacción del linker con la membrana.

#### 4.2.3.2. La naturaleza dual de la interacción linker-membrana

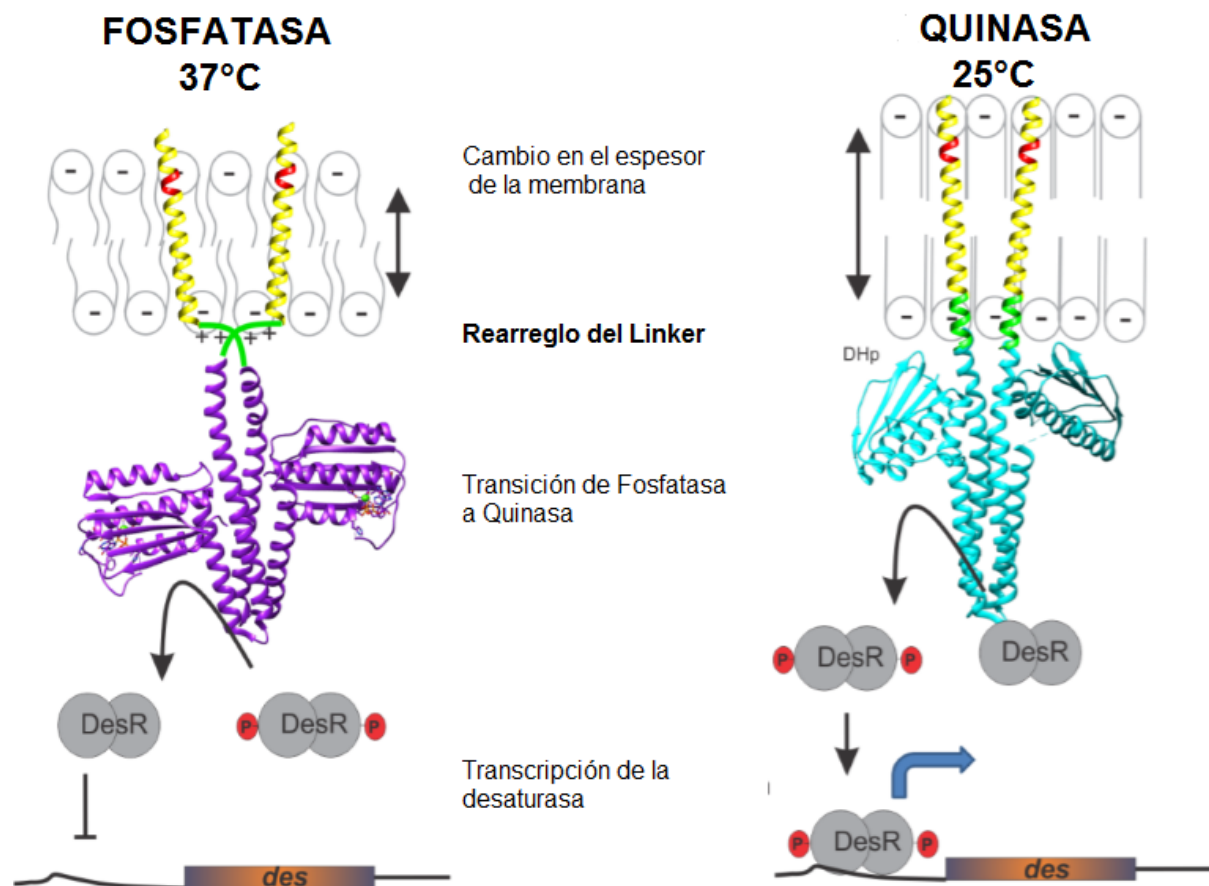
Proponemos que el linker de DesK tiene la habilidad de adoptar una conformación dual: hélice y random coil. La conformación random coil es estabilizada por interacciones electrostáticas con la interfase lipídica de la membrana, mientras que la hélice es estabilizada por formación de puentes salinos. Esta dualidad de conformación se convierte en la esencia del switch de transmisión molecular que será al mismo tiempo sensible a cambios conformacionales sutiles percibidos por el motivo sensor SB y le permitirá ser capaz de transmitir la señal.

#### 4.2.3.3. Un modelo de trabajo para el termosensor DesK.

Proponemos que a altas temperaturas (membranas delgadas) el motivo N-terminal SB está localizado en la interfase agua-membrana. La región hidrofóbica del TM es suficientemente larga como para permitir al linker adoptar un estado hidrofílico desestructurado (Fig. 5.11,

panel izquierdo), de manera de optimizar la interacción con los lípidos cargados de la membrana por el lado citoplasmático.

La interacción del linker con la interfase de la bicapa lipídica causa la interrupción de la hélice, favoreciendo la conformación fosfatasa. Esta observación experimental es compatible con los datos cristalográficos reportados para el dominio citoplasmático de la conformación competente como fosfatasa (H188V), en la que la región linker no pudo resolverse, posiblemente como consecuencia de su gran flexibilidad conformacional (Albanesi y col., 2009).



**Figura 5.11. Modelo para la activación DesK con los cambios en la temperatura.** El aumento del espesor de la membrana previene la interacción de la región linker con la bicapa lipídica y contribuye a estabilizar y favorecer la continuidad de la hélice entre el segmento transmembrana y el dominio intracelular. La interacción reversible del linker con la superficie de la bicapa lipídica permitiría a DesK alternar entre los estados quinasa y fosfatasa.

Como consecuencia, una hélice continua desde la membrana al citoplasma favorecería la conformación quinasa. Esto es compatible con estudios estructurales que muestran que en la conformación quinasa la estructura helicoidal de la proteína DHp se extiende más allá hacia el lado proximal de la membrana (Albanesi y col., 2009). Es tentador especular que cambios en la rotación de los segmentos transmembrana resultantes de cambios en el espesor de la membrana podrían cumplir un rol en el proceso de señalización (Matthews y col., 2006),

estabilizando el linker en una u otra conformación (unida o no unida a la membrana) para finalmente determinar el estado de señalización de DesK. Esta reorganización estructural del linker podría constituir la base de la transmisión de la amplificación de una señal sensada por el dominio TM y transmitido al dominio catalítico, y podría resultar en la modulación de la torsión interhelicoidal del DHP requerido para regular la actividad de DesK (sección 1.12).

A bajas temperaturas el espesor de la membrana aumenta y la región hidrofóbica del TM no es lo suficientemente larga como emparejarse con el corazón hidrofóbico de la membrana. De esta manera, tiende a enterrar el motivo SB y la parte N-terminal del motivo linker KSRKERERLEEK. Esto impone un estrés a lo largo de toda la región transmembrana, que forzaría al linker a alinearse con la parte transmembrana y adoptar una estructura más helicoidal protegiendo el esqueleto del linker que, de otra manera, quedaría expuesto del corazón hidrofóbico de la membrana (Fig. 5.11, panel derecho). El entierro del grupo de cargas desapareadas en el ambiente apolar de la membrana es desfavorable termodinámicamente, de manera que para entrar en la membrana, los residuos cargados deberían aumentar sus interacciones coulombicas mutuas haciendo pares de cargas opuestas y desencadenando la formación de una hélice continua desde la región transmembrana a la parte citoplasmática. Para cumplir con esto, la hélice está estabilizada por una distribución peculiar de residuos positivos y negativos que contribuyen a la formación de puentes salinos en el registro helicoidal:  $n$  con  $n+3$  o  $n$  con  $n+4$  ( $n$ = número de residuos a lo largo de la cadena peptídica). Estos puentes salinos se vuelven estables y potenciados en la fase lipídica debido a la gran disminución de apantallamiento de cargas en el medio de baja constante dieléctrica (Fernández y col., 2008). La distribución alternada de residuos cargados positiva y negativamente permiten el agrupamiento eficiente de las cargas en una estructura helicoidal que puede favorecer la entrada de esta región en la membrana, de manera que una distribución más helicoidal es la manera de optimizar dicha interacción (Fig. 5.12). El linker puede removerse así de la interfase de la membrana adoptando entonces una estructura helicoidal.



**Fig. 5.12.** Registro ( $n$  con  $n+4$ ) helicoidal que permite la estabilización de cargas dentro de la membrana. Por la distribución de los residuos positivos y negativos, se estabilizan las cargas de manera de poder apantallar las cargas en un ambiente de baja constante dieléctrica.

Es interesante remarcar que un grupo de residuos positivos y negativos localizados en la interfase agua-lípido está también presente en el canal de potasio (TREK-1), en el sensor de potasio KdpD, en las proteínas receptoras de potencial transiente (TRPs), en el transportador

OpuA y en el canal mecano sensor MscL, ente otras (ver Tabla III). Para algunos de ellos se ha sugerido que los residuos cargados podrían interactuar con la superficie cargada negativamente de la membrana modulando la actividad (Kdp, OpuA y TREK-1). Proponemos que el agrupamiento de residuos altamente cargados que forman parte de proteínas de señalización y canales (Tabla III) son capaces de adoptar conformaciones alternativas (no unida o unida a membrana) en respuesta a cambios en las propiedades mecánicas de las membranas lipídicas, permitiendo a esta región comportarse como un switch molecular para la activación de la proteína corriente abajo.

**Tabla III. Grupos de residuos cargados se localizan en la continuación del TM con el dominio citosólico en proteínas de señalización, canales y transportadores.**

Organización Proteica	Organismo	Referencia
DesK N- <b>TM 5</b> - <sup>+</sup> R <sup>+</sup> K <sup>+</sup> E <sup>+</sup> R <sup>+</sup> E <sup>-</sup> R <sup>-</sup> L <sup>-</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> K <sup>+</sup> -- C	Bacillus	<i>Inda y col., 2014</i>
KdpD N- <b>TM 4</b> -E <sup>-</sup> Y <sup>-</sup> L <sup>-</sup> H <sup>-</sup> R <sup>-</sup> K <sup>-</sup> S <sup>-</sup> M <sup>-</sup> E <sup>-</sup> -- C	E. coli	<i>Zimmann y col., 2007</i>
OpuA N- <b>TM 7</b> -E <sup>-</sup> K <sup>-</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> N <sup>-</sup> K <sup>-</sup> -- C	L. lactis	<i>van der Heide y col., 2001</i> <i>Biemans-Oldehinkel y col., 2006</i>
TREK-1 N- <b>TM 4</b> - <sup>+</sup> K <sup>+</sup> <sup>+</sup> T <sup>+</sup> K <sup>+</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> --- C	Mamífero	<i>Chemin y col., 2005</i>
TREK-2 N- <b>TM 4</b> - <sup>+</sup> K <sup>+</sup> <sup>+</sup> T <sup>+</sup> K <sup>+</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> --- C	Mamífero	<i>Lesage y col., 2000</i>
MscL N- <b>TM 2</b> - <sup>+</sup> R <sup>+</sup> <sup>+</sup> K <sup>+</sup> <sup>+</sup> E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> --- C	E. coli	<i>Kloda y col., 2006</i>
OMS-9 N- <b>TM 6</b> -E <sup>-</sup> E <sup>-</sup> R <sup>-</sup> <sup>+</sup> S <sup>+</sup> E <sup>-</sup> S <sup>-</sup> K <sup>+</sup> --- C	C. elegans	<i>Colbert y col., 1997</i>
TRPA1 N- <b>TM</b> -D <sup>-</sup> R <sup>-</sup> F <sup>-</sup> K <sup>+</sup> <sup>+</sup> K <sup>+</sup> E <sup>-</sup> --- C	Mamífero	<i>Jaquemar y col., 1999</i>
TRPV4 N- <b>TM</b> - <sup>+</sup> R <sup>+</sup> L <sup>+</sup> R <sup>+</sup> R <sup>+</sup> D <sup>-</sup> R <sup>-</sup> --- C	Mamífero	<i>Liedtke y col., 2000</i>

N: dominio N-terminal, TM: dominio transmembrana, C: dominio citosólico.

---

### 4.3. CAPITULO III. Una lucha entre puentes hidrógeno e interacciones electrostáticas definen el estado de señalización de DesK.

---

#### 4.3.1. Introducción al Capítulo III

---

Con el objetivo de plantear un modelo general del mecanismo de termosensado del MS-DesK, en este capítulo estudiaremos más en detalle la naturaleza de dos tipos de interacciones que luchan entre sí por definir la activación del sensor: el competidor electrostático vs. el competidor puente H.

##### 4.3.1.1. El competidor electrostático

En el capítulo anterior hemos demostrado que la región linker interactúa electrostáticamente con la membrana y que esta interacción favorece el estado de fosfatasa, mientras que, si la interacción electrostática se interrumpe mediante la adición de sales, se favorece el estado quinasa. En ese estudio, el MS-DesK se reconstituyó en liposomas hechos de extracto polar de *E. coli* y los proteliposomas obtenidos fueron utilizados para ensayos *in vitro* (Inda y col., 2014). Estos lípidos han sido ampliamente utilizados para estudios *in vitro* de proteoliposomas de DesK y MS-DesK utilizando la reconstitución acoplada a la traducción *in vitro* (Albanesi y col., 2009, Martin y col., 2009, Cybuski y col., 2010). Si bien estos estudios han aportado información importante respecto al mecanismo de regulación de ambas proteínas, ahora que sabemos de existencia de una interacción directa proteína-lípido, la naturaleza del lípido utilizado se vuelve relevante. En el primer capítulo vimos la importancia de que el MS estuviera inserto en una membrana para que pudiera termoregularse (fig 4.8) y en el segundo capítulo identificamos la región del MS responsable de la interacción con la membrana, surge entonces la pregunta, ¿cómo es el comportamiento del MS en los lípidos naturales de *B. subtilis*? En este capítulo abordaremos este punto.

##### 4.3.1.2. El competidor Puente H

En el capítulo I, demostramos que los residuos de serina en las posiciones S23, S30 y S33 del C-terminal de los segmentos TM son críticos para la conformación quinasa. La hipótesis que planteamos consiste en que a bajas temperaturas, cuando la membrana está menos hidratada,

los grupos hidroxilo de las serinas forman enlaces de hidrógeno con la otra serina contraparte, considerando que DesK es un homodímero, de manera de estabilizar la interfaz del dímero. A mayores temperaturas, la membrana es más delgada y más hidratada; y los enlaces H serina-serina situadas en la interfase lípido-agua pueden ser desestabilizados ya que el agua o grupos fosfato de los alrededores pueden entrar en competencia; en consecuencia, generando la disrupción de la interfaz de dímero. Con el objeto de entender el mecanismo global de sensado y la alternancia entre las distintas actividades de la proteína, quisimos estudiar más en detalle la naturaleza química de esta dimerización.

En este capítulo nos abocamos a analizar en detalle la interacción por puente H que permite la dimerización y para ello nos valemos de estudios genéticos en *B subtilis*.

### 4.3.2. Resultados

---

#### 4.3.2.1. El competidor electrostático

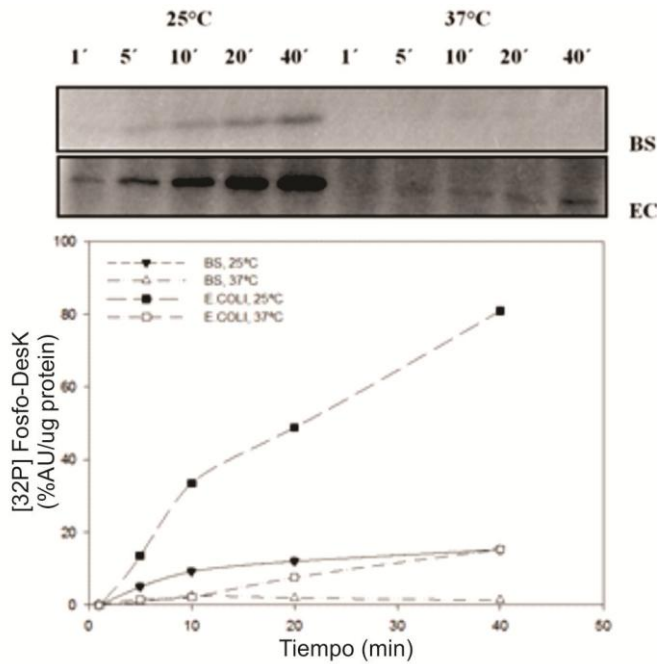
Para analizar el comportamiento de DesK en su entorno natural, se reconstituyó el MS-DesK en lípidos de *Bacillus subtilis* preparados según el método de Bligh y Dyer (ver M & M). La actividad autoquinasa fue medida a 37 °C y 25 °C. Sorprendentemente, la actividad del MS-DesK reconstituido en lípidos de *B. subtilis* es cuatro veces menor que en los lípidos heterólogos de *E. coli* (Fig. 6.1A), comparando sus velocidades iniciales de las pendientes de las curvas (4%UA/min para lípidos de *E. coli* frente a 1 %UA/min para lípidos de *B subtilis*). El análisis comparativo de los lípidos presentes en cada célula muestra que los lípidos extraídos de *B. subtilis* tienen mayor contenido de PG que los lípidos de *E. coli* (45% frente a 20%) (*Dowhan 1997 Op Den Kamp et al., 1969*). Considerando que interacciones electrostáticas entre la superficie de la membrana cargada negativamente y la región linker fueron propuestas para modular la actividad (*Inda y col., 2014*), surgía la pregunta ¿es esta interacción lípido específico? Para entender este comportamiento diferencial en la actividad de DesK en diferentes lípidos, analizamos el efecto de lípidos cargados negativamente sobre la actividad *in vitro* del MS-DesK. MS-DesK se reconstituyó en liposomas con una proporción creciente de los siguientes lípidos cargados negativamente: 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DOPG) y cardiolipina (ver Materiales y Métodos, Fig 6.1B y C). La actividad quinasa fue medida a 25 °C, temperatura que activa la conformación quinasa en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Como se ve, el aumento de contenido de PG disminuye considerablemente la actividad autoquinasa, sugiriendo que es este lípido cargado negativamente el que favorece las interacciones electrostáticas con la proteína, dificultando

así la capacidad de DesK para autofosforilarse (Fig. 6.1B). Tiene sentido que en los lípidos naturales de *Bacillus subtilis* el sistema tienda a estar repimiendo la expresión génica, siendo necesario para ello estabilizar el estado fosfatasa. De esta manera, en el entorno natural de DesK, la bacteria se asegura de que la señal debe ser lo suficientemente fuerte como para activar el sistema.

La cardiolipina, en cambio, no tiene un efecto inhibitor tan marcado (Fig. 6. 1C) a pesar de conservar la carga neta negativa, sugiriendo que otras propiedades de este lípido puedan estar también afectando la regulación del termosensor. Pensamos que si bien la cardiolipina conserva la carga negativa, la mayor rigidez que aporta este lípido a la membrana podría compensar los efectos inhibitorios, favoreciendo la actividad quinasa. Sin embargo, siendo ambos causas en sentidos opuestos es difícil identificar lo que la proteína está sensando.

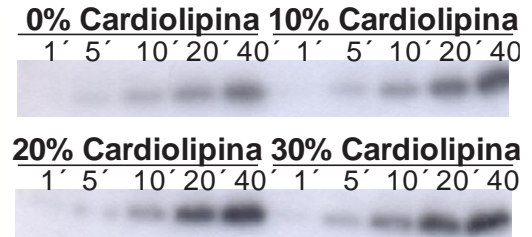
Para analizar si la interacción de la proteína con PG está mediada por el linker, se diseñó un péptido correspondiente a la región linker, incluyendo un fluoróforo (W): KSRKERERWEEK. Cuando se introdujo esta mutación (L160W) en la proteína, esta no afectó la regulación por temperatura del MS-DesK, (Fig. 6.2A). El péptido se incubó en presencia de liposomas marcados con dansilo, compuesto usado como quencher de la fluorescencia. Si el péptido interacciona con la bicapa lipídica, se observa FRET entre el péptido marcado con W y el dansilo de los liposomas (fig. 6.2B). Una transferencia de energía importante se observa cuando el porcentaje de la PG cargado negativamente se incrementa (0, 10, 30 y 50% DOPG), mostrando una disminución en la intensidad del pico de emisión de péptido (centrado en 350 nm por el W) y un aumento concomitante en la intensidad de emisión del pico del dansilo (centrado en 518 nm) (fig. 6.2C). La adición de concentraciones crecientes de sal a las mezclas de péptido-lípido disminuye el FRET, mostrando que la interacción electrostática entre el péptido y la membrana se disrumpe en presencia de sales (fig. 6.2D).

A.

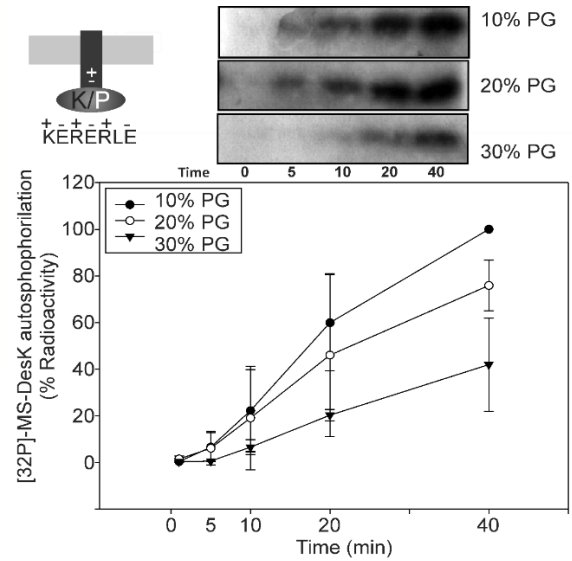


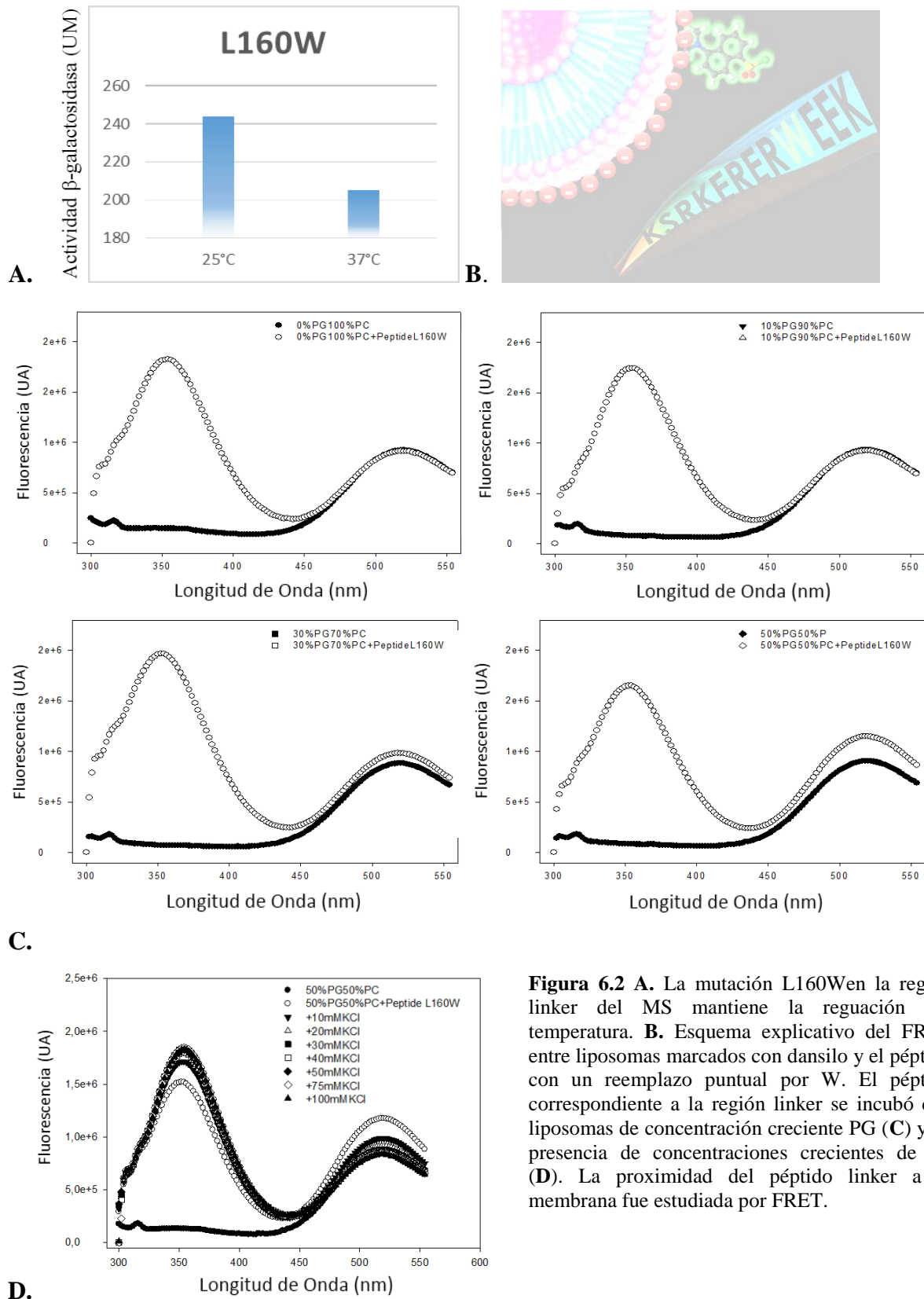
**Figura 6.1A. Actividad quinasa de MS-DesK reconstituída en distintos entornos lipídicos.** A. MS-DesK se reconstituyó en: BS, lípidos naturales purificados de membranas de *B. subtilis* y EC, lípidos polares de *E. coli*; la actividad de la quinasa se midió a 25 ° C y a 37°C en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP. Las cantidades totales de proteína fosforilada presentes en cada pocillo fueron determinadas por densitometría y se representan como porcentajes de la actividad. Los resultados corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes. B. Las cargas negativas favorecen el equilibrio hacia la actividad de la fosfatasa de DesK. El MS-DesK se reconstituyó en liposomas con concentraciones crecientes de DOPG o cardiolipina (10%, 20%, 30% mol/mol). La actividad autoquinasa se ensayó a los tiempos indicados y se cuantificó como en la Figura 1A.

B.



C.

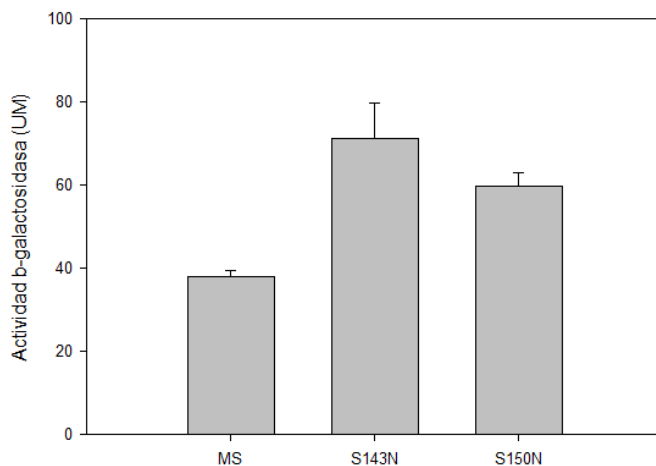




**Figura 6.2 A.** La mutación L160W en la región linker del MS mantiene la regulación por temperatura. **B.** Esquema explicativo del FRET entre liposomas marcados con dansilo y el péptido con un reemplazo puntual por W. El péptido correspondiente a la región linker se incubó con liposomas de concentración creciente PG (**C**) y en presencia de concentraciones crecientes de sal (**D**). La proximidad del péptido linker a la membrana fue estudiada por FRET.

#### 4.3.2.2. El competidor Puente H. Validando la interacción por puente H

¿Qué propiedad química de las serinas se requiere para activar la actividad quinasa? En el capítulo I hipotetizamos que era su capacidad formadora de enlace de H, pero quisimos buscar más evidencias de esto. La sustitución de las serinas S143, S150 a alanina, residuo con ninguna capacidad de enlace de H resultó en la pérdida de actividad de la quinasa. ¿Qué sucedería si revirtiéramos el efecto sustituyendo por residuos con una fuerte capacidad de enlace de H? Al sustituir por asparagina que tiene mayor capacidad de formar puente H dentro de la membrana (Tieleman y col., 2004) por tener la capacidad de ser dador y aceptor de puente H, encontramos que la proteína desplaza su equilibrio hacia una mayor conformación quinasa (Fig 6.3). Este resultado fortalece la idea que la fuerza motriz para la interacción entre monómeros es la formación de enlaces de H intermoleculares, que se estabilizan en una membrana deshidratada, a bajas temperaturas.



**Fig. 6.3. El Cierre de Serina del MS-DesK puede fortalecerse por reemplazos con Asparagina, de mayor capacidad formadora de puentes H.** Células que expresan las variantes del linker de MS-DesK fueron crecidas a 37°C y transferidas a 25°C a una OD<sub>525</sub>=0.3. La actividad β-galactosidasa fue ensayada cada hora en triplicados independientes. Los resultados mostrados son expresados como promedio de tres experimentos y corresponden a las 2 horas luego del choque por frío.

#### 4.3.2.3. Puente hidrógeno vs interacciones electrostáticas: ¿quien gana la lucha en definir el estado de señalización del MS?

El estado quinasa del MS-DesK se estabiliza tanto por la disminución de la interacción electrostática entre el linker y la membrana como por estabilización del Cierre de Serina en la región transmembrana. ¿Cómo pueden estos dos tipos de interacciones, una electrostática y la otra por puentes hidrógenos, combinarse en la interfase membrana-agua para definir el estado de señalización de DesK? Para abordar este asunto, la mutante en el linker A3, con carga negativa, congelada en estado quinasa debido a la formación de una hélice en la región linker y separada de la membrana debido a la repulsión electrostática fue combinada con las mutaciones en el Cierre de Serina que congelaban a DesK en la conformación fosfatasa (S143A, S150A) (Fig. 6.4A). Las dobles mutantes A3-S143A y A3-S150A fueron expresadas en una cepa *desk-* y se midió su actividad quinasa. Para nuestra sorpresa, aun cuando el linker

está localizado corriente abajo en el mecanismo de señalización desde la membrana al centro catalítico citoplasmático, encontramos que mutaciones en el Cierre de Serina tiene un efecto predominante bloqueando la actividad quinasa por sobre la señal del linker (Fig. 6.4B). Asimismo, la mutante que refuerza el Cierre de Serina, L27S, fue combinado con la mutante quinasa- , Q3, con carga positiva (Fig. 6.4A), observándose una total indiferencia al fenotipo causado por la mutación que fortalece la interacción con la membrana por su carga neta positiva, mostrando alta actividad quinasa, en concordancia con el resultado anterior (Fig. 6.4B).

En conjunto, estos resultados sugieren que aun cuando el linker está localizado corriente abajo en el mecanismo de la señalización de la membrana al corazón catalítico, la formación de la interfase de dimerización mediada por el cierre de serinas es una master switch para definir el estado de señalización de DesK. La imposibilidad de formar puentes hidrógeno entre los transmembranas restringe el rearrreglo conformacional global requerido para alcanzar el estado quinasa.

Entonces, la estabilización de esta interfaz de dimerización conduce a una conformación quinasa constitutivamente activa, con relativamente baja contribución de la conformación del linker.

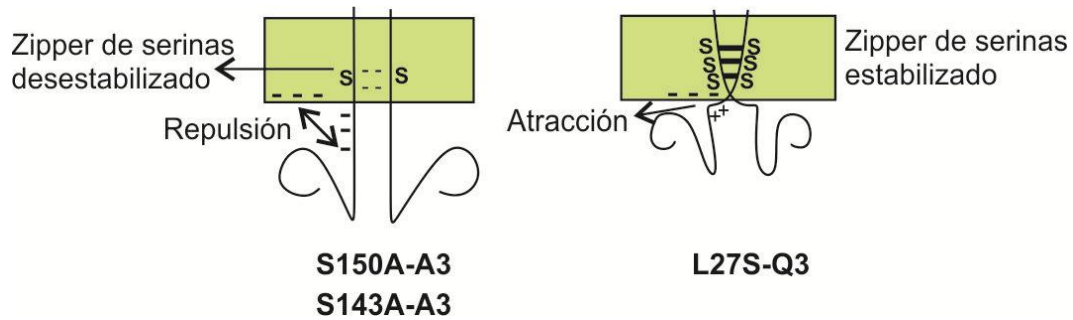
### 4.3.3. Discusión

---

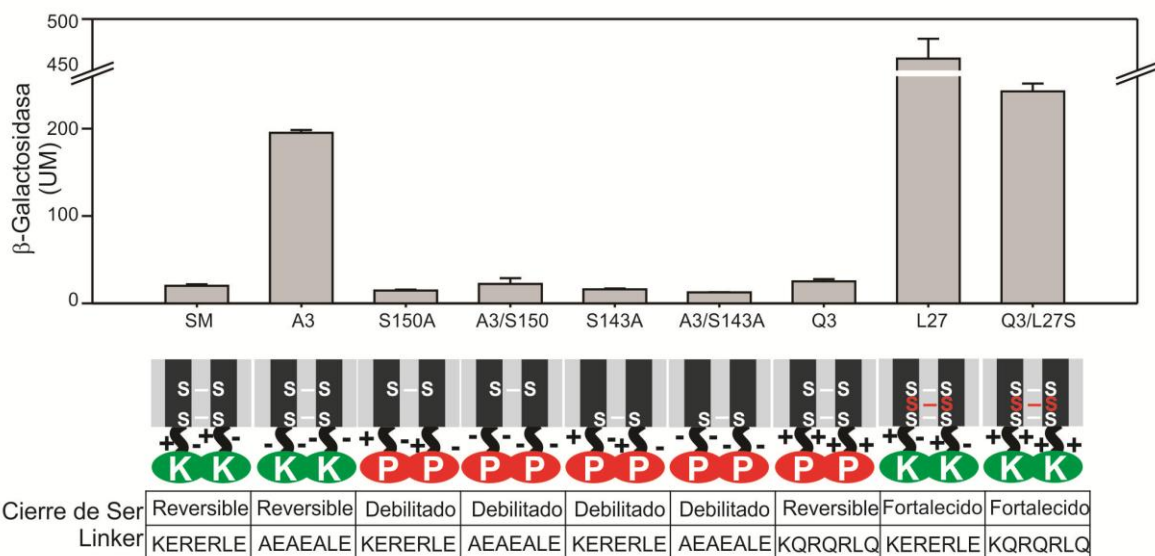
#### 4.3.3.1. Propuesta de Modelo de termosensado

En esta tesis hemos mostrado de a partes resultados que sugieren un modelo de activación del MS-DesK, en el que una interfaz de dimerización sometida a regulación es posible, y donde el grado de exposición del motivo hidrófilo a la fase acuosa determina la interfaz de dimerización y por lo tanto la actividad del sensor (cap I). DesK-SM se comportaría como un calibre molecular que mediría el cambio en el espesor de la membrana en función de la temperatura, funcionando la K10 (cap I) y el motivo KSRK C-terminal del TM (cap II) como límites superior e inferior del calibre, respectivamente. Además, a nivel del linker también se ha demostrado que está dotado de una dualidad conformacional hélice/random coil aleatoria (cap II). Por lo tanto, la interrupción de la estructura helicoidal entre el segmento transmembrana y el dominio intracelular está mecánicamente explotado para transmitir cambios conformacionales de la región transmembrana a la región intracelular dependientes de la temperatura (*Inda y col., 2014*).

A.



B.

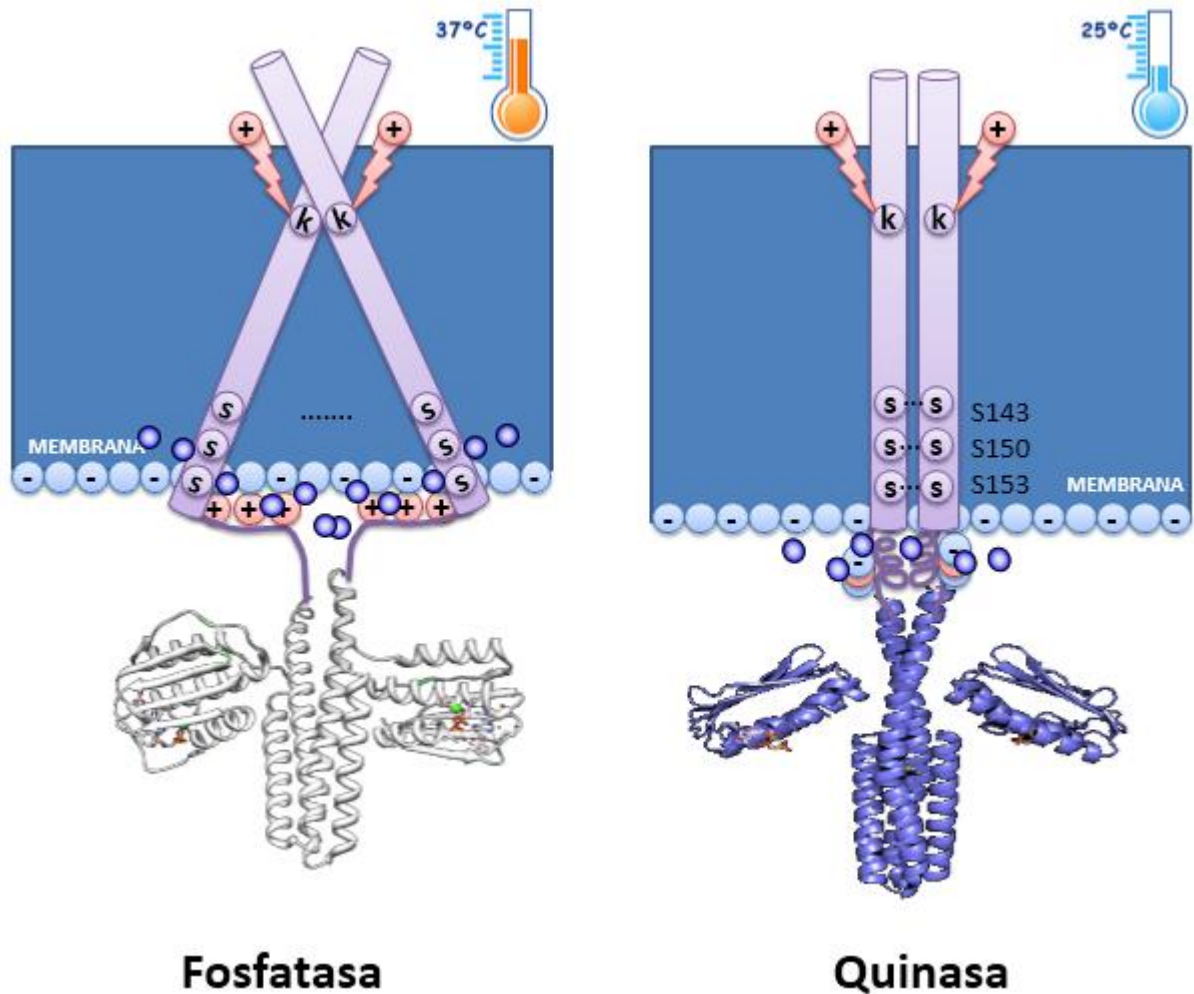


**Figure 6.4. El Cierre de Serina dicta el estado de señalización de DesK.** A. Diagrama que muestra las dos versiones del MS con combinaciones de mutaciones tanto en el linker y como en el cierre de serina. B. Células de *B. subtilis desk-* fueron complementadas tanto con MS-DesK salvaje o como con variantes de MS-DesK con mutaciones puntuales a nivel del SB de membrana (SB+) o en la interfaz de dimerización (S150A o S143A) o variantes MS-DesK con combinaciones de mutaciones tanto en la región TM como en la interfaz de dimerización (SB+S143A, SB+S150A). Las células que expresan las distintas variantes del MS-DesK fueron crecidas a 37°C y estimuladas por frío a 25°C y las actividades β-galactosidasa específicas fueron determinadas cada hora. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes medidos 2 horas después del estrés por frío.

Entonces, ¿cómo podría tal TM ser capaz de organizar tanto la detección y la señalización en un mismo proceso?

A bajas temperaturas las cadenas acilo están ordenadas en un empaçado estado rígido en la cual los movimientos moleculares están altamente restringidos. Con el calentamiento, la membrana transita una transición endotérmica y aumenta la permeabilidad a las moléculas pequeñas, formándose canalículos de agua por entre las cadenas en creciente desorden. Los lípidos fundidos en el estado líquido-cristalino permanecen en estructura lamellar, pero la

capa es más fina debido a que las cadenas acilo están con menos frecuencia en su conformación completamente extendida e interdigitan.



**Figura 6.5. Modelo propuesto de activación del MS-DesK frente al descenso de la temperatura.** La Lys 10 marca el límite superior del calibre molecular mientras que la secuencia KSRK del C-terminal del TM define el límite inferior, interaccionando con las cargas negativas de la membrana. Frente a un descenso en la temperatura, los lípidos se ordenan y se ensancha el espesor de la membrana, la Lys10 marca el “tope” hasta donde puede introducirse el TM, de manera de tirar de la región C-terminal. Las cargas opuestas del linker se apantallan permitiendo estructurarse en una hélice que enfrenta los grupos OH del motivo Cierre de Serinas, estabilizando esta conformación por seis puentes H, de manera de inducir la rotación necesaria para el cambio conformacional de la región citoplasmática al estafo quinasa.

El motivo SB N-terminal se encuentra dentro de la región TM justo debajo de la interfaz lípido-agua. Dentro de este motivo se destaca el residuo hidrófilico K10 (Fig.6.5). Es de suponer que este el aminoácido K10 del SB satisface su necesidad de hidratarse en el entorno de la interfaz aprovechándose de la capacidad de su cadena lateral de bucear, pudiendo enterrarse en la membrana (proponemos seis residuos por debajo de la membrana) y posicionar a la vez la carga en la superficie.

En esta situación de constricción de membrana, la región hidrófoba del TM es lo suficientemente larga como para permitir que la región linker se hidrate por fuera de la

membrana. En la última vuelta de la hélice intramembrana se destaca el motivo KSRK, altamente concentrado en residuos de carga positiva (Fig.6.5). Estando la hélice relajada, estos residuos pueden interactuar con las cargas negativas de los lípidos por interacción electrostática. El linker adopta, entonces, un estado hidrófilo desestructurado que se une a la superficie de la membrana por la cara interna, las K y R tiran de la hélice hacia la interfaz. Los lípidos estabilizan el linker de manera que el motivo hidrófilo C-terminal puede llegar al ambiente hidrofílico y las serinas pueden satisfacer su puente H con las aguas de hidratación de la interfase de la membrana. El motivo de dimerización, “Cierre de Serinas”, se neutraliza y es desarmado. El linker no tiene oposición para interactuar plenamente con la membrana cargada negativamente. La distribución aleatoria de los residuos de carga positiva y negativa es la manera de optimizar dicha interacción. La interacción del linker con la bicapa disrumpe la continuidad de la hélice, lo que libera la tensión en la región catalítica C-terminal que permite aparear las posiciones a y d del coiled-coil del 4-HB desplazando el equilibrio a la conformación de la fosfatasa.

Cuando la temperatura desciende, los lípidos reducen su movimiento molecular dentro de la membrana y las cadenas acilo se encontrarán con sus cadenas extendidas, expandiendo el espesor de la membrana. Este aumento del grosor genera una desigualdad entre la hélice hidrofóbica TM y el ambiente que la rodea. La región hidrofoba del MS-DesK ahora no es lo suficientemente largo para que coincida con el núcleo hidrofóbico de la membrana y tiende a enterrar aún más el motivo SB. Sin embargo, la lisina K10 está en su límite, de manera que impide al TM seguir tirando de la parte N-terminal, marcando como una boya el límite hidrofobo al cual puede ser forzado el sistema. Esto impone una tensión a lo largo de toda la región de TM que llega al extremo C-terminal, lo que forzará al motivo KSRK a alinearse con la parte TM continuando los puentes-H entre los grupos carboxilo y amida típicos de la estructura helicoidal con el fin de proteger el esqueleto carbonado de la hidrofobicidad de la membrana. El entierro de grupos cargados no apareados sería termodinámicamente desfavorable, por lo tanto, se espera que los residuos cargados aumentarán sus interacciones de Coulomb mutuas dentro del entorno apolar de la membrana, haciendo pares de carga opuesta y provocando la formación de una hélice continua de la región de transmembrana a la parte citoplásmica. La hélice se estabiliza mediante una distribución peculiar de residuos positivos y negativos que contribuyen a la formación de puentes salinos intrahelice entre cargas opuestas emparejadas por el registro helicoidal: n con n + 3 o 4. Estos puentes de sal se estabilizan en la fase lipídica debido a la gran disminución de la protección de carga en el medio dieléctrico bajo. El clúster serina queda ahora atrapado dentro del núcleo hidrofobo de

la membrana, lo cual sería entrópica desfavorable y por lo tanto el péptido debe reposicionar este motivo en la interfaz de un dímero, donde los pares serina-serina de ambas hélices se atan mediante enlaces puente-H interhélice dentro de la membrana. El cierre de serina puede formar fuertes puentes H dentro de la membrana, estabilizado por el medio de baja constante dieléctrica además de no haber aguas de hidratación que compitan por estos puentes-H (Fig.6.5). Esto estabiliza ambas hélices en una estructura helicoidal dimérica que se proyecta desde la membrana, continuando con el 4-HB en el lado citoplasmático. Este motivo de dimerización rota y desplaza el equilibrio hacia el confórmero quinasa.

## Conclusiones

---

En el capítulo I validamos la hipótesis de que un cambio en el espesor de la membrana mediada por los cambios en la temperatura ejercen una perturbación electrostática que genera el cambio conformacional necesario para alternar entre el estado quinasa y fosfatasa. De los estudios *in vitro* se puede concluir que:

- A. MS-DesK se purifica con un alto rendimiento y una alta eficiencia de reconstitución en liposomas de distintos tipos de lípidos.
- B. MS-DesK necesita de la bicapa para estar termorregulado.
- C. La regulación térmica del MS-DesK reconstituído en membranas es reversible, demostrando la integridad de la proteína en las dos condiciones estudiadas de temperatura (25°C y 37°C).
- D. La variante del KK-MS-DesK presenta un equilibrio quinasa/fosfatasa desplazado hacia la conformación quinasa competente, mientras que lo contrario se demuestra para la variante K10L-MS-DesK.
- E. Mediciones de la membrana de *B. subtilis* por SAXS demuestran un aumento de 1.05 Å al disminuir la temperatura en el rango en estudio.
- F. Proponemos la intrigante posibilidad de que las deformaciones inducidas por la temperatura en la membrana celular actúen como reguladoras alostéricas del termosensor.

En el capítulo II identificamos una “región linker” (KSRKERERLEEK) que conecta el dominio TM sensor con el dominio catalítico citoplasmático involucrado en la transmisión de la señal. Mediante técnicas genéticas, espectroscópicas y bioquímicas en esta región, podemos concluir que:

- A. El linker está dotado de una dualidad conformacional hélice/random coil que le permite cumplir su rol de “switch” de transmisión.
- B. En respuesta a cambios en el espesor de la membrana dependiente de la temperatura, el linker alterna entre dos estados: i) random coiled estabilizando las cadenas laterales cargadas positivamente con las cabezas de los fosfolípidos cargados negativamente en la interfase agua-membrana y promoviendo así el estado fosfatasa o ii) no unido y formando una hélice continua que atraviesa la región comprendida desde la membrana al citoplasma, promoviendo el estado quinasa.

- C. La disrupción de la estructura de hélice entre el segmento transmembrana y el dominio intracelular disminuye el ratio de actividades quinasa/fosfatasa y esto sería explotado mecánicamente para transmitir los cambios conformacionales necesarios para alternar entre el estado quinasa y fosfatasa en la región intracelular.
- D. Como muchos termosensores y otros tipos de sensores contienen dominios linker similares, el mecanismo que describimos aquí podría resultar un tema general.

En el Capítulo III, mediante técnicas genéticas, espectroscópicas y de cinética *in vitro* pudimos dar evidencia de que:

- A. La interacción linker-membrana se ve favorecida en los lípidos naturales de *Bacillus subtilis*, desplazando el equilibrio hacia la conformación del sistema reprimido. El lípido al que adjudicamos esta propiedad es el PG, de mayor porcentaje en la composición total de estos lípidos.
- B. La interacción del Cierre de Serinas se estabiliza por enlaces puente Hidrógeno.
- C. Pudimos establecer un modelo general de sensado de temperatura que integra los resultados obtenidos en los Capítulos I y II, de manera de dar una respuesta global a la pregunta de cómo puede mecánicamente un termosensor integrar, procesar y transducir la información térmica para controlar la expresión génica

## Referencias Bibliográficas

---

- Abdel-Fattah WR, Chen Y, Eldakak A, Hulett FM (2005). Bacillus subtilis phosphorylated PhoP: direct activation of the E( $\sigma$ )A- and repression of the E( $\sigma$ )E-responsive *phoB-PS+V* promoters during *pho* response. J Bacteriol. 187(15):5166-78.
- Adamian L, Liang J. (2002). Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. Proteins. 47(2):209-18.
- Adamian L, Liang J. (2002). Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers.1;47(2):209-18.
- Aguilar PS, Cronan JE Jr, de Mendoza D (1998) A Bacillus subtilis gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J Bacteriol 180:2194–2200.
- Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in Bacillus subtilis EMBO J.20, 1681-1691.
- Aguilar PS, López P, de Mendoza D (1999) Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the  $\Delta 5$  desaturase of Bacillus subtilis. J Bacteriol 181:7028–7033.
- Albanesi D, Mansilla MC, de Mendoza D. (2004). The membrane fluidity sensor DesK of Bacillus subtilis controls the signal decay of its cognate response regulator J Bacteriol.186, 2655-2663.
- Albanesi D, Martín M, Trajtenberg F, Mansilla MC, Haouz A, Alzari PM, de Mendoza D, Buschiazzo A.(2009)Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 16185-16190.
- Alberts B., D. Bray y J. Lewis (2002). Organización interna de la célula. En Biología Molecular de la Célula, 4th ed pp. 510-513. Ediciones Omega, Barcelona.
- Altabe SG, Aguilar P, Caballero GM, de Mendoza D.(2003)The Bacillus subtilis acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. J. Bacteriol. 185, 3228-3231.
- Ansaldi M, Dubnau D (2004). Diversifying selection at the Bacillus quorum-sensing locus and determinants of modification specificity during synthesis of the ComX pheromone. J Bacteriol. 186(1):15-21
- Appleby, J. L., J. S. Parkinson, and R. B. Bourret (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. Cell 86: 845-848.

- Beckering, C. L., Steil, L., Weber, M. H., Volker, U., Marahiel, M. A. (2002). Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184(22): 395-402.
- Biemans-Oldehinkel E, Mahmood NABN, Poolman B.(2006) A sensor for intracellular ionic strength. *Proc Natl Acad Sci USA.*103, 10624–10629.
- Bilwes, A. M., L. A. Alex, B. R. Crane, and M. I. Simon (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96: 131-141.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bogdanov, M., Zhang, W., Xie, J., and Dowhan, W. (2005). Transmembrane protein topology mapping by the substituted cysteine accessibility method (SCAM(TM)): Application to lipid-specific membrane protein topogenesis. *Methods* 36, 148–171.
- Bradford, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brock. Madigan M. T., Martinko J.M., Parker J. (2004). La diversidad procariótica: Bacteria. En Brock, *Biología de los Microorganismos*, 10ª edición pp, 404. Pearson, Prentice Hall, New Jersey.
- Brock. Michael T. Madigan, John M. Martinko y Jack Parker. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos* 10ed. pp 152. Pearson, Prentice Hall, New Jersey.
- Burbulys, D., K. A. Trach, and J. A. Hoch (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64: 545-552. *Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 10090-10093.
- Chazarreta-Cifre L, Martiarena L, deMendoza D, Altabe SG. 2011. Role of ferredoxin and flavodoxins in *Bacillus subtilis* fatty acid desaturation. *J. Bacteriol.* 193:4043–48
- Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M.(2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *The EMBO J.*24, 44 – 53.
- Colbert HA, MSith TL, Bargmann CI.(1997)OMS-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17, 8259-8269.
- Cronan, J. E. and C. O. Rock. 1996. Biosynthesis of membrane lipids, p. 612-636. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S.

Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, D.C.

- Cybulski LE & de Mendoza D. (2011) Bilayer hydrophobic thickness and integral membrane protein function. *Curr Protein Pept Sci.* 12, 760-766.
- Cybulski LE, Albanesi D, Mansilla MC, Altabe S, Aguilar P, de Mendoza D.(2002)Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol. Microbiol.*45, 1379–1388.
- Cybulski LE, del Solar G, Craig PO, Espinosa M, de Mendoza D.(2004)*Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J. Biol. Chem.*279, 39340-39347.
- Cybulski LE, Martin M, Mansilla MC, Fernandez A, de Mendoza,D.(2010)Membrane Thickness Cue for Cold Sensing in a Bacterium. *Curr. Biology*20, 1539-1544.
- de Mendoza D, Cronan JE. 1983. Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 8:49–52
- Dowhan, W. 1997. Molecular Basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids?. *Annu. Rev. Biochem.* 66:199-232.
- El-Sharoud WM, Graumann PL (2007). Cold shock proteins aid coupling of transcription and translation in bacteria. *Sci Prog.*90(Pt 1):15-27.
- Esmay, M., 1969. *Principles of Animal Environment*. The Avi Publishing Company Inc.
- Fabret, C., Feher, V. A., Hoch, J. A. (1999). Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. *J. Bacteriol.*181(7): 1975-1983.
- Fernández A, Crespo A, Maddipati S, Scott R.(2008) Bottom-up engineering of peptide cell translocators based on environmentally modulated quadrupole switches. *ACS Nano* 2, 61-68.
- Fujii DK, Fulco AJ. 1977. Biosynthesis of unsaturated fatty acids by bacilli: hyperinduction and modulation of desaturase synthesis. *J. Biol. Chem.* 252:3660–70.
- Fulco AJ, BlochK. 1962. Cofactor requirements for fatty acid desaturation in *Mycobacterium phlei*. *Biochim. Biophys. Acta* 63:545–4632. Fulco AJ, Levy R, Bloch K. 1964. The biosynthesis of  $\omega_9$  and  $\omega_5$  monosaturated fatty acids by bacteria. *J. Biol. Chem.* 239:998–1003.
- Fulco AJ, Levy R, Bloch K. 1964. The biosynthesis of  $\omega_9$  and  $\omega_5$  monosaturated fatty acids by bacteria. *J. Biol. Chem.* 239:998–1003

- Goormaghtigh E, Raussens V, Ruyschaert JM.(1999) Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1422, 105-185.
- Goormaghtigh E, Ruyschaert J-M, Raussens V (2006) Evaluation of the information content in infrared spectra for protein secondary structure determination. *Biophys J* 90(8):2946–2957.
- Grau, R. and D. de Mendoza (1993). Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 8: 535-542.
- Graumann P, Marahiel MA (1996). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol.* 166(5):293-300.
- Graumann P, Wendrich TM, Weber MH, Schröder K, Marahiel MA (1997) . 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(4):741-56.
- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 203-209.
- Gualerzi, C. O., Giuliadori, A. M., Pon, C. L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* 331(3): 527-539.
- Holt, A.; Killian, J.A.(2010). Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models. *Eur. Biophys. J.* 39(4), 609-621.
- Hulko M., Berndt F., Guber M., Linder J., Truffault, Schultz A., Martin J., Shultz J, Lupas A., Coles M. (2006). The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126: 929-940.
- Inda, M.E., Vandenbranden M., Fernández A., de Mendoza, D., Ruyschaert J.M. Cybulski, L.E. Thermosensing in bacteria: the missing link. *PNAS*, 2013-17147.
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B.(1999) An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem.* 274, 7325-33.
- Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272: 196-202.
- Kaan T., Homuth G., Wretzel S., Light A., Gilooly L., McDaid K., (2002). Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* 148: 3441-36592.

- Killian, J.A. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998, 1376(3), 401-415.
- Klein W, Weber MH, Marahiel MA. 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* 181:5341–49
- Kloda A, Ghazi A, Martinac B.(2006) C-terminal charged cluster of MscL, RKKEE, functions as a pH sensor. *Biophys. J.* 90, 1992–1998.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, and A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, and A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
- L. E. Cybulski & D. de Mendoza (2011). Bilayer Hydrophobic Thickness and Integral Membrane Protein Function. *Current Protein and Peptide Science* 12: 1389-2037/11
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M.(2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275, 28398–28405.
- Liang J1, Adamian L, Jackups R (2005). The membrane-water interface region of membrane proteins: structural bias and the anti-snorkeling effect. *Trends Biochem Sci.* 30(7):355-7.
- Lichtemberg D. (1985) “Micelles and Liposomes” 3, pp 65. Apunte de la Cátedra de Biofísica.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S.(2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* 103, 525-35.

- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369: 242-245.
- Mansilla C. y De Mendoza D. (2005). The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperatura sensing. *Arch. Microbio* 183: 229-235.
- Martín M, de Mendoza D. (2013). Regulation of *Bacillus subtilis* DesK thermosensor by lipids. *Biochem. J.* 451(2):269–75
- Martín M., Albanesi D., Alzari, P., de Mendoza D. 2009). Functional *in vitro* assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK, *Protein Expr. Purif.* 66, 39–45
- Mascher T., Helmann J.D., Uden G.(2006). Stimulus perception in bacterial Signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews.*70, 910-938.
- Matthews EE, Zoonens M, Engelman DM.(2006) Dynamic helix interactions in transmembrane signaling.*Cell*127, 447-450.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mizuno, T. and M. Matsubara (2003). Role of the Histidine-Containing Phosphotransfer Domain (HPT) in the Multistep Phosphorelay through the Anaerobic Hybrid Sensor, ArcB, p. 166-190. In M. Inouye and R. Dutta (eds.), *Histidine Kinases in Signal Transduction*. Elsevier Science, California, USA.
- Najle S, Inda ME, de Mendoza D, Cybulski LE. Oligomerization of *Bacillus subtilis* DesR is required for fine tuning regulation of membrane fluidity. *BBA*, 2009.
- Op den Kamp, J. A. F., I. Redai and M. Van Deenen. 1969. Phospholipid Composition of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 99(1):298.
- Paulton R. J. L. (1970). Analysis of the Multiseptate Potential of *Bacillus subtilis*. *JBacteriol.* 104(2): 762–767.
- Phadtare, S., K. Yamanaka, and M. Inouye (2000). The cold shock response, p. 33-45. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, D.C.
- Porrini L, Cybulski L, Altabe SG, Mansilla MC, de Mendoza D. 2014. Cerulenin inhibits unsaturated fatty acids synthesis in *Bacillus subtilis* by modifying the input signal of DesK thermosensor. *MicrobiologyOpen.* 3:213–24.

- Priest, F. G. 1993. Systematics and Ecology of Bacillus, p. 3-16. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (eds.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. ASM Press, Washington, D.C.
- Purves W. K., D.Sadava, G.Orians, C.Heller (2003). Fisiología, homeostasis y regulación de la temperatura. En *Vida. La Ciencia de la Biología*, 6ta ed. pp. 698-700. Editorial Panamericana.
- R Dutta, L Qin, M Inouye (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol.* 34(4):633-40.
- Rigaud & Levy. Reconstitution of membrana proteins into liposomes. *Methods Enzimol.* (2003) 372: 65-86.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2° Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- ScheuerbrandtG, Bloch K. 1962. Unsaturated fatty acids inmicroorgansims. *J. Biol. Chem.* 237:2064–68.
- Sheu SY, Schlag EW, Selzle HL, Yang DY (2009). Hydrogen bonds in membrane proteins. *J Phys Chem B.* 113(15):5318-26.
- Sheu SY, Schlag EW, Selzle HL, Yang DY(2009) Hydrogen bonds in membrane proteins. *J Phys Chem B.* 16;113(15):5318-26.
- Snyder L. & W. Champness (1997). Regulation of Gene Expression. En *Molecular Genetics of Bacteria*, pp. 266-268. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington.
- Spizizen, J. (1958). Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 44: 1072- 1078.
- Stephenson K, Hoch JA (2002). Evolution of signalling in the sporulation
- Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P. (2000). Two Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 183-215.
- Stopar, D., Spruijt, R. B, Wolfs, C. J. A. M., and Hemminga, M. A. (1996) Local dynamics of the M13 major coat protein in different membrane-mimicking systems. *Biochemistry* 35, 15467-15473.
- Stragier P. and Losick R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 30: 297-341.
- Studier & Moffatt (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189(1):113-30.

- Suzuki, T., A. Imamura, C. Ueguchi, and T. Mizuno (1998). Histidine-containing phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 39: 1258-1268.
- T. Stockner, W. L. Ash, J. L. MacCallum, D. P. Tieleman. (2004) Direct Simulation of Transmembrane Helix Association: Role of Asparagines. 87: 1650–1656
- Trun N. & Trempy J. (2004). Transformation. En *Fundamental Bacterial Genetics*, pp. 177-179.
- Tsuzuki, M., K. Ishige, and T. Mizuno (1995). Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: *in vitro* studies with mutants. *Mol. Microbiol.* 18: 953-962.
- Ul'ianova VV, Zolotova MA, Kharitonova MA, Il'inskaia ON, Vershinina VI (2008). ResD-ResE two-component system positively regulates gene expression of bacilli guanyl-specific ribonucleases. *Mol Gen Mikrobiol Virusol.*; (3):23-8
- Van der Heide T, Stuart MC, Poolman B. (2001) On the osmotic signal and osmosensing mechanisms of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* 20, 7022–7032.
- Varughese KI, Madhusudan, Zhou XZ, Whiteley JM, Hoch JA (1998) Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase. *Mol Cell* 2:485–493.
- Vigh L, Los DA, Horváth I, Murata N. 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(19):9090–94.
- Weber MHW, Klein W, Muller L, Niess UM, Marahiel M (2001) Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* 39:1321–1329.
- White D. (2000). Adaptive and developmental changes. En *The physiology and biochemistry of prokaryotes*, 2ª edición pp. 435-437. Oxford University Press, New York.
- Zhang Y-M, Rock CO. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:222–33.
- Zimmann P, Steinbrügge A, Schniederberend M, Jung K, Altendorf K. (2007) The extension of the fourth transmembrane helix of the sensor kinase KdpD of *Escherichia coli* is involved in sensing. *J Bacteriol.* 189, 7326-7334.

