

Estudios estructurales del sistema de dos componentes DesK-
DesR de *Bacillus subtilis*

Índice

Resumen.....	3
Introducción.....	4
<i>Bacillus subtilis</i> y la variabilidad ambiental.....	4
Respuestas celulares ante la variación de la temperatura en <i>B. subtilis</i>	5
“Cold-shock proteins”: el inicio de la respuesta al choque frío.....	7
Modificaciones en la estructura del nucleóide durante el choque frío.....	10
La membrana plasmática: composición lipídica y actividades fisiológicas	12
La biosíntesis de ácidos grasos insaturados en <i>B. subtilis</i> es dependiente de una desaturasa	16
Los sistemas de dos componentes	19
Estructura molecular de la histidín-quinasa DesK.....	25
Hipótesis y objetivos.....	28
Materiales y métodos.....	30
Producción y purificación de la proteasa TEV recombinante.....	30
Producción de la proteína recombinante DesKC-WKV.....	32
Purificación de DesKC-WKV	33
Experimentos de cristalización con DesKC-V188 y DesKC-WKV.....	35
Rastreo de solubilidad con DesKC-WKV	35
Rastreo de condiciones de cristalización de DesKC-WKV.....	36
Optimización de los cristales de DesKC-WKV.....	36
Cuantificación de proteínas.....	37
Electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa	37
Resultados.....	38
Purificación de la proteasa TEV	38
Purificación de DesKC-WKV	39
Cromatografía de afinidad a níquel	39
Cromatografía de exclusión molecular	41
Ensayos preliminares de cristalización con DesKC-V188 y DesKC-WKV.....	42
Screening de solubilidad con DesKC-WKV	43

Cristalización de DesKC-WKV	43
Optimización de cristales	44
Ensayos preliminares de difracción de rayos X	45
Discusión.....	47
Bibliografía.....	51

Resumen

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva que se encuentra ampliamente distribuída habitando las capas altas del suelo, sujeta naturalmente a numerosas variaciones en las condiciones ambientales que en ocasiones pueden transformarse en situaciones de stress. La variación en la temperatura ambiental suele ser un factor clave para la supervivencia, y en este sentido, *B. subtilis* es capaz de responder a tales situaciones a través de mecanismos que le permiten percibir e inducir señales intracelulares de los cambios en la temperatura ambiental, que culminan en variaciones de algunos aspectos del metabolismo celular a fines de adaptarse a tal situación de stress. Por ejemplo, el descenso brusco de la temperatura ambiental induce una respuesta por parte de *B. subtilis* (y los organismos unicelulares de vida libre) que se conoce con el nombre de “respuesta al choque frío”; esta respuesta, involucra numerosos cambios en el metabolismo celular, como por ejemplo, cambios en la expresión génica, en la topología del ADN, y en las propiedades físicas de la membrana plasmática, y en su conjunto permiten a *B. subtilis* sobrevivir en condiciones de baja temperatura. Si bien ha sido muy estudiado desde diversas perspectivas la respuesta al choque frío en esta bacteria, muy poco se conoce actualmente sobre los mecanismos moleculares implicados en la percepción y señalización intracelular de las bajas temperaturas. No obstante, la proteína implicada en dicha función (percepción y señalización) no solo ha sido caracterizada, sino también ya se ha dilucidado la estructura de la porción citoplasmática mediante cristalografía de rayos X. Se trata de la proteína histidina-quinasa conocida como DesK, capaz de actuar tanto como quinasa o fosfatasa de otra proteína conocida como DesR (o “regulador de respuesta” de DesK, conformando ambas un sistema de dos componentes) la cual puede actuar como factor de transcripción (según su estado de fosforilación) del gen *des*, codificante para una proteína desaturasa, capaz de incorporar insaturaciones “*in situ*” sobre ácidos grasos de membrana, disminuyendo su punto de fusión a fines de mantener el estado fisiológico de la membrana

plasmática. En este trabajo, estudiaremos la posible variación estructural de la porción citoplasmática de un triple mutante de DesK respecto a otro mutante de DesK (cuya estructura ya ha sido dilucidada), generada precisamente en virtud de las mutaciones estratégicamente diseñadas sobre el mutante que estudiamos aquí. En fin, discutiremos los posibles cambios en el empaquetamiento cristalino de ambos mutantes, y veremos la importancia que reside en un par de residuos aminoacídicos en ese sentido.

Introducción

Bacillus subtilis y la variabilidad ambiental

Los organismos vivos deben responder a los cambios ambientales que ocurren naturalmente en sus hábitats para sobrevivir. Variaciones en la temperatura, presencia de nutrientes y de oxígeno, osmolaridad y pH suelen ser las más frecuentes a las que se enfrentan los organismos unicelulares de vida libre. En particular, las respuestas fisiológicas hacia los cambios de temperatura han sido estudiadas en todos los niveles de la escala biológica, de manera que las especies se han clasificado globalmente en dos categorías: organismos “poiquiloterms” (varían su temperatura según el ambiente) y “homeoterms” (mantienen relativamente constante la temperatura independiente a los cambios del ambiente). Todos los organismos estudiados hasta la fecha responden hacia los cambios repentinos de la temperatura ambiental, y de acuerdo al tipo del cambio, aumento o descenso, la respuesta se ha llamado “heat-shock response” (HSR-respuesta a choque de calor) o “cold-shock response” (CSR – respuesta a choque frío) respectivamente (Vigh et al, 1998).

Ya desde mediados del siglo XX, *Bacillus subtilis* ha sido muy estudiado desde el punto de vista bioquímico, genético y fisiológico. Dada su extraordinaria versatilidad y fácil manipulación genética, se convirtió en un modelo de estudio en el laboratorio representando la rama de bacterias mesofílicas del suelo, siendo además la primera bacteria Gram positiva cuyo genoma fue secuenciado completamente (Vigh et al, 1998; Kunst et al.1997; Woese et al, 1990). *B. subtilis* es una bacteria aeróbica y anaeróbica facultativa, que se encuentra ampliamente distribuida habitando principalmente las capas altas del suelo, sujeta a numerosas situaciones de stress asociadas a variaciones ambientales (Woese et al, 1990; Vigh et al, 1998; Kunst et al. 1997). Los cambios de temperatura

constituyen un factor clave para el crecimiento celular y supervivencia en el suelo, aunque en casos de extrema escasez de nutrientes o baja hidratación, *B. subtilis* es capaz de formar endosporas altamente resistentes a la radiación y deshidratación (Vigh et al, 1998; Mansilla et al, 2004). La esporulación suele ser un proceso que ocurre en última instancia, en el caso de que ciertas respuestas celulares ante la inanición nutricional fallen; entre esas respuestas, se incluyen la inducción de la motilidad y quimiotaxis, producción de hidrolasas (proteasas y carbohidrasas) y antibióticos (Harwood et al, 2001). *B. subtilis* y otras especies de *Bacillus* son utilizadas en una amplia variedad de procesos industriales para la producción de vitaminas y enzimas (por ej. amilasas y proteasas) que son capaces de secretar en ciertos casos a concentraciones de gramos por litro (Woese et al, 1990; Kunst et al, 1997).

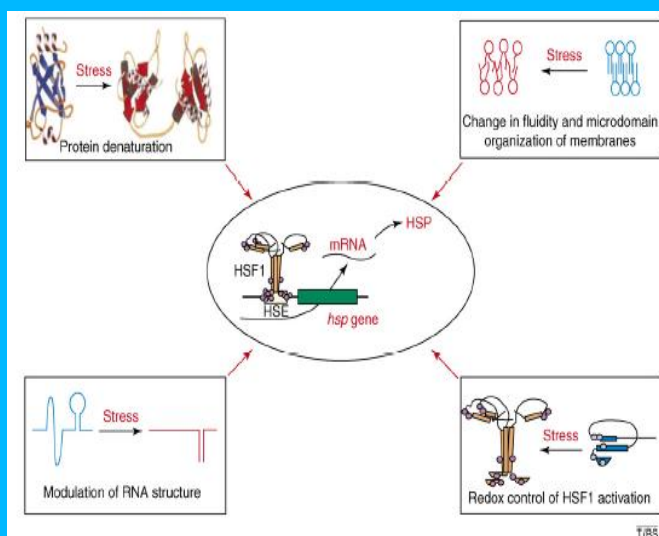
Respuestas celulares ante la variación de la temperatura en B. subtilis

Los organismos procariotas de vida libre se encuentran sometidos a ciertos rangos de variación de la temperatura ambiental, que en algunos casos puede llegar a ser lo suficientemente hostil como para bloquear por completo el crecimiento y las actividades metabólicas celulares (Los & Murata, 2004). No obstante, debido a que en el laboratorio es relativamente sencillo someter a las bacterias a cambios bruscos de temperatura, las respuestas ante tales variaciones han cobrado el interés de numerosos investigadores interesados en comprender los mecanismos moleculares implicados en tales adaptaciones para la supervivencia. En ese sentido, bajo condiciones de laboratorio se ha demostrado que *B. subtilis* posee una temperatura de crecimiento óptima de 39 °C, aunque es capaz de sostener el crecimiento celular en el rango de 11° C a 52° C (Vigh et al, 1998; Mansilla et al, 2004). Pero cuando la temperatura es variada bruscamente (aumentada o disminuida) dentro de ese rango, o las células son cultivadas por largos períodos a temperaturas cercanas a los extremos, entonces la célula es capaz de responder para adaptarse mediante la expresión de conjuntos de proteínas implicadas en mantenerla fisiológicamente estable.

Los cambios en la expresión génica que ocurren inmediatamente luego de un rápido incremento en la temperatura es lo que se conoce como HSR (Fig1A) (Vigh et al, 2005); tales respuestas se encuentran reguladas a los niveles transcripcionales y post-transcripcionales, y la evidencia proveniente del estudio de una gran variedad de organismos sugieren que los cambios inducidos por stress térmico en dominios específicos

de la membrana plasmática (cuyas propiedades físicas se alteran en relación a un incremento en la motilidad de los ácidos grasos y desnaturalización de proteínas transmembrana) podrían modular la respuesta al choque por calor (Kaneda, 1977,1991). La HSR es una reacción conservada que ocurre tanto en células como en organismos frente a elevadas temperaturas. Deriva en varios efectos biológicos: (i) protege a las células y organismos de sufrir un daño severo, (ii) permite la reanudación de las actividades celulares y fisiológicas normales, y (iii) conlleva a un nivel de termo-tolerancia (Kaneda, 1991). Esta reacción es resultado de la actividad en conjunto de las proteínas expresadas a elevadas temperaturas, las HSP (“heat-shock proteins”), con funciones de chaperonas, proteínas asociadas a membrana y proteasas, como por ejemplo GroEL, GroES, DnaK y GrpE,

(A)



(B)

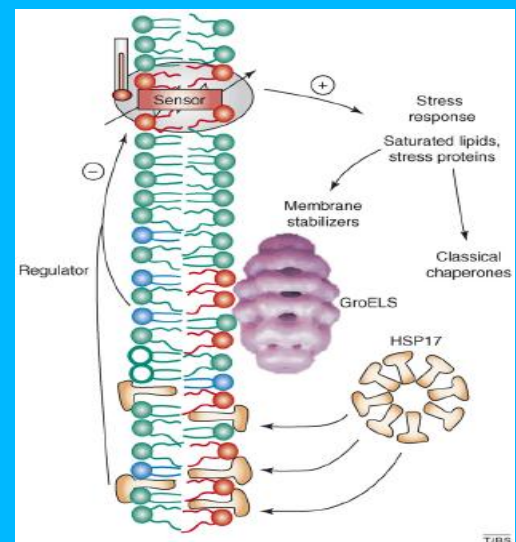


Fig.1: (A) Posibles sensores que inducen la expresión de los genes “hat-shock” (*hsg*), los cuales codifican para las HSP. Los *hsg* se activan transcripcionalmente una vez que los HSFs (factores “heat-shock”) se unen a los HSE (elementos “heat-shock”) en sus promotores. **(B)** Esquema mostrando la repuesta al choque de calor mediante la expresión de HSP17, GroEL/S y chaperonas en *Synechocystis sp.* Se postula que HSP17 y GroEL/S actuarían también directamente sobre los lípidos de la membrana plasmática, estabilizándola y modulando su fluidez y, a su vez, regulando negativamente la expresión de los *hsg* (adaptado de Vigh et al, 2007).

detectables también en *B.subtilis* (Fig1B) (Mansilla et al, 2004; Kaneda, 1991; Horváth et al, 2008). Por otra parte, el incremento de la temperatura dispara también la rápida inducción de la expresión de un amplio regulón inducido por stress, controlado por el factor de transcripción alternativo SigmaB (Budde et al, 2006), el cual provee a *B. subtilis* de

protección frente a la inhibición del crecimiento por el choque de calor, además de una resistencia múltiple y no específica ante condiciones adversas; de hecho, se ha demostrado con estudios transcriptómicos y proteómicos que el regulón controlado por SigmaB, se expresa también en respuesta al choque frío (Budde et al, 2006; Beckering et al, 2002; Kaan et al, 2002)

El rápido y significativo descenso de la temperatura conocido como “choque frío” (CS - “cold shock”) ocasiona una serie de procesos que afectan las funciones propias de la membrana plasmática (transporte, replicación y producción de energía), el plegamiento de las proteínas, las actividades enzimáticas, la biosíntesis de proteínas, el metabolismo primario y la estructura de las moléculas de ARN y ADN, los cuales inducen a la célula a realizar cambios globales en la expresión génica y que se ha denominado como CSR. Así, la CSR se ha definido como la suma de todas las reacciones celulares requeridas para una eficiente adaptación a un brusco descenso de la temperatura ambiental (Vigh et al; 1998; Klein et al, 1999). Sin embargo, las células deben poseer mecanismos que les permitan primero sentir el descenso de la temperatura ambiental para luego responder satisfactoriamente; en *B. subtilis* se ha caracterizado un sistema de dos componentes (DesK/DesR) termosensible, capaz de regular la expresión de un gen codificante para una desaturasa de fosfolípidos ($\Delta 5$ -desaturasa) en respuesta a los cambios en las propiedades físicas de la membrana plasmática que ocurren tras el descenso de la temperatura (Aguilar et al, 1998, 2001); por otra parte, así como los cambios en la estructura (propiedades físicas) de la membrana plasmática, los cambios en la topología del ADN (incremento del superenrollamiento negativo) también podrían ser críticos activando la transcripción de nuevos genes, destinados a la aclimatación (Vigh et al, 1998)(Fig.2).

"Cold shock proteins": el inicio de la respuesta al choque frío

Mientras la síntesis de la mayoría de las proteínas expresadas en condiciones normales se ve disminuida cuando desciende la temperatura ambiental, existe un conjunto de proteínas cuya expresión se ve inducida y se encuentran directamente implicadas en el inicio y mantenimiento de la respuesta al choque frío (Klein et al, 1999). En principio se las han denominado “proteínas inducidas por frío” (CIP- “cold-induced proteins”), de las cuales un

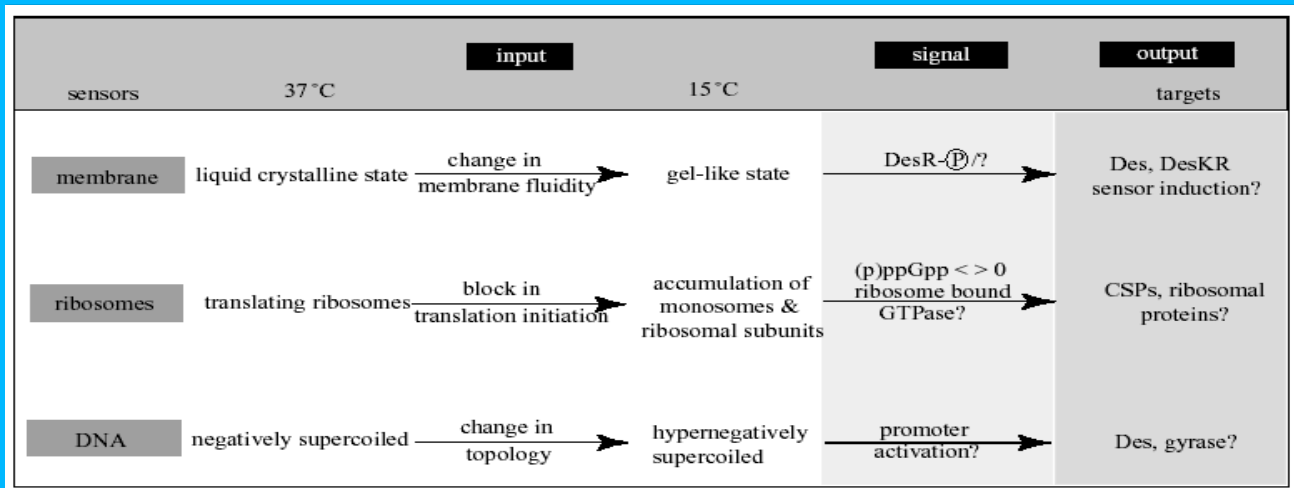


Fig.2: El esquema muestra los posibles mecanismos por los cuales las células sensan y responden al descenso brusco de la temperatura. Modificaciones locales en la membrana plasmática, alteraciones estructurales en los ribosomas, formación de estructuras secundarias en ARNm, y cambios en la topología del ADN, marcarían el disparo de la CSR, llevando a inducción de la expresión de nuevos grupos de genes y proteínas para recobrar el estado fisiológico normal (Weber & Marahiel, 2002).

subgrupo de ellas ha sido intensamente estudiadas y que han recibido el nombre de “cold-shock proteins” (CSP- proteínas del choque frío). Esta familia de proteínas está constituida de especies generalmente pequeñas (~ 7,4 kDa) y ácidas, y si bien su expresión es inducida tras el descenso brusco de la temperatura en diversas bacterias, en algunas de ellas se expresan incluso en condiciones normales (Los & Murata, 1997). La primer CSP (CspA, Fig.2a) fué identificada en 1987 (Jones et al, 1987), codificada por uno de los genes del “cold-shock stimulon” en *Escherichia coli*. Desde entonces, se han identificado CSP en casi todas las bacterias psicrófilas, mesófilas, termófilas e hipertermófilas estudiadas, incluyendo *Thermotoga* (Fig.2b) y *Aquifex*, (con la excepción de encontrarse en algunas bacterias como *Helicobacter pylori* y *Mycoplasma genitalium*) (Giaquinto et al, 2007). En *E. coli* se han identificado 9 CSPs (CspA-I) de las cuales 4 (CspA, CspB, CspG y CspI) son inducidas por frío. En *B. subtilis* se han identificado 3 CSPs (CspB-D, Fig.2c) que incrementan su expresión ante el descenso de la temperatura, aunque la actividad (y por tanto la expresión) de CspB y CspD es también importante a la temperatura óptima de crecimiento, en contraste con CspC que muestra un patrón de expresión asociado exclusivamente a bajas temperaturas (Schindler et al, 1999). Las CSPs de *B. subtilis* muestran entre un 72% y 80% de similitud entre sí, y son de hecho capaces de complementarse unas a otras (Schindler et al, 1999); se ha reportado que la presencia de al menos una de las CSP es esencial para la supervivencia de las células, incluso bajo condiciones óptimas de crecimiento (Weber et al,

2002).

Prácticamente todas las CSP consisten en un barril integrado por 5 hebras β antiparalelas, de las cuales 2 de ellas ($\beta 2$ y $\beta 3$ a partir del extremo N- terminal) incluyen los 2 motivos absolutamente conservados: RNP1 (hebra $\beta 2$, secuencia consenso KGYGFIEV) y RNP2 ($\beta 3$, VFVHF), formando el dominio conocido como “dominio del choque frío” (CSD – “cold-shock domain”) (Los & Murata, 1997; Weber et al, 2002; Max et al, 2007). Los residuos aromáticos presentes en ambos motivos son esenciales para mediar la interacción con moléculas simple hebra de ARN, precisamente los ARNm codificantes para las CIP (entre ellas las propias CSP), estabilizando sus estructuras secundarias que serían afectados e impedidos de interactuar con el ribosoma debido a las condiciones de baja temperatura (Max et al, 2007). Se ha demostrado que las CSP también se unen a moléculas simple hebra de ADN, con mas afinidad aún que con el ARN (Weber et al, 2001). Esta propiedad de unirse con alta afinidad a ácidos nucleicos permite un amplio espectro de interacciones a las proteínas de esta familia, cuyos miembros poseen diversos niveles de afinidad de unión

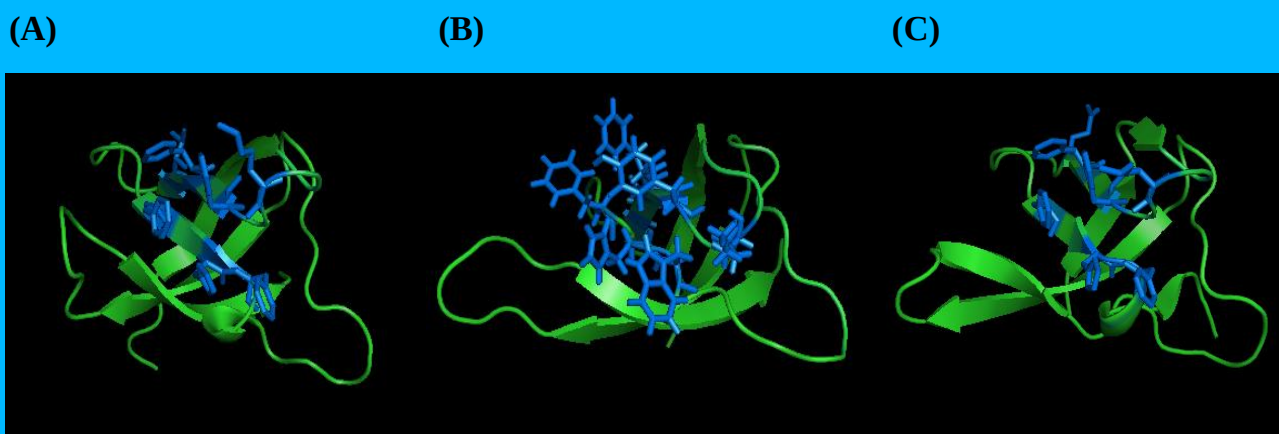


Fig. 3: Modelos estructurales de CspA de *E.coli* (A), Csp de *T.maritima* (B) y CspB de *B.subtilis*. En azul se muestran los motivos conservados de unión a ssADN y ssARN, RNP1 y RNP2, que conforman el CSD. Nótese la estructura de barril (visto de costado) de las CSP, así como la prominencia de los residuos aromáticos de interacción con los ácidos nucleicos en ambos motivos (realizado en PyMOL, éste trabajo).

y especificidad de secuencia (Vigh et al, 1998). Sin embargo, fisiológicamente las CSP cumplirían primordialmente el papel de chaperonas de ARN en la regulación de la traducción (Max et al, 2007). *In vitro* se demostró que CspA de *E. coli* incrementa la traducción de su propio ARNm y se vuelve más susceptible a la degradación por RNAsas

(Brandi et al, 1996; Jiang et al, 1997), lo cual indica que CspA mantiene una conformación lineal del ARN permitiendo la iniciación de la traducción por el ribosoma y por tanto, acoplando la transcripción con la traducción (Los & Murata, 1997). Por otro lado, los estudios han destacado que inmediatamente después que ocurre un CS los ribosomas aún no “adaptados” al frío traducen los ARNm de las CSPs sin la colaboración de proteínas chaperonas, probablemente debido a las propiedades estructurales intrínsecas del ARNm de las CSP que son resultado de los apareamientos intramoleculares entre pares de bases complementarias, e incapaces de bloquear el inicio de la traducción. Asimismo, y en el sentido de demostrar que durante el CS se asegura aún más la expresión de las CSPs, los experimentos *in vitro* indicaron que la estabilidad del ARNm de CspA se incrementa a bajas temperaturas, lo cual permitiría que los ribosomas entonces “adaptados” al frío sean capaces de reconocerlos y traducirlos normalmente (Los & Murata, 1997; Brandi et al, 1996; Goldenberg et al, 1996).

Además de la estabilidad concedida por las CSP hacia ciertos ARNm, otras proteínas detectadas durante la CSR están involucradas en impedir la formación de estructuras secundarias en los ARNm que podrían llegar a generar un bloqueo de la traducción. Entre éstas se puede mencionar a ARN helicasas, capaces de desenrollar moléculas de doble hebra de ARN facilitando su reconocimiento por parte de las subunidades ribosomales involucradas en el inicio de la traducción (Weber & Marahiel, 2002). Las ARN helicasas inducidas por CS han sido detectadas en bacterias Gram-negativas, cianobacterias, archeas y Gram-positivas, y análisis transcriptómicos en *B. subtilis* han revelado el incremento en más de dos veces en la tasa de expresión de 2 genes (*ydbR* e *yqfR*) codificantes para proteínas del tipo ARN helicasas, homólogas a la ARN helicasa CsdA de *E. coli* (Beckering et al, 2002).

Modificaciones en la estructura del nucleóide durante el choque frío

La capacidad de las bacterias para adaptarse a condiciones de baja temperatura con mayor o menor éxito, depende del repertorio genético que posea para expresar e inducir la síntesis de proteínas destinadas a la aclimatación. Así, la variación en el patrón de la transcripción génica post-CS se acompaña de cambios en la topología del ADN precisamente sobre los sitios donde la transcripción de tales genes es reprimida en condiciones normales de temperatura (Weber et al, 2001).

Estudios microscópicos han revelado que luego del CS, la estructura del nucleóide bacteriano sufre una compactación similar al que ocurre una vez que las bacterias entran en la fase estacionaria de crecimiento a 37° C (Weber et al, 2001). Tal compactación puede ser interpretada en términos del incremento de superenrollamiento negativo incorporado por ADN girasas para generar una modificación local en la estructura del cromosoma en el sentido de facilitar la transcripción de los genes inmersos en esa región (Tse-Din et al, 1997; Woldringh et al, 1995); de hecho, en *B. subtilis* la tasa de expresión de los genes *gyrA* y *gyrB* codificantes para ADN girasas (generan superenrollamiento negativo en el cromosoma bacteriano) se muestra duplicada, tal como lo demuestran los perfiles transcripcionales luego del CS (Beckering et al, 2002); conforme con ello, la expresión del gen *topA* codificante para la topoisomerasa I (que cataliza la relajación del superenrollamiento negativo) se ve reducida a la mitad. De esa manera y acorde con los estudios de la topología del ADN, las regiones que presentan superenrollamiento negativo tienen tendencia a desenrollarse parcialmente y exponer regiones simple hebra, potenciando así la transcripción y eventualmente la replicación (Watson et al, 2004). Un ejemplo interesante, es el efecto de la incorporación del inhibidor de girasas novobiocina en *B. subtilis*, que inhibe la expresión del gen *des* (codificante para la Δ^5 -desaturasa), demostrando el rol regulatorio indirecto de genes a partir de cambios mediados por ADN girasas (Vigh et al, 1998; Grau et al, 1994).

A partir de los experimentos en los cuales se demostró que las CSP se encuentran interactuando con ARNm y subunidades ribosomales expresadas bajo el CS, mediando la transcripción con la traducción y que en conjunto conforman los ribosomas “adaptados” al frío, es de esperar que exista una relación estrecha entre las regiones del nucleóide activas en la transcripción y la localización intracelular de las CSP durante el “cold-shock”.

Utilizando microscopía de fluorescencia y la expresión de CspB unida a GFP, Weber y colaboradores mostraron que las CSP colocalizan con los ribosomas en regiones circundantes (activas traduccionalmente) del nucleóide durante la CSR (Weber et al, 2001) (Fig 4). Estos resultados son concordantes con estudios anteriores que proponían un modelo en donde la transcripción en bacterias ocurre mayormente sobre la parte central del nucleóide mientras que la traducción ocurre en regiones circundantes al nucleóide (Azam et al, 2000; Lewis et al, 2000). Por otra parte, la inhibición de la transcripción eliminó la

(A)

(B)

(C)

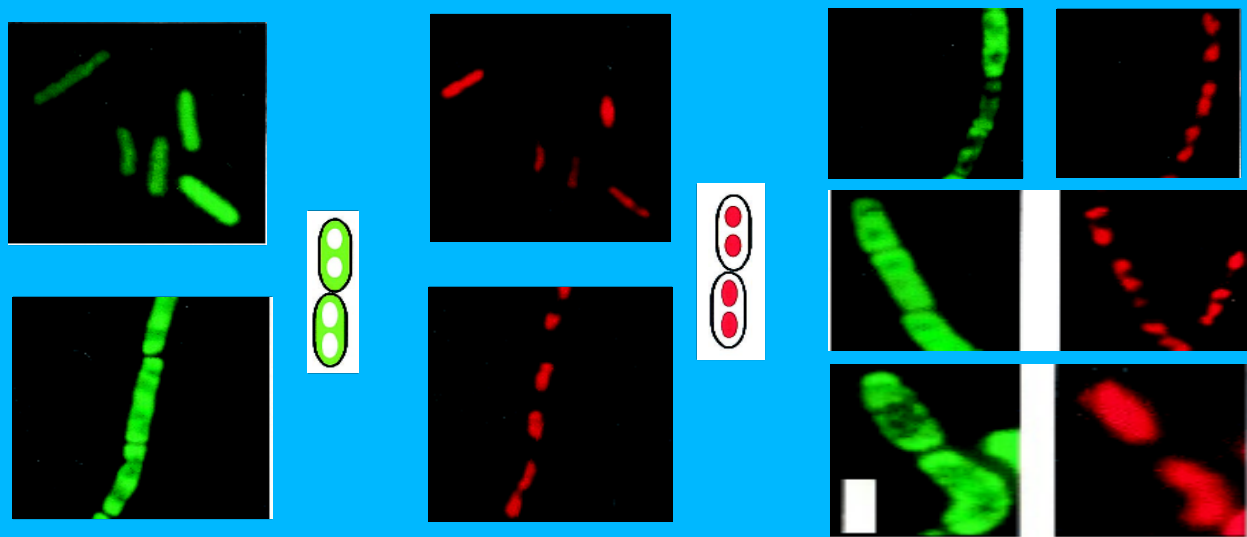


Fig.4: (A) En el panel superior se muestra el patrón de localización de GFP, mientras que en el inferior se muestra la localización específica de CspB-GFP, en células vivas a 25°C. En (B) se muestra el ADN teñido con DAPI, tanto en la figura superior como en la inferior, en células a 25°C, mientras que en (C) se observa la localización específica de CspB-GFP a 37°C (panel superior) y a 15°C (panel central); en el panel inferior, el patrón de localización de CspB-GFP es diferente en células mutantes para las proteínas *smc*, las cuales poseen un nucleoide mas descondensado. Nótese la ausencia de fluorescencia verde en la región central del nucleoide (adaptado de Weber et al, 2001).

localización específica de las CSP, mientras que la ausencia de CSPs induce defectos en la estructura del nucleoide y en la segregación del cromosoma, así como la misma estructura del nucleoide influencia sobre la localización intracelular de las CSP (Fig 4 C) (Weber et al, 2001).

La membrana plasmática: composición lipídica y actividades fisiológicas

Uno de los procesos esenciales durante la CSR en bacterias es la adaptación de la membrana plasmática al frío. La membrana plasmática provee a las células un almacén estructural que impide el libre pasaje de elementos (iones, macromoléculas, etc.) entre el interior y exterior celular, está involucrada en mecanismos de señalización y consiguientes respuestas celulares, y los derivados intracelulares de la membrana citoplasmática permiten además la compartimentalización intracelular en organelas en las células eucariotas. Sin embargo, la actividad fisiológica de la membrana se sabe que depende críticamente del estado físico de la membrana, y por ende, la composición lipídica y la dinámica de los lípidos de membrana han recibido gran atención hace ya varias décadas (Mansilla et al,

2004; Zaritsky et al, 1985). Diversos tipos de stress ambientales como las variaciones de la temperatura, osmolaridad, presión atmosférica, pH, etc., son capaces de afectar la fluidez de la membrana y por tanto, alterar las actividades fisiológicas de la misma. La fluidez de la membrana se entiende como el “desorden” o movimiento molecular que existe dentro de una bicapa lipídica, y es una propiedad física que permite a la célula sensar y responder a los cambios ambientales, a través de la regulación de la actividad de las proteínas unidas a la membrana tales como translocadores de pequeñas moléculas, canales de iones, protein-quinasas asociadas a receptores, y proteínas sensoras (Los & Murata, 2004). Si bien los mecanismos moleculares responsables de la percepción de tales cambios no han sido aún esclarecidos, sí han sido caracterizados varios sistemas moleculares implicados en tal percepción y en la transducción de la señal (Los & Murata, 2004).

En organismos poiquiloterms han sido muy estudiados los programas de respuesta celular ante los cambios de temperatura, de manera que actualmente se conocen una serie de aspectos involucrados particularmente en la regulación de la composición de los ácidos grasos de membrana (Marr & Ingraham, 1962; Kaneda, 1977, 1991; Klein et al, 1999), regulación de la transcripción de genes y síntesis de proteínas que participan en el metabolismo responsable de la aclimatación térmica (Los & Murata, 1997; Graumann & Marahiel, 1998; Vigh et al, 2007; Aguilar et al, 1998; Fujii & Fulco, 1977). El descenso de la temperatura disminuye la movilidad de los lípidos de membrana, haciéndola pasar de un estado líquido-cristalino a un estado gelificado (Fig.5), mientras que el aumento, si bien mantiene el estado líquido-cristalino, incrementa la fluidez de la membrana que podría culminar en un cambio de la estructura laminar (bicapa) a una no laminar (cilindros hexagonales) (Vigh et al, 1998). Así, uno de los objetivos principales (sino el más importante) de la aclimatación térmica consiste en mantener a la membrana en un estado de “homeoviscosidad”, es decir, de fluidez fisiológicamente óptima (Sinensky, 1974), lo cual implica que a bajas temperaturas se sintetizen fosfolípidos con un punto de fusión (“melting point”) más bajo que los presentes a la temperatura óptima de crecimiento.

Prácticamente todos los organismos poiquiloterms muestran un incremento en la proporción de los ácidos grasos insaturados (o con propiedades análogas) en sus membranas plasmáticas cuando la temperatura ambiental desciende (Aguilar et al, 1998; Mansilla et al, 2004). Se han identificado diversas vías para que eso ocurra. Una de ellas es la regulación en la tasa relativa de incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados en los lípidos

de membrana ocasionado por las bajas temperaturas. Alternativa o simultáneamente, también se han identificado cambios en la concentración de cofactores críticos para las reacciones de desaturación (por ejemplo el O_2), los cuales controlan la incorporación de dobles enlaces carbono-carbono de configuración *cis* en las cadenas de ácidos grasos constituyentes de la membrana (Fujii & Fulco, 1977; Weber & Marahiel, 2002; Sinensky, 1971; Allen & Bartlett, 1999). La incorporación de dobles enlaces puede llevarse a cabo también anaeróbicamente en otros sistemas, durante la síntesis de los ácidos grasos, como ocurre en *E. coli* (Cronan & Rock, 1996; Mansilla et al, 2004). La vía aerobia sobre ácidos grasos ya sintetizados a través de enzimas desaturasas, es típico de *Synechocystis* spp., *B. subtilis* y otras bacterias Gram+ (Los & Murata, 2004; Mansilla et al, 2004). La



Fig.5:(A) Esquema de una bicapa lipídica en el estado líquido-cristalino, fisiológicamente óptima. **(B)** La misma membrana esquematizada en el estado tipo gel tras el descenso de la temperatura (adaptado de Vigh et al, 1998).

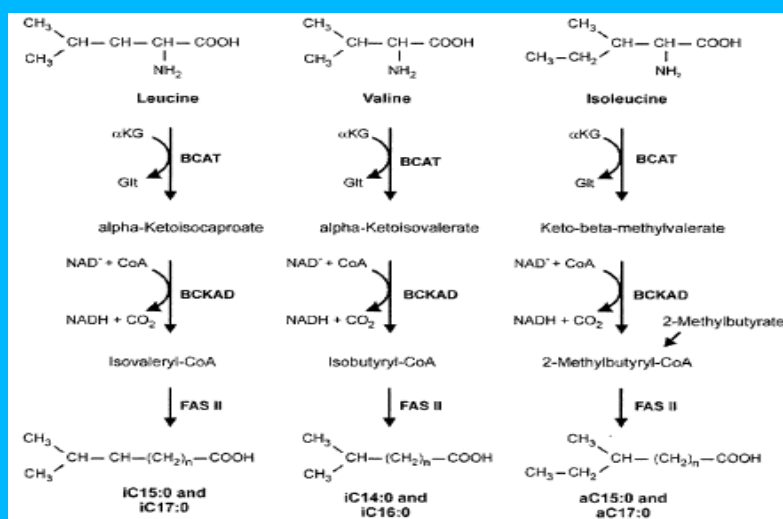
regulación de la fluidez de membrana puede efectuarse también por otros mecanismos, ya sea mediante alteraciones en la longitud de las cadenas acilo de los ácidos grasos, o con la síntesis de ácidos grasos ramificados (Kaneda, 1991; Weber et al, 2002).

Los ácidos grasos de membranas pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) la familia de los ácidos grasos de cadena recta, que incluye los ácidos palmíticos, esteáricos, hexadecenoicos, octadecenoico, ciclopropánico y 10-metilhexadecanoico, entre otros, y b) la familia de los ácidos grasos de cadena ramificada, que incluye los ácidos grasos iso-ramificados, anteiso-ramificados y β -alicíclicos, con o sin sustituciones (insaturaciones e hidroxilaciones) (Kaneda, 1991). No obstante, los mecanismos utilizados para mantener la homeoviscosidad de la membrana por cada organismo, dependerá de la presencia/ausencia de los genes codificantes para enzimas claves de ciertos pasos durante la síntesis de los ácidos grasos y/o de enzimas desaturasas.

Un ejemplo claro de esto, reside en la diferencia de los mecanismos utilizados entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, tomando como modelo a *E. coli* y *B. subtilis* en el primer y segundo grupo respectivamente, así como de cianobacterias, cuyo modelo clásico es el de *Synechocystis*. *E. coli* presenta una bicapa lipídica muy simple, constituida por tres tipos de cadena de ácidos grasos en sus fosfolípidos, unas de tipo saturada (ácido palmítico ó hexadecanoico) y las otras dos, insaturadas: ácido palmitoleico (*cis*-9-hexadecenoico) y ácido *cis*-vaccénico (*cis*-11-octadecenoico); la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados requiere de 3 enzimas, FabA, FabB y FabF (Mansilla et al, 2004), y cuando baja la temperatura se incrementa la síntesis del ácido *cis*-vaccénico de manera que compite con el ácido palmítico durante la incorporación en los fosfolípidos, disminuyendo así el punto de fusión de la membrana (Marr & Ingraham, 1962); se demostró que el aumento de ácido *cis*-vaccénico ocurre debido a que la actividad de FabF es más eficiente a bajas temperaturas. De todas formas, la síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados están solapados, ya que FabA cataliza la incorporación anaeróbica de un doble enlace en la cadena del ácido graso intermediario de 10 carbonos, α -hidroxidecanoil-ACP, que posteriormente es elongada por FabB y FabF (Garwin et al,1980; Mansilla et al, 2004) hasta *cis*-9-hexadecenoil-ACP y *cis*- 11-octadecenoil-ACP.

Los fosfolípidos que integran la membrana plasmática de *B. subtilis* contienen en un 95% de los ácidos grasos totales, ácidos grasos de cadena iso e anteiso-ramificada (Kaneda, 1991) y a diferencia de *E. coli*, la síntesis de ácidos grasos insaturados ocurre por mecanismos

(A)



(B)

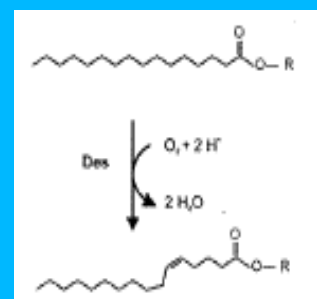


Fig.6: (A) Biosíntesis de ácidos grasos de cadena ramificada en *B. subtilis*; a partir de los aminoácidos

leucina, valina e isoleucina se sintetizan ácidos grasos de cadena impar iso-ramificados, de cadena par iso-ramificados y de cadena impar anteiso-ramificados, respectivamente. **(B)** Reacción aeróbica de desaturación del ácido palmítico a ácido *cis*-5 hexadecenoico, mediada por la desaturasa Des en *B. subtilis*. BCAT:branched-chain amino acid transaminase; BCKAD:branched-chain α -ketoacid dehydrogenase; FAS:fatty acid synthase (adaptado de Mansilla et al, 2004).

independientes al de la síntesis de los ácidos grasos ramificados saturados (Mansilla et al,2004) (Fig. 6A) . En un bajo porcentaje, aparecen integrados ácidos grasos saturados de cadena recta, como el ácido palmítico, el sustrato de la desaturasa Des en *B. subtilis* (Fig.6B). Los ácidos grasos de cadena ramificada poseen un punto de fusión menor que los ácidos grasos saturados cuando están asociados a fosfolípidos (Kaneda, 1991) y son sintetizados a partir de 3 precursores aminoacídicos, valina, leucina e isoleucina, cuyas cadenas laterales son ramificadas e hidrofóbicas. Experimentos destinados a comprender el estrecho acoplamiento que existe entre el metabolismo de aminoácidos y la biosíntesis de ácidos grasos a partir de ellos, han demostrado que bajas concentraciones de isoleucina (aminoácido precursor de ácidos grasos anteiso-ramificados) pero no de treonina (aminoácido precursor de la síntesis de isoleucina) en el medio de cultivo, son críticas para mantener la fluidez de la membrana a bajas temperaturas (Cybulski et al, 2002; Klein et al, 1999). Se ha visto que la importancia clave del aminoácido isoleucina en el medio de cultivo para el mantenimiento de la membrana lipídica (a bajas temperaturas y a 37° C en ausencia de una fuente externa de isoleucina), se debe a que *B. subtilis* incrementa la proporción de ácidos grasos de cadena impar anteiso-ramificadas incorporados en los fosfolípidos, ya que tales ácidos grasos poseen un punto de fusión más bajo que los ácidos grasos iso-ramificados (Cybulski et al, 2002; Mansilla et al, 2003). De todas maneras, los ácidos grasos de cadena saturadas y de cadena ramificada parecen compartir las enzimas biosintéticas, con la diferencia en el mecanismo de selección del sustrato que termina especificando el producto final según las condiciones (Klein et al, 1999; Kaneda, 1991); en consecuencia se ha hipotetizado que el incremento en la síntesis de ácidos grasos anteiso-ramificados podría ocurrir debido a la regulación por temperatura en la especificidad de selección del sustrato por parte de la enzima “beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase II” (sintetasa II de β -cetoacil dependiente de proteína portadora de acilos), FabF (Mansilla et al, 2004).

B. subtilis es capaz de mantener la homeoviscosidad de la membrana plasmática (descendiendo su punto de fusión) tras el “cold-shock”, mediante 2 mecanismos principales: i) Incrementando la proporción de ácidos grasos de cadena impar anteiso-ramificadas en los fosfolípidos de membrana, “switch” que depende de isoleucina (explicado anteriormente) (Kaneda, 1991; Beranová et al, 2007; Weber et al, 2001); y ii) Incrementando la proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática generados por la enzima $\Delta 5$ -desaturasa (Aguilar et al, 1998; Weber et al., 2001; Fujii & Fulco, 1977; Mansilla et al, 2003).

La biosíntesis de ácidos grasos insaturados en B. subtilis es dependiente de una desaturasa

La síntesis de ácidos grasos insaturados para ser incorporados en la membrana plasmática en bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y cianobacterias, es un mecanismo típico que han desarrollado para mantener la homeoviscosidad de la membrana no sólo ante condiciones adversas que puedan afectarla, sino también para mantenerla fisiológicamente activa (estable) durante la fase estacionaria de crecimiento. Sin embargo, existen diferencias notables en el metabolismo biosintético de los ácidos grasos insaturados entre las distintas bacterias, tanto a nivel de los complejos moleculares implicados, como en la presencia de cofactores esenciales para poder llevarlo a cabo. Ejemplos clásicos donde se reflejan esas diferencias, se encuentran entre *E. coli*, *B. subtilis*, y *Synechocystis*. En *E. coli* la síntesis de ácidos grasos insaturados ocurre anaeróbicamente durante la elongación de las cadenas acilo, específicamente por FabA (véase más arriba). En *B. subtilis* y *Synechocystis* las insaturaciones son incorporadas por acción de desaturasas, capaces de introducir dobles enlaces en forma aeróbica, sobre las cadenas acilo de ácidos grasos ya sintetizados e incorporados en fosfolípidos de membrana. En *B. subtilis* se ha detectado una única desaturasa ($\Delta 5$ -desaturasa), transmembranaria, mientras que en *Synechocystis* existen 4 desaturasas (DesA, DesB, DesC y DesD) cuya actividad parece estar asociada a los lípidos de la membrana de los tilacoides.

La desaturasa de *B. subtilis* ha sido ampliamente estudiada, desde su contexto genético hasta sus actividades enzimáticas, e incluso se han propuestos modelos topológicos de su estructura a partir de su secuencia aminoacídica y perfil hidropático (Cybulski et al, 2004;

Aguilar et al, 1998; Diaz et al, 2002). Esta proteína de 352 aminoácidos, codificada por el gen *des*, posee 3 motivos (“clusters”) de histidinas de unión a hierro, esenciales para su actividad catalítica (conservados en desaturasas de plantas y cianobacterias) (Aguilar et al, 1998) y 6 segmentos de transmembrana (Diaz et al, 2002; Aguilar et al, 1998; Mansilla & de Mendoza, 2005). La transcripción del gen *des* aumenta considerablemente luego del CS en *B. subtilis* (Aguilar et al, 1999), al igual que en *B. megaterium*, donde Fujii & Fulco observaron el mismo fenómeno y que nombraron “hiperinducción” de la síntesis de la desaturasa (Fujii & Fulco, 1977). En concordancia con el concepto de “hiperinducción”, los perfiles transcripcionales de *B. subtilis* durante el “cold shock” indican un incremento de hasta 10 veces en la tasa de transcripción de *des* (Kaan et al, 2002; Beckering et al, 2002; Aguilar et al, 1999). Asimismo, se demostró que la síntesis de la desaturasa en cultivos sometidos al CS (transferidos desde una temperatura de 35° C a 20° C) es dependiente de la síntesis de proteína y ARN, pues la adición tanto de rifampicina (inhibidor de la síntesis de ARN) como de cloranfenicol (inhibidor de la traducción), bloquea la aparición de la actividad desaturasa (Fujii & Fulco, 1977).

La disrupción del gen *des* demostró que, si bien tales mutantes nulos son capaces de sobrevivir durante la fase de crecimiento tanto a 37° C como a 20° C, los mismos presentan una supervivencia severamente reducida durante la fase estacionaria, más marcada a bajas temperaturas, aunque incluso detectable a 37° C (Aguilar et al, 1998); este hecho demuestra que la síntesis de ácidos grasos insaturados es esencial para mantener la fluidez de la membrana en un estado óptimo aún en fase estacionaria, y su ausencia afecta profundamente la capacidad de sobrevivir en el largo plazo a *B. subtilis*. Por otra parte, si bien fue demostrado que la proteína desaturasa introduce un doble enlace en la posición 5 de la cadena hidrocarbonada del ácido palmítico (de ahí su nombre $\Delta 5$ -desaturasa) (Fulco, 1968; Aguilar et al, 1998), la comparación de los perfiles de ácidos grasos en cepas de *B. subtilis* portadoras y no portadoras del gen *des*, demostró que en las cepas no portadoras se encuentran ausentes 4 tipos de ácidos grasos insaturados que difieren entre sí en longitud, patrón de ramificación y posición del doble enlace, lo que llevó a hipotetizar que la síntesis de tales ácidos grasos es estrictamente dependiente de $\Delta 5$ -desaturasa (Weber et al, 2001). La activación transcripcional del gen *des* disparada por el CS ha llevado a varios grupos de investigación a estudiar el origen y las vías de señalización y regulación de esta vía, implicada así en la percepción de cambios en las propiedades físicas de la membrana,

directamente vinculados a las variaciones de la temperatura ambiente.

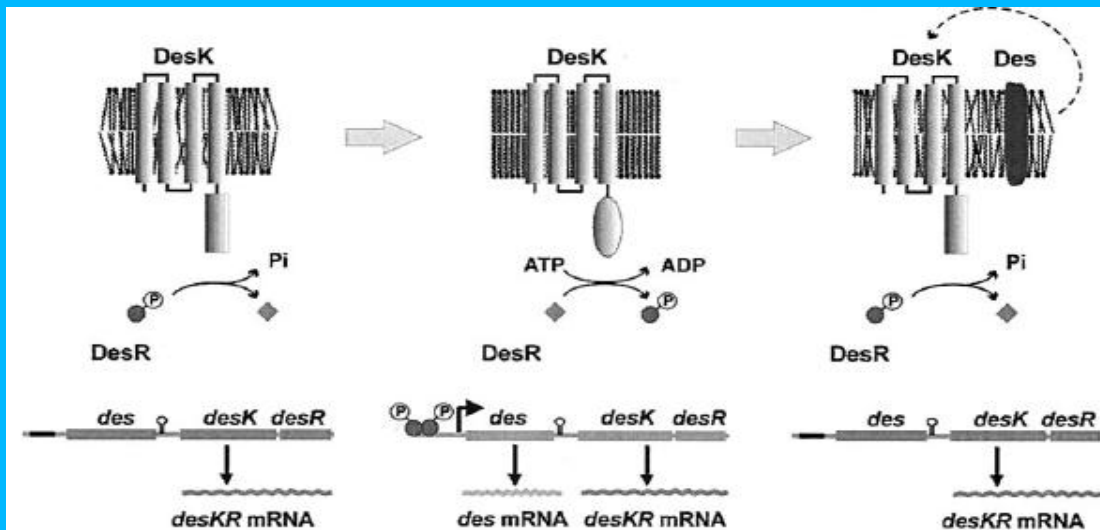


Fig.7: Esquema de la activación del sistema de dos componentes DesK-DesR y la regulación de la transcripción del gen *des*. Los genes *desK* y *desR*, codificantes para las proteínas DesK y DesR respectivamente, se expresan en forma constitutiva. Cuando la fluidez de la membrana es óptima, DesK actúa como fosfatasa de DesR, regulando negativamente la expresión del gen *des*. Cuando la fluidez lipídica se ve afectada por el descenso de la temperatura, DesK se autofosforila y fosforila a su regulador de respuesta DesR. DesR fosforilada se une al promotor del gen *des* y activa su transcripción. Una vez que se revierte a las propiedades físicas normales de la membrana por la acción catalítica de la $\Delta 5$ -desaturasa, DesK vuelve a actuar como fosfatasa de DesR inhibiendo nuevamente la transcripción del gen *des* (Mansilla et al, 2004).

moleculares implicados en la percepción de los cambios en las propiedades físicas de la membrana, lo que ha conducido a que actualmente se conozcan varias proteínas implicadas en la activación transcripcional y síntesis de Des. Se trata de una vía regulatoria mediada por el sistema de dos componentes DesK-DesR, conocido como “Des pathway”(vía Des), constituido por la histidina-quinasa de transmembrana DesK, y su regulador de respuesta específico DesR, que sufre ciclos de fosforilación y desfosforilación catalizados por DesK (Fig. 7) (Cybulski et al, 2002; Aguilar et al, 2001; Mansilla et al, 2003).

Los sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (SDC) constituyen la principal vía de señalización en bacterias mediando una enorme diversidad de respuestas celulares que permiten a los microorganismos sobrevivir y adaptarse a condiciones ambientales muy variables, ya se acomodándose a potenciales fuentes de carbono o nitrógeno, resistiendo a posibles toxinas presentes en su ambiente y estableciendo comunicaciones intra e inter-específicas (Foussard et al, 2001; Hoch, 2000, Koretke et al, 2000; Neiditch, 2006;). Los SDC también están implicados en la regulación de una variedad de procesos celulares esenciales, como la progresión del ciclo celular, división celular, patogenicidad, vías de desarrollo, esporulación y mantenimiento de la fluidez de la membrana (Hoch, 2000; Fabret & Hoch, 1998; Fukushima, 2008). Hasta el momento se han detectado sistemas de dos componentes no sólo en bacterias, sino también en archeas, cianobacterias y en eucariotas superiores (Stock et al, 2000; Mizuno et al, 1996, Koretke et al, 2000). Estas vías de respuesta adaptativas permiten a los organismos sensor una multitud de señales extracelulares y luego transducir dichas señales al interior de la célula, de manera de poder responder adecuadamente mediante la expresión o silenciamiento de un repertorio específico de genes (Mascher et al, 2006).

Básicamente, un SDC consiste, como su nombre lo indica, de dos componentes proteicos: 1) una “proteína-quinasa sensora”, y 2) un “regulador de respuesta”. La proteína-quinasa sensora es capaz de monitorear cambios en algún parámetro ambiental mediante un dominio o región sensora (“input domain”), generalmente en su extremo N-terminal, que le permite interaccionar directamente con la señal de entrada (“input signal”). Esta señal de entrada es transducida a través de cambios conformacionales intramoleculares mal conocidos actualmente, que resultan en la activación o inhibición del dominio transmisor (“transmitter domain”) de la quinasa, de localización citoplasmática. En su conformación activada, el dominio transmisor es capaz de autofosforilarse en un residuo de histidina específico, a expensas de una molécula de ATP que se une al mismo dominio. Una vez fosforilada, la histidin-quinasa es capaz de transferir activamente el grupo fosfato a un residuo aspartato ubicado en el dominio receptor (“receiver domain”) de su regulador de respuesta (Stock et al, 1989; Stock et al, 2000; Hoch, 2000; Marina et al, 2005). Esta fosforilación induce una nueva transducción de señales intramoleculares en el regulador de respuesta, que culminan modulando la actividad del dominio efector (“output domain”), a través de interacciones

proteína:proteína o proteína:ADN, actuando directamente sobre el nivel de la expresión de sus genes blancos (“targets”, en general activando la transcripción), o sobre el comportamiento celular frente al estímulo detectado (Mascher et al, 2006; Mizuno et al, 1996,1997). Si bien la organización modular de los sensores y los reguladores de respuesta es una característica típica de los SDC, lo cierto es que la variedad de dominios funcionales de entrada (“input domain”) y salida (“output domain”) y los arreglos en diferentes configuraciones, construyen a veces circuitos de fosfotransferencia (*phosphorelay*) más complicados, involucrando a una o más proteínas intermedias adicionales, ejemplo de lo cual es el bien conocido sistema de esporulación Spo de *B. subtilis* (Hoch, 2000; Foussard et al, 2001).

Sin embargo, las histidina-quinasa sensoras actúan frecuentemente también como fosfatasa de sus reguladores específicos de respuesta, desactivándolos en tanto que factores de transcripción y por tanto, regulando negativamente la transcripción de los genes blanco. El hecho que la histidina-quinasa posea ambas actividades, quinasa y fosfatasa, permite al ligando (o señal de entrada) estimular una de las actividades (quinasa) y suprimir la otra (fosfatasa), haciendo que sea capaz de sensar tanto la presencia como la ausencia de la señales estimulantes, alterando el nivel de fosforilación del regulador de respuesta en uno y otro caso (Perego & Hoch, 1996).

Varias proteína-quinasa de sistemas de dos componentes han sido estudiadas a nivel de su organización estructural, ya sea mediante predicción a partir de sus secuencias, por resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X (Minor, 2007); actualmente se conocen los diferentes dominios que conforman a estas proteínas, de manera que existen varias clasificaciones según los criterios adoptados, basados en aspectos funcionales, relaciones de secuencia, organización modular o transducción de señales (Mascher et al, 2006; Fabret et al, 1999, Foussard et al, 2001, Dutta et al, 1999; Hoch, 2000). Los dominios sensores de las histidin-quinasa difieren enormemente entre sí, probablemente reflejando la

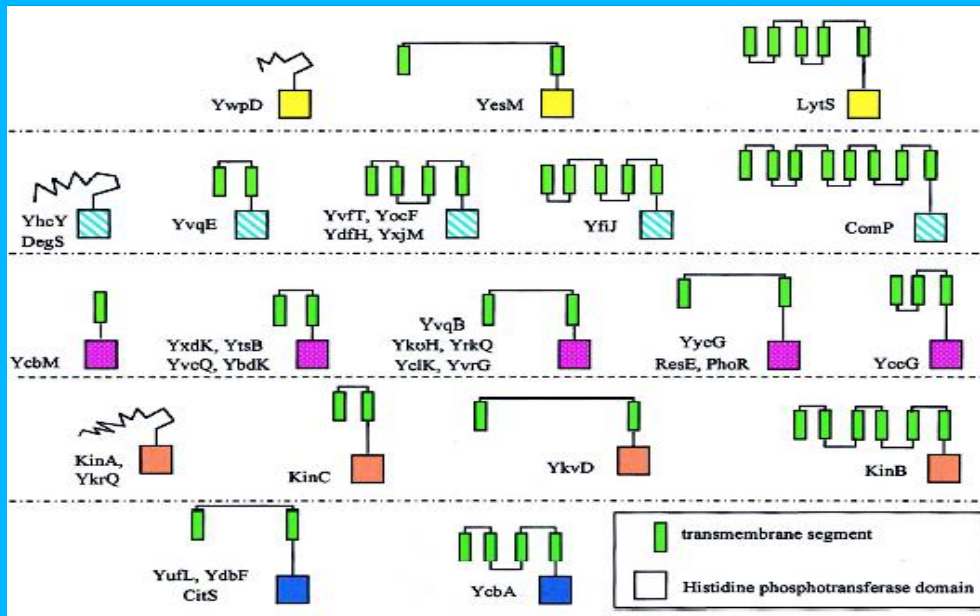


Fig. 8: Clasificación de los 35 sistemas de dos componentes de *B. subtilis* basados en la homología de secuencia de la región circundante de la histidina fosforilable. DesK (YocF) integra el grupo II según este criterio, mientras que su regulador de respuesta DesR (YocG) pertenece a la familia de los reguladores de respuesta con el “output domain” homólogo al de NarL. Las barras verdes indican los segmentos transmembrana, y los cuadrados, el dominio histidín-fosfotransferasa de cada una (Fabret et al, 1999).

diversidad de estímulos que son capaces de detectar; sin embargo, todas poseen un sitio de unión de ATP muy conservado en el denominado dominio catalítico.

Existe una clasificación de las histidin-quinasa basada en la arquitectura de sus dominios sensores (N-terminal), que las agrupa según sus aspectos funcionales correspondientes en 3 grupos (Hunger et al, 2004): i) Los sensores periplásmicos (o extracelulares), que incluyen proteínas con un dominio sensor extracelular (N-terminal) flanqueado de al menos 2 hélices transmembrana, y suelen ser aquellos adaptados para la señalización de solutos y nutrientes presentes en el medio. ii) Los sensores con mecanismos acoplados a la membrana, que pueden llegar a contener desde 2 hasta 20 regiones de hélices transmembrana organizadas en diversas formas; a diferencia del grupo anterior, éstas proteínas carecen de un dominio sensor extracelular, y son sensores adaptados para detectar estímulos que afectan las propiedades mecánicas de la membrana tales como stress mecánico, cambios bruscos de temperatura, turgencia, gradientes químicos, procesos de transporte o presencia de compuestos que afecten la integridad de la envoltura celular. DesK se incluye en éste grupo

de sensores, ya que detecta cambios en las propiedades físicas de la membrana ocasionados por el frío mediante una región transmembrana constituida por 5 hélices transmembrana. iii) Los sensores citoplasmáticos, que pueden encontrarse anclados a la membrana o solubles en el citosol, detectando la presencia de solutos citoplasmáticos y proteínas señalizadoras del estado metabólico o de desarrollo de la célula, como también del ciclo celular (Hunger et al, 2004; Mascher et al, 2006) .

Otra clasificación de las histidín-quinasa en *B. subtilis* agrupa los 35 SDCs existentes en 4 grupos, según la homología aminoacídica presente sobre la región que rodea la histidina fosforilable (caja H ó “H box”) (Fabret et al, 1999). Estas 4 clases de histidín-quinasa pueden correlacionarse con sus reguladores de respuesta, basados en la homología que existe entre los “output domain” de los reguladores de respuesta de *B. subtilis* y *E. coli* (Fig. 8); de acuerdo a esta clasificación, las histidina-quinasa del grupo DesK pertenecen a la clase de histidina-quinasa que se relacionan con reguladores de respuesta tipo NarL; en otras palabras, puede decirse que DesR es un regulador de respuesta del tipo NarL (Fabret et al, 1999).

Basándose en la arquitectura modular de sus dominios funcionales, las histidina-quinasa han sido clasificadas en dos clases: 1) Las de Clase I, que representan la mayoría, están organizadas típicamente por un dominio sensor N-terminal, muy variable y que puede contener hasta más de 500 aminoácidos, y un dominio transmisor C-terminal de aproximadamente 250 aminoácidos; este último posee secuencias motivo altamente conservadas, conocidas como “cajas” H, N, G1, F y G2 (Foussard et al, 2001; Dutta et al, 1999; Marina et al, 2005). Por ejemplo, en el sensor osmótico EnvZ (la histidina-quinasa del sistema de dos componentes EnvZ-OmpR de *E. coli*, considerada como modelo de las histidina-quinasa de Clase I) la caja H se ubica en el extremo N-terminal del dominio transmisor y contiene a la histidina fosforilable conservada. Debido a que las histidina-quinasa actúan en forma de dímero, el dominio de dimerización conteniendo la región H ha sido denominado “dominio de dimerización y fosfotransferencia a histidina” (“DHp: Dimerization and histidine-phosphotransfer domain”) Por otro lado, las cajas N, G1, F y G2, presentan homologías de secuencia y de estructura típicas del dominio de unión a ATP (“ATP binding domain”) formando parte del dominio catalítico de las histidina-quinasa e involucrados en la unión, hidrólisis y transferencia de un grupo fosfato sobre el imidazol de la histidina fosforilable (Wolanin et al, 2002; Korchid & Ikuro, 2006). Análisis de

homología más precisos del dominio de unión a ATP, muestran similitudes estructurales de ese dominio con el dominio de unión a ATP de proteínas tipo topoisomerasa II (GyrB, que

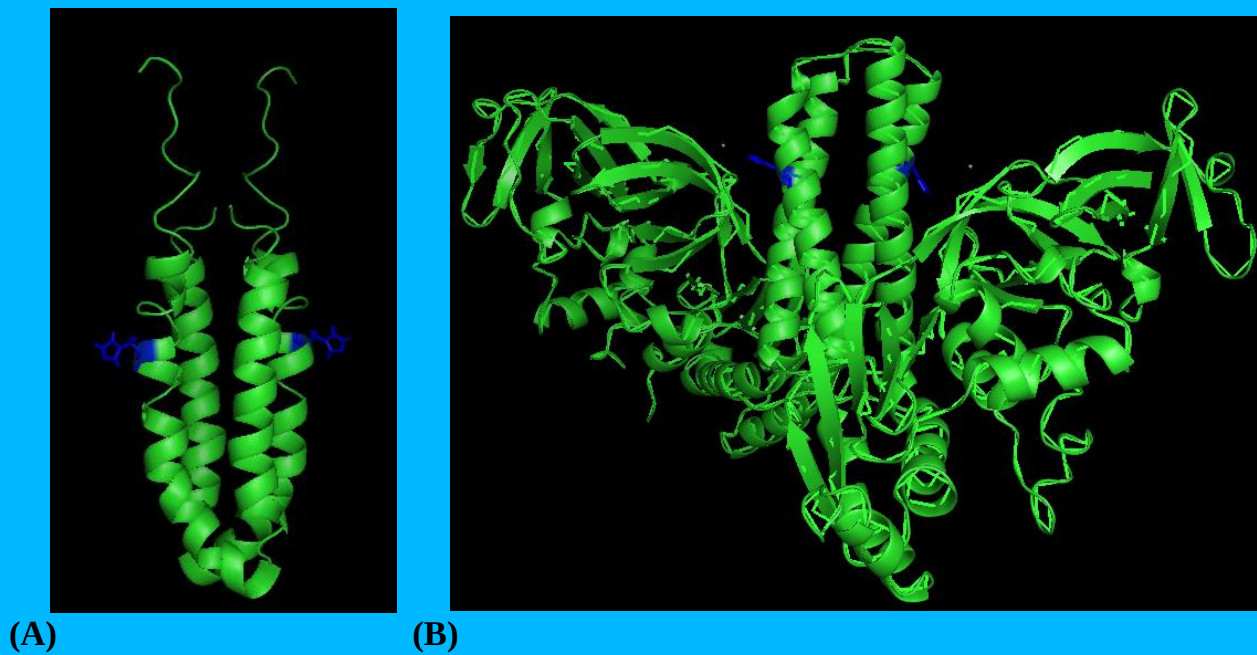


Fig. 9: (A) Estructura dimérica de la región N-terminal del “transmitter domain” de la histidín-quinasa de clase I EnvZ; en azul se muestra la histidina fosforilable de cada monómero. (B) Estructura del homodímero de la histidín quinasa de clase II CheA. En azul se muestra la histidina fosforilable, que a diferencia que EnvZ, se ubica en el extremo N-terminal de la proteína. Nótese la similitud estructural del “four-helix bundle” de ésta región, similar al “transmitter domain” de EnvZ (realizado en PyMOL, éste trabajo).

genera superenrollamiento negativo sobre el ADN, véase anteriormente, pp. 8), MutL y Hsp90 (Wolanin et al, 2002; Foussard et al, 2001). Algunas histidín-quinasas poseen además dominios o regiones de unión (“linker domains”) entre los dominios sensores y los dominios transmisores, que actúan como transductores de las señales, ubicándose inmediatamente en el extremo C-terminal de los dominios transmembrana; ejemplos de éstos dominios son los dominios PAS, dominio HAMP y dominio tipo P (Hulko et al, 2006; Aravind & Ponting, 1999; Hoch, 2000; Korchid & Ikura, 2006; Szurmant et al, 2007) ;

2) Las histidina-quinasas de Clase II contienen el residuo de histidina distante del dominio transmisor, más precisamente en el extremo N-terminal de la proteína (dominio P1) (Foussard et al, 2001). Estas quinasas contienen además dominios insertos que cumplen roles específicos, como unión del regulador de respuesta o actividad regulatoria de la quinasa. Un clásico ejemplo de histidina-quinasas de Clase II es la proteína involucrada en

la respuesta quimiotáctica CheA (McEvoy et al, 1998). Esta proteína es multimodular, y contiene un dominio de fosfotransferencia conteniendo la histidina fosforilable (“HPt-histidine containing phosphotransfer domain”), seguido de un dominio de unión al regulador de respuesta; luego le sigue el dominio transmisor que consiste únicamente en el dominio de unión a ATP, y en el extremo C-terminal de la proteína contiene un dominio regulatorio. La histidina-quinasa CheA puede fosforilar a dos proteínas reguladoras de respuesta, CheY y CheB; CheY funciona como un interruptor dependiente de fosforilación en la respuesta de excitación, mientras que CheB es una metilesterasa involucrada en la atenuación de la respuesta (McEvoy et al, 1998).

Dentro de la gran variedad de organización y combinación de dominios en los sistemas de dos componentes, existe un grupo de proteínas-quinasas denominadas “híbridas” que contienen además de los dominios comunes, un dominio receptor (“receiver domain”) con el aspartato fosforilable fusionado en el extremo C-terminal, a diferencia de lo que ocurre generalmente, donde el dominio receptor es codificado por la región N-terminal del regulador de respuesta (Stock et al, 2000; Wolanin et al, 2002). Estas proteínas actúan mediante circuitos de fosfotransferencia de varios pasos, a través de una proteína intermediaria (que puede ser soluble o consistir de un módulo más fusionado al extremo C-terminal de la quinasa híbrida) conteniendo un dominio de histidina-fosfotransferencia (HPt) (Stock et al, 2000). Esta proteína o unidad de fosfotransferencia es quien finalmente activa al regulador de respuesta que porta el dominio efector, mediante fosforilación. Una de las quinasas más representativas de las quinasas híbridas es ArcB del sistema Arc de *E. coli*, capaz de responder ante condiciones de aerobiosis específicas. ArcB es una quinasa híbrida que posee fusionado en el extremo C-terminal un dominio similar al dominio receptor de los reguladores de respuesta, portando un aspartato fosforilable, seguido de un

(A)

(B)

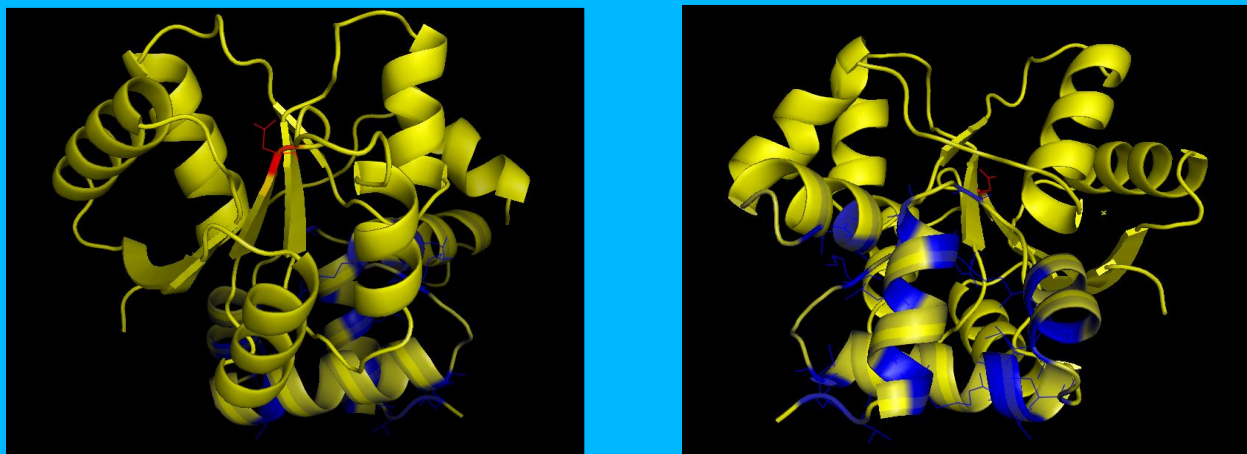


Fig. 10: Estructura tridimensional del regulador de respuesta NarL de *E. coli*. En **(A)** se muestra el dominio receptor (“receiver domain”), con el aspartato fosforilable marcado en rojo. En **(B)** se muestra el dominio de unión al ADN (“output domain”); en azul se resaltan los aminoácidos homólogos con DesR (realizado en PyMOL, éste trabajo).

dominio Hpt, la que finalmente es capaz de fosforilar un aspartato fosforilable del regulador de respuesta ArcA, y así activar su dominio efector (Stock et al, 2000).

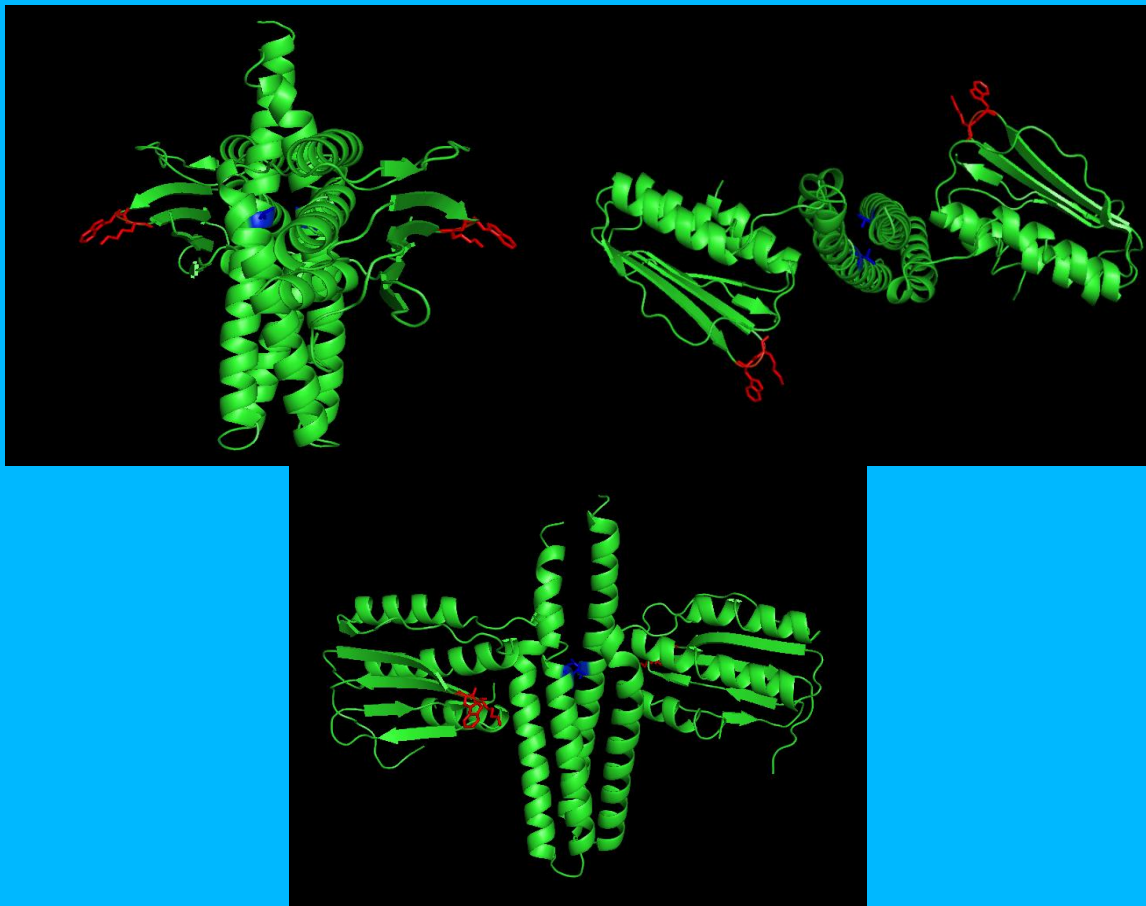
Estructura molecular de la histidin-quinasa DesK

Numerosos experimentos han sido realizados con la finalidad de comprender los mecanismos funcionales de los dominios de DesK, ya sea en la percepción de los cambios de la fluidez de la membrana o en la regulación de las actividades quinasa/fosfatasa (Aguilaret al, 2001; Albanesi et al, 2004; Hunger et al, 2004). DesK es capaz de actuar como quinasa o fosfatasa de su regulador de respuesta DesR según el estado físico de la membrana, y se ha demostrado que la porción citoplasmática, expresada en ausencia de la región transmembrana, es capaz de inducir la expresión del gen *des* de una manera independiente de la temperatura (Hunger et al, 2004; Albanesi et al, 2004), lo cual es una clara evidencia de que la regulación de la actividad quinasa/fosfatasa de DesK está mediada por su región transmembrana, capaz de detectar directamente los cambios conformacionales de la membrana plasmática ocasionados por el descenso brusco de la temperatura. Si bien el mecanismo molecular de este dominio sensor N-terminal no ha sido dilucidado por completo, se piensa que la región transmembrana de DesK consiste en 4 ó 5 segmentos transmembrana de los cuales uno ó más estarían implicados en la propagación de los

cambios ocurridos sobre en la membrana (Cybulski et al, 2002; Mascher et al, 2006).

Como vimos anteriormente, las histidina-quinasas pueden poseer además un dominio de unión que conecta el dominio transmembrana con el dominio transmisor citoplasmático. Este dominio de unión comienza a partir del último segmento transmembrana y se extiende hasta la caja H. Debido a que su longitud es muy variable entre distintas histidina-quinasas, es posible clasificarlas en tres amplios grupos según su longitud: a) menores de 40 aa; b) entre 60 y 80 aa; c) entre 130 y 170 aa (Fabret et al, 1999). Precisamente, DesK integra el grupo de los dominios de unión que poseen una extensión menor de 40 aa, careciendo del dominio HAMP, PAS, u otros más difundidos.

La dilucidación de la estructura tridimensional de la porción citoplasmática de DesK (DesKC) “wild type” (salvaje) y el mutante puntual DesKC-H188V mediante cristalografía



de rayos X (Albanesi et al., 2008, enviado para publicación), ha esclarecido la organización en el espacio que mantienen los distintos módulos citoplasmáticos de ésta histidina-quinasa

Fig. 11: Modelo estructural del homodímero de la porción citoplasmática entera (“transmitter domain”) del mutante DesKC-H188V, visto en distintas perspectivas. Cada monómero está formado por un dominio DHp

y un dominio de unión a ATP. En azul se muestra el aa valina 188 ocupando la posición de la histidina autofosforilable; en rojo se muestran los aa triptófano 311 y lisina 312, involucrados en la formación de contactos intermoleculares en el empaquetamiento cristalino (explicado en el texto) (realizado en PyMOL, éste trabajo).

(Fig.11). La histidina fosforilable se ubica en el dominio de dimerización central e histidina-fosfotransferencia (DHp), al igual que en las histidina-quinasa de clase I. Por otro lado, los dominios de unión a ATP (extremo C-terminal de cada monómero), adoptan una disposición “perpendicular” al “four-helix bundle” en el homodímero, precisamente a la altura de la histidina fosforilable. En el caso que la proteína adopte tal conformación *in vivo*, es posible que esta disposición y proximidad de los dominios de unión a ATP sobre la histidina autofosforilable sea importante para una adecuada transferencia del grupo fosfato desde el dominio de unión a ATP al dominio de dimerización e histidina-fosfotransferencia.

Sin embargo, existen dudas con respecto a si DesK efectivamente adopta esa conformación *in vivo*, o si se trata simplemente de una conformación que adoptan los dímeros en el sentido de lograr un adecuado empaquetamiento en las celdas cristalinas durante la cristalización (artefacto de cristalización), ya que la estructura fue dilucidada mediante cristalografía de rayos X. La duda deriva de la existencia de una interacción intermolecular muy estrecha entre 2 residuos del dominio de unión a ATP (W311 y K312) de un monómero, con el “four-helix bundle” de un dímero vecino (Fig. 11 y 12). El extremo acercamiento de éste par de residuos sobre las hélices del “four-helix bundle” podría estar demostrando una interacción de mucha energía, estable, capaz de inducir una rigidificación de la proteína que imposibilita al dominio de unión de ATP tanto catalizar la hidrólisis del nucleótido como transferir un grupo fosfato sobre la H188 (Albanesi et al., 2008, artículo enviado para publicación).

Aún resta por dilucidarse la estructura tridimensional del dominio sensor transmembrana de DesK. Una de las principales limitantes para la utilización de cristalografía de rayos X en este sentido, reside en la dificultad que existe para cristalizar proteínas transmembrana con regiones hidrofóbicas (Loll, 2003).



Fig. 12: Empaquetamiento cristalino de DesKC-H188V; nótese como los residuos W311 y K312 (en rojo) interactúan de manera estrecha con el “four-helix bundle” de un homodímero vecino (realizado en PyMOL, éste trabajo).

Hipótesis y Objetivos

Como vimos anteriormente, los recientes resultados obtenidos en el laboratorio donde realizo este trabajo especial permitieron resolver las estructuras tridimensionales de la región citoplasmática entera (“transmitter domain”) DesKC de las proteínas DesK-wt (salvaje) y el mutante DesK-H188V (DesKC-V188 de ahora en más), usando técnicas de difracción de rayos X (Albanesi et al., 2008, enviado para publicación). Debido a que DesKC-V188 incluye una mutación puntual en el sitio clave de fosforilación de proteína, a pesar de lo cual muestra una actividad fosfatasa específica sobre DesR idéntica a DesKwt, tanto *in vitro* como *in vivo* (Albanesi, et al. 2004), fue por ello tomado como modelo de un estado fosfatasa+/quinasa-, de importancia para entender los fundamentos moleculares de la transmisión de información en el curso del ciclo regulatorio fisiológico (recuérdese que DesK adopta el estado de fosfatasa para regular negativamente la expresión del gen *des*,

véase anteriormente pág. 16). Entre otras diferencias significativas al comparar las estructuras 3D de DesKC-wt (pdb 3EHF HPUB ‘hold for publication’) y DesKC-V188 (3EHH HPUB), la mutación H188V genera una rigidificación de la estructura disparando un reordenamiento de residuos que bloquean a los dominios catalíticos a una distancia grande del dominio DHp central e inhibiendo así la autofosforilación (Albanesi et al. enviado para publicación). Dado que DesKC-V188 ha sido cristalizada en dos grupos de espacio (ortorrómbico $P2_12_12_1$ y monoclinico $P2_1$), estos resultaron ser variantes de un mismo empaquetamiento cristalino, lo cual es una fuente de duda en cuanto a la validez de las conclusiones, pues la rigidez observada en DesKC-V188 podría ser un artefacto de la cristalización. Dicho de otra manera, la falta de movilidad de los dominios catalíticos podría ser debida fundamentalmente a las fuerzas intermoleculares de proteínas vecinas en el cristal (Fig. 12), y no a los reordenamientos de residuos observados en los dominios de la proteína ocasionados simplemente por la mutación H188V. Si bien contamos con otras fuentes de evidencia experimental que apoyan nuestra hipótesis actual de que esta rigidez es genuina y existe efectivamente en la proteína en solución (por ej. datos de radio de giro hidrodinámico aparente, observado por cromatografía analítica de exclusión por tamaño, resultados no mostrados, o también resultados de mutagénesis de otros equipos de investigación, ver Marina et al., 2005), la obtención de otras formas cristalinas de DesKC-V188 permitirían dar con un resultado directo y concluyente. El análisis de los empaquetamientos cristalinos de DesKC-V188 en sus variantes ortorrómbica y monoclinica, muestra la importancia clave de los residuos triptófano 311 y lisina 312, que permiten a un dímero interaccionar con el vecino en el contexto del cristal (Fig. 12). Este trabajo propone entonces, como objetivo general, demostrar que el mutante DesKC-V188 y un mutante DesKC-V188 que lleva además los residuos críticos modificados (DesKC-H188V/W311G/K312S, al cual llamaremos DesKC-WKV de ahora en más) presentan empaquetamientos cristalinos distintos. Para ello, establecimos como objetivos específicos:

- 1) Producir la proteína recombinante DesKC-WKV en un sistema de expresión procariota, y purificarla mediante técnicas cromatográficas;
- 2) Efectuar ensayos comparativos de cristalogenésis, en las condiciones de cristalización conocidas para DesKC-V188, entre dicho mutante DesKC-V188 y DesKC-WKV;
- 3) Encontrar condiciones de cristalización para DesKC-WKV mediante un método de

rastreo factorial ralo;

4) Optimizar los cristales de DesKC-WKV que eventualmente identifiquemos;

5) Demostrar por difracción de rayos X sobre cristal único, que el grupo de espacio y parámetros de celda del cristal de DesKC-WKV es distinto al de DesKC-V188.

Materiales y métodos

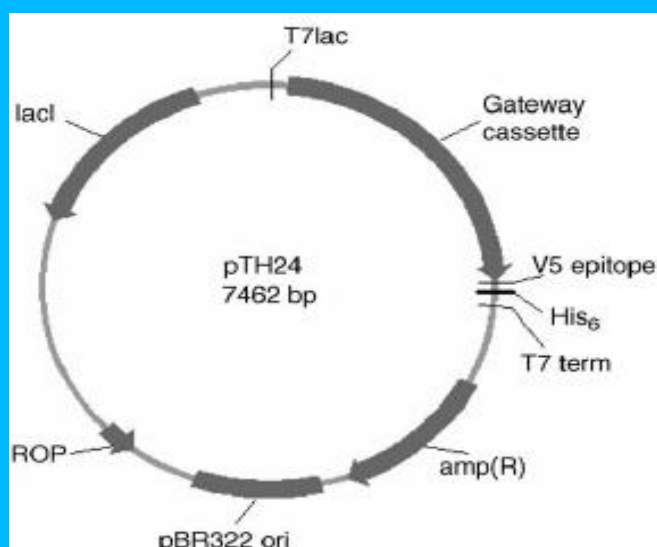
Producción y purificación de la proteasa TEV recombinante

Producción de la proteína TEV

Cultivo para inducción

Varios clones de bacterias *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS portando el vector pTH24 (Fig.13A) con la secuencia génica codificante para la proteasa TEV (del ‘tobacco etch virus’) (Fig.13B), fueron inoculados en 30 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (15 µg/ml), y cultivados a 37 °C, 220 rpm, 14 horas (van der Berg et al, 2006).

(A)



(B)

geslfkgprdynpisstichltnesdghttslygigfgpfiiitnkhlfrrnngtllvqslhgvfkvknnttlqqh
lidgrdmiiirmpkdfppfpqklkfrepqreericlvttnfqtksmssmvdsctfpssdgifwkhwiq
tkdgqcgsplystrdgfivgihsasnftntnnyftsvpknfmelltnqeaqqwvsgwrlnadsvlwggghk
vfmskpeepfqpvkeatqlmnelvysq

Fig.13: (A) Plásmido pTH24 portadora del gen codificante de la proteasa TEV (gateway cassette), cuya expresión está regulada bajo el control del promotor del fago T7lac inducible por IPTG. (B) Secuencia de la proteasa recombinante TEV (241 aminoácidos); no se muestra la cola de histidinas en el extremo C-terminal.

Inducción

10 ml de cultivo fueron inoculados en 2 litros de medio 2xYT con carbenicilina (50 µg/ml), cultivados a 37 °C, 220 rpm, hasta alcanzar DO₆₀₀ 0.7-0.9. Se agregó luego 1mM IPTG y se incubó por 20 horas a 37 °C, 240 rpm. Culminada la inducción, los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm, 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el PT (“pellet”) guardado a -80 °C (van der Berg et al, 2006).

Purificación de la proteína TEV

Lisis de las bacterias

Las bacterias se resuspendieron a razón de 1 gr en 5 ml de buffer de lisis (50 mM fosfato de sodio pH 7, 0.3M NaCl, inhibidores de proteasa EDTA-free (Roche), lisozima de clara de huevo de gallina (1 mg/ml)), e incubado ~20 minutos a temperatura ambiente. El lisado se sonicó con 10 pulsos de 15 segundos, 35% de amplitud con intervalos de 30 segundos, manteniendo la preparación en hielo. Se centrifugó 1 hora a 15000 rpm, 4° C. La fracción soluble fue filtrada con filtro de 0,45 µm, y la fracción insoluble (pellet) fue resuspendida en 8M urea para análisis posterior por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)

Se utilizó una columna His-Trap (GE Healthcare) de 1 ml, cargada con Ni²⁺, previamente lavada con agua pura y equilibrada con 10 ml de buffer A (fosfato de sodio pH7 50 mM, NaCl 0.3 M, imidazol 20 mM). Se sembraron 50 ml de lisado (1 ml/min). La elución de TEV se llevó a cabo en un instrumento LKB (Pharmacia) de cromatografía líquida, con un gradiente lineal de buffer A y buffer B (fosfato de sodio pH7 50mM, NaCl 0.3M, imidazol 0.5M) de 0 a 100% de B en 30ml a 1ml/min (Coligan et al, 2007; Affinity Chromatography Handbook, 2007; The Recombinant Protein Handbook, 2000; Recombinant Protein Purification Handbook, 2006; Protein Purification Handbook, 2001) .

Diálisis

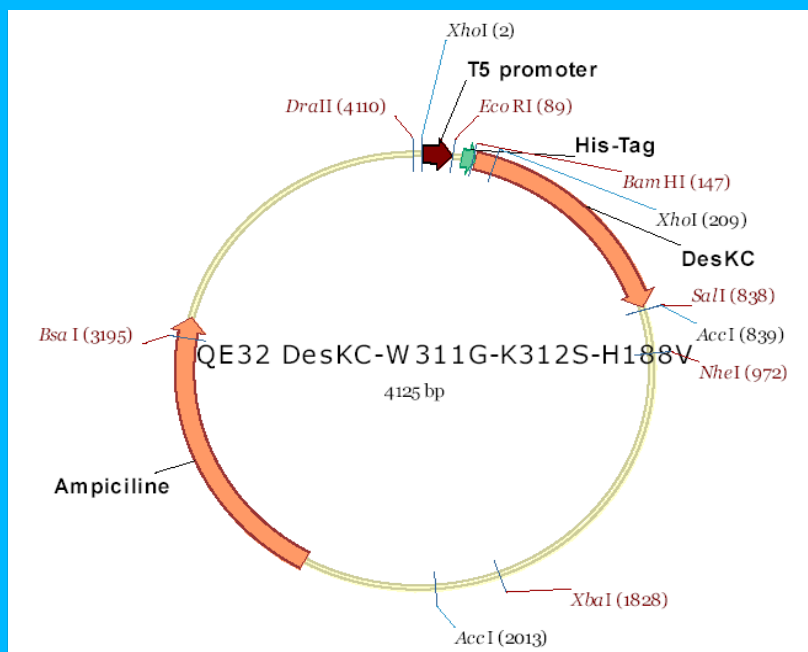
A la proteína eluída de IMAC se le incorporó EDTA 2mM y DTT 10mM. Se dializó luego en 2 pasos contra 100X volúmenes de buffer de diálisis (fosfato de sodio pH7 25 mM, NaCl 0.2M , EDTA 2mM, DTT 2mM, glicerol 10%) con una membrana Amicon, cut-off 6-8 kDa, en 1,5 litros de buffer de diálisis por cada paso. La primer diálisis se realizó durante 14 horas a 4 °C con agitación suave. La segunda diálisis se realizó durante 2 horas suplementarias. Finalmente, se filtró con filtro de 0,22 µm para hacer alícuotas y guardar a -80° C (van der Berg et al, 2006).

Producción de la proteína recombinante DesKC-WKV

Transformación de células competentes

Para la producción de la proteína recombinante DesKC-WKV, células *E.coli* M15 fueron transformadas con ~1 ng de plásmido pQE32 (Fig.14A) portando la secuencia génica codificante de la región citoplasmática de la proteína mutante DesKC-WKV (fig.14B) mediante electroporación (500 mV, 0.8 mA)(Sambrook et al, 1989).

(A)



(B)

MRGSHHHHHHHGIHMENLYFQGRKERERLEEKLEDANERIAELVKLEERQRIARDLVDT
LGQKLSLIGLKSDLARKLIYKDPEQAARELKSVQQTARTSLNEVRKIVSSSMKGIRLKDELI
NIKQILEAADIMFIYEEEEKWPENISLLNENILSMCLKEAVTNVVKHSQAKTCRVDIQQLS
EVVITVSDDGTFKGEENSFSKGGHLLGMRERLEFANGSLHIDTENGTKLTMAIPNNSK

Fig. 14: (A) Plásmido pQE32 portadora del gen codificante de la región citoplasmática de DesK (DesKC) con las 3 mutaciones en sus respectivos sitios (H188V, W311G, K312S); la expresión recombinante está regulada por el promotor T5 inducible por IPTG (B) Secuencia de DesKC-WKV, donde se muestra en el extremo amino terminal la cola de histidinas y el sitio de corte para TEV (negrita); los residuos mutados se muestran en azul (V188), rojo (G311) y amarillo (S312).

Plaqueo de células competentes

Las células transformadas fueron resuspendidas en 1 ml de medio LB e incubadas una hora a 37 °C, 220 rpm. 100 µl de cultivo fueron dispensados sobre placas de LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) y cultivadas a 37 °C, 15 horas. Posteriormente, las placas fueron guardadas a 4 °C.

Inducción

Se resuspendieron bacterias provenientes de varias colonias crecidas sobre placa LB-agar, en 15 ml de medio LB (líquido) con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (10 µg/ml), y se cultivó a 37 °C, 220 rpm, 14 horas. 10 ml de cultivo fueron incorporados en 1 litro de medio de cultivo 2xYT con ampicilina (100 µg/ml) y cultivados a 37 °C, 240 rpm, hasta alcanzar DO₆₀₀ 0.7-0.9. Se agregó luego 0.5mM IPTG, y se incubó 4 horas a 37 °C, 240 rpm. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos a 4 °C; el sobrenadante fue descartado, y el PT guardado a -80 °C.

Purificación de la proteína DesKC-WKV

Lisis de las bacterias

Las bacterias se resuspendieron a razón de 1g en 5ml de buffer de lisis (Tris.HCl pH8 50mM, NaCl 0.5M, inhibidores de proteasa EDTA-free (Roche), lisozima (1 mg/ml)) durante 20 minutos a temperatura ambiente. El lisado fue sonicado con 6 pulsos de 10 segundos, 35 % de amplitud, con intervalos de detención de 30 segundos, hasta perder viscosidad. Se incorporó 1% Tritón X100 y se centrifugó a 15000 rpm durante 1 hora a 4°C. La fracción soluble se filtró con filtro de 0,45 µm, y el PT resuspendido en 8M urea para guardar alícuotas a fines analíticos.

1^{ra} Cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)

Se utilizó una columna His-Trap de 1 ml, incorporando Ni²⁺ como metal de afinidad. La columna fue equilibrada con 10 ml de buffer A (Tris.HCl pH8 50 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 20mM). Se sembró el extracto a temperatura ambiente, a un flujo de 1 ml/min. DesKC-WKV fue eluída con un gradiente lineal de buffer A y buffer B (Tris.HCl pH8 50 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500mM), de 0 a 100% de B en 30 volúmenes de columna a 1ml/min (Coligan et al, 2007; Affinity Chromatography Handbook, 2007; The Recombinant Protein Handbook, 2000; Recombinant Protein Purification Handbook, 2006).

Diálisis

Se agregó 1/40 w/w de proteasa TEV purificada a DesKC-WKV eluída de la primer IMAC. Se dializó luego en 2 pasos con una membrana Amicon, cut-off 6-8 kDa, contra 1 litro de buffer de diálisis (Tris.HCl pH8 50mM, NaCl 0,3M, DTT 0.5mM, glicerol 10%) en cada paso. La primer diálisis se realizó durante 2 horas a 20° C; la segunda diálisis se realizó durante 14 horas a 20 °C con agitación suave.

2^a IMAC

Para separar la proteasa TEV, se llevó a cabo una segunda IMAC utilizando otra columna His-Trap con Ni²⁺. Los 25 ml del producto de la diálisis, se filtraron con un filtro de 0.22µm, y se sembraron en la columna a 1ml/min. El eluato de fracciones no unidas conteniendo DesKC-WKV sin tag de histidinas, fue conservado. TEV se eluyó de la columna en un paso con 0.5M imidazol.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC – Size Exclusion Chromatography)

Para la cromatografía de exclusión molecular (gel-filtración), se utilizó una columna Superdex 75 pg Hiloal 26/60 (GE Healthcare) conectada a un cromatógrafo líquido ÄKTA Purifier (GE Healthcare). La columna fue pré-equilibrada con tres volúmenes de columna, de buffer Tris.HCl pH8 50mM, NaCl 0.3M, DTT 0.5mM, a 1 ml/min. El eluato de las fracciones no unidas de la segunda IMAC se concentró utilizando un centricon de 20 ml, “cut-off” 30 kDa, centrifugando a 5000 g hasta llegar a volúmenes inferiores a 5ml. Se inyectó la muestra, y se fraccionó la elución de a 1ml en una placa de 96 pocillos. De acuerdo al cromatograma, las fracciones correspondientes al pico de DesKC-WKV se juntaron y se concentró en un centricon de 5 ml, “cut-off” 30 kDa , a una velocidad de 5000 g a 4 °C, hasta alcanzar una concentración final de ~8-10 mg/ml, para alicuotar y guardar a -80° C (Coligan et al, 2007; Gel-filtration Handbook).

Estudios cristalográficos de DesKC-WKV

Experimentos de cristalización con DesKC-V188 y DesKC-WKV

Ensayos de cristalización con DesKC-V188 y DesKC-WKV (en condiciones de cristalización de DesKC-V188)

Los ensayos de cristalización se realizaron mediante el método de difusión de vapor en gota colgante (Ng et al, 2003; Luft et al, 2003; Drenth, 2007; Messerschmidt, 2007) , en placas de 24 reservorios (VDX, Hampton Research). Se dispensó 1 ml de licor madre (condición de cristalización: PEG 3350 10%, glicerol 30%, CaCl₂ 0.2 M, bicina pH9 0.1M) en los reservorios. Se mezclaron 2 µl de DesKC-V188 (11 mg/ml) y 2 µl de licor madre, en un cubreobjetos siliconizado de 22mm, con el que se selló herméticamente el reservorio (con grasa o vaselina), de manera de dejar la gota colgando sobre el pocillo con líquido. El mismo procedimiento se repitió en pocillos separados con DesKC-WKV (9,77 mg/ml). Esto se hizo por sextuplicado.

Las proteínas habían sido previamente incubadas con ADP (5mM final de nucleótido, diluído previamente en Tris.HCl pH8.5 0.5M, para evitar la acidificación brusca de la proteína).

El mismo tipo de experimento fue repetido con las proteínas acomplejadas a ATP. Todo fue igual, excepto el licor madre: se eligió otra condición que había ya sido identificada para cristalizar el complejo DesKC-V188+ATP (PEG 8000 12%, glicerol 10%, KCl 0.5M).

Rastreo de solubilidad con DesKC-WKV

Se realizó un ensayo de solubilidad con DesKC-WKV para determinar concentraciones óptimas de proteína para lanzar rastreos de condiciones de cristalización (Izaak et al, 2006).

1^{er} ensayo de solubilidad: variación en la concentración de DesKC-WKV

DesKC-WKV se concentró hasta 48.5 mg/ml. Posteriormente, 37 µl de proteína fueron incubados con 2.6µl ATP 100mM y 2.6µl Tris.HCl pH8.5 1M, durante 10 minutos en hielo. El ensayo se llevó a cabo con el mismo licor madre en la cual cristalizó DesKC-V188 (PEG 8000 12%, glicerol 10%, KCl 0.5M) usando 1 ml de solución madre por pocillo. La proteína fue usada a 15 , 20 , 30 , 35 y 40 mg/ml, en buffer Tris.HCl pH8 50 mM, NaCl 0.3M. 2 µl de cada una de las concentraciones fueron mezcladas con 2 µl de licor madre para generar una gota de 4 µl, suspendida en el cubreobjetos siliconizado de acuerdo al formato de gota colgante ya descripto.

2º ensayo de solubilidad: variación en la concentración de agente precipitante (PEG)

El segundo ensayo de solubilidad se realizó variando la concentración de PEG 8000. La concentración de PEG 8000 fue variada entre 15% y 30% usando DesKC-WKV a 48.5 mg/ml. Los demás detalles técnicos fueron semejantes al primer ensayo descripto arriba.

Rastreo de condiciones de cristalización de DesKC-WKV

Concentración, cuantificación e incubación de DesKC-WKV con AMP-PCP

Para el rastreo de condiciones de cristalización, DesKC-WKV fue concentrada hasta 45 mg/ml en un concentrador de 1 ml (Vivaspin, Sigma), cut-off 5 KDa, a 14000g durante 20 minutos a 4° C, y se midió la concentración mediante espectrofotometría. Luego se incubaron 117,8 µl de proteína (57,3 mg/ml) con 10,5 µl de AMP-PCP (100 mM) + 5,25 µl Tris.HCl pH8 1M., 1,5 µl MgCl₂ 1M, 15 µl NaCl 0.3M + DTT 0.5mM durante 10 minutos en hielo.

Rastreo de condiciones de cristalización

La búsqueda de condiciones de cristalización para DesKC-WKV se llevó a cabo con un robot dispensador de líquidos (Honeybee963®, Genomic Solutions), utilizando los kits comerciales PEG Suite, AmSO₄ Suite, pHclear Suite y Classic L Suite (Qiagen), en placas de 96 reservorios (Greiner), con 90µl de cada condición por pocillo. Las placas Greiner utilizadas tienen el formato capaz de incluir 3 gotas de proteína por condición de cristalización. Se dispensaron gotas de 0,3 µl de DesKC-WKV (45 mg/ml) a las que se adicionó el mismo volumen de reservorio. Las placas fueron incubadas a 20° C, y visualizadas sistemáticamente según criterios convencionales (gota clara, separación de fases, aparición de precipitación, presencia/ausencia de cristales, hábito cristalino, etc) (Luft et al, 2003; DeLucas et al, 2003).

Optimización de los cristales de DesKC-WKV

A partir de una condición de cristalización del rastreo inicial en la cual crecieron cristales (bicina pH9 100 mM, NH₄SO₄ 2.4 M), se efectuó un nuevo screening con la finalidad de reproducir el crecimiento de cristales y optimizar su crecimiento. Para ello, se dispensó 1 ml de 6 nuevas soluciones madre en 6 reservorios de una placa de screening, donde se varió la concentración de NH₄SO₄ (1.8, 2, 2.2, 2.6, 2.8 y 3 M , respectivamente). Cada reservorio fue sellado con un cubreobjeto siliconizado portando sobre la cara interna al reservorio una gota de 4 µl, producto de la mezcla de una gota de 2 µl de solución madre del reservorio y una gota de 2 µl de proteína DesKC-WKV (45 mg/ml).

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo de 2 maneras distintas: 1) utilizando el reactivo de Bradford, tomando como curva standard una dilución seriada de albúmina sérica

bovina (2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml); 2) mediante espectrofotometría, utilizando cubetas de cuarzo de 100 µl de volumen mínimo. El coeficiente de extinción molar calculado para DesKC-WKV es $A_{280} = 0.345$.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se prepararon en general al 12% final de acrilamida en buffer Tris.HCl pH 8.8 0.1M, SDS 1%. La corrida electroforética se realizó a 180V, 18A. Las alícuotas fueron diluídas (en los casos necesarios) lo suficiente como para correr alrededor de 2 µg de proteína por carril, para lograr una buena visualización.

Resultados

Purificación de la proteasa TEV

Debido a que DesKC-WKV fue expresada fusionada a una cola de histidinas (His-tag) en su extremo N-terminal, era necesario producir y purificar la proteasa correspondiente al sitio específico de corte incluido en el vector de expresión (TEV, en este caso).

TEV fue expresada en forma recombinante fusionada a una cola de histidinas, aunque en su extremo C-terminal (figura 1, véase materiales y métodos). En la figura 15 se muestra el cromatograma correspondiente a la columna de afinidad a metal (iminodiacetic metal affinity chromatography IMAC) usada para purificar esta proteasa. El pico en el extremo izquierdo del perfil corresponde al lavado con 30 volúmenes de columna (30 ml) realizado con buffer A, con la finalidad de limpiar la columna de proteínas del extracto no unidas. La elución se logró por medio de un gradiente lineal de imidazol de 20mM a 500mM. TEV comenzó a eluir a una concentración de ~80 mM de imidazol, en un pico relativamente ancho (~18 ml), probablemente debido a la gran cantidad de proteína recombinante que rindió la preparación, así como al gradiente de baja pendiente usado.

Con fines analíticos, se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones solubles e insolubles de la inducción, así como de alícuotas correspondientes a las fracciones pre y post-columna (Figura 16A). En el carril donde se corrió una alícuota de la fracción

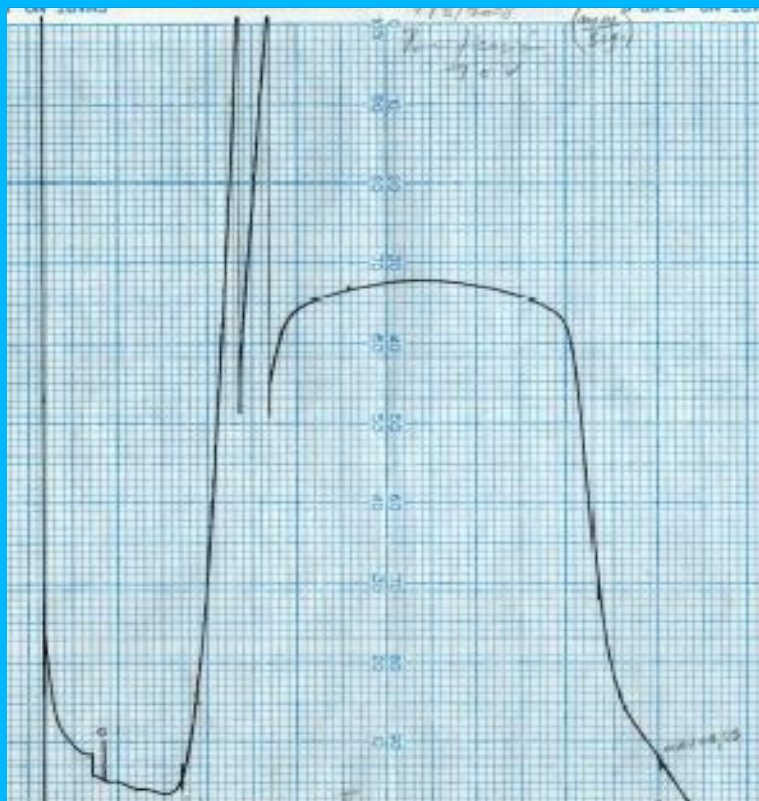


Fig.15 : Perfil de la IMAC de TEV. Los picos bruscos previos al tope de la campana se deben al cambio de escala que se realizó en el equipo para lograr una mejor visualización del perfil. La “G” indica el comienzo del gradiente de imidazol.

(A)

(B)

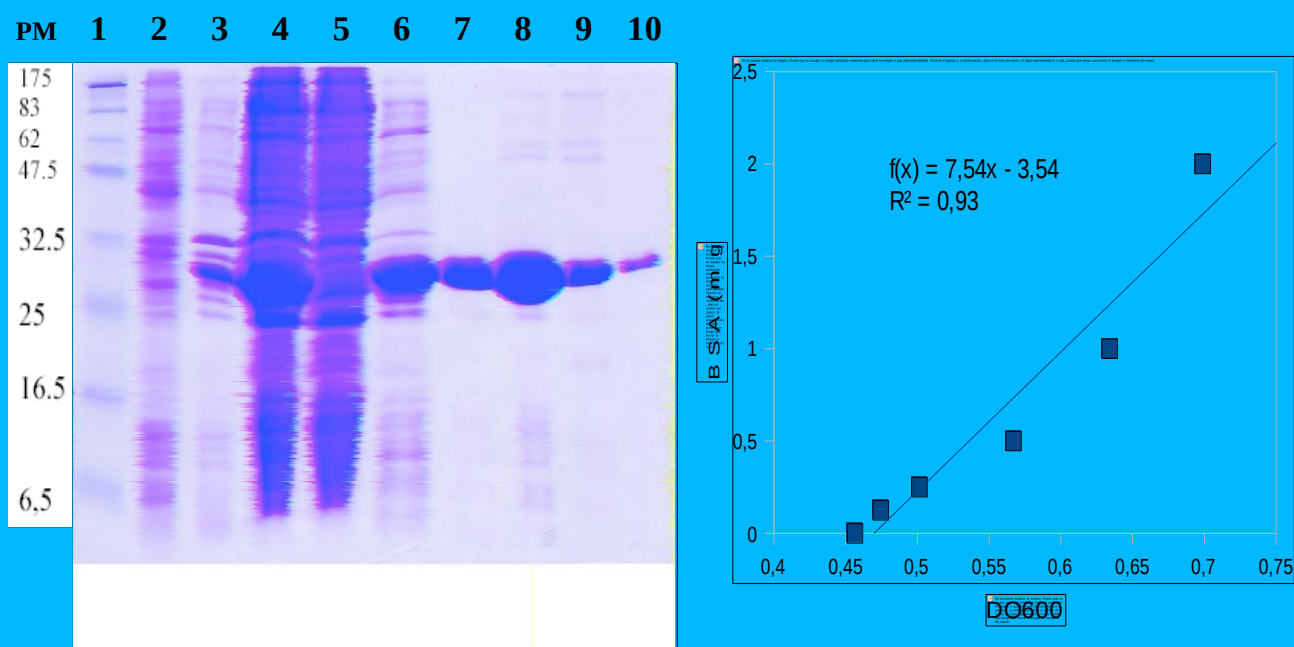


Fig.16: (A) Gel de poliacrilamida donde se corrieron alícuotas provenientes de los pasos de la purificación de TEV; los carriles corresponden a: 1-estándares de peso molecular conocido, 2-cultivo sin inducir, 3-fracción insoluble de la inducción, 4-fracción soluble, 5-post-columna (eluato de las fracciones no unidas) de la IMAC, 6-lavado a 4% de B y 7-10-fracciones 2, 3, 4 y 5 correspondientes al pico de elución, respectivamente. **(B)** Curva estándar para cuantificar TEV (BSA (mg/ml) vs. DO₆₀₀), realizada a partir de una dilución seriada de BSA.

soluble del extracto, aparece una fuerte banda de ~30 KDa que se corresponde con el peso esperado de TEV, y que no aparece en el carril de un cultivo blanco donde no se efectuó la inducción de la proteína recombinante. Este es un fuerte indicador de que la proteína fue efectivamente sobre-expresada en el cultivo inducido con IPTG, y que la misma es soluble. Si bien con este simple protocolo de purificación, TEV no está purificada a homogeneidad (se ven algunos contaminantes entre 50 y 100 KDa, y también algunas bandas de menos de 16,5 KDa, en los carriles donde se corrieron alícuotas del pico de elución de la IMAC) el uso que se le dará en etapas posteriores para cortar proteínas recombinantes de interés (DesKC-WKV en éste caso), implica una gran dilución de la proteasa. A su vez las proteínas cortadas son luego sometidas a posteriores pasos de purificación inmediatos. Es por ello que se juzga innecesario proceder a subsiguientes pasos de purificación de TEV. Finalmente, se cuantificó la concentración de TEV a través del método de Bradford. La figura 16B muestra la recta que mejor se ajusta a los puntos del gráfico BSA (mg/ml) vs. DO₆₀₀, la ecuación de dicha recta y el índice de correlación lineal. La cuantificación de TEV resultó en una DO de 0.605 (~1 mg/ml por extrapolación), dando una estimación de 11.8 mg de proteína en un volumen total de 11 ml, lo que se ajusta perfectamente a los rendimientos esperados.

Purificación de DesKC-WKV

Cromatografías de afinidad a níquel

A diferencia de la purificación de TEV, DesKC-WKV fué purificada en tres pasos, dos cromatografías por afinidad a níquel y una cromatografía por exclusión de tamaño (Figuras

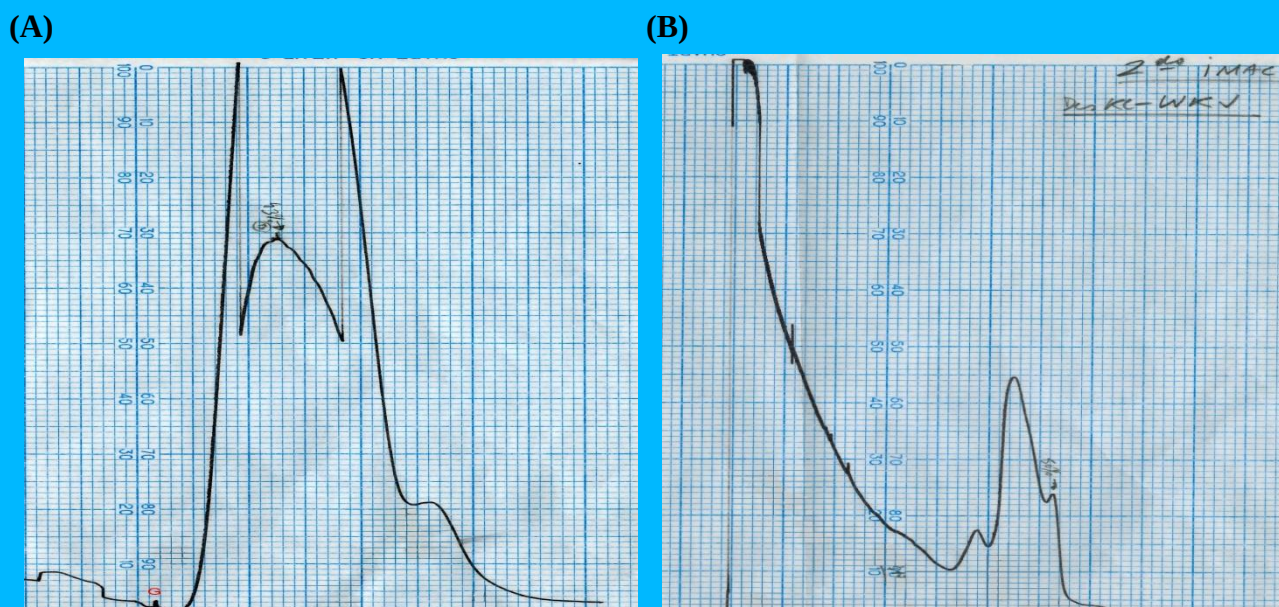


Fig. 17: Perfil de la primera (A) y segunda (B) IMAC de DesKC-WKV. La marca en rojo en (A) indica el inicio del gradiente de elución con imidazol; el cromatograma se encuentra cortado debido a un cambio de escala realizado en el LKB para poder visualizar el pico.

17 y 19). Luego de haber pasado el extracto por la primer columna de afinidad a níquel, el primer lavado a 20 mM de imidazol se hizo con una bomba peristáltica sin conexión a un lector de UV y por tanto, el pico correspondiente al lavado no aparece en el cromatograma.

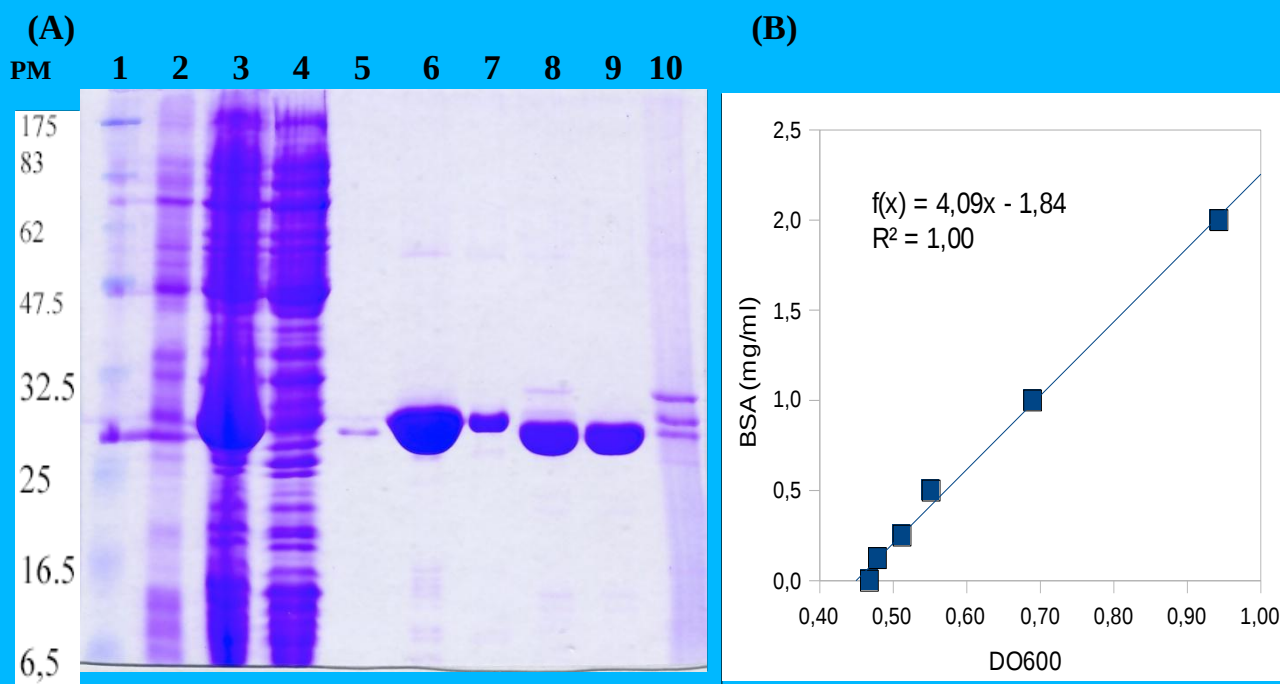


Fig. 18:(A) Gel de poliacrilamida donde se corrieron alícuotas de los pasos de purificación de DesKC-WKV. Los carriles corresponden a: 1-estándares de peso molecular conocido, 2-cultivo sin inducir, 3-fracción soluble de la 1° IMAC, 4-post-columna (eluato de las fracciones no unidas) de la 1° IMAC, 5-lavado a 4% de B de la 2° IMAC, 6 y 7- pico 2 y 3 de la elución de la 1° IMAC, respectivamente, 8-pre-columna de la 2° IMAC, 9-post-columna de la 2° IMAC, 10-pico de la elución de TEV. (B) Curva estándar para cuantificar DesKC-WKV (BSA (mg/ml) vs. DO600), realizada a partir de una dilución seriada de BSA para

medir la cantidad de proteína total post-gel-filtración.

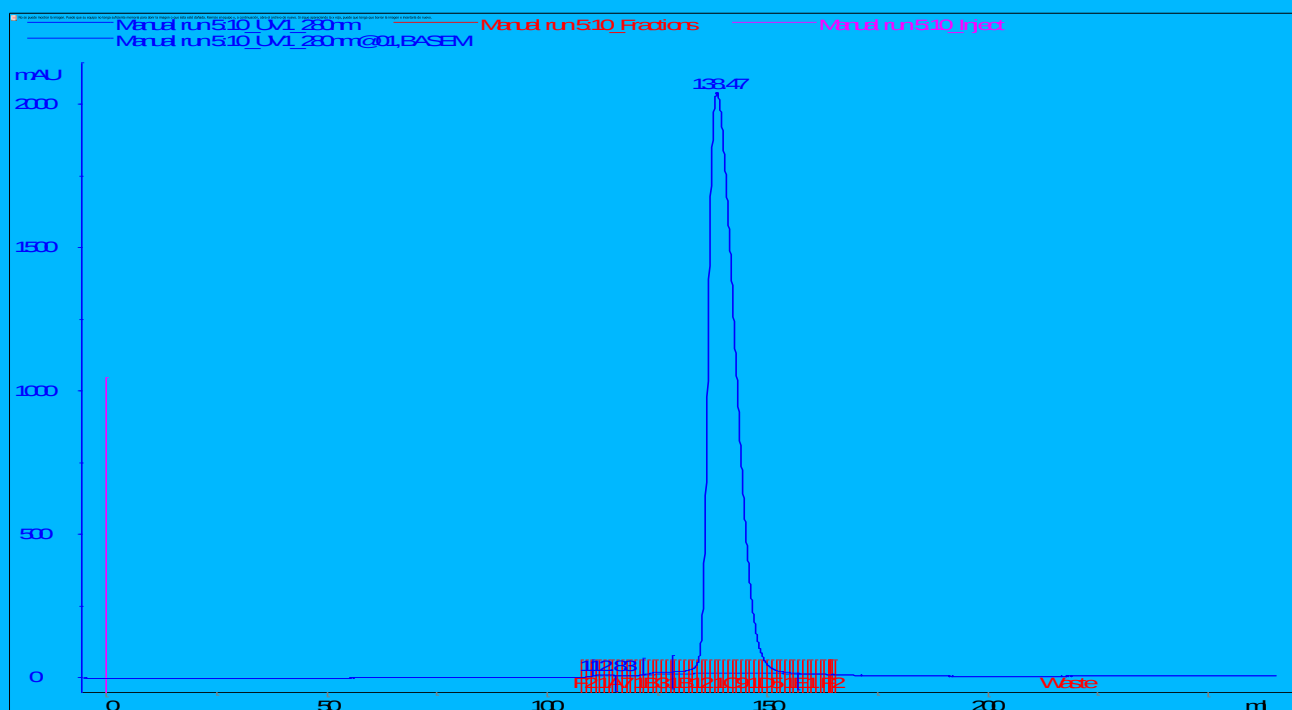
Una vez lanzado el gradiente lineal de imidazol de 20mM a 500 mM, DesKC-WKV comenzó a eluir a una concentración de 85 mM imidazol, alcanzando el máximo del pico (~1300 mAU) a 215 mM imidazol. La segunda columna IMAC fue realizada al día siguiente, luego de haber dializado en presencia de TEV, con el doble fin de disminuir la concentración de imidazol y simultáneamente cortar el tag de histidinas con la proteasa específica. La figura 17B muestra el perfil de esta IMAC. El eluato de las fracciones no unidas de ésta segunda IMAC fue recuperado, ya que contiene la fracción de DesKC-WKV que no posee el tag de histidinas.

La purificación de DesKC-WKV, se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida de las distintas fracciones alicuotadas (Fig.18A). Comparando el carril en el cual se corrió la fracción soluble del extracto con el carril blanco (sin inducir), se observa en el primero una intensa banda correspondiente a una proteína de peso molecular entre 25 y 32.5 KDa, tal como el peso esperado para un monómero de DesKC-WKV fusionado al tag de histidinas (~27.2 KDa). La misma banda aparece muy intensa en los carriles donde se corrió las fracciones del pico de la 1° IMAC. Luego, en los carriles donde se corrió el pre-columna y el eluato de las fracciones no unidas de la 2° IMAC la banda intensa se corresponde con un peso molecular apenas menor con la banda anterior (lo cual se corresponde con el peso molecular esperado de un monómero de DesKC-WKV sin el tag de histidinas (~25.6 KDa); en menor intensidad se observa esa misma banda en el pre-columna de la 2° IMAC, aunque en el eluato de las fracciones no unidas se observa únicamente la banda esperada. Finalmente, la banda superior que se muestra en el carril del pre-columna de la 2°IMAC y el gradiente de elución de TEV, se corresponde exactamente con el peso molecular de la proteasa TEV (~30 KDa).

Cromatografía de exclusión molecular (SEC - Size Exclusion Chromatography)

El eluato de las fracciones no unidas de la segunda columna IMAC se concentró hasta <5 ml para inyectarlos en una columna de gel filtración Superdex75 26/60. En la figura 5A se observa el cromatograma (A_{280} vs. Volumen de elución). DesKC-WKV alcanzó un máximo A_{280} ~2000 mAU a los 138.5 ml de volumen de retención (Fig. 19A), consistente con el peso molecular del dímero de DesKC-WKV (~25.7 KDa por monómero) de acuerdo a una calibración reciente esta columna (Fig. 19B).

(A)



(B)

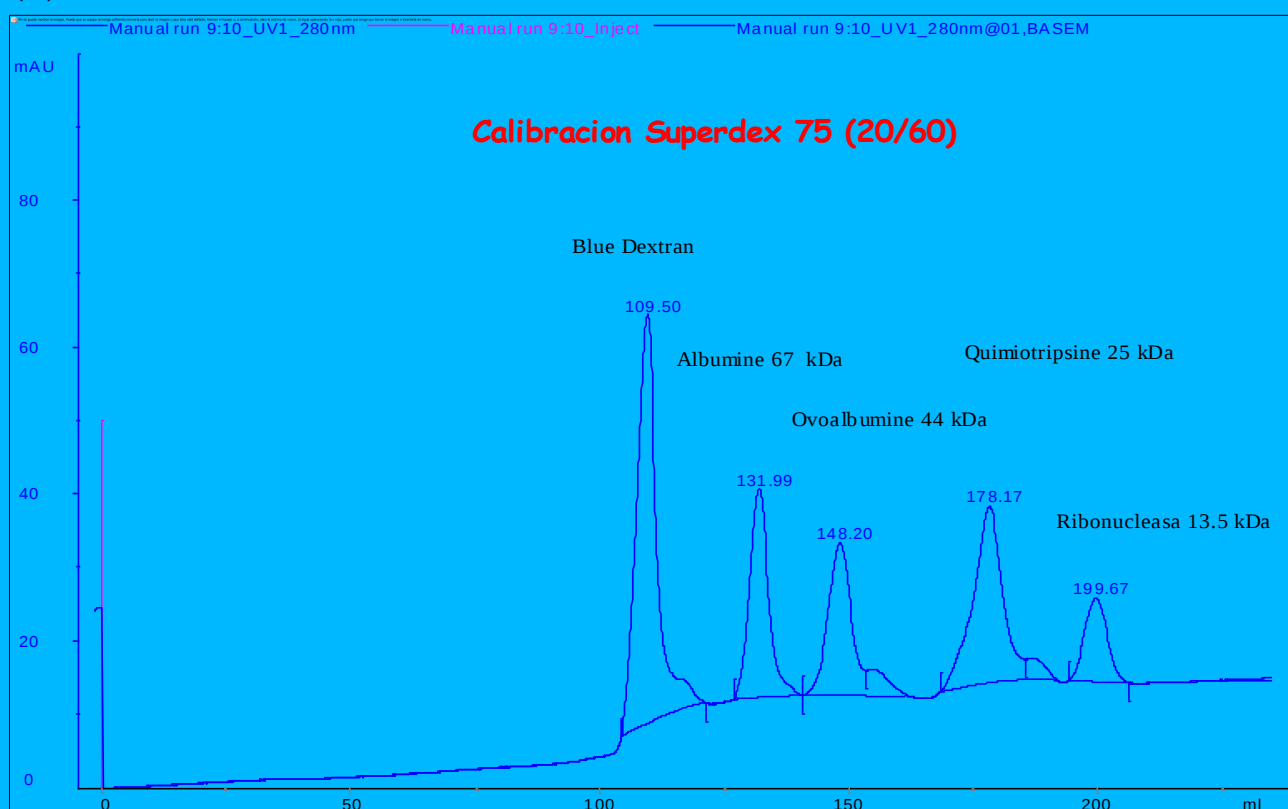


Fig. 19: (A) Perfil de la gel filtración (A_{280} vs. Vol. de elución) de DesKC-WKV; la línea vertical rosada a la izquierda indica la inyección de la proteína en el equipo; el pico alcanzó un máximo de aprox. $A_{280} = 2,0$ AU, correspondiente a un volumen de retención de 138.47 ml, y las líneas verticales rojas sobre el eje de elución corresponden a la recolección fraccionada de la elución, que se realizó entre los 110 ml y 163 ml de vol. de elución. **(B)** Perfil de calibración de la columna Superdex 75 HiLoad pg 26/60; el gráfico muestra A_{280} vs. Vol. de elución de 5 proteínas de peso molecular conocido. Nótese que el pico de la gel filtración de DesKC-WKV se corresponde con una “entidad” de peso molecular entre 44 y 67 kDa.

Además, no se observa la presencia de picos contaminantes y, la simetría del pico sugiere fuertemente una homogeneidad conformacional de la especie dimérica, característica importante en vistas a la cristalización.

Experimentos cristalográficos

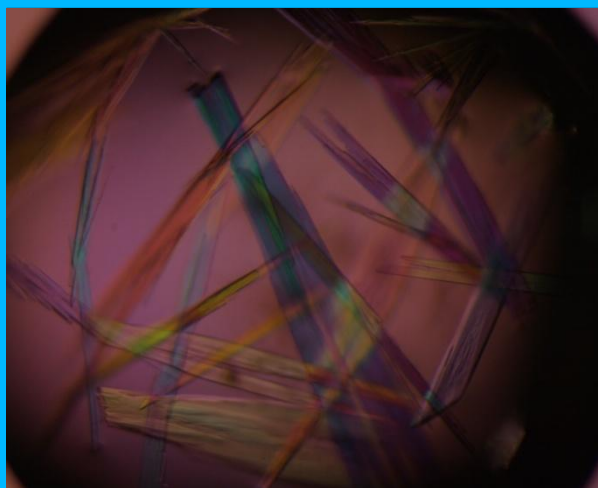
Ensayos preliminares de cristalización con DesKC-V188 y DesKC-WKV

Todos los ensayos cristalográficos con DesKC-WKV fueron realizados mediante el método de difusión de vapor al equilibrio en gota colgante. Para verificar si el par de aminoácidos W311 y K312 es realmente crítico para el empaquetamiento cristalino se intentó cristalizar el triple mutante DesKC-WKV en las mismas condiciones de cristalización donde se cristalizó DesKC-V188. Empleando 12% PEG 8000, 10% glicerol, 0.5M KCl, el mutante DesKC-V188 (11 mg/ml) cristalizó rápida y reproduciblemente (Fig. 20A); mientras que el mutante DesKC-WKV (8.1 mg/ml) no cristalizó, manteniéndose soluble (Fig. 20B).

Screening de solubilidad con DesKC-WKV

Habiendo demostrado que DesKC-WKV no cristaliza en las mismas condiciones que DesKC-V188, y como paso previo a un rastreo extensivo de condiciones de cristalización, se decidió hacer ensayos de solubilidad para estimar una concentración óptima de DesKC-WKV a usar. Para ello se usó 12% PEG 8000, 10% glicerol, 0.5M KCl como licor madre, y se varió en experimentos separados la concentración de proteína y la concentración de PEG 8000.

(A)



(B)

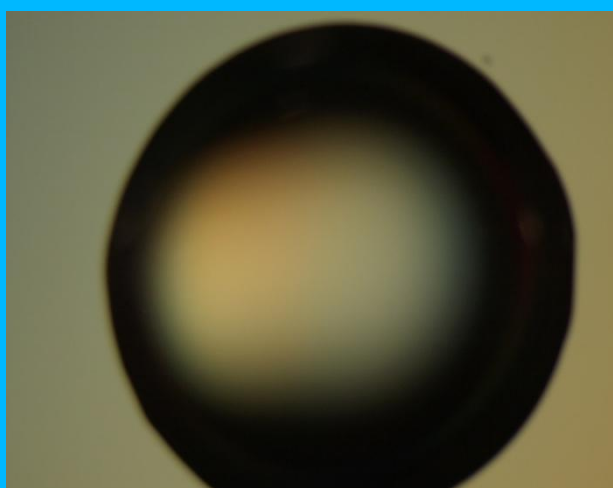


Fig. 20: (A) Fotografía de los cristales de DesKC-V188, crecidos en la condición de cristalización 12% PEG 8000, 10% Glicerol, 0,5 M KCl. Los cristales se formaron en pocos minutos de haber realizado las gotas y sellado el reservorio. (B) Fotografía de la gota clara de DesKC-WKV en la misma condición que DesKC-V188, sacada tras 47 días de su lanzamiento.

En el screening donde se varió progresivamente la concentración de DesKC-WKV no se observó precipitación de la proteína, incluso en el máximo de concentración (48.5 mg/ml); por otro lado, en el screening donde se varió la concentración de agente precipitante, se observó precipitación de DesKC-WKV (a 48.5 mg/ml) al llegar a 22% PEG 8000. Con estos datos se decidió usar la proteína a 45mg/ml como punto de partida en los rastreos de cristalogénesis.

Cristalización de DesKC-WKV

Con la finalidad de encontrar condiciones en las cuales DesKC-WKV (45 mg/ml) sea capaz de cristalizar, se realizó un rastreo de 384 soluciones diferentes, provenientes de los kits comerciales PEG Suite, pHclear Suite, Clasic Suite y AmSO4 Suite (Qiagen), con el dispensador robótico Honeybee963® (Genomic Solutions). A los 4 días se observaron cristales, en una gran cantidad de condiciones. Dichos cristales presentaron hábitos variados: agujas, barras, esferulitas, en forma de pluma y de ramillete. La figura 21 muestra una fotografía tomada de los cristales crecidos en la condición 66 del kit pHclear Suite (0.1M bicina pH 9, 2.4M (NH₄)₂SO₄); los cristales poseen forma de pequeñas barras.

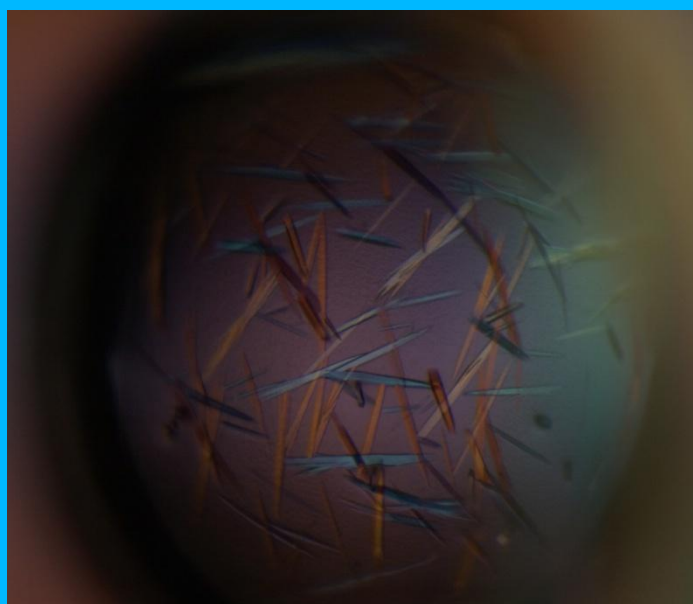


Fig. 21: Fotografía tomada de una de las condiciones del kit pHclear (0,1 M Bicina pH 9 ; 2.4 M (NH₄)₂SO₄, en la cual crecieron cristales. La concentración de proteína usada para el rastreo fue de 45 mg/ml.

Optimización de cristales

Para mejorar la calidad de los cristales, se eligieron aquéllos que crecieron en 0.1M bicina pH9, 2.4M (NH₄)₂SO₄ (fig. 21). Se realizó un nuevo rastreo más focalizado en torno a la condición escogida, donde se varió la concentración de agente precipitante (sulfato de amonio) manteniendo constante tanto la concentración de la proteína en 45 mg/ml como el

pH. Al mismo tiempo, se aprovechó para reproducir la condición original de 2.4M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las condiciones que contenían concentraciones de sulfato de amonio superiores a 2.4M resultaron en una alta precipitación de la proteína, tanto más fuerte cuanto mayor

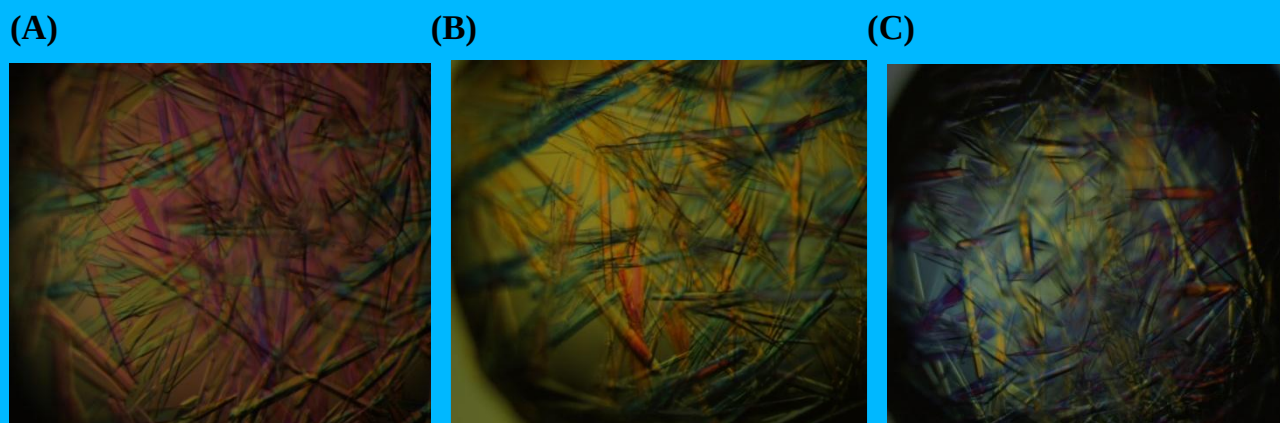


Fig. 22: Fotografías de los cristales crecidos en la condición 0,1 M Bicina pH=9 con (A) 1.8 M (B) 2 M, y (C) 2.2 M de sulfato de amonio. El screening se realizó para optimizar los cristales originales, crecidos en la condición 66 del kit pHclear (Fig. 21); los cristales optimizados crecieron al segundo día de largado las gotas.

la concentración de agente precipitante. Sin embargo, en las condiciones que contenían menos precipitante, crecieron numerosos cristales luego de dos días de incubación (Fig. 22 A, B y C).

Ensayos preliminares de difracción de rayos X

A partir de una de las condiciones de optimización de cristales ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,8 M) se escogió uno de los mejores cristales en términos de forma (regular, bien facetado, monocristalino) y tamaño (la difracción es proporcional al volumen de material dispersante) para poder llevar a cabo experimentos de difracción de rayos X. El cristal fué montado en el difractómetro e incidido con un haz de luz monocromática de longitud de onda $\lambda = 1,7$ Angstroms; efectivamente, el cristal difractó y mostró un patrón de spots (haces difractados e incididos sobre el detector electrónico del difractómetro, que se observan como puntos en el patrón de difracción) que indicaba ser de un cristal de proteína dada su distribución (no se muestran los datos); inmediatamente se procedió a su indexación a partir de algunas imágenes de oscilación (1° por imagen). La difracción alcanzó una resolución máxima de aproximadamente 4 Angstroms, según el patrón de difracción. En la tabla 1 se muestra los datos de indexación, sugiriendo los posibles parámetros de celda y simetría cristalográfica con su correspondiente penalidad (una medida de desviación entre la celda unidad observada y una celda unidad correspondiente a la simetría sugerida). Las soluciones se ordenan según la penalidad (de menor a mayor verticalmente hacia abajo), considerando *per se* como igual a 0 la penalidad para la solución triclinica. Luego se proponen soluciones de simetría de baja penalidad (**mp**, **mc**, **oc** y **mc**: penalidad < 2,0 ; **mp** y **op**: penalidad < 13,0), que en su conjunto son propuestas como las más probables por el programa (marcadas con una estrella a la izquierda de la tabla).

A partir de éstos resultados de indexación es que se prosigue a la determinación exacta del grupo de espacio, y refinamiento de la celda unidad, del cristal difractado. Este trabajo

culmina en estos resultados, y por tanto, nos limitamos a aceptar que las celdas del cristal difractado de DesKC-WKV se corresponden con alguna de las soluciones propuestas en la

Tabla 1: Se muestran las posibles dimensiones de la celda unidad, sus respectivas simetrías y la penalidad. ap: triclinico primitivo; mp:monoclinico primitivo; mc: monoclinico centrado; oc: ortorrómbico centrado; op: ortorrómbico primitivo.

LATTICE- CHARACTER		SIMETRÍA	PENALIDAD	CONSTANTES DE LA CELDA UNIDAD					
				a	b	c	alpha	beta	gamma
				(ANGSTROMS)			(GRADOS)		
*	31	aP	0.0	87.9	88.1	132.1	90.0	90.0	88.6
*	44	aP	0.1	87.9	88.1	132.1	90.0	90.0	91.4
*	34	mP	0.3	87.9	132.1	88.1	90.0	91.4	90.0
*	10	mC	1.4	125.9	123.0	132.1	90.0	90.0	90.1
*	13	oC	1.7	123.0	125.9	132.1	90.0	90.0	89.9
*	14	mC	1.7	123.0	125.9	132.1	90.0	90.0	89.9
*	33	mP	12.1	87.9	88.1	132.1	90.0	90.0	91.4
*	35	mP	12.2	88.1	87.9	132.1	90.0	90.0	91.4
*	32	oP	12.2	87.9	88.1	132.1	90.0	90.0	91.4

tabla 1. Actualmente, el laboratorio donde desempeñé este trabajo se encuentra aún en la determinación del grupo de espacio, y refinamiento de la celda. No obstante, dada la resolución de la difracción del cristal que difractamos ($\sim 4\text{\AA}$), nos vemos impedidos de seguir con el refinamiento de la estructura molecular de DesKC-WKV, lo que requerirá seguir optimizando hacia la obtención de un cristal que difracte a mayor resolución.

Discusión

Bacillus subtilis es capaz de responder ante el descenso brusco de la temperatura mediante mecanismos que implican cambios en los niveles de transcripción y traducción de varios genes, así como de vías metabólicas esenciales para la supervivencia. La estabilidad proporcionada por las CSPs hacia ARNm esenciales, la síntesis de subunidades ribosomales que conforman y permiten a los ribosomas la iniciación de la traducción de ARNm específicos, los cambios en la topología del ADN mediados por ADN girasas y topoisomerasas para la transcripción de nuevos genes, el incremento de la síntesis de ácidos grasos anteiso-ramificados de bajo punto de fusión, y la incorporación de insaturaciones en los ácidos grasos de membrana por la $\Delta 5$ -desaturasa, son ejemplos claros de la capacidad adaptativa que presenta esta bacteria ante tal circunstancia (véase la introducción y referencias contenidas allí). De todas maneras, y pese a lo que ya se conoce por evidencia bioquímica y genética, aún quedan por conocerse en detalle los mecanismos moleculares

implicados en la percepción y la señalización intracelular del descenso brusco de la temperatura ambiental, y su relación con los cambios conformacionales (estructurales) que sufren las proteínas implicadas en esta función (percepción y señalización del descenso de la temperatura) durante los procesos celulares de adaptación. En este sentido, y como ejemplo de un sistema molecular destinado a percibir variaciones en las propiedades físicas que ocurren en la membrana plasmática de *B. subtilis*, el sistema de dos componentes DesK/DesR se ha convertido en objeto para su análisis estructural, aunque hasta el momento solo se ha podido dilucidar la estructura de la porción citoplasmática de DesK, restando aún por dilucidarse la estructura de la porción transmembrana de esta histidina-quinasa, de DesR y del complejo binario DesKC/DesR.

Como vimos, la resolución de la estructura molecular del mutante DesKC-V188 mediante cristalografía de rayos X indicó que este mutante adopta una conformación abierta y rígida, que podría resultar: 1) O bien del reordenamiento de residuos ocasionado por la sustitución de la histidina fosforilable por el aminoácido valina, haciendo que el dominio de unión a ATP se mantenga lejos e impedido de interactuar con el DHp central; 2) O bien por una fuerte interacción entre dos residuos del dominio de unión a ATP de un monómero (W311 y K312) con el “four-helix bundle” de un dímero vecino, en el contexto del empaquetamiento cristalino (Fig. 23). Si bien la primera hipótesis se ve sustentada por otras evidencias

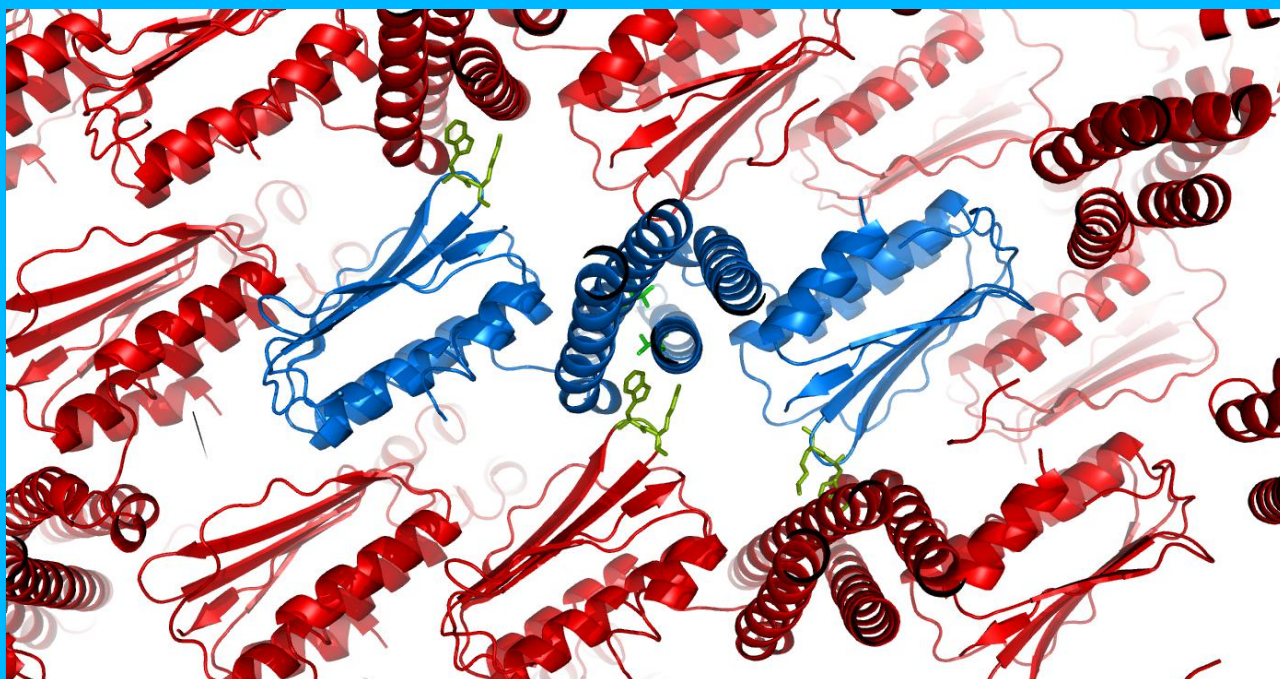


Fig. 23: Esquema del empaquetamiento cristalino de DesKC-V188 en cristal de grupo de espacio monoclinico $P2_1$; nótese como los aminoácidos W311 y K312, representados en verde, participan en estrechos contactos intermoleculares entre el dominio de unión de ATP de un homodímero con el “four-helix

bundle” de un homodímero vecino (realizado en PyMol, éste trabajo).

biofísicas (véase pág. 27), el hecho de que los residuos W311 y K312 interactúen de forma similar en las dos variantes de empaquetamiento (ortorrómbica y monoclinica), no permite descartar de manera concluyente que la estructura molecular del mutante DesKC-V188 en el cristal se deba a un artefacto de cristalización generado por la fuerza que ejerce ese par de residuos aminoacídicos en el contexto del empaquetamiento. Desafortunadamente, aún no se ha podido obtener una nueva forma de empaquetamiento para este mutante (DesKC-V188) en el cual el par aminoacídico W311/K312 no se vea interaccionando en la forma previamente mencionada.

A partir de estos antecedentes es que se diseñó el triple mutante DesKC-WKV, el cual como ya hemos dicho, lleva sustituido el par W311/K312 por G311/S312, además de H188V. Si el par W311/K312 es efectivamente crítico para el empaquetamiento cristalino conocido, entonces DesKC-WKV no debería cristalizar en las mismas condiciones que DesKC-V188, pues sería incapaz de mantener las interacciones adecuadas en ese licor madre. En el ensayo comparativo de cristalogénesis entre DesKC-V188 y DesKC-WKV (el cual se empleó una única solución madre donde se sabe que cristaliza DesKC-V188), se demostró reproduciblemente que DesKC-WKV no cristaliza (Fig. 20); este resultado apoya la importancia del par W311/K312 para el empaquetamiento en la condición previa. Este resultado nos permitirá ahora confirmar que la estructura rígida del dímero es independiente de la forma cristalina, una vez que resolvamos la estructura 3D de DesKC-WKV.

La búsqueda extensiva de condiciones de cristalización, asistida por el dispensador robótico y los kits comerciales, resultó exitosa. La Figura 21 muestra una fotografía de los cristales crecidos en una de las muchas condiciones donde se generaron cristales, muchos de ellos probablemente de DesKC-WKV, y no de sal, dados sus hábitos cristalinos. De hecho, los cristales de la Fig. 21 son similares morfológicamente a los cristales de DesKC-V188 (no se muestran los datos), así que nos basamos en esa condición para un rastreo de optimización con el fin de obtener cristales adecuados para llevar al difractor. A partir del patrón de difracción se determinó de inmediato que el cristal era efectivamente proteico (no se muestran los datos), aunque desafortunadamente la resolución máxima de la difracción (~ 4 Å) no fue lo suficientemente alta como para obtener un juego de datos que permitiera el refinamiento de la estructura molecular. Si bien no pudimos resolver el empaquetamiento cristalino de esta forma (debido a la superposición de ejes de simetría cristalográficos con

no-cristalográficos), sí logramos indexar y determinar los grupos puntuales de simetría compatibles con los parámetros de celda encontrados (Tabla 1). Efectivamente, las dimensiones de la celda unidad de esta forma cristalina de DesKC-WKV, son significativamente distintas a las del cristal de DesKC-V188 (monoclínico $P2_1$; $a = 62,3$; $b = 34,3$; $c = 131,2$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 96,6^\circ$; $\gamma = 90^\circ$ – compárese con los datos de la tabla 1). Es muy probable que el empaquetamiento cristalino de DesKC-WKV sea distinto al empaquetamiento cristalino de DesKC-V188, y por tanto, las interacciones intermoleculares entre unidades asimétricas dentro de una celda y entre celdas contiguas, no sean las mismas para ambos mutantes.

Se han cumplido los cinco objetivos específicos propuestos para éste trabajo y, en particular, se identificaron numerosas condiciones de cristalización para DesKC-WKV hasta ahora desconocidas. El laboratorio donde desempeñé este trabajo se encuentra actualmente trabajando en la optimización de los cristales de DesKC-WKV a fin de obtener difracción a mayor resolución y poder así refinar su estructura 3D, lo que redundará en datos concluyentes sobre la conformación rígida o flexible de DesK. En fin, las conclusiones a las que podamos llegar a partir de la dilucidación del empaquetamiento cristalino y la estructura de DesKC-WKV, podrían solucionar un fenómeno correlacionado con nuestras hipótesis actuales, que tiene que ver con la dificultad que se ha encontrado en el laboratorio de usar DesKC-V188 en estudios de biofísica en solución. En particular, ensayos de resonancia plasmónica de superficie y de microcalorimetría de titulación isotérmica, en los que uno de los componentes en estudio es esta proteína, resultan en perfiles en los que se detecta una auto-asociación de DesKC-V188, que imposibilitan la cuantificación fidedigna de constantes cinéticas y de equilibrio. Si probáramos que los residuos W311/K312 son efectivamente significativos en promover asociaciones interproteicas, habremos avanzado en la comprensión de mecanismos de asociación potencialmente relevantes en la fisiología y el mutante DesKC-WKV se transformará en una herramienta valiosa para progresar en estudios biofísicos en solución.

Bibliografía

1. **Albanesi, D., Mansilla, M.C., D. de Mendoza.** 2004. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. J. Bacteriol. **186:** 2655-2663.
2. **Allen, E. E., Bartlett, D.H.** 2000. FabF is required for piezoregulation of *cis*-vaccenic acid levels and piezophilic growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. J. Bacteriol. **182:** 1264-1271.
3. **Aguilar, P., Cronan, J. D. de Mendoza.** 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J. Bacteriol. **180:**2194-2220.
4. **Aguilar, P., Lopez, P., D. de Mendoza.** 1999. Transcriptional control of the low-

temperature *des* gene, encoding the Δ -5 Desaturase of *Bacillus subtilis*.

5. **Aguilar, P., Hernandez-Arriaga, M., Erazo, A., D. de Mendoza.** 2001. molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **20**:1681-1691.
6. **Amersham Biosciences** in "Protein Purification: Handbook". 2001, Ed. AC 18-1132-29, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden.
7. **Amersham Pharmacia Biotec** in "The recombinant protein handbook: protein amplification and simple purification". 2000, Ed. AA 18-1142-75, Amersham Pharmacia Biotec AB, Uppsala, Sweden.
8. **Aravind, L., Ponting, C.** 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Letters.* **176**: 111-116.
9. **Azam, T.A., Hiraga, S., Ishihama, A.** 2000. Two types of localization of the DNA binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes to cells.* **5**: 613-626.
10. **Beckering, C., Steil, L., Weber, M.H.W., Völker, U., Marahiel, M.A.** 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**: 6395-6402.
11. **Beranová, J., Jemiola-Rzeminska, M., Elhottová, D., Strzalka, K., Konopásek, I.** 2008. *Biochim.Biophys.Acta.* **1778**: 445-453.
12. **Berg, S., Löfdahl, P., Härd, T., Berglund, H.** 2006. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol.* **121**:291-298.
13. **Brandi, A., Pietroni, P., Gualerzi, C.O., Pon, C.L.** 1996. Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **19**: 231-240.
14. **Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Völker, U., Bremer, E.** 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to grow at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiol.* **152**:831-853.
15. **Coligan, J.E., Dunn, B.M., Speicher, D.W.** in "Current Protocols in Protein Science" - Ed. by: , PT Wingfield. 2007 Wiley Interscience. Series Editor: G Taylor.
16. **Cronan, J.E., Rock, C.O.** 1996. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* **1302**: 1-16.
17. **Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mansilla, M., Altabe, S., Aguilar, P., D. de Mendoza.** 2002. Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol. Microbiol.* **45**: 1379-1388.
18. **Cybulski, L., G. del Solar, Craig, P., Espinosa, M., D. de Mendoza.** 2004. *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity.

J Biol. Chem. **279**:39340-39347.

19. **DeLucas, L.J., Bray, T.L., Nagy, L., McCombs, D., Chernov, N., Hamrick, D., Cosenza, L., Belgovskiy, A., Stoops, B., Chait, A.** 2003. Efficient protein crystallization. J Structur. Biol. **142**: 188-206.
20. **Diaz, A., Mansilla, M., Vila, A., D. de Mendoza.** 2002. Membrane topology of the Acil-lipid desaturase from *Bacillus subtilis*. J Biol.Chem. **50**: 48099-48106.
21. **Drenth, J.** in "Principles of Protein X-Ray crystallography". 2007, 3rd. ed. Springer Science+business media, NY, USA.
22. **Dutta, R., Qin, L., Inouye, M.** 1999. Histidine-kinases: diversity of domain organization. Mol. Microbiol. **(34)**633-640.
23. **Fabret, C., Hoch, J.** 1998. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. J Bacteriol. **180**: 6375-6383.
24. **Fabret, C., Feher, V., Hoch, J.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. J Bacteriol. **181**: 1975-1983.
25. **Foussard, M., Cabantous, S., Pédelacq, J., Guillet, V., Tranier, S., Mourey, L., Birck, C., Samama, J.** 2001. The molecular puzzle of two-component signaling cascades. Microbes and infection. **3**: 417-424.
26. **Fujii, D., Fulco, A.** 1977. Biosynthesis of unsaturated fatty acids by Bacilli. J Biol. Chem. **252**: 3660-3670.
27. **Fukushima, T., Szurtmant, H., Kim, E., Perego, M., Hoch, J.** 2008. A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **69**: 621-632.
28. **Fulco, A.** 1968. The biosynthesis of unsaturated fatty acids by Bacilli. J Biol. Chem. **244**: 889-895.
29. **Garwin, J., Klages, A. Cronan, J.E.** 1980. β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II of *Escherichia coli*. J Biol.Chem. **255**: 3263-3265.
30. **General Electric Healthcare** in "Affinity Chromatography: Principles and Methods". 2007, Ed. 18-1022-29, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.
31. **General Electric Healthcare** in "Gel filtration: Principles and Methods". 2006, Ed.18-1022-18 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.
32. **General Electric Healthcare** in "Recombinant protein purification handbook: Principles and Methods". 2006, Ed. 18-1142-75, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden.
33. **Giaquinto, L., Curmi, P.M.G., Siddiqui, K.S., Poljak, A., DeLong, E., DasSarma, S., Cavicchioli, R.** 2007. Structure and function of cold shock proteins in archaea. J Bacteriol. **189**: 5738-5748.

34. **Goldenberg, D., Azar, I., Oppenheim, A.B.** 1996. Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold shock response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **19**:241-249.
35. **Goulding, C.W., Perry, L.J.** 2003. Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. *J Structur Biol.***142**: 133-143.
36. **Grau, R., Gradiol, D., Glikin, G.C., D. de Mendoza.** 1994. DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **11**: 933-941.
37. **Graumann, P., Marahiel, M.** 1998. A superfamily of proteins that contain the cold shock domain. *TIBS.* **23**: 286-290.
38. **Harwood, C.R., Crawshaw, S.G., Wipat, A.** 2001. From genome to function: systematic analysis of the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Comp. Funct. Genom.* **2**: 22-24.
39. **Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., Vigh, L.** 2008. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochim.Biophys. Acta.* **1778**: 1653-1664.
40. **Hoch, J.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Op. In Biol.* **3**: 165-170
41. **Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J., Lupas, A.N., Coles, M.** 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signailing. *Cell.* **126**:929-940.
42. **Hunger, K., Beckering, C.L., Marahiel, M.A.** 2004. Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol. Letters.* **230**: 41-46.
43. **Izaac, A., Schall, C.A., Mueser, T.C.** 2006. Assessment of a preliminary solubility screen to improve crystallization trials: uncoupling crystal condition searches. *Acta Cryst. D***62**: 833-842.
44. **Jones, P., VanBogelen, R., Neidhardt, F.C.** 1987. Induction of protein in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **169**: 2092-2095.
45. **Kaan, T., Homuth, G., Mäder, U., Bandow, J., Schweder, T.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold shock response. *Microbiol.* **148**: 3441-3445.
46. **Kaneda, T.** 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Review.* **41**: 391-418.
47. **Kaneda, T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Review.* **55**: 288-302.
48. **Klein, W., Weber, M., Marahiel, M.A.** 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol.***181**: 5341-5349.

49. **Korchid, A., Ikura, M.** 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *The Intern. J. Biochem.& Cell Biol.* **38**: 307-312.
50. **Koretke, K., Lupas, A., Warren, P., Rosenberg, M., Brown, J.** 2000. Evolution of two component signal transduction. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1956-1970.
51. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessie´res, 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, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Du¨sterho¨ft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.-Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. He´naut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.-F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S.-M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Maue´l, C. Me´digue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.-H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanlan, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B.-S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weizenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.-F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, and A. Danchin.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249–256.
52. **Lewis, P.J., Thaker, S.D., Errington, J.** 2000. Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **19**: 710-718.
53. **Loll, P.J.** 2003. Membrane protein structural biology: the high throughput challenge. *J Structur Biol.* **142**:144-153.
54. **Los, D., Murata, N.** 1997. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant. Physiol.* **115**: 875-879.
55. **Los, D., Murata, N.** 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Bichim. Biophys. Acta.* **1666**: 142-157.

56. **Luft, J.R., Collins, R.J., Fehrman, N.A., Laricella, A.M., Veatch, C.K., DeTitta, G.T.** 2003. A deliberate approach to screening for initial crystallization conditions of biological macromolecules. *J Structur Biol.* **142**: 170-179.
57. **Mansilla, M., Aguilar, P., Albanesi, D., Cybulski, L., Altabe, S., D. de Mendoza.** 2003. Regulation of fatty acid desaturation in *Bacillus subtilis*. *Prost. Leukot. Essent. Fatty Acids.* **68**: 187-190.
58. **Mansilla, M., Cybulski, L.E., Albanesi, D., D. de Mendoza.** 2004. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol.* **186**: 6681-6688.
59. **Mansilla, M.C., D.de Mendoza.** 2005. The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch. Microbiol.* **183**: 229-235.
60. **Marina, A., Waldburger, C.D., Hendrickson, W.A.** 2005. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* **24**: 4247-4259.
61. **Marr, A.G., Ingraham, J.L.** 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **84**: 1260-1267.
62. **Mascher, T., Helmann, J.D., Uden, G.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing Histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* **70**: 910-938.
63. **Max, K.E.A, Zeeb, M., Bienert, R., Balbach, J., Heinemann, U.** 2007. Common mode of DNA binding to cold shock domains. Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*. *FEBS J.* **274**: 1265-1279.
64. **McEvoy, M.M., Hausrath, A.C., Randolph, G.B., Remington, S.J., Dahlquist, F.W.** 1998. Two binding modes reveal flexibility in kinase/response regulator interactions in the bacterial chemotaxis pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **95**: 7333-7338.
65. **Messerschmidt, A.** in "X-ray crystallography of biomacromolecules. A practical guide". 2007, 1^o ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
66. **Minor, D.L.** 2007. The neurobiologist's guide to structural biology: a primer on why macromolecular structure matters and how to evaluate structural data. *Neuron.* **54**: 511-533.
67. **Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S.** 1996. Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA Research.* **3**: 407-414.
68. **Mizuno, T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal trasducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Research.* **4**: 161-168.
69. **Neiditch, M.B., Federle, M.J., Pompeani, A.J., Kelly, R.C., Swem, D.L., Jeffrey, P.D., Bassler, B.L., Hughson, F.M.** 2006. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell.* **126**: 1095-1108.

70. **Ng, J.D., Gavira, J.A., García-Ruiz, J.M.** 2003. Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination. *J Structur Biol.* **142**: 218-231. .
71. **Perego, M., Hoch, J.** 1996. Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *TIG.* **12**: 97-101.
72. **PyMOL (TM) Incentive product** – Copyright © 2006 DeLano Scientific LLC.
73. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** in "Molecular cloning: A laboratory manual".1989, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
74. **Schindler, T., Graumann, P.L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F.X., Marahiel, M.** 1999. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. *J Biol.Chem.* **274**: 3407-3413.
75. **Sinensky, M.** 1971. Temperature control of phospholipid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **106**: 449-455.
76. **Sinensky, M.** 1974. Homeoviscous adaptation- a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc.Nat.Acad.Sci.* **71**: 522-525.
77. **Stock, J.B., Ninfa, A., Stock, A.M.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive response in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-490.
78. **Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* **69**: 183-215.
79. **Szurmant, H., White, R., Hoch, J.** 2007. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr. Op. Struct. Biol.* **17**: 706-715.
80. **Tse-Dinh, Y., Qi, H., Menzel, R.** 1997. DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. *Trends in Microbiol.* **5**: 323-326.
81. **Vigh, L., Maresca, B., Harwood, J.L.** 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *TIBS.* **23**: 369-374.
82. **Vigh, L., Escribá, P., Sonnleitner, A., Sonnleitner, M., Piotto, S., Maresca, B., Horváth, I., Harwood, J.** 2005. The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing functions.*Prog. Lipid Research.* **44**: 303-344.
83. **Vigh, L., Horváth, I., Maresca, B., Harwood, J.L.** 2007. Can the stress protein response be controlled by "membrane-lipid therapy"? *TIBS.* **32**: 357-363.
84. **Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R** in "Molecular biology of the gen". 2004, 5° ed., Pearson education, inc., publishing as Benjamin Cummings, 1301 Sansome street, San Francisco, Ca, USA
85. **Weber, M.H.W., Klein, W., Müller, L., Niess, U.M., Marahiel, M.** 2001. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* **39**: 1321-1329.

86. **Weber, M.H.W., Volkov, A.V., Fricke, I., Marahiel, M., Graumann, P.** 2001. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *J Bacteriol.* **183**: 6435-6443.
87. **Weber, M.H.W., Fricke, I., Doll, N., Marahiel, M.** 2002. CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucl. Acid. Research.* **30**: 375-378.
88. **Weber, M.H.W., Marahiel, M.** 2002. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **357**: 895-907.
89. **Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **87**: 4576-4579.
90. **Woldring, C.L., Jensen, P., Westerhoff, H.V.** 1995. Structure and partitioning of bacterial DNA: determined by a balance of compaction and expansion forces? *FEMS Microbiol. Letters.* **131**: 235-242.
91. **Wolanin, P.M., Thomason, P.A., Stock, J.B.** 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**: 3013.1-3013.8.
92. **Zaritsky, A., Parola, A.H., Abdah, M., Masalha, H.** 1985. Homeoviscous adaptation, growth rate, and morphogenesis in bacteria. *Biophys. J.* **48**: 337-379.