

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS Y FARMACEUTICAS

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-
Departamento de Microbiología-Area Microbiología Básica.**

Tesis a presentar para optar al título de Doctor:

Regulación de la síntesis de lípidos en *Bacillus subtilis* durante la adaptación a bajas temperaturas de crecimiento

Autor:

Bqco. PABLO S. AGUILAR

Director:

Dr. DIEGO DE MENDOZA

2001

Parte de los resultados que aquí se describen han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas.

Trabajos publicados:

Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulsky, L.E., Erazo, A.C. and de Mendoza, D. (2001) Molecular basis of thermosensing: a two component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. EMBO J. 20 (7): 1-11.

de Mendoza, D., Schujman, G. and Aguilar, P.S. (2001) Biosynthesis and function of membrane lipids, in "*Bacillus subtilis* and its relatives: from genes to cells". J. A. Hoch, R. Losick and A. Sonenshein (Eds). American Society for Microbiology, en prensa.

Aguilar, P.S., Lopez, P. and de Mendoza, D. (1999). "Transcriptional control of the low-temperature inducible *des* gene encoding the $\Delta 5$ desaturase of *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol., 181(22), 7028-7033.

Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. and de Mendoza, D. (1998) "A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. J. Bacteriol. 180(8), 2194-2200

Presentaciones a Reuniones científicas:

Aguilar, P.S., Cybulski, L.E. and de Mendoza, D. (2001) "A two component signal transduction system controls the low-temperature induction of the *des* gene encoding the membrane lipid desaturase from *Bacillus subtilis*." Functional Genomics of Gram Positive Microorganisms. The 11th International Conference on Bacilli. San Diego, U.S.A.

de Mendoza, D. y Aguilar, P.S. (2000) "Percepción y transducción de señales térmicas en *Bacillus subtilis*." Simposio: "Nuevos Mecanismos de la Expresión de Genes en Bacterias."

I Reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Biología Celular- XXXVI Reunión anual de la SAIB. Viña del Mar, Chile.

Aguilar, P.S., Erazo, A.C., Cybulski, L.E. y de Mendoza, D. (1999) "El control por temperatura de la expresión del gen de la D5 desaturasa de *Bacillus subtilis* esta determinado por un sistema regulador de dos componentes y por los ácidos grasos insaturados". XXXV Reunión anual de la SAIB.

Aguilar, P.S., López García, P. and de Mendoza, D. (1999) "Transcriptional control by temperature of the *Bacillus subtilis des* gene coding for a membrane fatty acid desaturase. 10th International Conference on Bacilli, Baveno, Italy.

Aguilar, P.S. y de Mendoza, D., (1998) "Regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados en *Bacillus subtilis*: estudio del transcripto del gen de la $\Delta 5$ -desaturasa". XXXIV Reunión anual de la SAIB.

Aguilar, P.S. y de Mendoza, D. (1997) "Un nuevo gen regulado por la temperatura decrecimiento: la transcripción del gen *des* de *Bacillus subtilis* es inducida por una caída de la temperatura pero la enzima $\Delta 5$ -desaturasa no es esencial para la viabilidad a bajas temperaturas", XXXIII congreso de la SAIB.

Aguilar, P.S. and de Mendoza D. (1996) "Changes in DNA Topology in *Bacillus subtilis* Towards the cold-shock response" VIII Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology-(PABMB) Congress , Pucón, Chile.

Aguilar P.S., Ornella L., Grau R. y de Mendoza D. (1993) "Aislamiento de Fusiones *lac-Z* Inducibles por Frío Deficientes en la Desaturación de Acidos Grasos en *Bacillus subtilis*"; XIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR).

Ornella L., Aguilar P.S., Grau R. y de Mendoza D. (1993) "Regulación de la desaturasa frío-inducible de *Bacillus subtilis* por la fluidez de membrana"; XXIX Reunión anual de la SAIB.

AGRADECIMIENTOS

Estos agradecimientos no precisan mayor elucidación,
responden absolutamente a todos
aunque mi afición quisiera resaltar
a Diego y
a Manuel, a Rafi, Arli, al Japo, Colo, Preto, Mosta, Maurizio, Pistol, y tantos otros, todos
los otros, si si.

Vida y muerte le han faltado a mi vida.
De esa indigencia, mi laborioso amor por estas minucias.

J.L.B. 1932, Buenos Aires.

FM

INDICE

INDICE

INTRODUCCION

EL ESTRES EN LOS PROCARIOTES.	2
RESPUESTAS AL STRESS.	2
EL ESTRES EN <i>Bacillus subtilis</i> .	3
EL ESTRES POR FRIO.	5
EL ESTRES POR FRIO EN <i>B. subtilis</i> Y <i>Escherichia coli</i> .	5
AJUSTE DE LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.	8
SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN <i>B. subtilis</i> .	11

OBJETIVOS 13

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS.	16
OLIGONUCLEOTIDOS.	17
MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	18
CURVAS DE CRECIMIENTO.	19
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	19
Extracción de ADN cromosomal.	19
Preparación de ADN plasmídico.	20
Obtención de ARN total.	20
TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE ADN.	20
ANÁLISIS DE ARN POR NORTHERN-BLOT Y DOT-BLOT.	20
MEDICION DE LA DEGRADACION DE LOS ARN TOTALES.	21
ENSAYO DE EXTENSION DE CEBADOR.	21

ENSAYO DE RETARDO EN GELES.	22
ENSAYO DE PROTECCION A LA DNasaI.	22
ANALISIS DE ACIDOS GRASOS.	23
Marcado de cultivos de <i>E. coli</i> y <i>B. Subtilis</i> con [¹⁴ C]-palmitato y [1- ¹⁴ C]-acetato.	23
Extracción de lípidos.	23
Preparación de metil-ésteres de ácidos grasos.	23
Separación de metil ésteres de AGIs y AGSs.	23
Análisis de AGIs por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (GC-MS).	24
CONSTRUCCION DE CEPAS DE <i>B. subtilis</i> .	24
Fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i> .	24
Mutantes de los genes <i>des</i> , <i>desR</i> y <i>desK</i> .	24
TRANSFORMACIÓN DE CELULAS COMPETENTES.	26
CLONADO, EXPRESION Y PURIFICACIÓN DE h-DesR.	26
DOSAJE DE PROTEINAS.	27
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y ENSAYOS DE INMUNOBLOT.	27
ENSAYO DE ACTIVIDAD AMILASA.	27
ENSAYO DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA.	27
METODOS BIOINFORMATICOS.	28

RESULTADOS Y DISCUSION

<u>CAPITULO I: Clonado y caracterizacion del gen que codifica para la Δ5-desaturasa de <i>Bacillus subtilis</i></u>	30
AISLAMIENTO DEL GEN DE LA DESATURASA DE <i>B. subtilis</i> .	31
ANALISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN DE LA DESATURASA.	32
EL GEN <i>des</i> CODIFICA PARA UNA Δ5 DESATURASA.	33
DISRUPCION DEL GEN <i>des</i> .	38
CONTROL TERMAL DE LA EXPRESION DEL GEN <i>des</i> .	39

DISCUSION 45

CAPITULO II: Caracterización del control transcripcional ejercido sobre el gen *des* de *B. subtilis* por la temperatura 50

DETERMINACION DEL SITIO DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN *des*. 52

ANALISIS DE LOS NIVELES DEL ARNm *des* DURANTE LA ADAPTACION AL FRIO. 53

ANALISIS DE LA ESTABILIDAD DEL ARNm-*des*. 56

EL MENSAJERO DE LA DESATURASA PUEDE ACUMULARSE A 37°C. 57

SINTESIS DE AGIs EN *B. subtilis* A 37°C. 60

DISCUSION 63

CAPITULO III: PERCEPCION DE LA TEMPERATURA EN BACTERIAS. Identificación y caracterización del sistema de transducción de señales que gobierna la expresión del gen *des* de *B. subtilis* 67

LA INACTIVACION DE LOS GENES *yocF* Y *yocG* IMPIDE LA EXPRESION DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES *pdes-lacZ* INDUCIDA POR LA BAJA TEMPERATURA. 70

LA INACTIVACION DE *yocG* IMPIDE LA SINTESIS DEL ARNm DE LA DESATURASA Y DE AGIs EN *B. subtilis*. 73

SIMILITUDES ENTRE *YocF*, *YocG* Y PROTEINAS DE LOS SISTEMAS REGULATORIOS DE DOS COMPONENTES. 73

h-DESR ES CAPAZ DE UNIR ESPECIFICAMENTE AL PROMOTOR DEL GEN *des*. 75

h-DESR PROTEGE SEGMENTOS DE ADN UBICADOS -28 A -77 NUCLEOTIDOS CON RESPECTO AL INICIO DE LA TRANSCRIPCION. 78

DISCUSION 45

CAPITULO II: Caracterización del control transcripcional ejercido sobre el gen *des* de *B. subtilis* por la temperatura 50

DETERMINACION DEL SITIO DE INICIACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN *des*. 52

ANALISIS DE LOS NIVELES DEL ARNm *des* DURANTE LA ADAPTACION AL FRIO. 53

ANALISIS DE LA ESTABILIDAD DEL ARNm-*des*. 56

EL MENSAJERO DE LA DESATURASA PUEDE ACUMULARSE A 37°C. 57

SINTESIS DE AGIs EN *B. subtilis* A 37°C. 60

DISCUSION 63

CAPITULO III: PERCEPCION DE LA TEMPERATURA EN BACTERIAS. Identificación y caracterización del sistema de transducción de señales que gobierna la expresión del gen *des* de *B. subtilis* 67

LA INACTIVACION DE LOS GENES *yocF* Y *yocG* IMPIDE LA EXPRESION DE LAS FUSIONES TRANSCRIPCIONALES *pdes-lacZ* INDUCIDA POR LA BAJA TEMPERATURA. 70

LA INACTIVACION DE *yocG* IMPIDE LA SINTESIS DEL ARNm DE LA DESATURASA Y DE AGIs EN *B. subtilis*. 73

SIMILITUDES ENTRE *YocF*, *YocG* Y PROTEINAS DE LOS SISTEMAS REGULATORIOS DE DOS COMPONENTES. 73

h-DESR ES CAPAZ DE UNIR ESPECIFICAMENTE AL PROMOTOR DEL GEN *des*. 75

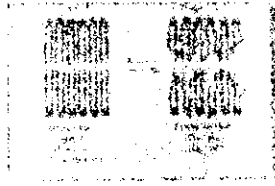
h-DESR PROTEGE SEGMENTOS DE ADN UBICADOS -28 A -77 NUCLEOTIDOS CON RESPECTO AL INICIO DE LA TRANSCRIPCION. 78

DesK ACTIVA Y DESACTIVA A DesR EN FUNCION DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO.	78
LOS AGIs REGULAN LA EXPRESION DEL GEN <i>des</i> .	82
DISCUSIÓN	86
EL “ENCENDIDO” DEL GEN <i>des</i> .	86
EL “APAGADO” DEL GEN <i>des</i> .	87
CONCLUSIONES	91
RESUMEN	93
REFERENCIAS	95

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina 5' difosfato
AGIs	ácidos grasos insaturados
AGSs	ácidos grasos saturados
AMP	adenosina 5' fosfato
Amp	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina 5' trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
Ci	Curie
Cm	cloranfenicol
CoA	coenzima A
cpm	cuentas por minuto
dATP	deoxi adenosina 5' trifosfato
DNAsa	desoxirribonucleasa
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
Em	eritromicina
GC-MS	cromatografía gaseosa-espectrometría de masa
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
IR	repetición invertida
kpb	kilopares de bases
kDa	kilodaltons
LB	medio de Luria Bertani
Lm	lincomicina
min	minuto(s)
MOPS	ácido 4-morfolino propano sulfónico
nt	nucleótido (s)
ONPG	<i>O</i> -nitrofenil-galactopiranosido

ORF	marco de lectura abierto
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
PL	fosfolípidos
p/v	peso en volumen
R	resistente
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
s	sensible
SDS	dodecil sulfato de sodio
SPI	sales de Spizizen
SSC 20x	3 M NaCl y 0.3 M citrato de sodio
Tet	tetraciclina
TLC	cromatografía en capa delgada
Tris	N-Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UM	unidades Miller
v/v	volumen en volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido



normal cell function...

condiciones letales de estrés, las respuestas generadas pueden llevar al sacrificio de muchos individuos en función de aumentar la probabilidad de supervivencia de la población (Storz y Hengge-Aronis, 2000). Muchas y muy variadas son las situaciones de estrés que han sido estudiadas en procariotes, y las respuestas que los mismos presentan ante las mismas. Ante un determinado estrés, la respuesta puede ser muy focalizada, es decir puede consistir en la síntesis de un grupo de proteínas que eliminen al agente que produce estrés o que reparen el daño originado, tal es el caso de las respuesta al estrés oxidativo o al calor. A este tipo de respuesta se las denomina *Respuestas Específicas*. El otro tipo de respuestas, las *Respuestas Generales*, puede dispararse por igual ante distintas situaciones de estrés y comúnmente están gobernadas por uno o unos pocos factores reguladores de la expresión génica. Tal es el caso por ejemplo de la formación de esporas en *Bacillus subtilis* y las respuestas controladas por los factores de transcripción σ^B y σ^S en *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Desde el punto de vista de la interacción entre bacterias patógenas y sus organismos huéspedes se puede definir un tercer grupo de respuestas que resultan de la interacción entre los mismos. En la Tabla 1 se resumen los distintos tipos de respuestas a el estrés encontradas en bacterias.

Ha sido reconocido ampliamente que uno de los más fascinantes aspectos de las respuestas al estrés es aquel que nos permite aprender acerca de la complejidad de la fisiología celular normal. A través del estudio de la respuesta al estrés se han elucidado aspectos críticos de la función celular bacteriana. En tal sentido se pueden destacar algunos de los paradigmas de la regulación génica en bacterias: sistemas reguladores de dos componentes compuestos por una quinasa y un regulador transcripcional, factores sigma y anti-sigma, ARN reguladores y factores de transcripción regulados alostéricamente por moléculas pequeñas o por reacciones rédox. También al entendimiento de procesos celulares básicos como la reparación del ADN o el modelado de proteínas ha contribuido el estudio de las respuestas al estrés en bacterias (Storz y Hengge-Aronis, 2000).

El estrés en *Bacillus subtilis*.

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva mesofílica, cuyo hábitat natural es la superficie del suelo y su metabolismo intermedio permite clasificarla como quimiorganotrofa aeróbica. Presenta movilidad a través de flagelos peritricos y es naturalmente susceptible de

El estrés en los procariones.

Variabilidad y adaptabilidad son características cruciales de todos los organismos que poseen la capacidad de sobrevivir y prosperar en una amplia variedad de condiciones ambientales. Si bien cualquier hábitat apropiado para el crecimiento de los organismos superiores lo es también para el crecimiento de microorganismos, no es común lo contrario. Existen numerosos hábitats donde, debido a distintas condiciones físicas o químicas extremas, los organismos superiores se encuentran ausentes mientras que los microorganismos no sólo existen en tales hábitats sino que hasta florecen (Brock y col., 1997). En la gran mayoría de los hábitats naturales, los microorganismos se encuentran con condiciones nutricionales limitadas y con la competencia de multitudes de otros microorganismos por un mismo nicho que precisamente no siempre es el mismo. Los microorganismos, en particular las bacterias, se encuentran constantemente expuestas a cambios ambientales tales como luz, temperatura, humedad, pH, presión osmótica, disponibilidad de nutrientes, etc.. Esto hace que el cambio y la adaptación al mismo sean el estilo de vida normal de las bacterias en la naturaleza y define al crecimiento en condiciones óptimas como una rareza propia de un laboratorio de microbiología. En este contexto se inserta naturalmente el concepto de estrés. Si bien la idea de estrés es algo que todos manejamos de manera intuitiva, no es fácil definirla en forma global para los seres vivos dado que la percepción de una situación ambiental extrema depende del sistema biológico en particular que se esté estudiando. Sin embargo, como definición operativa, puede considerarse al estrés como cualquier desviación de las condiciones óptimas de crecimiento que resulte en una disminución de la velocidad del mismo (Storz y Hengge-Aronis, 2000).

Respuestas al estrés.

Se pueden distinguir, de manera general, distintos niveles de severidad de estrés. Bajo niveles mínimos de estrés, el crecimiento generalmente continúa al mismo ritmo y las células se adaptan completamente a las nuevas condiciones. Bajo condiciones severas de estrés, la velocidad de crecimiento se reduce pero las células pueden adaptarse y tolerar la nueva situación. En condiciones extremas de estrés las células detienen totalmente su crecimiento y utilizan todos sus recursos en responder para adaptarse y sobrevivir. Bajo

INTRODUCCION

Tabla 1. Respuestas al estrés en bacterias

Tipo:	Referencias
Específicas	
Estrés por calor	Yura y col., 2000. Gross, 1996
Estrés a la cubierta bacteriana	Raivio y Silhavy, 2000.
Estrés por frío	Phadtare y col., 2000. Thieringer y col., 1998.
Estrés oxidativo	Storz y Zheng, 2000.
Deprivación de O ₂	Patschokowsky y col., 2000.
Estrés osmótico	Csonka y Epstein, 1996.
Estrés ácido	Foster, 2000.
Estrés por daño al ADN	Walker, 1996.
Estrés por Na ⁺	Padan y Krulwich, 2000.
Generales	
σ^S en <i>E. coli</i>	Hengge-Aronis, 2000.
σ^B en <i>B. subtilis</i>	Price, 2000.
Esporulación	Grossman, 1995.
Fase estacionaria	Finkel y col., 2000.
Patogénicas y Adaptativas	
Respuestas al tejido huésped	Isberg., 2000
Respuestas al tratamiento con antibióticos	Alekshun y Levy, 2000. Levy, 1998.

transformación por ADN. Su nicho ecológico determina que se encuentre sujeta a condiciones que cambian frecuentemente y de manera transitoria. Bajo depleción de nutrientes *B. subtilis* es capaz de formar esporas en un proceso de diferenciación celular que tiene lugar en aproximadamente 7 horas (Stragier y Losick, 1996). Asimismo *B. subtilis* es capaz de responder rápidamente a una gran variedad de cambios ambientales. Esta bacteria responde casi inmediatamente ante distintas situaciones de estrés aumentando la síntesis de un grupo de proteínas generales de estrés (GSPs, Hecker y Volker, 1998). Los genes que codifican para la mayoría de las GSPs cuya síntesis es inducida por el calor, estrés salino, etanol o depleción de glucosa, fosfatos u oxígeno pertenecen al regulón dependiente del factor de transcripción σ^B (Hecker y Volker, 1998). Los mecanismos moleculares por los cuales *B. subtilis* responde a distintas situaciones de estrés,

especialmente al calor, han sido intensamente estudiadas. Sin embargo poco se sabe de su respuesta ante una de las situaciones de estrés más comunes para todos los organismos vivos, el frío.

El estrés por frío.

La temperatura determina límites fisiológicos para una amplia variedad de actividades biológicas. Cambios en el orden de 1°C pueden llevar a variaciones en la velocidad de reacciones biológicas del 10% (Cossins y Bowler, 1987). Fluctuaciones mayores en la temperatura pueden abolir procesos metabólicos y llevar a una rápida muerte celular. Por lo tanto, la capacidad de percibir y responder a cambios en la temperatura es un asunto de vital importancia para todo organismo. Los seres vivos resuelven los profundos efectos que ejerce la temperatura sobre la función celular de dos maneras. Una de ellas involucra la regulación de la temperatura corporal. Esta capacidad, presente en los organismos homeotermos o endotermos, permite dentro de ciertos límites mantener la temperatura del medio interno en condiciones óptimas ante variaciones de la temperatura ambiente. Un interesante ejemplo de ello es la termogénesis adaptativa inducida por frío presente en mamíferos (Lowell y Spiegelman, 2000). La otra manera consiste en reorganizar el organismo completo en función de la nueva temperatura, esto es lo que ocurre en plantas, peces, levaduras, bacterias y demás organismos que son incapaces de regular su temperatura corporal eficazmente, es decir, los denominados organismos ectotermos o poiquilotermos (Huey y Bennett, 1990).

El estrés por frío en *B. subtilis* y *E. coli*.

En contraste a lo que ocurre con la respuesta al estrés por calor (heat-shock), que ha sido extensamente estudiada desde bacterias a humanos, la repuesta al estrés por frío ha atraído la atención de la comunidad científica recién en los últimos años (Phadtare y col., 2000). En este periodo, el estudio de la respuesta y adaptación al frío ha ido cobrando creciente importancia con el objeto de entender los mecanismos de supervivencia al frío lo cual es considerado fundamental para el mejoramiento de la tolerancia al frío de plantas y microbios de interés agroindustrial. El estudio de la respuesta al frío también tiene importancia en el área de la salud. Por citar un ejemplo; *Listeria monocytogenes*, el

patógeno oportunista causante de la listeriosis (una enfermedad que afecta principalmente embarazadas, recién nacidos e individuos inmunocomprometidos) es capaz de sobrevivir en una gran variedad de alimentos refrigerados (Bayles y col., 1996). El entendimiento de los mecanismos por los cuales *L. monocytogenes* sobrevive al frío es de fundamental importancia para el diseño de estrategias que permitan prevenir su adaptación a bajas temperaturas. El estudio de la respuesta y adaptación al frío también es de gran importancia para mejorar la supervivencia de bacterias utilizadas en la industria láctea tales como las del género *Lactobacillus* (Chapot-Chartier y col., 1997)

En los últimos años, varios genes cuya expresión se induce ante una disminución de la temperatura han sido descritos en un amplio rango de organismos poiquilotermos. Así es que se pudieron identificar los genes que codifican para las proteínas del "cold-shock" o genes *csp* en *E. coli* (Jones y col., 1987) y en *B. subtilis* (Willimsky y col., 1992), *corS* en *Pseudomonas syringae* (Ullrich y col., 1995) y genes que codifican para desaturasas de ácidos grasos en plantas (Gibson y col., 1994), peces (Tiku y col., 1996) y cianobacterias (Wada y col., 1990). A pesar de la vasta acumulación de información sobre genes cuya expresión se induce ante cambios en la temperatura, poco es lo que se sabe sobre los mecanismos moleculares que controlan la detección de un cambio en la temperatura ambiente y el modo en que esta percepción se transduce en una regulación de la expresión génica.

En el caso de *B. subtilis*, una amplia variedad de proteínas se sintetiza en mayores cantidades luego de una disminución de la temperatura de 37 a 15°C (Graumann y col., 1996). Entre ellas se encuentran CheY, Hpr, las proteínas ribosomales S6 y L7/L12, la peptidil-prolil cis/trans isomerasa, la cisteína sintasa, la cetoácido reducto-isomerasa, la gliceraldehído deshidrogenasa y la triosafosfato isomerasa. De manera similar a *E. coli*, en *B. subtilis* también se identificó una familia de proteínas de bajo peso molecular involucradas en la respuesta al frío: CspB, CspC y CspD (Graumann y col., 1997). Estas 3 proteínas en conjunto parecen ser esenciales para un crecimiento óptimo a 37°C, la adaptación a bajas temperaturas y la supervivencia en fase estacionaria (Graumann y col., 1997). Si bien el papel fisiológico de estas proteínas es aún discutido se acepta que funcionarían como chaperones de ARN facilitando la traducción del ARNm a bajas temperaturas (Jiang y col., 1997). En cuanto a la regulación de los genes que las codifican,

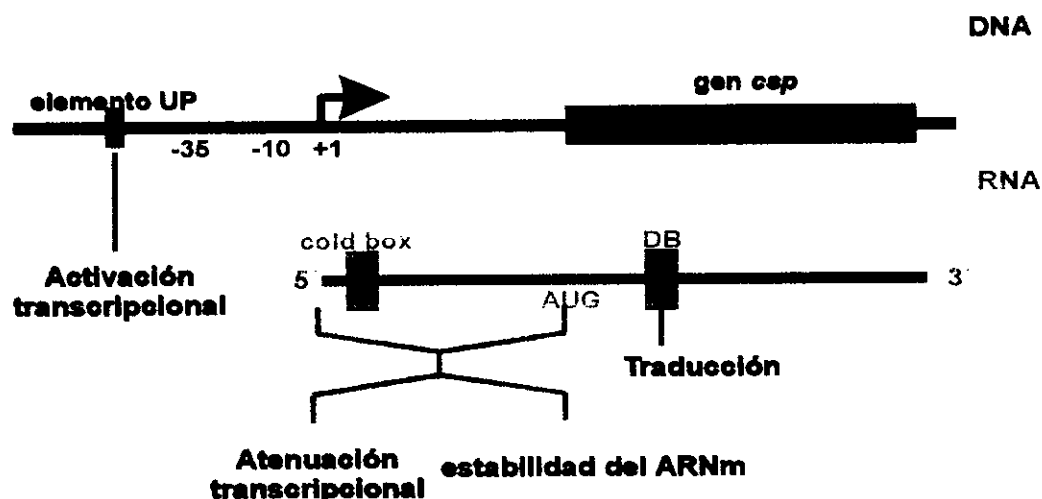


Figura 1. Motivos característicos que afectan la regulación de los genes *csp*. Las regiones involucradas en la regulación a nivel transcripcional, de estabilidad del ARNm y a nivel traduccional están representadas. +1 indica el sitio de iniciación de la transcripción.

el más estudiado ha sido el gen *cspA* de *E. coli*. En la regulación de *cspA* han sido identificados elementos involucrados en su transcripción así como también en la estabilidad y traducción del ARNm codificado por dicho gen. Dichos elementos se encuentran esquematizados en la Figura 1. Una característica común que poseen los ARNm codificados por *cspA*, *cspB*, *cspG* y *cspI* de *E. coli* (así también como por los genes *csp* de *B. subtilis*) es la presencia de una región 5' no traducida (5'-UTR) de una inusual longitud de alrededor 400 nt. El análisis por delección de esta 5'-UTR ha demostrado que es responsable de la extrema inestabilidad del ARNm de *cspA* a 37°C (Mitta y col., 1997). Por otro lado se ha postulado que el ARNm de *cspA* es traducido de manera preferencial a bajas temperaturas por la maquinaria ribosomal, respecto al resto de los ARNm, debido a la presencia de un segundo sitio de unión a ribosomas llamado "downstream box" (DB, Fig. 1; Mitta y col., 1997) en la zona codificante. En cuanto a la regulación transcripcional han sido descritas dos regiones conservadas: i) una rica en AT (UP element, Fig. 1) corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción cuya remoción disminuye la actividad del promotor de *cspA* (Mitta y col., 1997), y ii) una región de 11 nt denominada "cold box"

involucrada en la atenuación de la transcripción de *cspA* por su propio producto, CspA (Bae y col., 1997).

A pesar de que se ha acumulado una gran cantidad de información concerniente a la respuesta al estrés por frío en bacterias, muchas preguntas fundamentales continúan aun sin ser contestadas. Por ejemplo, a diferencia de lo que se sabe de la respuesta al estrés por calor, no se han identificado factores transcripcionales específicos involucrados en la respuesta al frío (Phadtare y col., 2000).

Por todo lo hasta aquí descrito, en nuestro laboratorio consideramos una cuestión biológica de gran importancia estudiar los mecanismos de transducción de señales involucrados en la respuesta al estrés por frío. En este sentido, el principal objetivo de trabajo de esta Tesis, fue tratar de elucidar la identidad de los componentes moleculares involucrados en la percepción y transducción de la temperatura como una señal biológica. Para ello se tomó como modelo un mecanismo de adaptación a las bajas temperaturas ya descrito hace más de 30 años en las bacterias Gram-positivas del género *Bacillus*: La síntesis de ácidos grasos insaturados.

Ajuste de la composición de lípidos en función de la temperatura.

Un tipo de respuesta adaptativa ampliamente conservado entre bacterias y la mayoría (si no todos) de los organismos poiquiloterms, es el ajuste de la composición de los lípidos de membrana ante el cambio de la temperatura (de Mendoza y Cronan, 1983, Cossins, 1994, Murata y Wada, 1995, Nishida y Murata, 1996). A temperaturas óptimas de crecimiento los fosfolípidos se encuentran en un estado líquido cristalino, la bicapa lipídica tiene la fluidez adecuada para una normal función celular (Fig. 2). Sin embargo, cuando la temperatura ambiente desciende, el estado físico de los fosfolípidos de membrana sufre un cambio reversible pasando del estado líquido-cristalino al estado de gel. Esto trae como consecuencia que la membrana plasmática se torne rígida y su funcionalidad se vea comprometida. Es así que los organismos poiquiloterms deben recuperar la fluidez de sus membranas para seguir creciendo a bajas temperaturas y esto lo logran reajustando la composición de los fosfolípidos de sus membranas de modo tal que descienda el punto de fusión de las mismas. El cambio de composición lipídica de la membrana más observado entre bacterias y organismos poiquiloterms es la variación

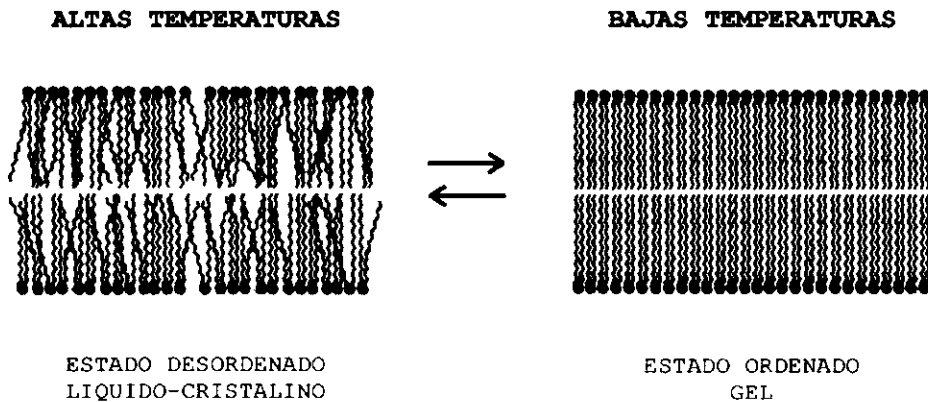


Fig. 2. Cambios en el estado físico de una bicapa lipídica en función de la temperatura. La fluidez de membrana en los organismos poiquiloterms se encuentra fuertemente condicionada por la temperatura ambiente, ver texto.

del grado de insaturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PL). A medida que la temperatura decrece, la proporción de ácidos grasos insaturados (AGIs) en los lípidos de membrana aumenta. Este mecanismo regulatorio, llamado control termal de la síntesis de ácidos grasos, estaría diseñado para amortiguar los efectos de los cambios de temperatura sobre el estado físico de los PL de membrana (Cronan y Rock, 1996, de Mendoza y Cronan, 1983, Cossins, 1994, Nishida y Murata, 1996). Esta bien documentado que la proporción de lípidos fluidos (desordenados) sobre los no-fluidos (ordenados) juega un pape fundamental en la función de las membranas biológicas. (Cronan y Rock, 1996, Nishida y Murata, 1996). Un aumento en la proporción de AGIs disminuye la temperatura de fusión de los PL de membrana mientras que una mayor proporción de ácidos grasos saturados (AGSs) ejerce el efecto opuesto (Cronan y Rock, 1996, de Mendoza y Cronan, 1983, Nishida y Murata, 1996). Este sistema regulatorio termal puede así adaptar la fluidez de la membrana para un óptimo funcionamiento ante cambios en la temperatura de crecimiento.

Los mecanismos utilizados para alterar el grado de insaturación de los PL de membrana en respuesta a un cambio en la temperatura de crecimiento dependen del mecanismo de síntesis de AGIs que el organismo posea. En bacterias, tanto mecanismos aeróbicos como anaerobios son responsables de la síntesis de AGIs.

El camino anaerobio, elucidado en detalle en *E. coli* (Fig. 3), produce cis-AGIs mediante una 2,3 hidroxidecanoil dehidrasa específica (para una revisión ver Cronan y Rock, 1996).

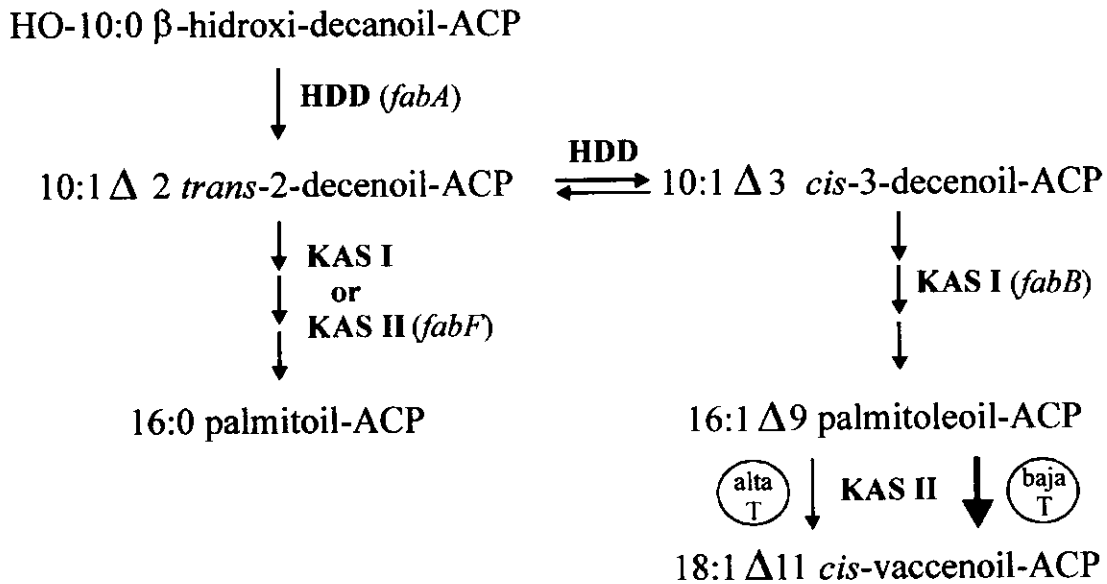


Fig. 3. Síntesis de ácidos grasos insaturados en *E. coli*. La enzima β -hidroxidecanoil-ACP-dehidrasa (HDD) cataliza el paso clave de la producción de AGIs en *E. coli*, mientras que la enzima β -cetoacil-ACP-sintasa I (KAS I) es esencial para la elongación de los acil-ACP insaturados intermedios. La enzima β -cetoacil-ACP-sintasa II (KAS II) es capaz de participar en la síntesis de AGSs y en la elongación de palmitoleil-ACP pero es incapaz de reemplazar a KAS I en la elongación de *cis*-3-decenoil-ACP. La actividad de KAS II, mayor a menores temperaturas de crecimiento, es la responsable de la modulación del contenido de AGIs en función de la temperatura. Entre paréntesis se indican los nombres de los genes respectivos.

En ciertas bacterias y en eucariotes, la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos emplea un mecanismo general común totalmente diferente al descrito para *E. coli*. Esta reacción es catalizada por un sistema de desaturación O_2 -dependiente que requiere la participación de una cadena transportadora de electrones específica (Murata y Wada, 1995, Shanklin y col., 1994). El mecanismo molecular del sistema de control termal de la biosíntesis de AGIs ha sido extensamente estudiado en *E. coli* (para una revisión, ver Cronan y Rock, 1996). En este organismo, el AGI sintetizado en mayor cantidad a bajas

temperaturas es el ácido *cis*-vaccénico. Esta respuesta regulatoria no requiere síntesis *de novo* de proteína y funciona por modulación termal de la actividad de la enzima soluble 3-cetoacil-ACP-sintasa II que convierte ácido palmitoleico en ácido *cis*-vaccénico, el cual es sintetizado a todas las temperaturas, pero en mayor cantidad a bajas temperaturas de crecimiento (ver Fig. 3, Cronan y Rock, 1996). A diferencia de las células eucariotas, las bacterias no presentan membrana nuclear ni organelas intracitoplasmáticas por lo que puede considerarse que prácticamente la totalidad de sus lípidos se encuentra formando parte de la membrana celular (de Mendoza y col., 2001). Los fosfolípidos (PL) de *B. subtilis* están constituidos mayormente por fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidiletanolamina (PE). En una proporción 3/1, estas dos especies constituyen el 80% de los lípidos totales, el 20% restante está compuesto por ésteres de lisina y fosfatidilglicerol y en menor medida por cardiolipina (CL). Los ácidos grasos (AG) son componentes esenciales de las membranas celulares en bacterias y se presentan como acil derivados de PL. En función de sus vías de síntesis es posible clasificarlos en dos familias. La de los *ácidos grasos de cadena lineal*, que incluye los ácidos palmítico, esteárico, hexadecanoico, octadecanoico, 10-metil-hexadecanoico y 3- o 4- hidroxilderivados (Kaneda, 1991). La otra familia es la de los *ácidos grasos ramificados* (AGR), que incluye a los AG de las series iso, anteiso y ω -alíclicos (Kaneda, 1991). Las especies del género *Bacillus* contienen en sus membranas los ácidos grasos ramificados iso y anteiso como especies predominantes (ver Tabla 2). Las principales especies encontradas en *B. subtilis* son anteiso-C15:0 e iso-C15:0. Los ácidos grasos de cadena lineal mirístico y palmítico, los más comunes en la mayoría de los organismos, son generalmente componentes menores en el género *Bacillus* (de Mendoza y col., 2001).

Síntesis de ácidos grasos insaturados en *B. subtilis*.

Un mecanismo regulatorio diferente al de *E. coli* para la síntesis de AGIs en respuesta a bajas temperaturas de crecimiento fue demostrado por primera vez treinta años atrás por Fulco (1967) en un gran número de especies de *Bacillus* que sintetizan AGIs mediante un mecanismo de desaturación O₂-dependiente. Esta respuesta adaptativa ha sido extensamente caracterizada en *Bacillus megaterium*, que desatura palmitato generando Δ 5-hexadecenoato solo a bajas temperaturas de crecimiento (Fujii y Fulco, 1977). Se ha postulado que la incapacidad de *B. megaterium*, creciendo a 35°C, de presentar actividad

desaturasa se debe a la ausencia, a esta temperatura, del ARN mensajero (ARNm) que codifica para la síntesis de la enzima desaturasa (Fujii y Fulco, 1977, Fulco, 1983). Así, el

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de *B. subtilis*.

Ácido graso	% del total de ácidos grasos ^a	
	37°C	20°C
Iso-C _{14:0}	1.1	1.8
n- C _{14:0}	2.3	1.1
Iso-C _{15:0}	19.3	11.1
Anteiso-C _{15:0}	32.7	42.8
Iso-C _{16:1}	nd	1.2
Iso-C _{16:0}	4.7	4.5
n-C _{16:1}	nd	2.8
n-C _{16:0}	10.1	7.8
Iso-C _{17:1}	nd	1.7
Anteiso-C _{17:1}	nd	3.2
Iso-C _{17:0}	7.7	3.9
Anteiso-C _{17:0}	18.1	14.7
n-C _{18:0}	3.7	3.4

a: ver Materiales y Métodos

nd: no determinado

comienzo de la síntesis de la desaturasa, luego de la transferencia del cultivo de 35°C a 20°C, requeriría estrictamente de la síntesis previa de un nuevo mRNA (Fujii y Fulco, 1977, Fulco, 1983).

Sin embargo, hasta ahora no existen evidencias experimentales directas que soporten el modelo propuesto de “encendido” o “apagado” transcripcional de la inducción de la síntesis de la actividad desaturasa de *Bacillus*. Los datos previos son todos indirectos y basados en el uso de inhibidores de la síntesis de ARNm o de proteínas y también podrían ser explicados debido a la necesidad de la síntesis de un componente del sistema distinto a la desaturasa tal como un componente del sistema transportador de electrones necesarios para la actividad de la enzima. En función de profundizar más en tal sistema, dado que consideramos que representa un interesante modelo para estudiar las bases moleculares de la detección de la temperatura por un organismo poiquilotermo, se decidió estudiar la inducción frío-inducible de la síntesis de AGIs en la bacteria *Bacillus subtilis*. Hemos elegido este organismo debido a la disponibilidad de una excepcional cantidad de base de datos de información genómica y genética y debido a que puede ser manipulado

genéticamente con extrema facilidad. Al igual que *B. megaterium*, *B. subtilis* creciendo a 37°C sintetiza casi exclusivamente AGSs, sin embargo cuando un cultivo mantenido a 37°C es transferido a 20°C, se induce la síntesis de un ácido graso monoinsaturado C-16:1 (Fig.4).

OBJETIVOS:

Para comenzar entonces a elucidar las bases moleculares por las cuales un cambio en la temperatura de crecimiento es percibido por la célula y el modo en que esta señal es transducida para regular la expresión del(los) gen(es) involucrado(s) en la desaturación de ácidos grasos O₂-dependiente, se han planteado para este trabajo de Tesis los siguientes objetivos:

- i) Identificación y caracterización del(los) gen(es) que codifican para la actividad desaturasa de *B. subtilis*.
- ii) Estudio de la regulación de la expresión de tal(es) gen(es)
- iii) Identificación de el(los) genes involucrados en tal regulación.

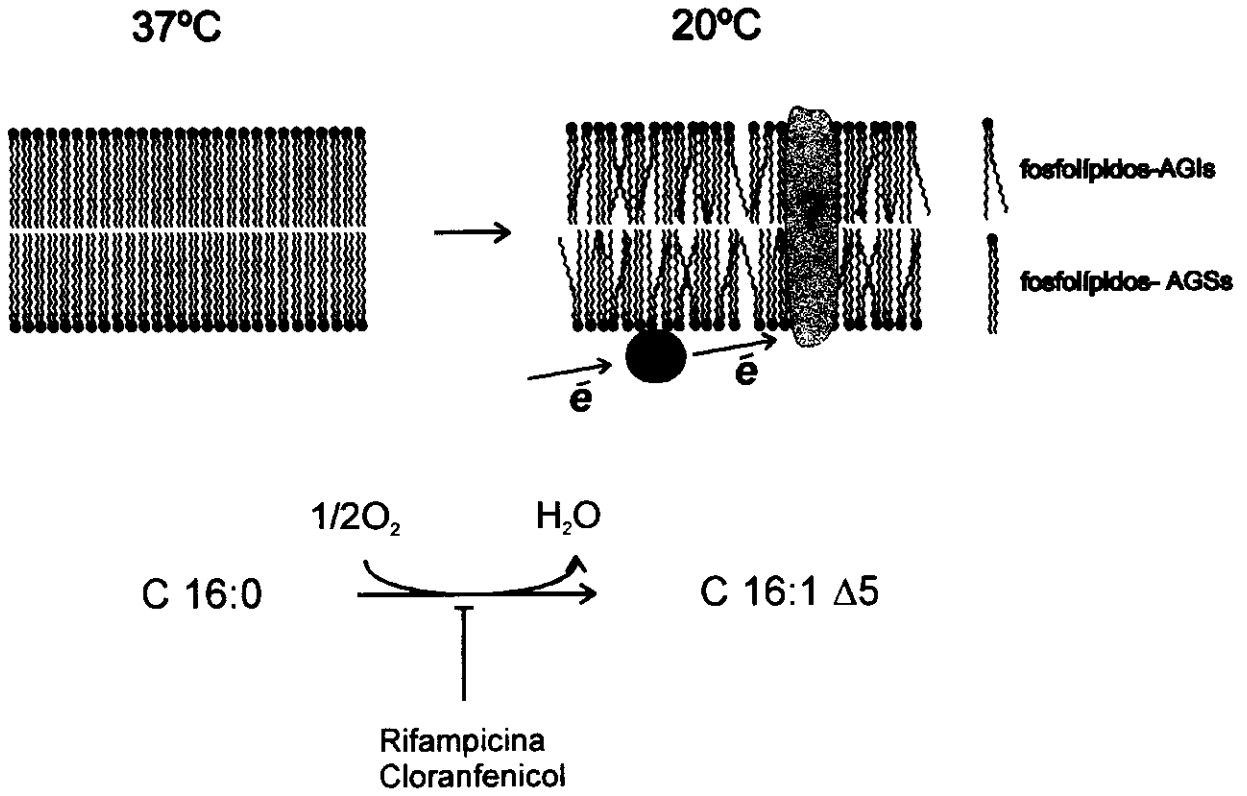


Fig 4. Síntesis de ácidos grasos insaturados en *B. subtilis*. Un cultivo de *B. subtilis* creciendo a 37°C sintetiza casi exclusivamente AGSs, sin embargo cuando un cultivo mantenido a 37°C es transferido a 20°C, es inducida la síntesis de un ácido graso monoinsaturado C-16 en una reacción que involucra una actividad desaturasa, O₂ y una cadena transportadora de electrones (Fuji y Fulco, 1977). Para la síntesis de UFA es necesaria la síntesis de novo de ARN y proteínas (Grau y de Mendoza, 1993).

MATERIALES Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo:

	Genotipo relevante	Referencia
<i>B. subtilis</i>		
JH642	<i>trpC2 pheA1</i>	colección lab.
AK667	JH642 <i>des::pAK667</i>	este trabajo
AKP2	JH642 <i>amyE:: [pdes(-635 a +31)^a-lacZ]</i>	este trabajo
AKP3	JH642 <i>amyE::[pdes(-269 a +31)^a-lacZ]</i>	este trabajo
AKP4	AKP3 <i>des::Km^r</i>	Tesis Larisa Cybulski
AKP5	JH642 <i>pspac-des</i>	este trabajo
AKP8	JH642 <i>yocG::Km^r</i>	este trabajo
AKP9	AKP3 <i>yocG::Km^r</i>	este trabajo
AK952	AKP9 <i>thrC::(pxil-yocG)</i>	este trabajo
AKP20	AKP3 <i>yocF::Km^r pKm-yocG</i>	este trabajo
AKP2047	AKP20 <i>thrC::(pxil-yocFG)</i>	este trabajo
AKP21	AKP3 <i>yocFG::Km^r</i>	este trabajo
AKP2147	AKP21 <i>thrC::(pxil-yocFG)</i>	este trabajo
AKP2152	AKP21 <i>thrC::(pxil-yocG)</i>	este trabajo
<i>E. coli</i>		
LE 392	<i>supE44, supF58, hsdR514, galK2 gal T22, metB1 trpR55 lacY1</i>	colección lab.
HC71	LE392 <i>fadE</i>	colección lab.
CY457	LE 392 <i>fabA^{ts}</i>	colección lab.
DM86	LE 392 <i>fabB^{ts}</i>	colección lab.
AK7	<i>fabB5, fadE zfa::Tn10</i>	colección lab.
DH5 α	<i>supE44, DlacU169, (ϕ80 lacZ D M115), hsd R 17, recA1, gyr A 96, Thi-1, rel A1</i>	colección lab.
M15[pREP4]	<i>lac ara gal mtl F⁻</i>	colección lab.

^a. distancia en nt respecto al sitio de iniciación de la transcripción del gen *des*.

OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.

Tabla 4.

Nombre	Secuencia ^a
RECO	ACACGAATTCTTATCATCTTCCATGACTGCTTGC
INDY	TCATTCAAGCTTATAGTTAGGCACCTTTGGACTC
BAMO	TAGTTAGGATCCTCTCATTGTGTGTCTCGGTTC
PECO 448	GTTTGGAAATTCACCCCTCAAGTGAGTGGAGC
PECO 810	AAAATGAATTCTCCGGCATCCCGATCATCGC
PECO 895	ATGCAGAATTCAAGCTATTTCCGGGTACATC
S1-1232	TCGAGGCTGAGATAAGCAAGAAACCATAGGC
23S1	TTAACGGGTGATGGCGTGCCTTTTG
23S2	ACTAACCCCTGAGCGGACGAGCCTTC
SPH1531	TTAGCGTCTGACTGAACCGAGACACACAATG
SAL1064	TCTGTATGCATGCTTTGTTTCGTCTGGATGC
SCAII034	AACATGAGCTCCGGAAGAATGCCTGATG
KPN3503	AGTGGGTACCTTTTCTTTATGTGCGATTC
SAC1729	CCCGCGAGCTCCATGATACGCTTGGGCAAAG
XHO3104	TTAGTCTCGAGCAGTTGGGCATGGCAGCTTCG
KPNI2789	TGCTGGGTACCTGAGCGATTTCTTTTGTG
FGSAL1146	AGTAAGTCGACAAGCTGAAAATGAGGTAAGATC
GKPN2923	TTCAGGGTACCAAAAAGGATCCTGGCAGATG
GCLA2283	TCAAAATCGATATAAAGGATGGCTTATATG
FGanti	TTGGCCGGTTGTACCTTTGC
DKINI	CAAGGAGGCCTAGCGAATGGCCCGGATCTCCATG
KINBGLII	AGATCTTTGGCCGGTTGTACCTTTGC
GBAM2299	GGATGGGATCCATGATTAGTATATTTATTGCAG
GSPH2915	AAAAAGCATGCTGGCAGATGCCAAGATC
FOOT1	CGGGTACATCACGAATATGG
FOOT2	TGTGTGTCTCGGTTCAGTATACGC

^a Las secuencias se muestran del extremo 5' al 3'. Los sitios de restricción están subrayados.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

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

Spizizen (SPI) (1958)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g/l
KH ₂ PO ₄	14.0 g/l
K ₂ HPO ₄	6.0 g/l
Citrato de Na	1.0 g/l
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0.2 g/l

Este medio salino fue suplementado con glucosa 0.5 %; triptofano, 0.01 %; fenilalanina, 0.01 % y casaminoácidos 0.1 % (concentraciones finales, medio SPI-CAA).

Luria Bertani (LB) (Robinson y col., 1973)

Triptona	10.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
NaCl	5.0 g/l

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

GMI: SPI 1X suplementado con glucosa, 0.5 %; extracto de levadura, 0.1 %; casaminoácidos, 0.025%; triptofano, 0.01%; fenilalanina, 0.01% (concentraciones finales). GMII: GMI suplementado con CaCl₂, 1 mM; MgCl₂, 5 mM.

Terrific Broth

Triptona	12.0 g/l
Extracto de levadura	24.0 g/l
Glicerol	0.4% (v/v)

Luego de esterilizado debe agregarse por cada 900ml de medio 100 ml de una solución de KH₂PO₄ 0.17 M, K₂HPO₄ 0.72 M.

El crecimiento en anaerobiosis sobre cajas de Petri con RB-agar fue llevado a cabo en una jarra de anaerobiosis con un sistema generador de atmósfera anaeróbica (Becton Dickinson, Cockeville, Md.). Para la preparación de medios sólidos se realizó el suplemento de agar hasta una concentración final de 1.5%. Los antibióticos utilizados se agregaron a los medios de cultivo en las siguientes concentraciones: ampicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$; cloranfenicol, 5 $\mu\text{g/ml}$; eritromicina, 1 $\mu\text{g/ml}$; lincomicina, 25 $\mu\text{g/ml}$; kanamicina, 5 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina 12.5 $\mu\text{g/ml}$.

CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas inoculando medio líquido con las correspondientes cepas bacterianas a partir de colonias aisladas, hasta alcanzar una DO_{590} de 0.1. El volumen de medio de cultivo en ningún caso superó la quinta parte del volumen del recipiente. Se utilizaron baños termostatazados a 37°C y vigorosa agitación. El crecimiento del cultivo fue monitoreado midiendo la DO del mismo a 590 nm o 525 nm, según se especifica.

EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS.

Extracción de ADN cromosomal.

La extracción de ADN de alto peso molecular de *B. Subtilis* se realizó de acuerdo al método descrito por Hoch (1991). Un cultivo líquido de *B. subtilis*, fue incubado con agitación a 37°C durante 14 horas. Las células fueron colectadas por centrifugación (7000 x g, 10 minutos, 4°C) y luego resuspendidas en 2 ml de TE (Tris pH 8 10 mM, EDTA 1 mM) sometidas a un tratamiento con lisozima (5 mg/ml) y RNAsa (5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. A la preparación se le agregó proteinasa K hasta una concentración final de 1 mg ml^{-1} y se incubó 15 minutos más a 37°C, para luego agregarle 200 μl de SDS 10%. Se realizaron dos extracciones con fenol (equilibrado con Tris-HCl, pH 7) y dos con cloroformo. Luego el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto frío y recuperado de la interfase enroscándolo en una varilla de vidrio.

Preparación de ADN plasmídico.

Se prepararon plásmidos a partir de *E. coli* por el método de lisis alcalina y precipitación con polietilenglicol (Sambrook, 1989).

Obtención de ARN total.

Se obtuvo ARN total de cultivos de *B. subtilis*, cultivados en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de azufre, de acuerdo al método descrito por Raya y col. (1998). Cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica tardía ($DO_{590} = 0.5$) las células fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer TE. La disrupción de las células se realizó con esferas de vidrio, a 4°C, en presencia de SDS, fenol equilibrado en TE, cloroformo y arcilla Macaloid. El sobrenadante acuoso fue tratado con fenol equilibrado en TE-cloroformo y luego el ARN fue recuperado por precipitación con acetato de sodio y etanol absoluto.

TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACION DE ADN.

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción y la ligación con T4 ADN ligasa se efectuó siguiendo las recomendaciones de los respectivos proveedores. Para aislar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se usaron membranas S & S NA45 DEAE (Lizardi).

ANALISIS DE ARN POR NORTHERN-BLOT Y DOT-BLOT.

Los análisis por hibridación tipo Northern se se llevaron a cabo separando cantidades iguales de ARN (entre 8 y 15 µg por calle) en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes como ha sido descrito (Lopez de Felipe y col., 1995) o en geles de poliacrilamida desnaturizantes (Drider y col., 1998). El tamaño del transcripto del gen *des* fue calculado por comparación con marcadores de peso molecular de ARN (Promega) en geles desnaturizantes de poliacrilamida. El tamaño del transcripto del operón *desKR* fue calculado del mismo modo pero en geles desnaturizantes de agarosa. Los análisis por hibridación tipo Dot-Blot fueron realizados según Sambrook y col. (1989), utilizando 4, 8 y 16 µg de ARN total. Los experimentos de Dot-Blot fueron realizados por triplicado. En todos los casos, para la detección del mensajero del gen *des* se sintetizó una sonda monocadena de ADN con la enzima T4 ADN polimerasa

(Pharmacia) utilizando el cebador antisentido INDY y como sustrato un fragmento de ADN obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos RECO e INDY. Para la detección del mensajero del operón *desKR* se sintetizó una sonda monocadena de ADN con la enzima T4 ADN polimerasa (Pharmacia) utilizando el cebador antisentido FGANTI y como sustrato un fragmento de ADN obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos DKINI y KINBGLII (ver Tabla 4). La sonda específica para al ARNr 23S se sintetizó por "random priming" (Sambrook y col., 1989) utilizando sustrato un fragmento de ADN obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos 23S1 y 23S2 (ver Tabla 4). Para los análisis de estabilidad de los ARNm-des, la radioactividad en las bandas de los Northern-blots y en los puntos de los Dot-Blots fue cuantificada utilizando un instrumento Phosphorimager (ImageQuant).

MEDICION DE LA DEGRADACION DE LOS ARN TOTALES.

La cinética de degradación de los ARN totales de *B. Subtilis* se determinó como ya ha sido descrito por Wang y Bechhofer (1996). El ARN total de *B. Subtilis* fue marcado in vivo mediante un pulso de dos minutos con 30 μCi de [^3H]-uridina a 30 ml de un cultivo en mitad de fase exponencial. Luego de este lapso la transcripción fue inhibida por el agregado de actinomicina D y ácido nalidíxico (conc. finales 4 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), mas el agregado de uridina fría (conc. final 200 $\mu\text{g/ml}$). A los tiempos indicados alícuotas de 1 ml fueron tomadas por duplicados y los ácidos nucleicos fueron precipitados con ácido tricloro acético 20%. La radioactividad precipitable fue colectada y cuantificada según ha sido descrito por Wang y Bechhofer (1996).

ENSAYO DE EXTENSION DE CEBADOR.

El ensayo de extensión de cebador se realizó utilizando transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (Promega), junto al oligonucleótido S1-1232 marcado en el extremo 5' con [^{32}P] y 5 μg de ARN total extraído de cultivos de la cepa JH642 (ver Capítulo II). Se secuenció el ADN de doble hebra del plásmido pDM10 usando el método de Sanger y col.(1977) con Sequenase 2.0 T7 DNA Polymerase (Pharmacia) y utilizando el oligo S1-1232 como cebador. La concentración final de acrilamida en los geles de secuencia fue de 6%, guardando una relación acrilamida:bis-acrilamida de 38:2.

La concentración de urea fue 8 M. El buffer utilizado tanto para la preparación de la acrilamida como para la electroforesis fue TBE (Tris-Borato, 0.089 M; EDTA, 1 Mm). La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura constante de 45°C.

ENSAYO DE RETARDO EN GELES.

Se utilizó como sonda de ADN del promotor del gen *des* un fragmento de ADN obtenido por incorporación de [α -³²P]-dATP mediante PCR utilizando como sustrato el plásmido pDM10 y los cebadores PECO895 y S1-1232. El fragmento resultante de 367 pb fue purificado de a partir de geles de poliacrilamida 5% con una actividad específica de $2,5 \times 10^6$ cpm/ μ g. Las reacciones de unión entre h-DesR y la sonda se llevaron a cabo en buffer Tris-HCl 25 mM pH= 8, DTT 1 mM, EDTA 0.25 mM, Cl₂Mg 4 mM, poli(dI-dC) 200 ng y glicerol 5% (volumen final 25 μ l). Luego de 30 minutos a temperatura ambiente la reacción fue interrumpida agregando 2,8 ml de glicerol 50% y las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida 5% y corridas por 1 hora en buffer Tris-borato 45 Mm, EDTA 1 mM pH= 8 a 4°C por 2 horas. Posteriormente los geles fueron secados y autorradiografiados.

ENSAYO DE PROTECCION A LA DNasaI.

Las sondas de ADN utilizadas para este ensayo fueron obtenidas por PCR utilizando el ADN del plásmido pDM10 como molde y los cebadores FOOT1 y FOOT2. Ambos oligonucleótidos fueron previamente marcados en sus extremos 5' con [γ -³²P]ATP utilizando T4 polinucleótido quinasa (Pharmacia). Los productos de PCR, de 178 pb, fueron purificados a una actividad específica de 8×10^6 cpm/ μ g. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l en buffer Tris-HCl 25 mM pH= 8, DTT 1 mM, EDTA 0,25 mM, Cl₂Mg 5 mM, NaCl 22 mM, CaCl₂ 2,5 mM y glicerol 5%. Las sondas (concentración final de 2,6 nM) fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con h-DesR (conc. final 700 nM) y poli(dI-dC) (4 ng/ μ l). Luego DNasaI (0,001 unidades) fue agregada y se prolongó la incubación a la misma temperatura por 5 minutos más. Las reacciones fueron interrumpidas agregando 25 ml de una solución conteniendo acetato de amonio 2 M, EDTA 0,15 mM, acetato de sodio 0,8 M, timo de ternera 100 μ g/ml y ARNt 400 μ g/ml. Las muestras de ADN fueron

precipitadas en etanol y redisueltas en 8 μ l de buffer de secuencia (formamida deionizada 80%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol 0,1%, xilen cianol 0,1% y EDTA 1 mM). Las muestras (3 μ l, 75000 cpm) fueron cargadas en geles de poliacrilamida 8% junto a reacciones de secuencia obtenidas por el método de terminación de cadena (T7 ADN polimerasa, kit de Pharmacia).

ANALISIS DE ACIDOS GRASOS.

Marcado de cultivos de *E. coli* y *B. Subtilis* con [14 C]-palmitato y [1- 14 C]-acetato.

Para las medidas de desaturación de ácidos palmítico en *E. coli*, las células fueron crecidas en los medios de cultivo antes descritos hasta fase exponencial. Alícuotas de tales cultivos (2 ml) fueron marcadas con 2 μ Ci de [14 C]-palmitato. Para las medidas de síntesis de ácidos grasos, células de *E. coli* fueron cultivadas hasta fase exponencial y entonces alícuotas de 2 ml fueron marcadas con 10 μ Ci de [1- 14 C] acetato de sodio. Para marcar la cepa AK7/pHP13, el cultivo fue primero privado del suplemento de oleato por centrifugación y luego las células fueron resuspendidas en 2 ml de medio fresco LB. Para las medidas de síntesis de UFAs en *B. subtilis*, las células fueron crecidas a 37°C hasta fase exponencial con aereación y luego muestras 2 ml fueron transferidas a 20°C y expuestas a 15 μ Ci de [1- 14 C] acetato de sodio por 12 hs.

Extracción de lípidos.

Para la extracción de lípidos totales de las distintas cepas de *E. coli* y *B. Subtilis* se siguió la técnica de Bligh & Dyer (1959) modificada por Grau y de Mendoza (1993)

Preparación de metil-ésteres de ácidos grasos.

El extracto lipídico obtenido mediante la técnica de Bligh & Dyer modificada primero fue secado por corriente de N_2 y la reacción de transesterificación se llevó a cabo mediante el agregado de 1.5 ml metóxido de Na anhidro 0.5 M. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente se agrega 1,5 ml de HCl 2N y se procede a la extracción de los metil-ésteres con el agregado de 3 ml de éter de petróleo.

Separación de metil ésteres de AGIs y AGSs.

Los metil-ésteres fueron separados en las fracciones saturados e insaturados por cromatografía de capa delgada de sílica gel impregnada en nitrato de plata 20% (Grau y de Mendoza, 1993). La cromatografía fue desarrollada a -17°C, las placas fueron

autorradiografiadas, y las áreas apropiadas de la sílica gel fueron extraídas y depositadas en viales con solución de centelleo para determinar su contenido radioactivo (Grau y de Mendoza, 1993).

Análisis de AGIs por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (GC-MS).

La posición de la doble ligadura del ácido graso mono-insaturado sintetizado por las cepa de *E. coli* pDM10/AK7 fue determinada extrayendo los lípidos como se ha descrito anteriormente. Luego los lípidos totales fueron transterificados con metóxido de sodio y los metil-ésteres resultantes fueron derivatizados mediante el agregado de DMDS según Yamamoto y col. (1991). Posteriormente estos aductos fueron analizados por GC-MS en una columna capilar SPB-1 (longitud 29 mts, diámetro 0,25 cm) en un equipo Shimadzu QP-5000. Las condiciones cromatográficas fueron: T° inyección 240°C, T° interface 280°C, presión columna 10 psi, flujo columna 1 ml/min, flujo total 29,3 ml/min. El contenido de ácidos grasos de *B. subtilis* de la Tabla 2 se determinó sintetizando ésteres de ácido picolínico a partir de ácidos grasos extraídos de cultivos de *B. subtilis* crecidos en medio SPI-CAA a 37°C o a 20°C según la técnica descrita por D.J. Harvey (1982). Los ésteres de ácido picolínico fueron analizados por GC-MS (Harvey, 1982)

CONSTRUCCION DE CEPAS DE *B. subtilis*.

Fusiones transcripcionales al gen *lacZ*.

Las fusiones transcripcionales de diferentes regiones del líder de *des* al gen *lacZ*, se construyeron usando el plásmido pJM116 (Dartois y col., 1996). Este plásmido posee el gen *lacZ* sin su promotor, precedido por un sitio de múltiple clonado y permite la integración de las fusiones por recombinación homóloga en el locus *amyE*, generando mutantes *amy*⁻ (Sekiguchi y col., 1975). Para la construcción de las cepas AKP2 y AKP3, fragmentos de ADN de 663 pb y 301 pb respectivamente fueron generados por PCR utilizando los oligonucleótidos BAMO y PECO448 para obtener el fragmento de 663 pb y BAMO y PECO810 para el de 301 pb (ver Tabla 4). Ambos fragmentos fueron purificados y sujetos a cortes con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* antes de ser clonados en el plásmido pJM116.

Mutantes de los genes *des*, *desR* y *desK*.

Para obtener la cepa AK667, el gen cromosomal *des* fue interrumpido mediante la transformación de la cepa JH642 con el plásmido pAK667, derivado del vector integrativo pJM103 (Perego, 1993) que lleva clonado en sus sitios *EcoRI-HindIII* un fragmento de 667 bp interno al gen *des* obtenido por PCR sobre el ADN cromosomal de la cepa JH642 utilizando los oligonucleótidos RECO e INDY. La cepa AKP4 fue construida en colaboración con L. Cybulski (comunicación personal). Para obtener la cepa AKP5 se construyó primero el plásmido pPA13. Para ello un fragmento de ADN obtenido por PCR con los cebadores SPH1531 y SAL1064 fue purificado y digerido con las enzimas *SphI* y *SalI*. Dicho fragmento fue clonado en el vector pAG58 obteniendo el plásmido pPA13. Para construir la doble mutante nula *desK desR*, un fragmento de ADN de 2378 pb fue obtenido por PCR usando los cebadores SCAI1034 y KPN3503. Dicho fragmento fue digerido con las enzimas *ScaI* y *KpnI* y clonado en el vector pBluescript SK II generando el vector pFG2378. En dicho vector se insertó un cassette de resistencia a kanamicina (cassete Km^R) en los sitios *EcoRI-HindIII* generando el plásmido pFG2378KAN. Este vector se utilizó para transformar por un doble evento de recombinación homóloga la cepa AKP3 obteniendo entonces la cepa AKP21. Para interrumpir el gen *desR* un fragmento de ADN de 1466 pb fue obtenido por PCR usando los cebadores SAC1729 y XHO3164. Dicho fragmento fue digerido con las enzimas *SacI* y *XhoI* y clonado en el vector pBluescript SK II generando el vector pFG1466. En dicho vector se insertó un Km^R en los sitios *Clal-XbaI* generando el plásmido pFG1466KAN. Este vector se utilizó para transformar por un doble evento de recombinación homóloga las cepas JH642 y AKP3 obteniendo entonces las cepas AKP8 y AKP9, respectivamente. La cepa AKP20 fue construida clonando primero un fragmento de ADN de 1765 pb obtenido por PCR usando los cebadores SCAI1034 y KPNI2789 en los sitios *ScaI-KpnI* del vector pBluescript SK II. Al plásmido resultante se le introdujo en los sitios *EcoRI-HindIII* un cassette Km^R sin su terminador transcripcional generando el plásmido pFG1765KAN. Dicho vector fue utilizado para transformar la cepa AKP3 generando la cepa AKP20. Para posicionar el operón *desKR* y el gen *desR* bajo el promotor xilosa (*pxil*) en el locus *thrC* de *B. subtilis*, *desKR* y *desR* fueron amplificados por PCR y clonados bajo el *pxil* en el vector pGS40 (G. Schujman, comunicación personal). Luego los fragmentos de ADN conteniendo las fusiones *pxil-*

desKR y *pxil-desR* fueron clonados en el vector integrativo pDG795 (Guerot-Fleury y col., 1995) para luego ser utilizados en la inserción en el locus *thrC* de cada una de las cepas utilizadas. El operón *desKR* fue clonado en los sitios *SalI-KpnI* del vector pGS40 utilizando un fragmento de ADN obtenido por PCR con los cebadores FGSAL1146 y GKPN2923. La fusión *pxil-desKR* fue obtenida digiriendo este plásmido con *BamHI*, fue purificada y luego clonada en el mismo sitio del vector pDG795 dando el plásmido pAG47. Este vector fue utilizado para transformar las cepas AKP20 y AKP21 generando las cepas AKP2047 y AKP2147, respectivamente. El gen *desR* fue clonado en los sitios *ClaI-KpnI* del vector pGS40 utilizando un fragmento de ADN obtenido por PCR con los cebadores GCLA2283 y GKPN2923. La fusión *pxil-desR* fue obtenida digiriendo este plásmido con *BamHI* y *EcoRI*, fue purificada y luego clonada en los mismos sitios del vector pDG795 dando el plásmido pAG52. Este vector fue utilizado para transformar las cepas AKP9 y AKP21 generando las cepas AKP952 y AKP2152, respectivamente.

TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES.

Células competentes de *E. coli* fueron transformadas con ADN plasmídico usando el procedimiento de cloruro de calcio o por electroporación (Ausubel y col., 1987, Sambrook y col., 1989). Las células competentes de *B. Subtilis* se obtuvieron por el método de dos pasos de Dubnau y Davidoff-Abelson.(1971).

CLONADO, EXPRESION Y PURIFICACION DE h-DesR.

El gen *desR* fue amplificado por PCR utilizando los cebadores GBAM2299 y GSPH2915. El producto de PCR fue digerido con las enzimas *BamHI* y *SphI*, purificado y clonado en el vector de expresión pQE30 (QIAGEN) generando el plasmido pAR18. Esta construcción posiciona una cola de 6 residuos de histidina en el extremo N terminal de DesR (h-DesR) y fue utilizada para transformar la cepa de *E. coli* M 15 [pREP4]. La sobreexpresión y purificación de h-DesR fue realizada mediante procedimientos de rutina (QIAGEN).

DOSAJE DE PROTEINAS.

La concentración de proteínas fue determinada mediante los métodos descritos por Bradford (1976) o Lowry y col. (1951), usando como patrón una solución de BSA, cuya concentración fue determinada espectrofotométricamente utilizando un valor de $A_{280\text{nm}}$ (0,1%, 1cm) de 0,667.

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y ENSAYOS DE INMUNOBLOT.

Las distintas cepas de *B. Subtilis* fueron crecidas según se indica en cada caso. Alícuotas de 1 ml fueron recolectadas, centrifugadas y congeladas a -20°C hasta su utilización. Los pellets fueron resuspendidos en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, PMSF 1mM y DTT 0.1 mM) agregando 180 μl de buffer por cada 1 $\text{DO}_{525\text{nm}}$. 20 μl de cada muestra fueron incubados durante 15 minutos con lisozima 500 mg/ml a 37°C y posteriormente calentados a ebullición por 5 minutos en presencia de buffer de carga para electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, Sambrook y col., 1989). Las muestras fueron sujetas a SDS-PAGE en geles poliacrilamida 12%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas utilizando anticuerpos de conejo anti-h-DesR, seguidos de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (Sambrook y col., 1989).

ENSAYO DE ACTIVIDAD AMILASA.

El fenotipo *amy*⁻ se detectó haciendo estrías de las cepas en estudio en placas de LB-agar conteniendo 1% (p/v) de almidón soluble. Después de 48 horas de incubación, 5 ml de reactivo de Lugol (0.5% p/v I_2 y 1% p/v KI) fueron volcados sobre la superficie de la placa de Petri. Después de un minuto el colorante fue descartado y se observó la formación de halos transparentes alrededor de las colonias *amy*⁺, mientras que las colonias *amy*⁻ no formaban halo.

ENSAYO DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.

Las cepas de *B. Subtilis* conteniendo fusiones transcripcionales al gen *lacZ* fueron cultivadas en medio SPI suplementado (ver arriba) en distintas condiciones según se indica en Resultados. Las distintas muestras fueron colectadas por centrifugación y se

realizó el ensayo de β -galactosidasa según una adaptación del método descrito por Miller (1972). Tres muestras de 1 ml fueron centrifugadas y resuspendidas en el mismo volumen de buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM). Se tomó una alícuota y su volumen fue ajustado a 0.73 ml con buffer Z. Se le agregaron 10 μl de lisozima (10 mg ml^{-1}) y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Luego se agregaron 10 μl de Tritón 100 al 10% y 100 μl de ONPG (4.5 mg ml^{-1}). Los tubos fueron transferidos a un baño a 28°C durante exactamente 15 minutos. La reacción se detuvo con 150 μl de Na_2CO_3 1.2 M. Las muestras se midieron a 420 nm. La actividad específica se expresó en unidades Miller (UM).

METODOS BIOINFORMATICOS.

Las secuencias de nucleótidos y proteínas fueron analizadas usando los programas BLAST y PSIBLAST (Alstchul y col., 1990, 1997). Los alineamientos de proteínas fueron creados usando el método CLUSTAL (Thompson y col., 1994). Los índices de hidropatía de las proteínas fueron calculados con el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

CLONADO Y CARACTERIZACION DEL GEN QUE CODIFICA

PARA LA Δ^5 -DESATURASA DE *Bacillus subtilis*.

Aislamiento del gen de la desaturasa de *B. subtilis*.

Nuestra estrategia para lograr el clonado del gen que codifica la actividad desaturasa de *B. subtilis* se basó en la complementación de dos distintos tipos de mutantes de *E. coli* que requieren de AGIs para crecer. Para la síntesis de AGIs, *E. coli* necesita los productos de los genes *fabA* y *fabB* (Cronan y Rock, 1996), *fabA* codifica para la enzima β -hidroxi-decanoil-dehidrasa que introduce un doble enlace *cis* a nivel del C-10 formando *cis*-3-decenoil-ACP, el cual es un intermediario esencial en la síntesis de AGIs (Fig. 3). El producto de *fabB*, la enzima condensante β -cetoacil-acil-sintasa I, también es esencial para AGIs de cadena larga dado que cataliza un paso limitante en la síntesis de AGIs (Fig. 3; Clark y col., 1983). Esta reacción probablemente sea la elongación de *cis*-3-decenoil-ACP (Cronan y Rock, 1996, Fig. 3). A pesar de tener la síntesis de AGIs bloqueada, ambas mutantes de *E. coli*, *fabA* y *fabB* sintetizan AGSs normalmente, de modo tal que requieren el suplemento de AGIs, como el ácido oleico, en el medio de cultivo para poder crecer (Cronan y Rock, 1996). Dado que la introducción de un doble enlace *cis* en ácidos grasos saturados de cadena larga por desaturación es estrictamente dependiente de O₂ (Fulco, 1983, Murata y Wada, 1995, Shanklin y col., 1994) hemos asumido que la expresión funcional del(los) gen(es) que codifican para la actividad desaturasa de *B. subtilis* podría complementar la auxotrofia de ambas mutantes de *E. coli* *fabA* y *fabB* en condiciones aeróbicas pero no en ausencia de O₂. Para ello se utilizó una biblioteca genómica de *B. subtilis* construida sobre el plásmido pHP13 con la intención de complementar las cepas CY457 y DM86 (ver Tabla 3) que contienen una mutación termosensible en los genes *fabA* y *fabB*, respectivamente. Estas cepas, a temperaturas no permisivas (42°C) requieren de la suplementación de ácido oleico. Luego de transformar las cepas CY457 y DM86 con la biblioteca genómica de *B. subtilis* se obtuvieron, en ambos casos, colonias capaces de crecer a 42°C en ausencia de ácido oleico. Los plásmidos contenidos por tales cepas fueron aislados y por medio de análisis por digestión con enzimas de restricción (datos no mostrados) se comprobó que todos los clones capaces de complementar las auxotrofias de las cepas CY457 y DM86 contenían plásmidos con el mismo patrón de restricción. Se seleccionaron 3 plásmidos (cada uno con un inserto del genoma de *B. subtilis* de 2,4 kpb) y la secuencia de los fragmentos insertos fue obtenida mediante secuenciación automática. Para los tres

insertos la secuencia obtenida fue la misma de modo tal que unos de los clones, denominado pDM10, fue elegido para su posterior caracterización. Este plásmido recombinante fue incapaz de complementar las mutantes de *E. coli* en condiciones anaeróbicas. Estos resultados demostraron que la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos de membrana de las mutantes complementadas era dependiente de O₂ y sugirieron fuertemente que habíamos aislado un gen de *B. subtilis* que codificaba para una actividad desaturasa.

Análisis de la secuencia del gen de la de desaturasa.

El inserto de 2,4 kbp presente en el plásmido pDM10 fue secuenciado en ambas cadenas y se encontró un marco abierto de lectura (ORF) de 352 residuos aminoacídicos (ver Fig. 5). El producto traducido de este ORF demostró tener una mediana similaridad (aproximadamente un 63 %) y también una relativamente baja identidad (aproximadamente un 23%) con las secuencias amminoacídicas deducidas de desaturasas de membrana tilacoides de cianobacterias y plantas (ver Fig. 6).

Sin embargo, para este ORF el perfil de hidropatía de la secuencia deducida de aminoácidos calculado utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) es significativamente similar al perfil de desaturasas de *Synechocystis sp.*, *Anabaena variabilis* (Sakamoto y col., 1944) , *Arabidopsis thaliana* (Falcone y col., 1994) y *Glycine max* (Hitz y col., 1994). Se puede observar que, como ha sido previamente descrito (Sakamoto y col., 1994) todas estas desaturasas poseen dos dominios hidrofóbicos postulados como posibles dominios transmembrana y tres motivos ricos en histidina altamente conservados, uno HXXXH y dos HXXHH ubicados del lado citoplasmático de la membrana (ver Fig. 7). En el caso del gen *des* de *B. subtilis* uno de los dos dominios HXXHH es HHVHH. Ha sido probado que los residuos conservados de histidina son esenciales para la actividad Δ^9 desaturasa de rata (Shanklin y col., 1994) y se ha sugerido que probablemente actúen como ligandos de átomos de hierro involucrados en el transporte de electrones que tiene lugar durante la reacción de desaturación (Shanklin y col., 1994, Murata y Wada, 1995). Estos motivos de histidina también están conservados en la postulada desaturasa de *B. subtilis*, excepto que uno de los motivos HXXHH es reemplazado por HHXHH. Además, la distancia entre cada dominio de histidina y el final de la región hidrofóbica previa también se encuentra conservada en la secuencia de 1056 nt traducida de *B. subtilis* cuando es comparada con

GAATTCGGGATCGTGTCTCCCGGACCAGCATGTCTATATATCAAATGAAGCAAAAATCCAAGCAAAAACGGCGTTAGAACGCTTAGG	90
TTATCGGGTAACCATCGCTGAACACGCAAATGAATGTAACGAATTTGATTCATCCTCTATCGAGTCAAGAGTCCATGATCTGCACGCTGC	180
CTTTTTTGATCCAGGCGTCAAAGCGATTTTAAACGACACTCGGAGGGTTTAAATCAAATCAGCTGCTGCGTTATCTTGATTACGAGAAAAAT	270
CAAACGACATCCAAAATTTCTGTGCGGTTATCCGATATAACCGCTCTTTGCAACGCTATTTATCAAAAACGGGCTTTGTTACGTATTC	360
AGGTCCCACTTCTCAACATTTGCAATGAAAAAGGACTCGATTATACAGAGGAGTATTTTCTTTCTTGTGCGCTTCAGACGATCCGTT	450
TGAAATTCACCCCTCAAGTGAAGTGGAGCGATGATCGCTGGTTTTTGGATCAAGAAAACAGGCGTTTTTATCCTAATAACGGCCCTGTTGT	540
AATCCAAGAAGGTTATCGGGAAGTACTTTAATTGGCGGAACTTATGCACGCTTAATTTGCTGCAGGGAACGGAGTATTTCCCGAAAC	630
AGAACATACTATTTTATTGATTGAAGATGATTATATGTCAGACATCCATATGTTTGACCGCGATCTGCAATCACATCCACCTCCCCCG	720
CTTTTTACATGTAAGGCGATTTGATCGGCAGATTTGAGAAAGCATCAAACGTATCAATAGATCTTGTAAAAGCCATGATCGAAACAAA	810
AAAAGAATTATCCGGCATCCCGATCATCGCAAATATAAATGCCGGACATACCTCGCAATTGCCAGCTTCCCTATAGGAGGAACATGCAG	900
GATTGAAGCTATTTCCGGTACATCAGAAATATGGATTGATAAACATTAATCAGCTTGTAATTTTTTACAAGCTTTTTTAGCCGAATCG	990
IR	
GCTATGCATGCCGCACGAGACATGACAAATGTCTATATAGGAGGCATGATGTGTGCTACTACAAAAGACTTCTCTCATTAGCGTATACTGA	1080
ACCGAGACACACAATGAGAGGATACTTACTATGACTGAACAAACCATTGCACATAAACAAAACAGCTGACAAAGCAAGTCCGCTGCATT	1170
RBS M T E Q T I A H K Q K Q L T K Q V A A F	
GCTCAGCCTGAAACAAAAACAGCCTGATTCAGCTTTTAAACACGTTTATCCATTCTTGGCCCTATGGTTTCTTGCTTATCTCAGCCCTC	1260
A Q P E T K N S L I Q L L N T F I P F F G L W F L A Y L S L	
GATGTCCTCATCTTCTTACGTTAGCATTAAACGGTATGCGCGAGTTTTCTGACAAGAATTTTATCATCTTCCATGACTGCTGCCAT	1350
D V S Y L L T L A L T V I A A G F L T R I F I I F H D C C H	
CAATCTTTTTCAACAAAAACGCTATAACCACATCTCCGTTTTCTGACAGGTGTCCTGACTTTATCCCGTATCTTCAATGGCAGCAC	1440
Q S F F K Q K R Y N H I L G F L T L F P Y L Q W D E	
AGCCATTCGATTTCATGCAACTAGCAGCAATCTGGATAAACCGGAACAGGAGACATCTGGATGTTAACAGTAAACGAATATAAAGCT	1530
S H S I H H A T S S N L D K R G T G D I W M L T V N E Y K A	
GCATCCAGACGAACAAAGCTTGCATACAGACTTTATAGAAACCCGTTTATCATGTTTATCTCGGACCGATTTATGTTTTTCTGATCAG	1620
A S R R T K L A Y R L Y R N P F I M F I L G P I Y V F L I T	
AACCGTTTTTAAACAAAAAGGCGCAAGACGCAAGGAACGTTAAACACATACCTTACGAATCGGCAATTGTCGCGTTGGCTGCCGCTTGC	1710
N R F N K K G A R R K E R V N T Y L T N L A I V A L A A A C	
TGCTGATCTTTGGCTGGCAATCGTTTTACTGGTGCAAGGCCGATATTTCTGATTCAGTTCAATCGGTGTTGGCTGTTTTATGTG	1800
C L I F G W Q S F L L V Q G P I F L I S G S I G V W L F Y V	
CAGCATACCTTTGAAGATCTTATTTTGAAGCGGATGAAAACCTGGAGCTACGTTACGGCTGCTGTTGAAGGCAGCTCATTTTATAAAGCTC	1890
Q H T F E D S Y F E A D E N W S Y V Q A A V E G S S F Y K L	
CCGAACTGCTTCAATGGCTAACAGGCAATATGGTTACCACCAGCTTCATCATTGAGTCCAAAGGTGCCATAACTATAAGCTTGAAGTT	1980
P K L L Q W L T G N I G Y H H V H H L S P K V P N Y K L E V	
GCTCATGAACATCAGCAACATTAAAAAACGTACCGACAATCACCTTAAACAAACAGCCTGCAATCACTTGGCTTCCGCTCTATGGGATGAA	2070
A H E H E P L K N V P T I T L K T S L Q S L A F R L W D E	
GATAACAAACAGTTTTGTGCTATTTCCGGCTATAAAACATATACCTGTAAGCCTTCCGCTGATTCACCAGAAAAACAGAAGCTGCCGAAG	2160
D N K Q F V S F R A I K H I P V S L P P D S P E K Q K L R K	
AATGCCATGATAAAGGAAGGCTTCTTAATATACTAGAAGGCTTCCCTTTTATTGTTGGAGGGTGCATTCTGGCTTTCACAATGATAAAG	2250
IR	
N A * * *	

Fig.5. Secuencia de ADN del gen *des* de *B. subtilis*. Se ilustra la secuencia entera del inserto del plásmido pDM10 y la secuencia de aminoácidos deducida del producto del gen *des*. Los nucleótidos 1 al 946 corresponden a parte de un ORF que presenta homología al gen *mccF* del plásmido pMCCC7 de *E.coli* (González Pastor y col., 1995). El posible sitio de unión al ribosoma (RBS) y las secuencias de los posibles terminadores de la transcripción (IR) están subrayados.

los perfiles de las desaturasas de cianobacterias y plantas mostrados en la Fig. 7. Estudios de hibridización de ADN genómico de la cepa silvestre de *B. subtilis*, digerido con varias enzimas de restricción con una sonda específica para este gen, reveló una única señal de hibridización, indicando la presencia de una única copia del gen (datos no mostrados). Así, basados en las características de este ORF y en la capacidad del gen de *B. subtilis* de abolir el requerimiento de AGIs exógenos de las mutantes auxótrofas de *E. coli fabA^{ts}* y *fabB^{ts}*, hemos denominado a este gen *des*, por *desaturasa*.

El gen *des* codifica para una Δ5 desaturasa.

E. coli es incapaz de introducir un doble enlace en ácidos grasos saturados de cadena larga completos (Cronan y Rock, 1996), por lo tanto, el criterio que utilizamos para

<i>Synechocys</i>	-----MTATIPPLRPETESSNPDRP-----IADLKLQDIIKTLPEKCFEKKASKAWAS	48
<i>Anabaena v</i>	----MTTSI IKNQEIKNKLSNPE-----LRLKDI IKTLPKECFQQNRKAWTQ	44
<i>Glycine_max</i>	VAIPVQPAPVESAEYRKQLAEDYGFRQVGEPLSDDVTLKDVINPLPKEVFIEDVVKAWKS	60
<i>Arabidopsis</i>	VAAPVAPPSADSAEDREQLAESYGFRQIGEDLPENVTLLKDIMDTPKEVFIEDLKALKS	60
<i>B. subtilis</i>	----MTEQTI AHKQK-----QLTKQVAA-FAQPETKNSLIQLLNT	35
.		
<i>Synechocys</i>	VLITLGAIALGYLGI IYLPWYCLPFTWIWTGTALTGAFFVVGHDGHRSAFAKKRWVNDLVG	108
<i>Anabaena v</i>	ALLSVVMVGLGYWSLAIAPWFLPIAWIFTGTALTGFFVIGHDCGHRSAFAKKRWVNDLVG	104
<i>Glycine_max</i>	VLSVTSYALGLFMISKAPWYLLPLAWVWTGTAITGFFVIGHDCAHRSAFSSNKLVEDIVG	120
<i>Arabidopsis</i>	VLSVTSYTLGLFMIKSPWYLLPLAWAWTGTAITGFFVIGHDCAKSFSKKNLVEDIVG	120
<i>B. subtilis</i>	FIPFFGLWFLAYLSLDVSYLLTLALTVIAAG-FLTRIFIIFHDCCHQSFQKRYNHILG	94
 * * * * * * *	
.		
<i>Synechocys</i>	HIAFAPLIYPFHWSRLLDHHHLHTNKIEVDNAWDPWSVEAFQASPAIVR--LFYRAIRG	166
<i>Anabaena v</i>	HIEMMPLIYPFHWSRIKHNHHKHTNKLEDDNAWHPIRPEVFASWGKTRQS-AFKLFMRQ	163
<i>Glycine_max</i>	TLAFMPLIYPPEWRFKHDRHAKTNMLREDTAWHPVWKDEFESTPLLKA- I IYGYGPF	179
<i>Arabidopsis</i>	TLAFPLVYYPPEWRFKHDRHAKTNMLVHDTAWQVPPEEFESSPVMRKA- I IYGYGPI	179
<i>B. subtilis</i>	FLTGLTLFPLQWQSHS IHATSSNLDKRGTGDIWMLTVNEYKAASRRTKLAYRLYRN	154
 * * * * * *	
.		
<i>Synechocys</i>	PFWWTGSI FHWGLMHFKLSNFAERDRNKVCLSIAVVFLFAAVAFPALII TTGVWGFVKFW	226
<i>Anabaena v</i>	RLWVWVGSVGHWAVVHFDWRKFKVKDQADVLSVAVVFLFAAVAFPALIIATTGIWGFVKFW	223
<i>Glycine_max</i>	RCWMS--IAHWLWVHFDLKKFRPSEVPRVKISLACVEAFIAIGWPLIIYKTGIMGWIKFW	237
<i>Arabidopsis</i>	RPWLS--IAHWVWVHFNLKKFRASEVNRVKISLACVEAFMAVGWPLIVYKVGILGWVKFW	237
<i>B. subtilis</i>	PFIMF--I-LGPIYVFLITNRFNKKGARRKERVNTYLTNLAI-VALAAACCLIFGWSFL	210
 * * * * * *	
.		
<i>Synechocys</i>	LMPWL VYHFWMST---FTIVHHTIPEIRFPAEDWSAAEAQLNGTVHCDYPRWVEVLCHD	283
<i>Anabaena v</i>	FVPWLYGHFWMST---FTIVHHTYDVPFEAENKWHEAMAQLFGTIHCDYPKWVEVLCHD	280
<i>Glycine_max</i>	LMPWLYGHFWMST---FTMVHHTAPYIPFKYSEEWNRQAQLNGTVHCDYPKWIEILCHD	294
<i>Arabidopsis</i>	LMPWLYGHFWMST---FTMVHHTAPHIPFKPADEWNAQAQLNGTVHCDYPSWIEILCHD	294
<i>B. subtilis</i>	LVQGPFI LSGSIVWLFYVQHTFEDSYFEADENWSYVQAAVEGSSFYKLPKLLQWLTGN	270
 * * * * * *	
.		
<i>Synechocys</i>	INVHI PHHLSVAI PSYNLRLAHASLK--QNWGPFLYERT-----FNWG-LMQQISGQCH	334
<i>Anabaena v</i>	INVHVPHHLSTAI PSYNLRLAYSSIQ--ENWG DYLDHDEL R-----FSWS-LMKLITDECQ	332
<i>Glycine_max</i>	INVHI PHHISPRIPSYNLRAAHKSLQ--ENWGQYLNEAS-----WNWR-LMKTIMTVQC	345
<i>Arabidopsis</i>	INVHI PHHISPRIPSYNLRAAHESI Q--ENWGKYTNLAT-----WNWR-LMKTIMTVCH	345
<i>B. subtilis</i>	IGYHHVHHLSPKVPNYKLEVAHEHHEPLKNVPTITLKTSLQSLAFRLWDEDNKQFVSFRA	330
	* * * * * * *	
.		
<i>Synechocys</i>	LYDPDNGYRT----FSSLK---	349
<i>Anabaena v</i>	LYQTDVGYQP----FKDY YAGR	350
<i>Glycine_max</i>	VYDKEKSLCC----LRRTCP--	361
<i>Arabidopsis</i>	VYDK-----	349
<i>B. subtilis</i>	IKHIPVSLPPDSPEKQKLRKNA	352

Fig. 6: Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de desaturasas. La secuencia aminoacídica deducida del ORF clonado en el vector pDM10 fue alineada mediante el programa Clustal W junto a las secuencias de aminoácidos de desaturasas de plantas y cianobacterias. Los asteriscos representan identidad entre aminoácidos mientras que los puntos denotan similitud.

demostrar que el producto del gen *des* de *B. subtilis* tiene actividad desaturasa fue investigar si células de *E. coli* que contienen el plásmido pDM10 eran capaces de desaturar [¹⁴C] palmitato. Para evitar la β-oxidación del palmitato por *E. coli*, se decidió

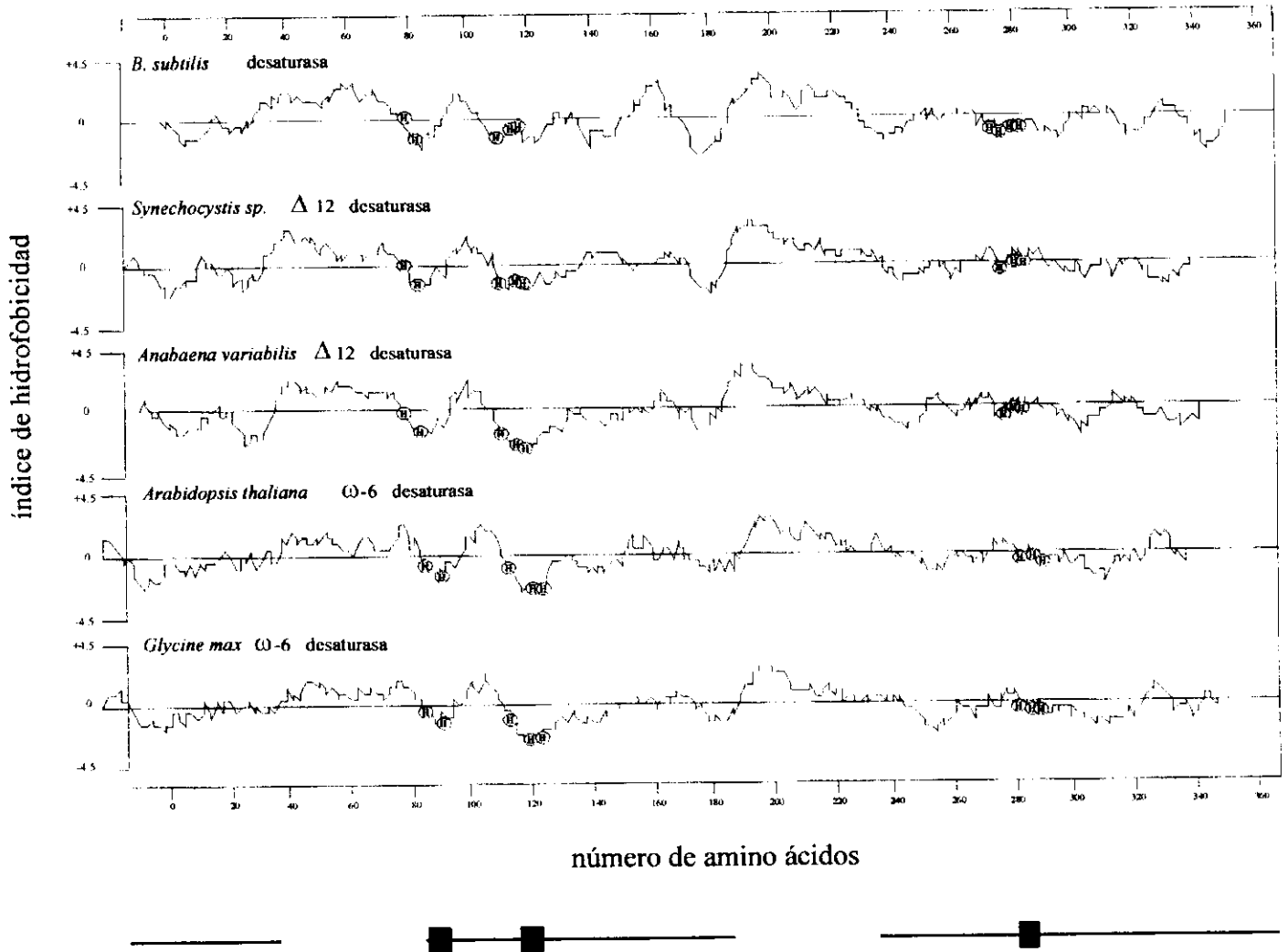


Fig 7. Perfil de hidropatía y sitios conservados de histidina de la postulada desaturasa de *B. subtilis*. Los índices de hidropatía de las desaturasas de *B. subtilis*, *Synechocystis sp.*, *Anabaena variabilis*, *Arabidopsis thaliana* y *Glicine max* fueron calculados mediante el algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) con una ventana de 11 residuos. Los residuos de histidina de los dominios conservados están representados por H rodeadas en círculos sombreados y rectángulos negros en la parte de abajo de la figura. Los rectángulos grises representan los dominios hidrofóbicos con más de 40 residuos aminoácidos (posibles dominios transmembrana). Notar que los perfiles están alineados en función de los dominios conservados de histidina y entonces los amino terminales de las desaturasas no coinciden.

transformar la cepa AK7 con el plásmido pDM10. Esta cepa es deficiente en la degradación de ácidos grasos (*fadE*) y también es incapaz de sintetizar AGIs debido a una mutación nula en el gen *fabB*. Dado que la cepa AK7 transformada con el plásmido pDM10 fue capaz de crecer en ausencia de oleato (datos no mostrados), se estableció que el gen *des* pudo curar la auxotrofia para AGIs de la cepa AK7. Se procedió entonces

a cultivar la cepa AK7 con y sin el gen *des* en presencia de [^{14}C]-palmitato, se extrajeron los lípidos totales y el perfil de ácidos grasos fue analizado por cromatografía en placas de sílica gel impregnadas con AgNO_3 (ver Materiales y Métodos). Como puede observarse en la Fig. 8 A (calles 1), la cepa AK7 en ausencia del gen *des* es incapaz de introducir dobles enlaces en el palmitato. Sin embargo la cepa AK7/pDM10 (Fig. 8 A, calles 3 a 5) convierte al [^{14}C] palmitato en un AGI que migra de manera similar al ácido graso 16:1 sintetizado por células de *B. subtilis* transferidas de 37°C a 20°C (Fig. 8 A, calle 2). Estos experimentos claramente demuestran que el producto del gen *des* posee actividad desaturasa y que las condiciones existentes en *E. coli* son suficientes para mantener niveles adecuados de cofactores necesarios para la desaturación aeróbica. Como se muestra en la fig. 8 B los niveles de desaturación de palmitato exógeno por la cepa pDM10/AK7 fueron mayores en células mantenidas a 30°C que a 37°C y 42°C .

Para reforzar la idea sugerida por los datos obtenidos mediante marcación in-vivo con [^{14}C] palmitato, el perfil de ácidos grasos de la cepa AK7/pDM10 fue comparado con el de la línea parental *fabB*⁺ creciendo dichas cepas en [^{14}C]-acetato seguido por cromatografía en placas de sílica gel impregnadas con AgNO_3 de los ácidos grasos radioactivos. Como puede observarse en la Fig. 8 C, la cepa AK7/pDM10 produce un único ácido graso insaturado (calles 2 a 4), el cual migra en una posición intermedia respecto a los AGIs de la cepa silvestre de *E. coli* HC71: $\Delta 9\text{-C}16:1$ y $\Delta 11\text{-C}18:1$ (Fig. 8 C, calle 1). En contraste con lo observado para la cepa AK7/pDM10, la cepa control AK7/pHP13 sintetiza solamente ácidos grasos saturados (AGSs, calle 5). También pudo observarse que, de manera similar a la desaturación de palmitato exógeno, en la cepa de *E. coli* que expresa el gen *des* de *B. subtilis* disminuye la síntesis de AGIs ante mayores temperaturas de crecimiento (Fig. 8 D). La posición de la doble ligadura del AGI sintetizado por la cepa AK7/pDM10 fue entonces determinada mediante análisis de espectrometría de masa (MS) del aducto producto de la derivatización con dimetil disulfuro (DMDS). En este tipo de derivatización, el DMDS reacciona con la doble ligadura del éster metílico de AGI introduciendo un grupo metilo a cada lado del doble enlace. El aducto resultante puede ser entonces resuelto mediante cromatografía gaseosa y al entrar a la fuente de ionización del espectro de masa se fragmenta en un conjunto de iones fácilmente identificables. Debido a que el simple enlace entre los dos C de la cadena alifática que portan los grupos metilo es ligeramente más débil que el resto, el espectro de masa resultante se verá enriquecido en la señal dada por los iones que

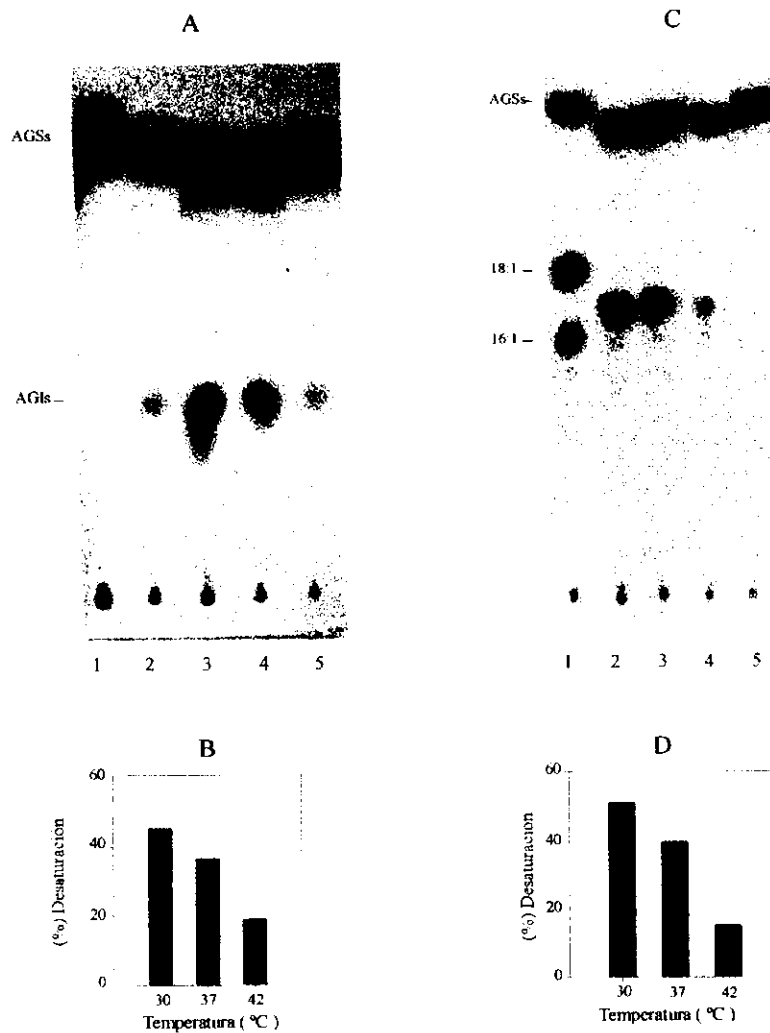


Figura 8. Estudio de la expresión del gen *des* de *B. subtilis* en *E. coli*. (A) Autoradiografía de los productos de marcación con [1-¹⁴C]palmitico de cepas portadoras de los plásmidos pHP13 o pDM10. Calle 1: células de la cepa AK7/ pHP13 fueron crecidas hasta fase exponencial en medio LB suplementado con oleato y luego lavadas para remover el ácido graso. Una alícuota de 2 ml fue marcada con 2 µCi de palmitico radioactivo y mantenida a 30°C por 90 min antes de ser procesada. Calle 2: Perfil de ácidos grasos sintetizados por la cepa silvestre de *B. subtilis* JH642 cultivada a 37°C hasta mitad de fase exponencial, marcada con [1-¹⁴C]acetato y luego transferida a 20°C por 12 hs. Calles 3 a 5: Células de la cepa AK7/pDM10 fueron cultivadas hasta mitad de fase exponencial a 30°C, alícuotas de 2 ml fueron marcadas con 2 µCi de palmitico radioactivo y mantenidas a 30°C (calle 3), 37°C (calle 4) o 42°C (calle 5) por 90 min antes de ser procesadas. Los lípidos fueron procesados como se describe en Materiales y Métodos. (B) Desaturación de [1-¹⁴C] ácido palmitico a distintas temperaturas. Los metil ésteres de AGIs representados en la calles 2 a 4 en (A) fueron cuantificados y expresados como porcentaje del total de metil ésteres recuperados. (C) Autoradiografía de los productos de marcación con [1-¹⁴C] acetato de cepas portadoras de los plásmidos pHP13 o pDM10. Cultivos de las cepas HC71/pHP13 (calle 1), AK7/pDM10 (calles 2 a 4) y AK7/pHP13 (calle 5) fueron crecidos hasta mitad de fase exponencial a 30°C. Alícuotas de 2 ml fueron marcadas con 10 µCi de acetato radioactivo e incubadas por 90 min a 30°C (calles 1, 2 y 5), 37°C (calle 3) o 42°C (calle 4) antes de ser procesadas. La cepa salvaje de *E. coli* HC71 sintetiza ácidos *cis*-Δ⁹-hexadecenoico y *cis*-Δ¹¹-octadecenoico. (D) Cuantificación al igual que en (B) de las fracciones de AGIs representadas en (C).

devienen de la ruptura de tal enlace. Se puede así, por simple identificación de tales iones, inferir la posición del doble enlace original en el metil éster del ácido graso (Fig. 9). El espectro de masa del aducto mostró una señal débil de un ion con una relación masa/carga (m/z) de 362, correspondiente al peso molecular teórico del ion molecular del aducto del metil éster de 16:1. Los picos observados a m/z 161 y m/z 201 indican que la posición del doble enlace es $\Delta 5$ (Fig. 10). El pico observado a m/z 129 se debe a la pérdida de metanol del ion de m/z 161, lo cual es característico de aductos de DMDS de ésteres de AGIs que contienen la doble ligadura cerca del grupo carboxilo (Yamamoto y col., 19XX). Estos resultados demuestran que el gen *des* de *B. subtilis* codifica para una $\Delta 5$ desaturasa.

La letra Δ indica que la posición del doble enlace es contada a partir del extremo carboxilo del AGI. Algunas desaturasas actúan de esta manera, es introduciendo la doble ligadura luego de identificar el $-\text{COOH}$ terminal del resto ácido graso, mientras que otras lo hacen a partir del grupo metilo. Para determinar si la $\Delta 5$ desaturasa reconoce la posición en la cual introduce el doble enlace tomando como referencia el $-\text{COOH}$ o el $-\text{CH}_3$ terminal del ácido graso se procedió entonces a analizar por CG-SM el perfil de AGIs de la cepa de *E. coli* AK7/pDM10 cultivada en medio rico suplementado con AGSs de distinta longitud de cadena. Como puede observarse en la Figura 11, la posición del doble enlace de los AGIs resultantes es siempre $\Delta 5$, demostrando que la desaturasa codificada por el gen *des* define la especificidad en la ubicación del doble enlace contando la longitud de cadena del resto ácido graso a partir del extremo carboxilo terminal.

Disrupción del gen *des*.

Para determinar si la actividad $\Delta 5$ -desaturasa es esencial para la viabilidad de *B. subtilis* a bajas temperaturas de crecimiento, hemos interrumpido el gen *des* como se describe en Materiales y Métodos, la mutante resultante *des*⁻ fue denominada AK667. En primer lugar se analizó la capacidad de esta cepa de sintetizar AGIs. Para ello, cultivos de las cepas AK667, JH642 y AK667/pDM10, fueron crecidos a 37°C hasta mitad de fase exponencial y luego fueron transferidos a 20°C en presencia de [¹⁴C]-acetato. Los lípidos fueron extraídos y el perfil de ácidos grasos fue analizado por cromatografía en sílica gel

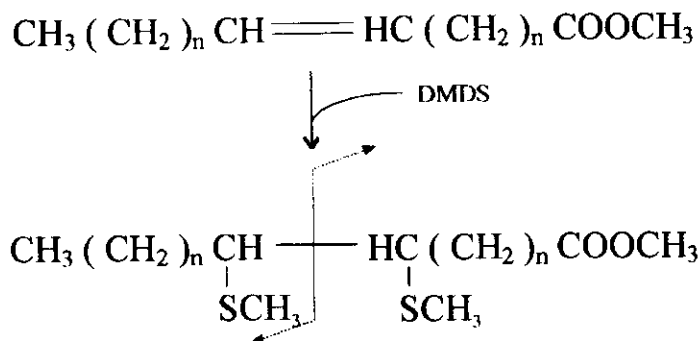


Fig. 9. Esquema de la fragmentación más probable que sufre un metil éster de ácido graso monoinsaturado derivatizado con DMDS.

impregnada con AgNO_3 . En la Fig. 12 puede observarse que a diferencia de la cepa salvaje

JH642 (calle 1), la cepa *des*⁻ no sintetiza AGIs (Fig. 12, calle 2). Asimismo, la síntesis de AGIs en esta cepa se restituye al ser transformada con el plásmido pDM10 (Fig. 12, calle 3). Mediante estos resultados podemos concluir que el gen *des* es el único que codifica para una actividad desaturasa activa a bajas temperaturas en *B. subtilis*.

Para investigar si la viabilidad o velocidad de crecimiento de las células *des*⁻ se encontraba comprometida a bajas temperaturas de crecimiento, la mutante y la cepa parental salvaje fueron cultivadas a 37 y 20°C en distintos medios de cultivo líquidos y sólidos. En ninguna de las condiciones ensayadas se encontraron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre las cepas *des*⁻ y *des*⁺ (datos no mostrados). Tampoco se observaron marcadas diferencias en la morfología de colonia o al microscopio óptico (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que el gen *des* no es esencial en *B. subtilis* para el crecimiento a las temperaturas ensayadas.

Control termal de la expresión del gen *des*.

Fulco y col. (Fujii y Fulco, 1977) han propuesto que la iniciación de la síntesis de AGIs luego de la caída de la temperatura de crecimiento en *Bacillus megaterium* requiere de la inducción transcripcional del gen que codifica para la actividad desaturasa. Es decir que para la desaturación de ácidos grasos ante la caída de la temperatura de crecimiento es necesaria la síntesis de novo de ARNm y proteínas. Tal postulado se basó exclusivamente en evidencias experimentales que indicaban que la desaturación de AGS

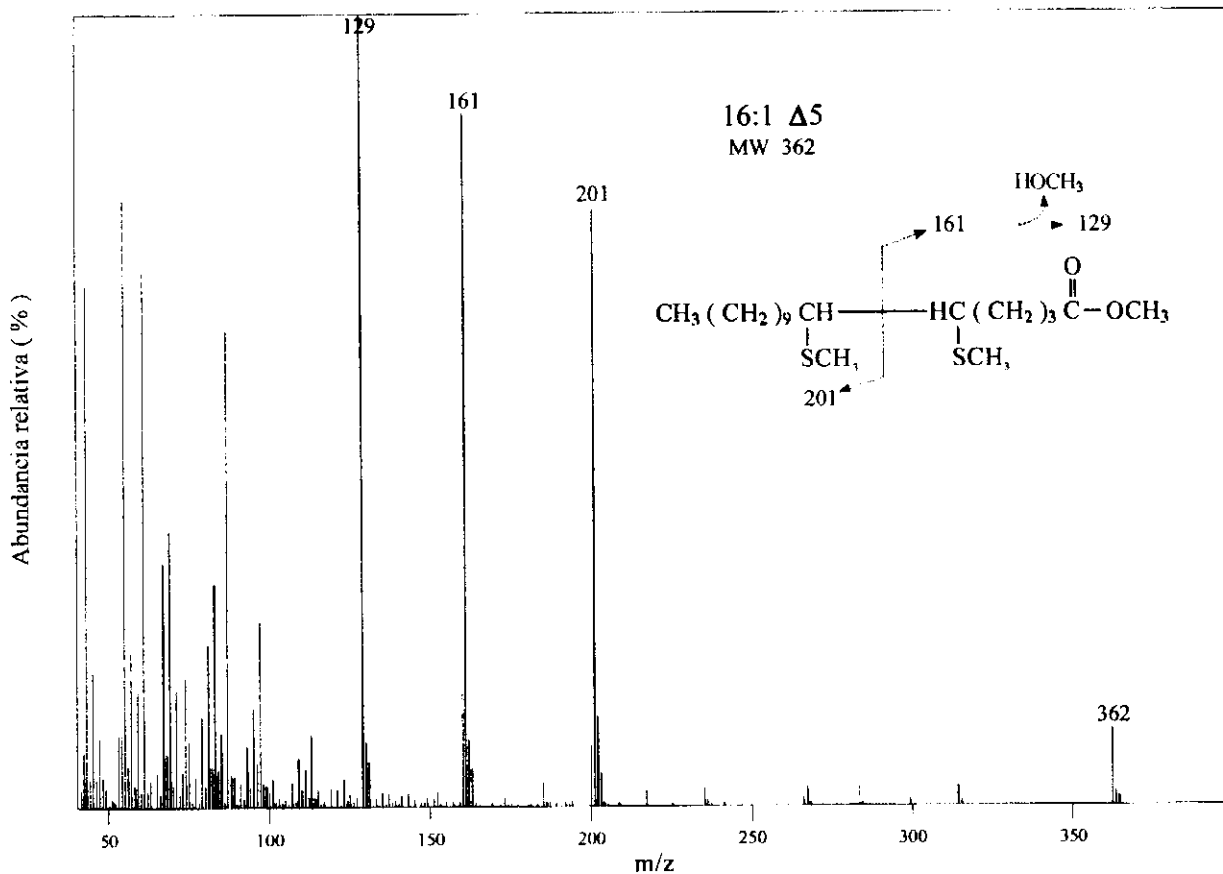


Fig. 10. Análisis de la posición del doble enlace del aducto con DMDS del metil éster de ácido graso C16:1 de la cepa AK7/pDM10. Los lípidos de esta cepa fueron extraídos y transesterificados y luego los aductos de DMDS fueron sintetizados como se describe en Materiales y Métodos. El análisis por CG-SM de tales aductos se llevó a cabo en una columna capilar SPB-1 en un equipo de CG-SM Shimadzu QP-5000.1991).

a bajas temperaturas era prevenida por la adición de antibióticos que inhibían la transcripción o la traducción cuando eran agregados antes de la disminución en la temperatura de crecimiento (Fujii y Fulco, 1977, Fulco, 1983). Estos experimentos fueron corroborados posteriormente por Grau y de Mendoza (1993) en *B. subtilis*. Sin embargo, dada la naturaleza indirecta de estos datos, no se puede descartar la posibilidad de que la Δ^5 -desaturasa sea sintetizada constitutivamente y que la caída de la temperatura de crecimiento lleve a la inducción transcripcional de algunos otros genes que codificaran para distintos cofactores involucrados en la desaturación aeróbica tales como por ejemplo, componentes de la cadena transportadora de electrones.

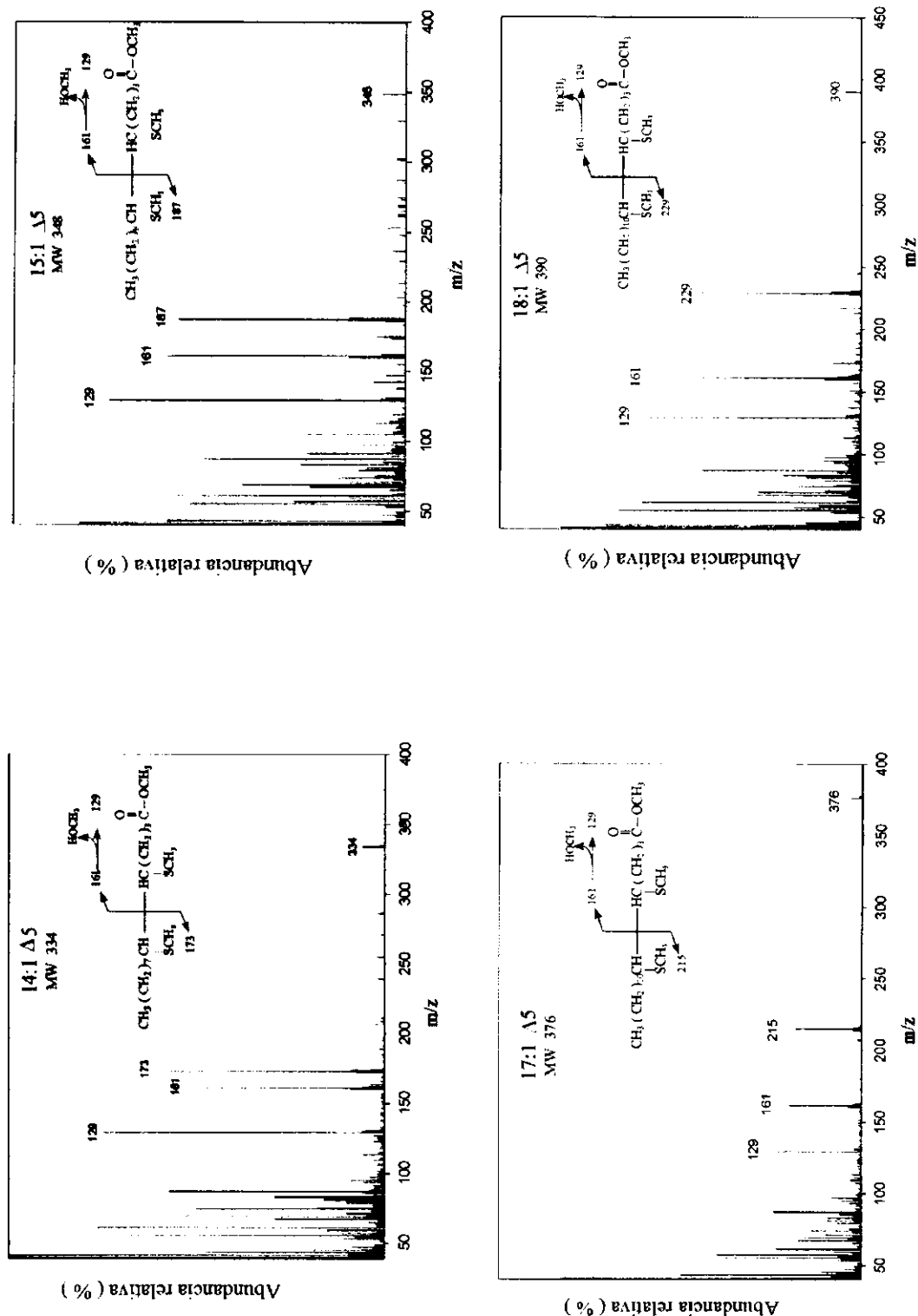


Fig. 11. El producto del gen *des* de *B. subtilis* codifica para una actividad Δ5 desaturasa. Cultivos de la cepa de *E. coli* AK7/pDM10 fueron incubados en presencia de AGSs de 14C (A), 15C (B), 17C (C) y 18 (C), posteriormente los lípidos de esta cepa fueron extraídos y transesterificados y luego los aductos de DMDS fueron sintetizados como se describe en Materiales y Métodos. El análisis por CG-SM de los aductos correspondientes a los AGIs de 14, 15, 17 y 18C se llevó a cabo en una columna capilar SPB-1 asociada en un equipo de CG-SM Shimadzu QP-5000.

Con el objeto de entender el mecanismo de regulación por temperatura del gen *des*, se llevó a cabo un análisis transcripcional mediante la construcción de una cepa de *B. subtilis* que portara la posible zona promotora del gen *des* fusionada transcripcionalmente al gen *lacZ* de *E. coli*. Para ello, en el vector integrativo pJM116 se clono un fragmento de ADN de 600 pb corriente arriba del codón de iniciación de la traducción del gen *des*. (ver Materiales y Métodos). El vector resultante, denominado pAR10, fue integrado ectópicamente en el locus *amyE* del cromosoma de *B. subtilis* mediante un proceso de doble recombinación homóloga (ver Materiales y Métodos). Cuando la cepa resultante, denominada AKP2, que contiene una fusión *des-lacZ* es crecida a 37°C los niveles de actividad β -galactosidasa son muy bajos (Fig. 13), pero cuando se la transfiere a 20°C, la actividad β -galactosidasa comienza a acumularse alcanzando un máximo cerca de las 4 horas luego de la caída de la temperatura con niveles de inducción de 10 a 15 veces los niveles existentes a 37°C (Fig. 13). Luego de aproximadamente 6 horas a 20°C, la síntesis de la β -galactosidasa decrece. Es interesante mencionar que cuando el vector pAR2 es introducido en células de *E. coli*, se registró una expresión constitutiva de la fusión *des-lacZ* (datos no mostrados). Estos experimentos permiten concluir que la transcripción del gen *des* es específicamente controlada por la temperatura de crecimiento en *B. subtilis*.

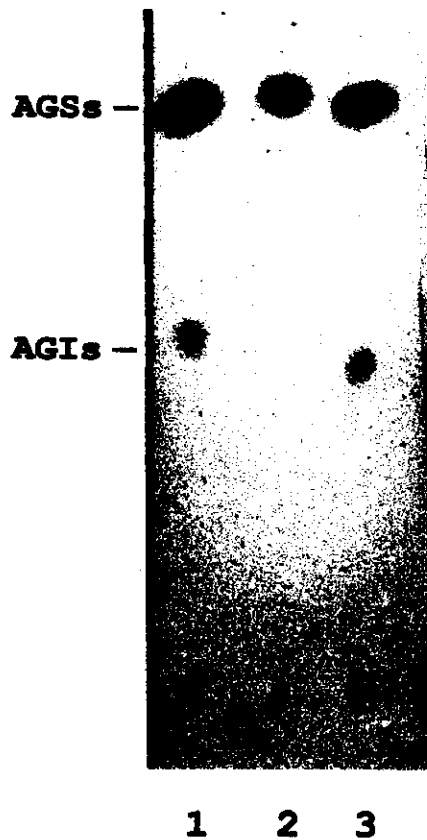


Fig. 12. Perfil de ácidos grasos sintetizados en cultivos de distintas cepas de *B. subtilis*. Cultivos de la cepa salvaje JH642 (calle 1), de la cepa *des⁻* (calle 2), y de la cepa *des⁻* portadora del plásmido pDM10 (calle 3), fueron crecidos hasta mitad de fase exponencial a 37°C. Luego, alícuotas de 2 ml de los distintos cultivo fueron expuestas a 10 μ Ci de [14 C] acetato y transferidas a 20°C como temperatura de crecimiento por 12 horas. Los lípidos fueron entonces extraídos y transesterificados. Los metil ésteres resultantes fueron resueltos por cromatografía de en sílica gel impregnada en AgNO₃ como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones de ácidos grasos saturados (SFA) en las calles 1, 2 y 3 contienen 10.000 cpm, 8.000cpm y 10.000 cpm respectivamente. La fracción de AGIs en la calle 1 contiene 1.400 cpm, en la calle 3 1.700 cpm, mientras que en la calle 2 la fracción de AGIs solo contiene niveles de fondo de radioactividad.

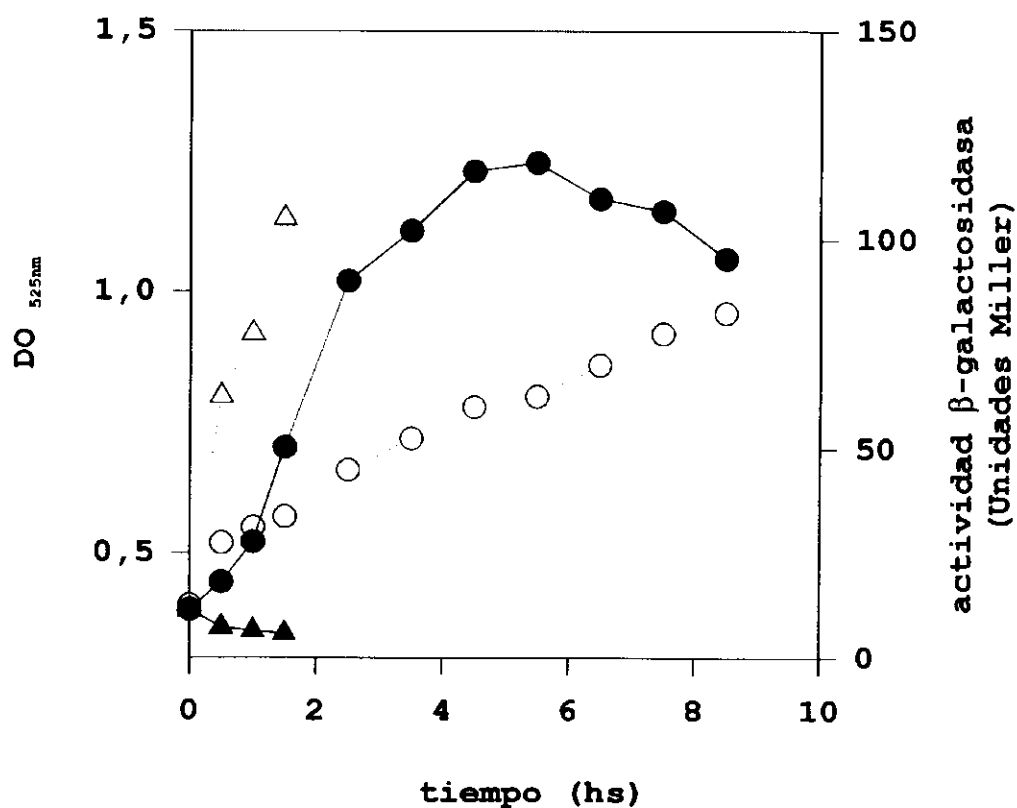


Fig. 13. Patrón de expresión de la fusión transcripcional *des-lacZ* luego de una caída en la temperatura de crecimiento. Un cultivo de la cepa de *B. subtilis* AKP2 fue crecido a 37°C hasta una densidad óptica de 0,35 a 525nm (DO_{525nm}) y luego dividido en 2 partes. Una fue transferida a 20°C (círculos) y la otra fue mantenida a 37°C (triángulos). Las DO_{525nm} (símbolos vacíos) y las actividades β-galactosidasa (símbolos llenos) fueron determinadas a los intervalos de tiempo indicados.

DISCUSION

La síntesis de AGIs en *B. subtilis* constituye un sistema atractivo para estudiar la regulación de la expresión génica por la temperatura. A diferencia del bien estudiado mecanismo constitutivo que utiliza *E. coli* para aumentar la cantidad de AGIs en sus fosfolípidos a bajas temperaturas, la expresión del sistema de desaturación de *Bacillus* es un proceso inducido por el frío (Fujii y Fulco, 1977, Grau y de Mendoza, 1993). Sin embargo, hasta ahora, el estudio mecanístico de esta respuesta ambiental se ha visto limitado por la imposibilidad de identificar el gen que codifica para el componente clave de este proceso de adaptación al frío: la desaturasa de *Bacillus*. En este capítulo se reporta el aislamiento y caracterización del gen de *B. subtilis des* que codifica para una acil-lípido $\Delta 5$ -desaturasa. La secuencia primaria de la desaturasa de *B. subtilis* muestra las características comunes de las desaturasas unidas a membrana: dos grupos de dominios hidrofóbicos extensos, ambos capaces de conformar dominios transmembrana, y tres motivos ricos en histidina uniformemente ubicados del lado citoplasmático de la membrana. Mediante dos experimentos distintos: *i*) desaturación in vivo de ácido palmítico por *E. coli* y *ii*) el análisis de la posición del doble enlace por GC-MS, podemos concluir que la desaturasa de *B. subtilis* funciona introduciendo un único doble enlace en la posición $\Delta 5$ de ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Cuando estas conclusiones fueron publicadas (Aguilar y col., 1998) constituyó el primer trabajo que describe el clonado, secuenciación del gen y caracterización funcional de una desaturasa bacteriana a excepción de las de cianobacterias. Asimismo, el gen *des* es el primer gen identificado en un organismo que codifica para una actividad $\Delta 5$ -desaturasa.

Nuestros experimentos de GC-MS indican que el único producto de desaturación en la cepa AK7/pDM10 fue el C16:1 $\Delta 5$. La incapacidad de esta cepa de *E. coli* de elongar 16:1 $\Delta 5$ a 18:1 $\Delta 7$ esta de acuerdo con resultados previos de nuestro laboratorio que sugerían que la desaturasa de *B. subtilis* toma como sustrato las cadenas acilos de los PL de membrana y no los de los acil-tioésteres (Grau y de Mendoza, 1993). Es importante mencionar que ha sido demostrado que las enzimas condensantes de *E. coli* catalizan la adición de dos átomos de C a partir de malonil-ACP a acil-tioésteres pero son incapaces de utilizar como sustratos los grupos acilo de los PL de membrana. (Cronan y Rock, 1996). Por ejemplo, los ácidos grasos 16:1 $\Delta 6$ y 14:1 $\Delta 9$ sintetizados por células de *E. coli* expresando acil-ACP desaturasas de plantas, son también elongados a 18:1 $\Delta 8$

(Cahoon y col., 1996) y 16:1 $\Delta 11$ (Schultz y col., 1996), respectivamente, por este organismo. Así, la desaturasa de *B. subtilis* parece ser una lípido-desaturasa, del tipo de las lípido-desaturasas de membrana tilacoides de cianobacterias y cloroplastos de plantas (Murata y Wada, 1995). Es interesante señalar que de acuerdo con la observación de que las acil-lípido desaturasas parecen estar sólo presentes, dentro de las bacterias, en las bacterias Gram-positivas y en cianobacterias, estas dos divisiones parecen tener una relación filogenética más cercana cuando son comparadas con otras divisiones bacterianas (Viale y col., 1994). En cianobacterias, a diferencia de *B. subtilis*, existen cuatro acil-lípido desaturasas distintas (Tasaka y col., 1996).

La disrupción del gen *des* no causó mayores cambios en la velocidad de crecimiento a las temperaturas de 20°C y 37°C. A diferencia de *B. subtilis*, los AGIs son esenciales en cianobacterias, donde su función ha sido relacionada con el mantenimiento de la viabilidad del sistema fotosintético a bajas temperaturas (Murata y Wada, 1995, Nishida y Murata, 1996). La capacidad de *B. subtilis* de crecer a bajas temperaturas de crecimiento sin AGIs puede ser atribuida a la naturaleza de los ácidos grasos de este organismo. En lugar de las cadenas normales de ácidos grasos lineales sintetizadas por la mayoría de los organismos, *Bacillus* sintetiza ácidos grasos saturados que en una importante proporción contienen ramificaciones de grupos metilo en posición iso y anteiso (de Mendoza y col., 1992, Kaneda, 1991). Los ácidos grasos ramificados (especialmente los anteiso) comparten con los *cis*-insaturados la capacidad de desestructurar el empaquetamiento de las cadenas acilo de los PL disminuyendo así la temperatura de transición de fase (Kaneda, 1991, Mc Elhaney, 1982). De acuerdo a esta hipótesis, recientemente fue comunicado (Klein y col., 1999) que mutantes nulas en el gen *des* de *B. subtilis* son incapaces de crecer a 10°C. Tal fenotipo es revertido mediante el agregado de precursores de la síntesis de ácidos grasos ramificados (Klein y col., 1999).

La expresión del gen *des*, como fue determinada por la expresión de la fusión transcripcional del promotor *des* al gen *lacZ* es inducida ante una caída en la temperatura de crecimiento. Estos resultados concuerdan con estudios previos de Fujii y Fulco (1977) los cuales sugirieron que la síntesis de la enzima desaturasa de *B. megaterium* se encuentra regulada por la temperatura a nivel transcripcional. Estos mismos autores (Fujii y Fulco, 1977) reportaron que la desaturación de ácido palmítico por *B. megaterium* alcanza un pico máximo 1 hora después que un cultivo de *B. megaterium* es

transferido de 35°C a 20°C y que luego disminuye a los niveles basales característicos de células creciendo a 20°C. En función de estos datos se postuló la existencia de una proteína moduladora cuya síntesis también se llevaba a cabo al caer la temperatura pero no inmediatamente sino luego de un breve retraso. Este modulador hipotético podría rápidamente regular la desaturación inhibiendo específicamente la síntesis del ARN mensajero codificante para la desaturasa (Fujii y Fulco, 1977). Sin embargo, nuestros resultados indican que la inducción transcripcional del gen *des* llega a un pico alrededor de las cuatro horas de iniciado el crecimiento a 20°C (Fig. 13). Dado que estos datos fueron obtenidos mediante la medida de actividad β -galactosidasa, los mismos pueden estar dando una idea inexacta de la cinética de la curva de inducción transcripcional debido a un menor índice de recambio de la actividad β -galactosidasa a bajas temperaturas. Para aclarar este y otros aspectos es necesario determinar los niveles del mensajero del gen *des* en similares condiciones a las ensayadas en la Fig. 13. Un nivel de control adicional de la síntesis de AGIs puede ser la función de la enzima desaturasa la cual puede ser funcionalmente ineficiente a altas temperaturas de crecimiento dado que, a pesar de que la fusión transcripcional *des-lacZ* es constitutivamente expresada en células de *E. coli*, la desaturación es menor cuando aumenta la temperatura de crecimiento (Fig. 8 A y C). Esta observación sugiere que la enzima es activa a bajas temperaturas pero tiene menor actividad a medida que la temperatura aumenta. Esta posibilidad concuerda con reportes previos (Fulco, 1972) que postulan que la inactivación de la desaturasa mediada por la temperatura es uno de los mecanismos para regular el nivel de AGIs en *B. megaterium*. Otra explicación posible para la regulación termal de la síntesis de 16:1 $\Delta 5$ en *E. coli*, es que el tiempo de vida media para el ARN mensajero de la desaturasa disminuya con el aumento de la temperatura. Este mecanismo ha sido propuesto para la regulación post-transcripcional de dos de las cuatro desaturasas de *Synechococcus* sp. cepa PCC7002 (Sakamoto y Bryant, 1997).

En conclusión, los datos presentados hasta aquí demuestran que la transcripción del gen *des* esta estrictamente regulada en *B. subtilis* por la temperatura de crecimiento. Es factible entonces postular la existencia de una proteína reguladora de la transcripción (ya sea activadora o represora) que participa en la regulación de la expresión del gen *des* durante los cambios de temperatura de crecimiento (ver Fig. 14). Asimismo, la estabilidad del mensajero del gen *des* puede jugar un rol importante en la regulación del

mismo de manera análoga a lo ya descrito para los genes *csp* de *E. coli* (Mitta y col., 1997).

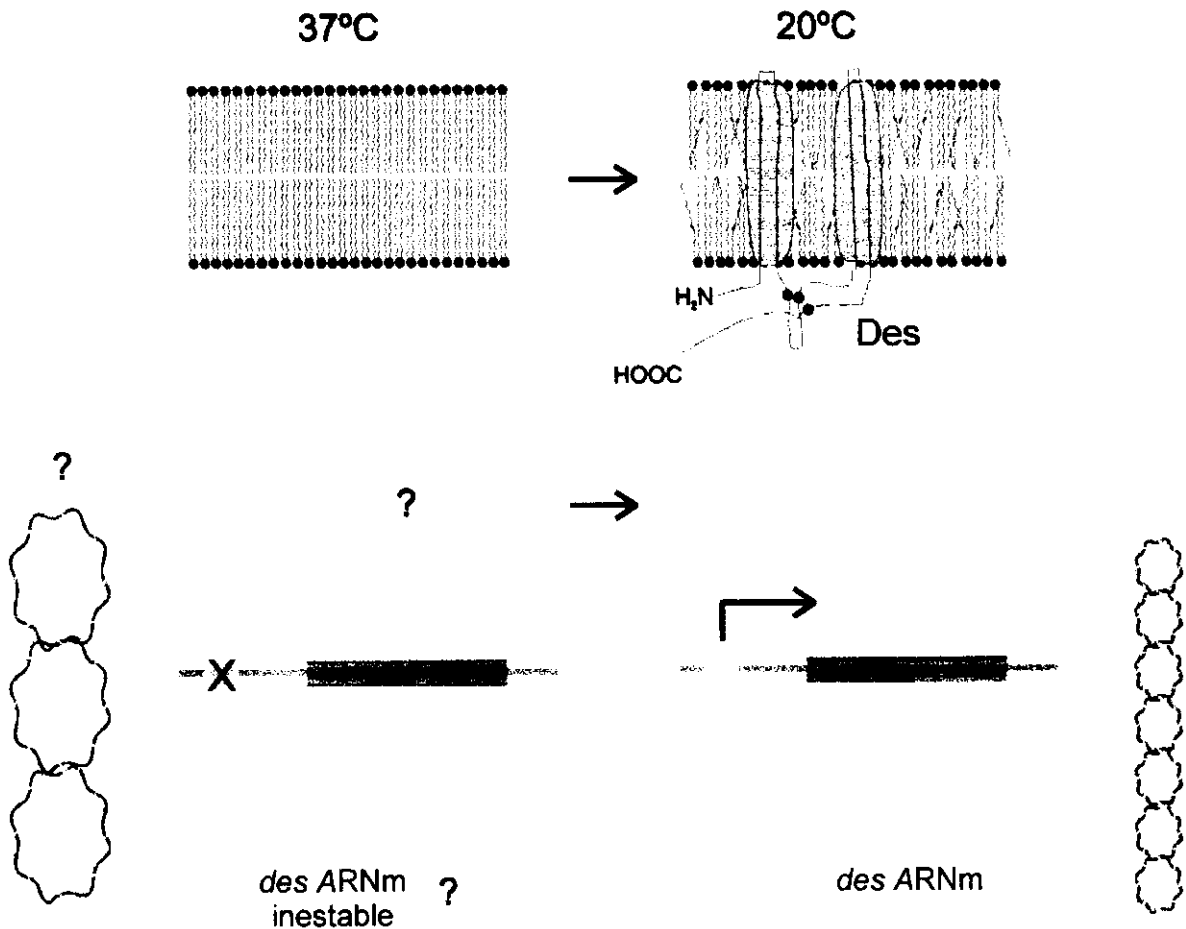


Fig. 14. Modelo del Capítulo I. A 37°C *B. subtilis* no sintetiza AGIs debido a que el gen *des* se encuentra transcripcionalmente inactivo, ya sea por represión de la transcripción o por una alta inestabilidad del ARNm de la desaturasa. Cuando la temperatura de crecimiento disminuye se induce la transcripción del gen *des*, pudiendo estar involucrada en esta inducción una proteína reguladora o el grado de superhelicidad del ADN cromosomal. Al estar presente el ARNm del gen *des*, este es traducido, se sintetiza la $\Delta 5$ -desaturasa llevando a la aparición AGIs en la membrana celular.

Además, un cambio en el grado de superenrollamiento del ADN podría ser importante para la expresión del gen *des* o genes asociados con su activación transcripcional (Grau y col., 1994). Ha sido sugerido que la desnaturalización localizada del ADN por la ARN polimerasa puede ser un obstáculo considerable a bajas temperaturas de crecimiento

(Graumann y Marahiel, 1996), así un aumento del grado de superhelicidad del ADN en estas condiciones favorecería la actividad de la ARN polimerasa (Grau y col., 1994). Nuestros resultados también sugieren que la modulación de la síntesis de AGIs a bajas temperaturas se llevaría a cabo también a nivel de la actividad desaturasa junto a la regulación transcripcional descrita. En este sentido, es posible que los AGIs recién sintetizados o bien un cambio de la fluidez de membrana sean los responsables de mantener la síntesis de AGIs en los bajos niveles observados en cultivos incubados prolongadamente a 20°C (Fujii y Fulco, 1977, Grau y de Mendoza, 1993). El hecho de que la síntesis de 16:1 $\Delta 5$ sea regulada por la temperatura de crecimiento sugiere que la actividad desaturasa de *B. subtilis* puede ser regulada post-transcripcionalmente.

CAPITULO II

**CARACTERIZACION DEL CONTROL TRANSCRIPCIONAL
EJERCIDO SOBRE EL GEN *des* POR LA TEMPERATURA.**

El análisis de la transcripción del gen *des* llevado a cabo mediante el uso de fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* de *E. coli* demuestra que la transcripción del gen *des* se encuentra reprimida a 37°C mientras que cuando la temperatura de crecimiento desciende a 20°C la transcripción aumenta de 10 a 15 veces (Fig. 13). Dicho análisis sugiere que al menos un nivel de control de la expresión del gen *des* es transcripcional.

A diferencia de *B. subtilis*, que posee una sola actividad desaturasa, las cianobacterias poseen cuatro desaturasas diferentes (Los y col, 1997, Murata y Wada, 1995, Sakamoto y Bryant, 1997). Al respecto ha sido reportado que en la cepa PCC7002 de *Synechococcus sp.* la estabilidad de los ARNm de los genes que codifican para las $\Delta 12$ y $\omega 3$ desaturasas se encuentra incrementada de manera significativa a bajas temperaturas de crecimiento (Sakamoto y Bryant, 1997). La misma estabilización del ARNm mediada por la temperatura fue también descrita para los genes que codifican para las $\Delta 6$, $\Delta 9$ y $\omega 3$ desaturasas de la cepa PCC 6803 de *Synechocystis sp.* (Los y col, 1997). A pesar de que en los trabajos arriba citados no se ha determinado si la estabilización de los ARNm de las desaturasas es específica o si es un efecto global presente sobre todos los ARNm de cianobacterias debido a la baja temperatura de crecimiento, se ha sugerido que la regulación de los genes de estas desaturasas tiene lugar por un efecto combinado sobre la síntesis y estabilización de los ARNm (Los y col, 1997, Sakamoto y Bryant, 1997).

Para profundizar en el estudio de los mecanismos de regulación del gen *des* por la temperatura, consideramos que era necesario caracterizar más detalladamente el proceso de inducción de la expresión del gen *des* a nivel de su ARNm. Para ello, se mapeó el sitio de iniciación de la transcripción y se determinó el peso molecular del transcripto del gen *des*. Posteriormente se cuantificaron los niveles del ARNm *des* en función de la temperatura de crecimiento y se determinó la estabilidad del ARNm *des* y de los ARNm totales de *B. subtilis* a distintas temperaturas. Estos y otros experimentos que se describirán a lo largo de este capítulo, nos permiten postular que la regulación del gen *des* se encuentra ejercida casi exclusivamente a nivel transcripcional y que la influencia de la estabilidad del ARNm en función de las distintas temperaturas no juega un papel significativo en la regulación de la expresión del gen que codifica para la $\Delta 5$ desaturasa.

Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *des*.

Una característica altamente conservada entre los genes inducidos por frío o genes *csp*, tanto de *E. coli* como de *B. subtilis*, es la presencia de una región 5' no traducida (5'UTR) inusualmente larga en sus transcritos. A esta región no traducida de dichos ARNm se le ha asignado un papel fundamental en la regulación por frío de los genes *csp* dado que es la responsable de generar una alta inestabilidad de los transcritos a altas (pero no a bajas) temperaturas de crecimiento (Graumann y Marahiel, 1996, Thieringer y col., 1998, Yamanaka y col., 1998). Estas zonas 5'UTR del ARNm (Fig. 1, Capítulo I) contienen estructuras secundarias que serían sitios blancos de degradación por RNasaE (Fang y col, 1997) y una secuencia altamente conservada de 11 bases denominada "cold-box" responsable de la atenuación de la transcripción de los genes *csp* durante la adaptación a bajas temperaturas de crecimiento (Graumann y Marahiel, 1998).

Para identificar la zona promotora responsable de la inducción por frío de la transcripción del gen *des* y para examinar si el mensajero de la desaturasa contiene una región del tipo 5'UTR, el sitio de iniciación de la transcripción fue mapeado mediante ensayo de extensión de cebador. Como se ve en la Figura 15, un solo producto de extensión fue detectado en estos experimentos utilizando como substrato ARN total extraído de cultivos de *B. subtilis* crecidos a 37°C y luego transferidos a 20°C. El sitio de iniciación de la transcripción del gen *des* se localiza en la posición -29 con respecto al primer ATG traducido. Este experimento demuestra que, a diferencia de lo que ocurre para los transcritos de los genes *csp*, el ARNm de la desaturasa no contiene una larga región líder similar a las 5'UTR. El análisis de secuencia de la zona 5' del gen *des* revela, en la región -10 con respecto al inicio de la transcripción, la presencia de una región de 6 nucleótidos coincidente con la secuencia consenso -10 de regiones promotoras con unión al factor σ^A de *B. subtilis*. Sin embargo no se pudo encontrar una zona -35 coincidente con ninguna de las secuencias consenso características de los distintos factores σ de *B. subtilis*, este resultado, compatible con la observación de que el gen *des* no se expresa en condiciones normales de crecimiento, sugiere el posible requerimiento de un regulador transcripcional para la expresión del gen *des*.

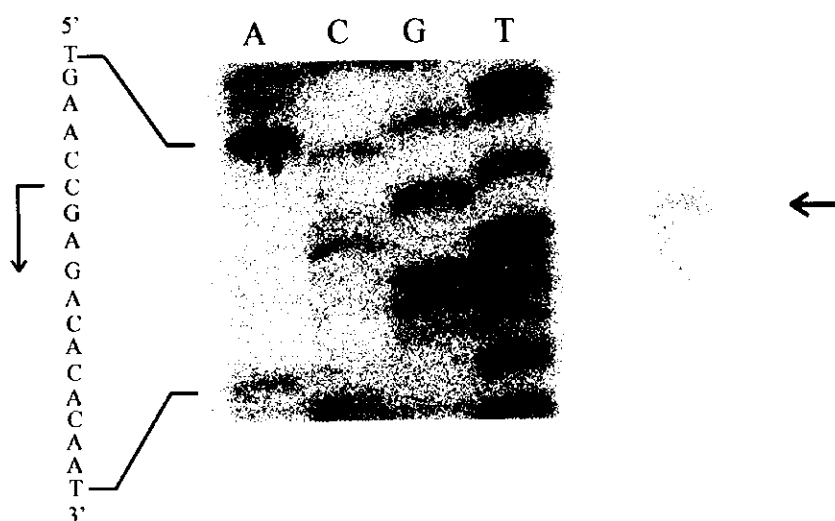


Fig. 15. Determinación del sitio de iniciación de la transcripción del gen *des*. La autoradiografía muestra el experimento de extensión de cebador llevado a cabo con ARN total extraído de un cultivo de *B. subtilis* crecido a 37°C hasta fase exponencial y luego transferido a 20°C por 45 minutos. Las calles A, C, G y T nominan las reacciones de secuenciación llevadas a cabo sobre el gen *des* con el mismo oligonucleótido utilizado para la extensión de cebador. La flecha horizontal indica el producto de extensión obtenido que corresponde al residuo C de la hebra codificante tomado entonces como sitio de iniciación de la transcripción. La flecha vertical indica el sentido de la transcripción.

Análisis de los niveles del ARNm *des* durante la adaptación al frío.

Para examinar el tamaño y las cantidades del transcripto del gen *des* durante la adaptación al frío de *B. subtilis*, cultivos de la cepa salvaje JH642 fueron crecidos a 37°C en medio SPI-CAA (ver Materiales y Métodos) hasta fase logarítmica temprana y luego transferidos a 20°C. Alícuotas de los cultivos fueron tomadas a distintos tiempos del crecimiento a 37 y 20°C y el RNA total de las mismas fue extraído según se describe en Materiales y Métodos. Experimentos de "Northern-blot" realizados con las muestras de ARN así obtenidas demostraron que el tamaño del transcripto es de aproximadamente 1,1 kb (datos no mostrados) y que el ARNm del gen *des* no es detectable en cultivos crecidos a 37°C (Fig. 16 A, calle 1). Estos resultados muestran que el gen *des* es transcripto como un ARNm monocistrónico y que sólo se acumula en células que han sido transferidas desde 37°C a 20°C. El mensajero del gen *des* es detectable a los 15 minutos luego de la disminución de la temperatura (Fig. 16 A, calle 2). Los niveles del ARNm-*des* van aumentando con el tiempo llegando a un máximo de

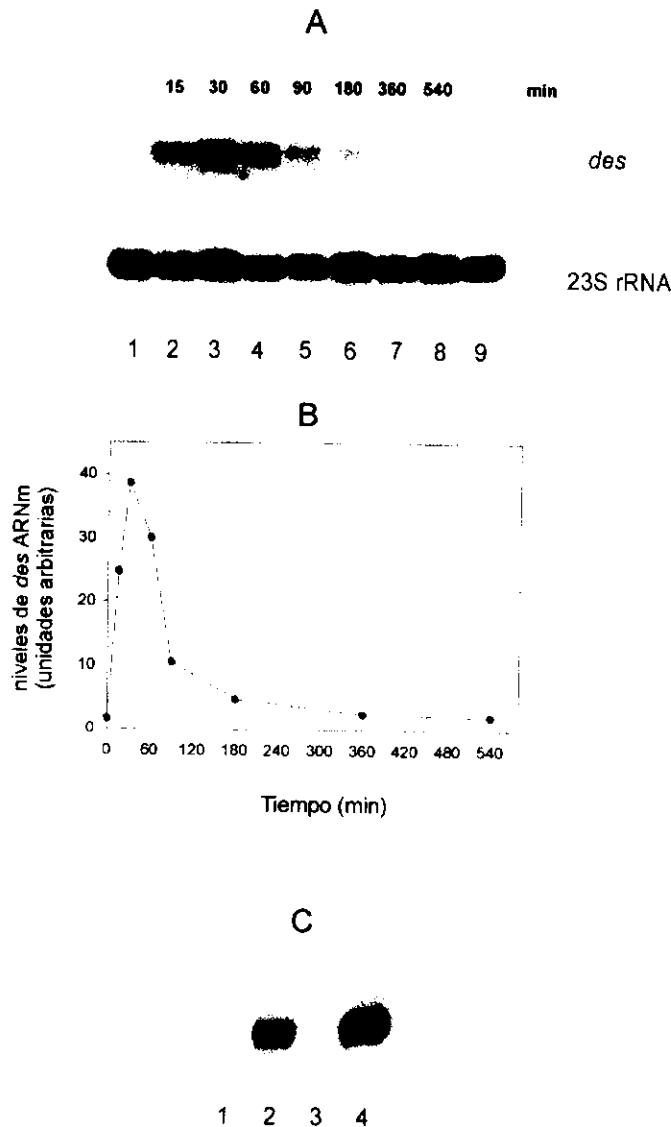


Fig. 16. Producción del mensajero de la desaturasa antes y después del shock frío. (A) Análisis de "Northern blot" en geles de agarosa-formaldehído llevado a cabo según se describe en Materiales y Métodos. Se extrajo ARN total de la cepa silvestre de *B. subtilis* JH642 cultivada a 37°C hasta mitad de fase exponencial (calle 1) y luego transferida a 20°C por distintos tiempos (calles 2 a 8), o bien de células crecidas continuamente a 20°C (calle 9). Cada calle contiene 8 µg de ARN total. Los ARN transferidos fueron hibridados con una sonda específica para el gen *des* y autoradiografiados, luego la sonda fue removida y los ARN fueron vueltos a hibridar con una sonda específica para el ARN ribosomal 23S de *B. subtilis*. (B) Representación gráfica de los resultados expuestos en el panel A. Las intensidades de las bandas correspondientes al mensajero del gen *des* y al ARNr 23S por cada calle fueron medidas por densitometría. La razón de las intensidades *des*/23S fue utilizada para la gráfica en función del tiempo de "shock" frío. (C) Análisis de "Northern blot" realizado igual que en A. Cultivos de JH642 fueron llevados a 37°C hasta mitad de fase exponencia (calle 1) y luego tratados con cloranfenicol (concentración final 200µg/ml) por 15 minutos (calle 3) o luego transferidos a 20°C por 45 minutos en ausencia (calle 2) o en presencia de cloranfenicol (calle 4).

acumulación a los 30 minutos de crecimiento a 20°C (Fig. 16 A, calle 3). Luego de dicho lapso los niveles comienzan a decaer llegando a ser indetectables pasadas las 6 horas de crecimiento continuo a 20°C (Fig. 16 A, calle 7). Estos datos fueron cuantificados y se representan en la Fig. 16 B. En dicha figura puede observarse que la disminución de la temperatura produce un aumento significativo y transitorio en los niveles de ARNm del gen *des* de *B. subtilis*.

Distintos autores han comunicado que tanto la respuesta al "shock" frío (Van Bogelen y Neidhart, 1990) como la transcripción del gen *cspA* (Jiang y col., 1993) puede ser inducida de manera específica por el antibiótico cloranfenicol a 37°C, sugiriendo así que la maquinaria traduccional podría estar de algún modo involucrada en la regulación mediada por la temperatura de distintos genes que responden al frío. Para ver si el gen *des* presentaba un comportamiento similar se realizaron experimentos de Northern-blot con ARN totales extraídos de cultivos crecidos a distintas temperaturas con y sin el agregado del antibiótico cloranfenicol. Cuando este antibiótico fue agregado a cultivos creciendo a 37°C, en concentraciones reportadas como inductoras de la respuesta al "shock" frío, no se observó la presencia del ARNm *des* (Fig 16 C, calle 3). Esta observación muestra que a diferencia del gen *cspA* de *E. coli*, el gen de la desaturasa de *B. subtilis* no se induce por una inhibición de la síntesis de proteínas a 37°C. Sin embargo, esta inhibición de la síntesis proteica, producto del agregado de cloranfenicol a 37°C, no impide que el gen de la desaturasa se exprese al caer la temperatura del cultivo como lo demuestra la presencia del ARNm *des* en cultivos que han crecido 45 min a 20°C luego de haber inhibido la traducción mediante el agregado de cloranfenicol antes de la transferencia del cultivo de 37 a 20°C (Fig. 16 C, calle 4). Estos resultados demuestran que la inducción del gen *des* producida por la caída en la temperatura de crecimiento no requiere la síntesis de novo de proteínas.

Estos resultados y los anteriormente descritos sugieren que la regulación del gen *des* por el "shock" frío tiene características diferentes a las descritas para los genes *csp* y que por lo tanto dicha regulación sería más bien de tipo transcripcional. A pesar de ello no podemos descartar que, así como ha sido reportado para los genes de las desaturasas de cianobacterias (Los y col., 1997, Sakamoto y Bryant, 1997), además de la inducción transcripcional dada por las bajas temperaturas de crecimiento, la estabilidad del ARNm de la desaturasa juegue un papel importante en la regulación de la expresión del gen *des*. Para investigar esta posibilidad decidimos efectuar un análisis de la estabilidad del ARNm del gen *des* a distintas temperaturas de crecimiento.

Análisis de la estabilidad del ARNm *des*.

Ha sido postulado por distintos grupos de investigación que las causas del incremento de los transcriptos de las desaturasa de cianobacterias ante una caída de la temperatura de crecimiento se deben a i) un aumento de la transcripción y ii) un aumento en la estabilidad de los transcriptos a bajas temperaturas (Los y col., 1997, Sakamoto y Bryant, 1997). Para examinar entonces si la acumulación del transcripto de la desaturasa observada a bajas temperaturas (Fig. 16 A) era también debida a un aumento de la estabilidad de dicho transcripto estudiamos la cinética de degradación del mensajero de la desaturasa luego del bloqueo de la transcripción mediante el agregado de rifampicina. Para este propósito, primero se indujo la acumulación del ARNm *des* en un cultivo de *B. subtilis* transfiriéndolo de 37°C a 20°C por 1 hora, luego se agregó rifampicina y ácido nalidíxico de modo tal de inhibir la transcripción. Seguidamente, una parte del cultivo fue mantenida a 20°C mientras que la otra se transfirió a 37°C. A distintos tiempos de incubación a dichas temperaturas se extrajeron alícuotas de cultivo y se las procesó para la extracción de ARN total el cual luego fue sometido a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 5 %, transferencia a membranas de nylon, hibridación con sondas radioactivas específicas y posterior cuantificación de la señales obtenidas mediante el empleo de un equipo de Phosphorimager (ver Materiales y Métodos).

Como puede apreciarse en las Figuras 17 y 18 el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del mensajero de la desaturasa varía significativamente entre ambas temperaturas. A 37°C el $t_{1/2}$ es de 1,7 minutos mientras que a 20°C es de 11,3 minutos, sugiriendo que la estabilidad del ARNm-*des* aumenta casi 7 veces al disminuir la temperatura de 37 a 20°C. Dado que la observada estabilización del ARNm-*des* a bajas temperaturas puede ser sólo el reflejo de lo que ocurre con el común de los ARNm de *B. subtilis* y por lo tanto ser una estabilización no específica, decidimos comparar los valores de $t_{1/2}$ determinados para el transcripto del gen *des* con los valores de $t_{1/2}$ de los mensajeros totales a las mismas temperaturas. Para ello se determino la cinética de desaparición de los mensajeros totales en *B. subtilis* a 20 y 37°C siguiendo la técnica de Bechhofer (Wang y Bechhofer, 1996). Para ello se marcaron los ARN totales de la cepa JH642 de *B. subtilis* mediante el agregado de [³H] uridina, luego se inhibió la transcripción agregando rifampicina y ácido nalidíxico y por último se cuantificó la radioactividad precipitable por el agregado de ácido tricloroacético (ver Materiales y Métodos). Los

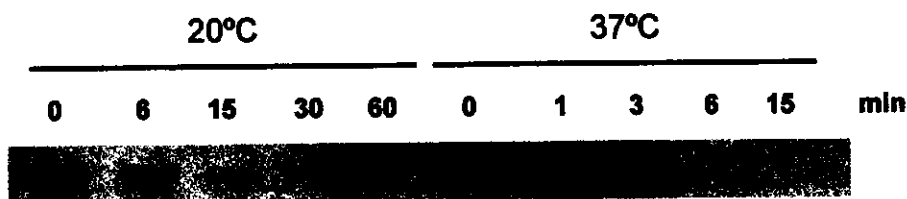


Fig. 17. Análisis por "Northern blot" de la caída de los niveles del transcripto del gen *des* luego de la adición de rifampicina. Cultivos de la cepa silvestre de *B. subtilis* fueron crecidos a 37°C hasta mitad de fase exponencial y luego la acumulación del ARNm-*des* fue inducida transfiriendo el cultivo a 20°C por 45 minutos para luego añadir rifampicina (conc. final 500 mg/ml) y ácido nalidíxico (conc. final 20 µg/ml); manteniendo parte del cultivo a 20°C y otra parte fue transferida a 37°C. Alícuotas de 25 ml de cultivo fueron tomadas luego del bloqueo de la transcripción para la extracción de los ARN totales (los tiempos indicados en cada calle refieren a los minutos transcurridos luego de la adición de los antibióticos).

datos resultantes de este experimento permitieron determinar un valor de $t_{1/2}$ para los ARNm totales de 4,5 minutos a 37°C y de 29,2 minutos a 20°C (Fig.18). Estos valores claramente demuestran que, de manera similar a lo que ocurre con el transcripto del gen *des*, la estabilidad en los mensajeros globales de *B. subtilis* aumenta más de 6 veces al disminuir la temperatura de crecimiento del cultivo de 37 a 20°C. De los resultados descriptos en las Figuras 17 y 18 podemos concluir entonces que si bien la estabilidad del transcripto del gen *des* es mayor a bajas temperaturas, esta característica no determina un punto de regulación específica del gen *des* con respecto al resto de los ARNm presentes a 20°C en *B. subtilis*.

El mensajero de la desaturasa puede acumularse a 37°C

Los resultados hasta aquí descriptos sugieren que la inducción por frío de la expresión del gen *des* es de carácter transcripcional y que la estabilidad de su ARNm no influye apreciablemente en dicha regulación. Dado que los mecanismos por los cuales la estabilidad de los ARNm es controlada en función de la temperatura en bacterias no son del todo conocidos (Thieringer y col., 1998), no podemos descartar que, mediante la estrategia experimental utilizada para el estudio de los $t_{1/2}$ de los ARNm (Figs. 17 y 18), la previa incubación de las células de *B. subtilis* a 20°C de alguna manera produzca un incremento en la estabilidad del ARNm-*des* a 37°C. De esta manera estaríamos sobrevalorando de manera artefactual la estimación del $t_{1/2}$ del ARNm a 37°C. Así, para

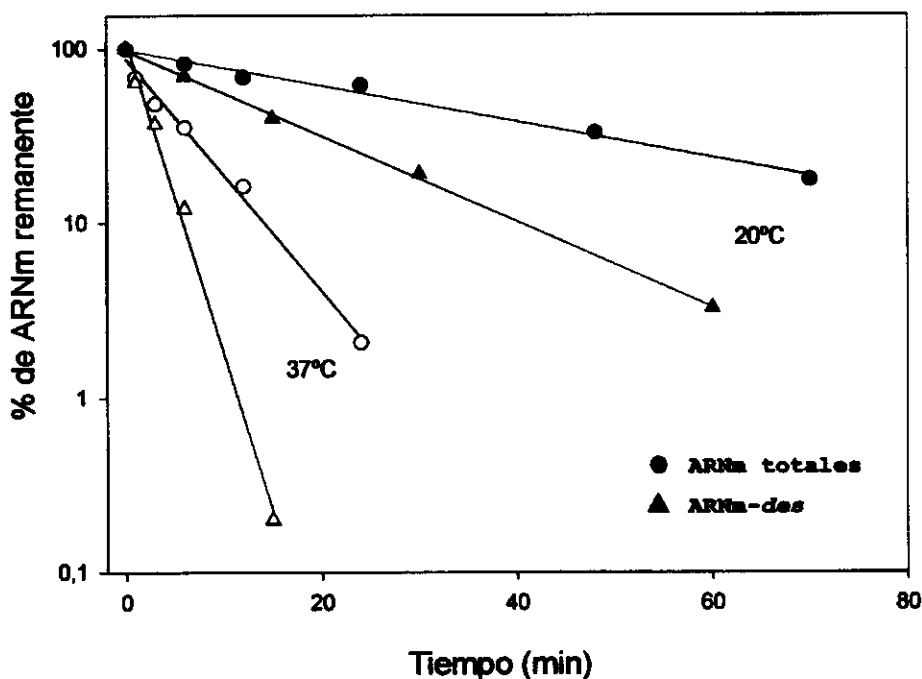


Fig. 18. Cinética de la degradación de los ARNm globales y del ARNm-*des* de *B. subtilis*. Los niveles de ARNm-*des* a 37°C (triángulos vacíos) o 20°C (triángulos llenos) fueron determinados cuantificando la radioactividad de cada una de las bandas del "Northern blot" de la figura 14 y de análisis de Dot blot de ARN hibridado con una sonda específica para el gen *des* (ver Materiales y Métodos). Las muestras para el Dot blot fueron tomadas en las mismas condiciones que las tomadas para el "Northern blot" de la Fig 17. Cada valor es el promedio de los resultados de dos experimentos independientes. Los niveles de ARNm totales fueron medidos según se describe en Materiales y Métodos. Las muestras a 37°C (círculos vacíos) fueron tomadas a los 0, 1, 3, 6, 12 y 24 minutos luego de la inhibición de la transcripción. Las muestras a 20°C (círculos llenos) fueron tomadas a los 0, 6, 12, 24, 48 y 70 minutos luego de la inhibición de la síntesis de ARN. Los $t_{1/2}$ fueron calculados como el tiempo necesario para que la cantidad de ARNm cuantificada antes del agregado de los inhibidores de la transcripción descienda un 50%.

separar cualquier efecto que pudiera tener el "shock" frío sobre la estabilidad del ARNm del gen *des* a 37°C, o lo que es lo mismo, para estudiar la estabilidad del transcripto de la desaturasa prescindiendo de la regulación transcripcional por temperatura del gen *des*, se decidió cambiar el promotor natural del gen *des* por un promotor que no dependiera de la temperatura. Para esto se eligió el promotor híbrido *pspac*, el cual contiene el sitio de reconocimiento de la ARN polimerasa proveniente de un promotor temprano del bacteriófago de *B. subtilis* SPO1 y el operador *lac* de *E. coli* (Henner, 1990). El promotor *pspac* permite un ajustado control de la transcripción, activándose sólo ante el agregado del isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG, Henner,

1990). Mediante el uso de este promotor podemos entonces inducir la transcripción del gen *des* mediante el agregado de IPTG a 37°C y analizar la acumulación de ARNm-*des* a esta temperatura. Para asegurarse de que los datos de estabilidad a 37°C del nuevo transcripto reflejen el efecto de la temperatura sobre el mensajero de la desaturasa, el cambio del promotor *des* por el promotor *pspac* fue realizado de modo tal que el transcripto resultante fuera idéntico al de la cepa silvestre. Para eliminar entonces la inducción por frío del promotor del gen *des* y al mismo tiempo controlarlo con el promotor *pspac* se siguió la estrategia representada en la Figura 19. Un fragmento de ADN conteniendo el extremo 5' del gen *des* (excluyendo la región promotora pero incluyendo la corta región transcripta no traducida) fue clonado entre el promotor *pspac* y el gen *lacI* del vector integrativo pAG58 (Perego, 1993) para generar así el plásmido pPA13. La integración tipo "Campbell" de este plásmido en el cromosoma de una cepa salvaje de *B. subtilis* posiciona la única copia funcional del gen *des* bajo el control del promotor *pspac* generando así la cepa AKP5 (Fig. 19).

Esta nueva cepa es adecuada entonces para el estudio de la estabilidad del ARNm-*des* a temperaturas en las que normalmente la transcripción es mínima o inexistente y permite determinar si la regulación del gen *des* por la temperatura es exclusivamente transcripcional o si también juega algún papel la estabilidad de su mensajero. Para ello, cultivos de la cepa AKP5 fueron incubados a 37°C hasta mitad de fase exponencial, en dicho punto el cultivo se dividió en cuatro: dos fracciones fueron mantenidas a 37°C (una suplementada con 1 mM de IPTG y la otra en ausencia de IPTG) y las otras dos fueron transferidas a 20°C (una suplementada con 1 mM de IPTG y la otra en ausencia de IPTG). El ARN total de las fracciones mantenidas a 37°C fue extraído 15 minutos después del agregado de IPTG, mientras que para las fracciones transferidas a 20°C, la extracción de ARN totales se realizó 45 minutos después del agregado de IPTG. Con estas muestras se realizaron entonces experimentos de "Northern blot" cuya autoradiografía se ilustra en la Figura 20. Como puede observarse entonces en esta figura, la acumulación de ARNm-*des* en la cepa AKP5 depende estrictamente de la presencia del inductor IPTG en el medio de cultivo sin importar la temperatura a la cual el mismo está sometido. Los niveles de transcripto acumulado a 20°C y 37°C en presencia de IPTG son aproximadamente iguales (calles 2 y 4) y comparables con los niveles observados en la cepa salvaje a 20°C 45 minutos después del "shock" frío (calle 5). Mediante experimentos de "Northern blot" con inhibición de la transcripción pudimos determinar que el $t_{1/2}$ en la cepa AKP5 del ARNm-*des* a 37°C es de 2 minutos

1990). Mediante el uso de este promotor podemos entonces inducir la transcripción del gen *des* mediante el agregado de IPTG a 37°C y analizar la acumulación de ARNm-*des* a esta temperatura. Para asegurarse de que los datos de estabilidad a 37°C del nuevo transcripto reflejen el efecto de la temperatura sobre el mensajero de la desaturasa, el cambio del promotor *des* por el promotor *pspac* fue realizado de modo tal que el transcripto resultante fuera idéntico al de la cepa silvestre. Para eliminar entonces la inducción por frío del promotor del gen *des* y al mismo tiempo controlarlo con el promotor *pspac* se siguió la estrategia representada en la Figura 19. Un fragmento de ADN conteniendo el extremo 5' del gen *des* (excluyendo la región promotora pero incluyendo la corta región transcrita no traducida) fue clonado entre el promotor *pspac* y el gen *lacI* del vector integrativo pAG58 (Perego, 1993) para generar así el plásmido pPA13. La integración tipo "Campbell" de este plásmido en el cromosoma de una cepa salvaje de *B. subtilis* posiciona la única copia funcional del gen *des* bajo el control del promotor *pspac* generando así la cepa AKP5 (Fig. 19).

Esta nueva cepa es adecuada entonces para el estudio de la estabilidad del ARNm-*des* a temperaturas en las que normalmente la transcripción es mínima o inexistente y permite determinar si la regulación del gen *des* por la temperatura es exclusivamente transcripcional o si también juega algún papel la estabilidad de su mensajero. Para ello, cultivos de la cepa AKP5 fueron incubados a 37°C hasta mitad de fase exponencial, en dicho punto el cultivo se dividió en cuatro: dos fracciones fueron mantenidas a 37°C (una suplementada con 1 mM de IPTG y la otra en ausencia de IPTG) y las otras dos fueron transferidas a 20°C (una suplementada con 1 mM de IPTG y la otra en ausencia de IPTG). El ARN total de las fracciones mantenidas a 37°C fue extraído 15 minutos después del agregado de IPTG, mientras que para las fracciones transferidas a 20°C, la extracción de ARN totales se realizó 45 minutos después del agregado de IPTG. Con estas muestras se realizaron entonces experimentos de "Northern blot" cuya autoradiografía se ilustra en la Figura 20. Como puede observarse entonces en esta figura, la acumulación de ARNm-*des* en la cepa AKP5 depende estrictamente de la presencia del inductor IPTG en el medio de cultivo sin importar la temperatura a la cual el mismo está sometido. Los niveles de transcripto acumulado a 20°C y 37°C en presencia de IPTG son aproximadamente iguales (calles 2 y 4) y comparables con los niveles observados en la cepa salvaje a 20°C 45 minutos después del "shock" frío (calle 5). Mediante experimentos de "Northern blot" con inhibición de la transcripción pudimos determinar que el $t_{1/2}$ en la cepa AKP5 del ARNm-*des* a 37°C es de 2 minutos

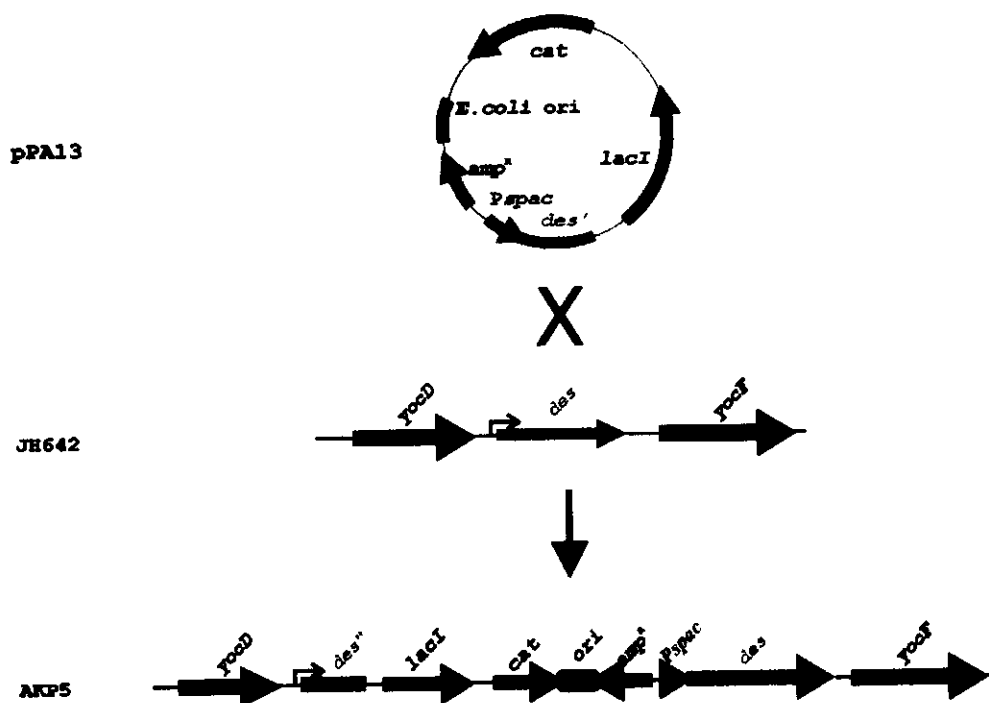


Fig. 19. Construcción de la cepa AKP5, con el gen *des* bajo control del promotor *pspac*. El plásmido pPA13, el cual contiene la región 5'UTR de 29 nucleótidos más los primeros 147 codones del gen *des* corriente abajo del promotor *pspac*, fue utilizado para transformar seleccionando por resistencia a cloranfenicol la cepa silvestre de *B. subtilis* JH642. La integración de tipo Campbell de este plásmido ubica al gen *des* bajo el dominio del promotor *pspac*.

(datos no mostrados), indicando que la estabilidad del ARNm-*des* a 37°C es aproximadamente la misma siendo el transcripto sintetizado a partir del promotor *pspac* o a partir del promotor silvestre.

Por consiguiente, del conjunto de experimentos descrito en las figuras 17, 18 y 20, y de los datos derivados de los experimentos realizados con fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* (ver Fig. 13 Capítulo I), podemos concluir que la acumulación de ARNm-*des* observada al caer la temperatura de crecimiento de un cultivo de *B. subtilis* se debe casi exclusivamente a una inducción de la transcripción dependiente del promotor del gen *des* y que la estabilidad del ARNm no está involucrada en la regulación por la temperatura de la expresión del gen *des*.

Síntesis de AGIs en *B. subtilis* a 37°C.

Como podemos observar en la calle 4 de la Figura 20, en la cepa AKP5 el mensajero de la desaturasa puede acumularse a 37°. Sin embargo, a pesar de que este mensajero

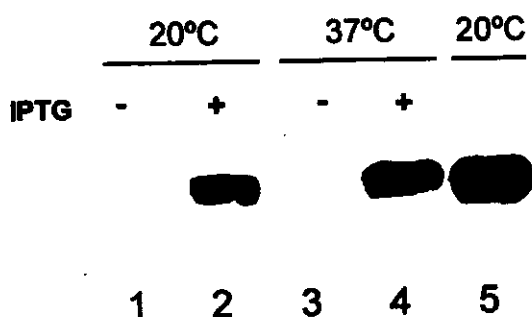


Fig. 20. Producción del ARNm-*des* bajo el control del promotor *pspac*. ARN total (10 µg por calle) extraído de la cepa AKP5 (calles 1 a 4) o de la cepa JH642 (calle 5) fue utilizado para este experimento de Northern blot. Cultivos de la cepa AKP5 fueron llevados a 37°C hasta mitad de fase log. y entonces mitad del cultivo fue suplementada con IPTG (conc. final 1mM). Los cultivos suplementados (+) y los no suplementados (-) fueron posteriormente transferidos a 20°C por 45 minutos (calles 1 y 2) o mantenidos a 37°C por 15 minutos (calles 3 y 4). La cepa JH642 fue cultivada a 37°C hasta mitad de fase log. y luego fue transferida a 20°C por 45 minutos (calle5).

se sintetice a 37°C, esto no implica que los AGIs se sintetizen a dicha temperatura. El ARNm-*des* es transcripto y es estable a 37°C, pero puede ser traducionalmente invariable a esta temperatura. Que el mensajero sea traducido tampoco implica que la $\Delta 5$ -desaturasa sea activa a 37°C, dado que puede darse el caso que durante el "shock" frío, además de la síntesis de la $\Delta 5$ -desaturasa, se induzca la síntesis de otros factores involucrados en la síntesis de AGIs tales como componentes de una cadena de electrones específica.

Para responder a estas cuestiones se analizó el perfil de ácidos grasos sintetizados por la cepa AKP5 crecida a distintas temperaturas con o sin el agregado de IPTG. Para ello, de manera similar al experimento descrito en la Figura 20, cultivos de la cepa AKP5 fueron incubados a 37°C hasta mitad de fase exponencial, en dicho punto el cultivo se dividió en cuatro: dos fracciones siguieron incubadas a 37°C (una suplementada con 1mM IPTG y la otra en ausencia de IPTG) y las otras dos fueron transferidas a 20°C (una suplementada con 1mM IPTG y la otra en ausencia de IPTG). Los ácidos grasos fueron marcados mediante el agregado de [14 C] acetato antes del agregado de IPTG y los cultivos fueron incubados 12 horas ya sea a 20 o 37°C. Seguidamente los cultivos fueron cosechados y los lípidos totales extraídos, transesterificados y cromatografiados

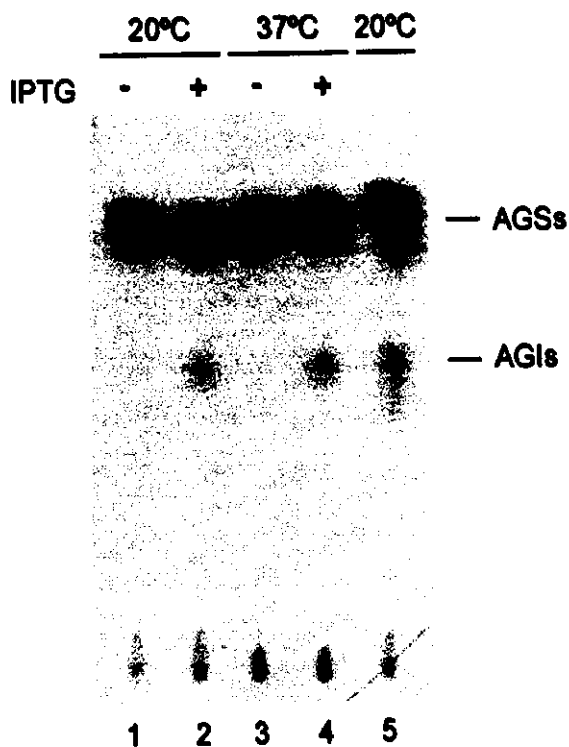


Fig. 21. Producción de AGIs bajo el control del promotor *pspac*. Cultivos de la cepa AKP5 fueron llevados a 37°C hasta mitad de fase log. y la mitad del cultivo fue suplementada con IPTG (conc. final 1mM). Alícuotas de 2 ml de los cultivos suplementados (+) o no suplementados (-) con IPTG fueron marcados con 10 μ Ci de [14 C] acetato y posteriormente fueron transferidos a 20°C (calles 1 y 2) o mantenidos a 37°C (calles 3 y 4) por 12 horas. Los lípidos fueron entonces extraídos y transesterificados. Los metil ésteres resultantes fueron separados en sus fracciones de ácidos grasos saturados (AGSs) y ácidos grasos insaturados (AGIs) mediante cromatografía en capa delgada de sílica gel impregnada con AgNO_3 al 20% (ver Materiales y Métodos). La cepa JH642 fue cultivada a 37°C hasta mitad de fase log., 2 ml de cultivo fueron marcados con 10 μ Ci de [14 C] acetato y posteriormente transferidos a 20°C por 12 horas (calle 5). En las calles 1 y 3, se determinaron 11.000 cpm en la fracción de AGSs mientras que las fracciones de AGIs para las mismas calles contienen niveles basales de radioactividad. Las muestras de las calles 2 y 4 contienen 10.000 y 1.300 cpm en las fracciones de AGSs y AGIs respectivamente. La muestra correspondiente a la calle 5 contiene 9.000 cpm y 1300 cpm en las fracciones de AGSs y AGIs respectivamente.

en TLC- AgNO_3 . En la Figura 21 puede observarse el resultado del autorradiograma de dicha cromatografía. Puede apreciarse que la cepa AKP5 es capaz de sintetizar AGIs a 37 o 20°C sólo cuando el medio de cultivo fue suplementado con IPTG (calles 2 y 4). Estos experimentos demuestran que la $\Delta 5$ -desaturasa se sintetiza y es activa a 37°C en *B. subtilis* indicando que a dicha temperatura todos los componentes necesarios para la desaturación de lípidos de membrana se encuentran presentes. Por lo tanto, podemos concluir que el producto del gen *des* es el único componente del sistema de desaturación de ácidos grasos de *B. subtilis* que se induce por las bajas temperaturas de crecimiento.

DISCUSION

Nuestros resultados muestran que el gen *des* está estrictamente controlado por la temperatura. Mientras que a 37°C el transcripto es indetectable, al disminuir la temperatura se observa una rápida y transitoria aparición del ARNm-*des* (ver Fig 16). Esta significativa acumulación del transcripto de la desaturasa es independiente de la síntesis de novo de proteínas. Asimismo pudimos demostrar que la inducción del gen *des* a bajas temperaturas tiene lugar exclusivamente por activación de la transcripción y que, a diferencia de lo reportado para la regulación de los genes de desaturasas de cianobacterias (Los y col., 1997, Sakamoto y Bryant, 1997), no depende de la estabilización de su ARNm. Estos experimentos también permiten postular que el factor limitante para la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos de membrana a bajas temperaturas es la $\Delta 5$ -desaturasa, ya que otros factores necesarios para la desaturación, como la(s) especie(s) donadora(s) de electrones o la(s) cadena(s) transportadora(s) de los mismos, parecen estar presentes a 37°C.

Los experimentos mostrados en este capítulo demuestran que el transcripto de la desaturasa puede ser sintetizado sin que se requiera alguna proteína diferente de las que ya fueron sintetizadas a 37°C (Fig., 16 C). Por lo tanto, si se requiere alguna proteína reguladora (de carácter activador o represor) involucrada en la regulación del gen *des*, esta debe sufrir algún tipo de cambio conformacional mediado por la temperatura que resulte en represión del gen *des* a 37°C y en su inducción transcripcional a 20°C. Si se tratara de un activador transcripcional, este se encontraría en un estado conformacional inactivo a 37°C y al disminuir la temperatura de crecimiento se favorecería la conformación activa que permitiría inducir la transcripción del gen *des*. Alternativamente, puede tratarse de un represor funcional a 37°C y sensible al frío. Este tipo de regulación por temperatura mediado por cambios conformacionales en factores transcripcionales ha sido descrito para el factor de virulencia de *Salmonella typhimurium* TtpA (Hurme y col., 1997). Esta proteína funciona como un represor homodimérico cuyo estado de plegamiento determina la capacidad de unión al ADN. Un aumento en la temperatura ambiente favorece el estado monomérico y por lo tanto la disociación de TtpA del ADN con la consiguiente activación de los genes antes reprimidos. Del mismo modo, temperaturas de 37°C en *B. subtilis* podrían determinar la inactivación del gen *des* debido al incorrecto plegamiento de un posible activador transcripcional a esta temperatura.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que la actividad ADN girasa era necesaria para la síntesis de AGIs (Grau y col., 1994) y que cuando *B. subtilis* es transferido de 37°C a 20°C se genera un significativo cambio en la topología de su ADN. Utilizando ADN plasmídico como marcador del estado de superhelicidad del ADN cromosomal se demostró que ante una caída en la temperatura de crecimiento el ADN plasmídico sufre un aumento en la superhelicidad negativa. Así, nuestro laboratorio postuló que la temperatura, a través de cambios en el grado de superenrollamiento del ADN cromosomal, podría regular la síntesis de los ácidos grasos insaturados en *B. subtilis* (Grau y col., 1994). Experimentos realizados en este sentido indicaron que para el aumento del grado de superenrollamiento negativo que se observa en *B. subtilis* al caer la temperatura no es necesaria la síntesis de novo de proteínas (datos no mostrados). Por lo tanto, con los datos experimentales obtenidos hasta ahora no podemos descartar la posibilidad de que el aumento de la superhelicidad negativa del ADN pueda contribuir de manera significativa a la regulación del gen *des*.

Otra pregunta que surge de los resultados descritos en este capítulo es: ¿De que manera se reprime la expresión del gen *des* luego de la caída de la temperatura? En las Figuras 16 A y 16C se ve claramente que la acumulación del ARN-*des* es de carácter transitorio. En efecto, luego de 5-6 horas del cambio de temperatura dicho ARNm es indetectable. Si bien el análisis derivado de los experimentos realizados con fusiones transcripcionales del promotor *des* al gen reportero *lacZ* (Fig. 13, Capítulo I) sugiere que la abrupta caída en los niveles de ARNm-*des* sería debido a un cese de la transcripción, no podemos descartar que la causa sea una mayor velocidad de degradación del ARNm-*des* una vez transcurridos los primeros 30 minutos de crecimiento a 20°C. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada mediante el experimento que se ilustra en la Figura 22. En esta Figura puede observarse que la cepa AKP5, donde el promotor original del gen *des* fue reemplazado por el promotor *pspac*, los niveles de ARNm-*des* se mantienen relativamente constantes luego de 7 horas después del enfriamiento del cultivo a 20°C. Si el mecanismo responsable de la caída de los niveles de ARNm-*des* fuera una desestabilización del mismo, deberíamos observar en la cepa AKP5 una acumulación transitoria de ARNm-*des* similar a la observada para la cepa JH642 en la Figura 16 A. Estos resultados sugieren fuertemente que el carácter transitorio de la inducción del gen *des* ante una caída en la temperatura de crecimiento se debe a un cese de la transcripción luego de los primeros 30 min del "shock" frío. Estos resultados concuerdan con los reportados por Fujii y Fulco (1977) en *B.*

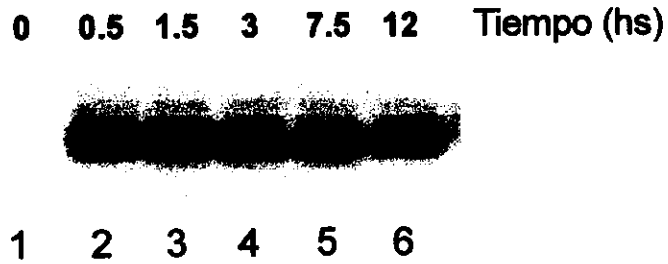


Fig. 22. Perfil de acumulación del ARNm-*des* en la cepa AKP5 a distintos tiempos luego del traspaso de 37 a 20°C. Cultivos de la cepa AKP5 fueron crecidos a 37°C hasta mitad de fase exponencial, suplementados con IPTG 1mM, y luego transferidos a 20°C. Distintas alícuotas fueron tomadas a los tiempos (posteriores al agregado de IPTG) descriptos para la extracción de ARN total. Las muestras de ARN total (10 mg or calle) fueron separadas en geles de agarosa-formaldehído y transferidas a membranas de nylon según se describe en Materiales y Métodos. La hibridación de las membranas se realizó utilizando una sonda específica para el gen *des*.

megaterium. Estos autores han descripto que luego de los 10 min en que un cultivo de *B. megaterium* es transferido de 35 a 20°C, la actividad $\Delta 5$ -desaturasa comienza y luego continúa a altos niveles por aproximadamente 1 hora. Esta fase, denominada por estos autores (Fuji y Fulco, 1997) hiperinducción, es seguida por un período en el que la actividad $\Delta 5$ -desaturasa disminuye a los niveles característicos de cultivos de *B. megaterium* crecidos permanentemente a 20°C. Estos y otros resultados les han permitido postular a Fuji y Fulco (1977), 23 años atrás y sin evidencia genética o molecular directa, que el cese de la hiperinducción resulta de la acción de un represor transcripcional, el cual bloquearía la síntesis del mensajero de la desaturasa. Nuestros resultados que describen la cinética de acumulación y desaparición del ARNm, así como aquellos que sugieren una represión transcripcional posterior a los primeros 30 minutos del shock frío concuerdan de manera apreciable con el fenómeno de hiperinducción descripto por Fuji y Fulco (1977) en *B. megaterium*. Es importante destacar que nuestro laboratorio ha comunicado que la cantidad de AGIs sintetizada por *B. subtilis* luego de una disminución en la temperatura de crecimiento es mucho mayor

que aquella sintetizada por cultivos crecidos por varias generaciones a 20°C (Grau y de Mendoza, 1993). Por lo tanto el fenómeno de hiperinducción de la desaturasa descrito por Fuji y Fulco (1977) y los resultados descritos en este capítulo son consistentes con la hipótesis de que la síntesis de AGIs en *B. subtilis* es modulada negativamente mediante una represión transcripcional del gen *des* luego del crecimiento prolongado a bajas temperaturas.

En resumen, el conjunto de resultados mostrado hasta aquí permite formular la hipótesis de que el gen *des* se regula, tanto en su inducción por la disminución de la temperatura como en la adaptación a bajas temperaturas, a nivel exclusivamente transcripcional. Dentro de esta hipótesis se inscriben dos líneas de especulación:

- 1- El gen *des* es regulado por medio de factores transcripcionales (activadores o represores) que sufren modificaciones conformacionales en función de los cambios en la temperatura ambiente. Esta posibilidad plantea naturalmente la búsqueda de mutantes defectivas en la regulación del gen *des*. Si fuera una proteína activadora, mutantes nulas del gen que la codifica darían un fenotipo *des*⁻ a 20°C. Si se tratara de una proteína represora, mutantes nulas en el gen que la codifica darían un fenotipo *des*⁺ a 37°C.
- 2- El grado de superenrollamiento del ADN cromosomal es el regulador del gen *des*. Según esta idea, a 37°C la ARN polimerasa sería incapaz de unirse correctamente a la zona -35 y -10 del promotor del gen *des* debido a que el grado de superhelicidad del ADN presente a dicha temperatura no sería el adecuado para tal unión. Cuando la temperatura disminuye, aumenta el grado de superenrollamiento negativo de modo tal que favorecería la unión de la ARN polimerasa a la zona promotora del gen *des* permitiendo así la transcripción del mismo. Una estrategia experimental que podría confirmar o descartar esta hipótesis sería la realización de estudios de transcripción in-vitro con la ARN polimerasa de *B. subtilis* utilizando como substratos plásmidos con distintos grados de superenrollamiento conteniendo el promotor del gen *des*.

Claramente no podemos descartar una combinación de ambas hipótesis o, más aún, en una tercera no imaginada por nosotros pero. Sin embargo, las evidencias experimentales presentadas en el próximo capítulo apoyan la primera de las dos hipótesis arriba planteadas.

CAPITULO III

PERCEPCION DE LA TEMPERATURA EN BACTERIAS

**IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE
TRANSDUCCION DE SEÑALES QUE GOBIERNA LA EXPRESIÓN
DEL GEN *des* .**

Hasta aquí se ha descrito un conjunto de resultados que permiten concluir que el gen *des* se encuentra regulado estrictamente por la temperatura. Los posibles mecanismos implicados en la regulación del gen *des* por la temperatura se han descrito al finalizar el capítulo anterior y se esquematizan en la siguiente figura (Fig. 23). Común a ambas hipótesis es el hecho de que el mecanismo regulador del gen *des* debe estar controlado por uno o más componentes sensores de la temperatura y que estos componentes deben ser capaces de transducir dicha señal hacia la regulación de la transcripción del gen *des*.

Distintos estudios han demostrado que las membranas biológicas pueden percibir cambios ambientales y que, como consecuencia de alteraciones en su estado de fase, son capaces de enviar señales que activen o repriman la transcripción (Vigh y col., 1993, Suzuki y col., 2000, Hoppe y col., 2000). En el caso de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, ha sido demostrado que un descenso en el grado de insaturación de los ácidos grasos de membrana, producido mediante hidrogenación catalítica in vivo, induce la expresión del gen *desA* que codifica para la $\Delta 12$ acil-lípido desaturasa (Vigh y col., 1993). Dicho gen es también inducido por las bajas temperaturas de crecimiento. Así, es factible suponer que un cambio en la fluidez de membrana pueden estar involucrados con la percepción de la temperatura que gobierna la regulación transcripcional de los genes de las desaturasas. También ha sido descrito que el estado físico de la membrana afecta la expresión de genes inducidos por altas temperaturas como ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*. En esta levadura, la modificación del cociente entre ácidos grasos saturados e insaturados lleva a un significativo cambio en la expresión de los genes de "heat-shock" *hsp70* y *hsp82* (Carratu y col., 1996). Estos descubrimientos refuerzan la hipótesis de que cambios en el estado físico de la membrana celular pueden llevar a la regulación de la expresión de genes descritos como inducibles por frío o calor. En bacterias, así como en todos los organismos vivos, existe un amplio número de proteínas responsables de percibir una multiplicidad de señales químicas y físicas que se generan extra o intracelularmente. Entre estas proteínas se encuentran las histidin quinazas. Las mismas se encuentran localizadas en su mayoría en la membrana plasmática aunque también existen en forma soluble. Las histidin quinazas junto a proteínas solubles asociadas (llamadas reguladores de respuesta) constituyen los denominados sistemas regulatorios de dos componentes los cuales están ampliamente difundidos en procariones (Appleby y col., 1996), levaduras (Maeda y col., 1994) y plantas (Chang y col., 1993; Kakimoto, 1996). Estos sistemas reguladores, constituidos

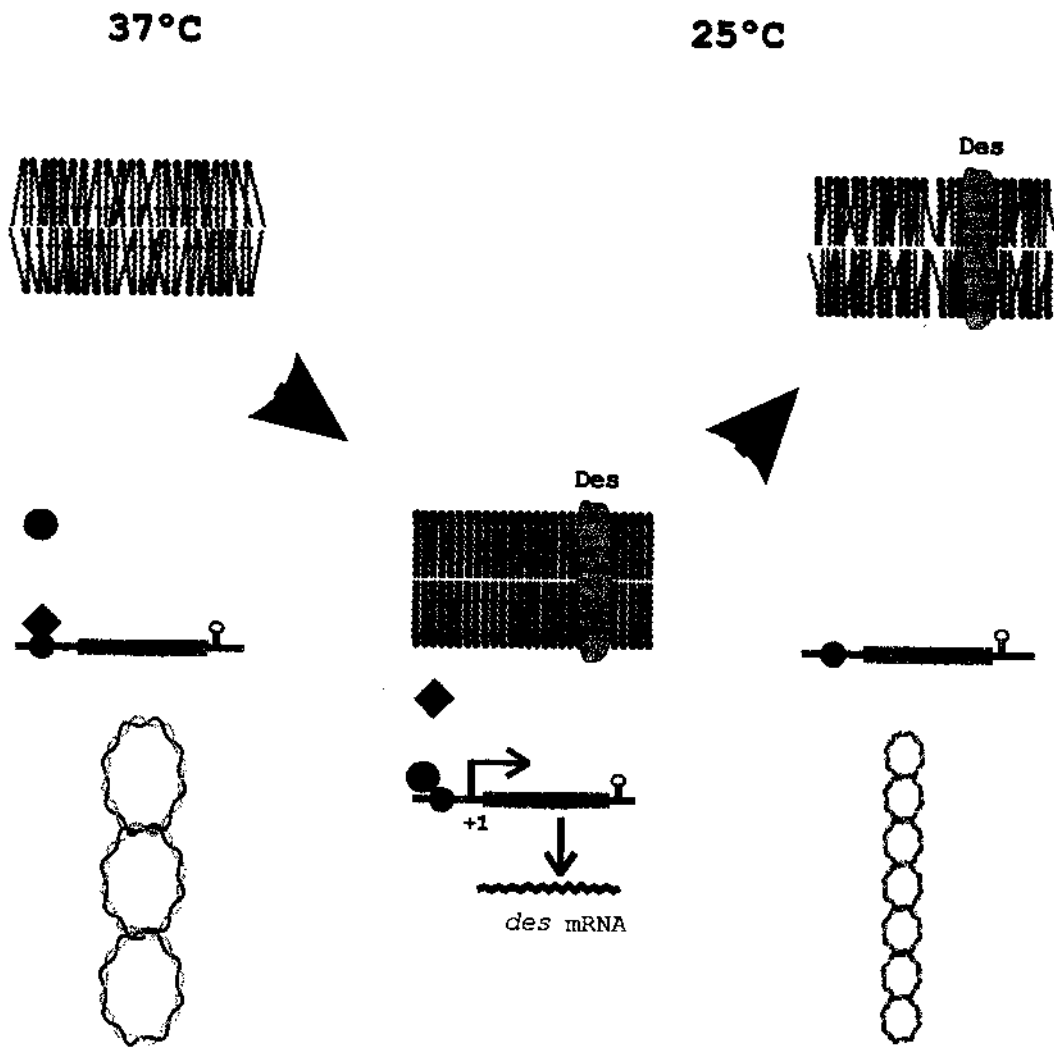


Fig. 23. Posibles mecanismos de regulación del gen *des*. A 37°C la transcripción de *des* se encuentra bloqueada debido a la presencia de un represor activo o de un activador disfuncional a dicha temperatura. Una caída en la temperatura ambiente lleva directa o indirectamente a un cambio conformacional de la proteína hipotética permitiendo la derrepresión (en el caso de que sea un represor) o la inducción transcripcional del gen *des*. Alternativamente, el aumento en el grado de superenrollamiento negativo del ADN que ocurre al disminuir la temperatura podría ser una causa principal de la activación del gen *des*. Asimismo, la inducción transcripcional del gen *des* por frío es de carácter transitoria.

por un componente sensor (la quinasa) y por otro efector (el regulador de respuesta) son los responsables, en gran medida, de la transducción de señales químicas o físicas a través de la membrana plasmática en procariones (Hoch 2000). Dado que las quinasas sensoras son usualmente proteínas integrales de membrana que responden a cambios ambientales hemos considerado la hipótesis de que la regulación por la temperatura del gen *des* esté controlada por un miembro de la familia de los sistemas reguladores de dos componentes.

Teniendo en cuenta esta hipótesis se procedió a analizar la secuencia completa del genoma de *Bacillus subtilis*.

La inactivación de los genes *yocF* y *yocG* impiden la expresión de las fusiones transcripcionales *des-lacZ* inducida por la baja temperatura.

El análisis del genoma completo de *B. subtilis* indica la existencia de 36 posibles histidin quinasas y 34 reguladores de respuesta en dicho organismo (Fabret y col., 1999). De ellos sólo 9 sistemas de dos componentes tienen funciones asignadas en distintos procesos adaptativos tales como competencia, esporulación, respiración anaerobia y quimiotaxis (Fabret y col., 1999). Entre los sistemas de función aún desconocida, se encuentra el operón *yocFG*, que se localiza inmediatamente adyacente a el gen *des*, corriente abajo. Ha sido previamente reportado que, en *B. subtilis*, el sistema de dos componentes *citST* muy próximo al gen *citM* y sin pertenecer a la misma unidad transcripcional, regula la transcripción del gen *citM*, involucrado en el transporte de citrato (Yamamoto y col., 1999). Este hallazgo junto con la sugestiva localización del par *yocFG* corriente abajo de *des* nos indujeron a analizar mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida la influencia de este putativo sistema regulatorio en el control de la expresión del gen de la desaturasa. Para monitorear la inducción del gen *des* ante una disminución de la temperatura de crecimiento se construyó la cepa AKP3 (ver Materiales y Métodos). Esta cepa posee en el locus *amyE* de la cepa JH642 de *B. subtilis* una fusión transcripcional del promotor del gen *des* al gen *lacZ* de *E. coli* (*pdes-lacZ*). Para determinar entonces si los genes *yocF* y *yocG* son esenciales para la expresión del gen *des* hemos interrumpido ambos genes introduciendo un cassette de resistencia a kanamicina en la cepa AKP3 (Km^R , ver Materiales y Métodos). La cepa resultante, denominada AKP21, fue utilizada entonces para la medición de la actividad β -galactosidasa a distintas temperaturas (Fig. 24).

Como puede observarse en la Fig. 24, cuando ambas cepas (AKP3 y AKP21) son cultivadas a 37°C los niveles de actividad β -galactosidasa son muy bajos. Sin embargo, como ya se describió en el Capítulo I, ante una caída en la temperatura de crecimiento de 37 a 25°C, los niveles de actividad β -galactosidasa en la cepa silvestre aumentan llegando a valores cerca de 13 veces mayores que los registrados a 37°C. En contraste con la cepa silvestre, la doble mutante *yocF yocG* no presenta un aumento significativo en su actividad β -galactosidasa ante la caída de la temperaturas de crecimiento (Fig. 24). Asimismo, la inducción por frío de la fusión *pdes-lacZ*

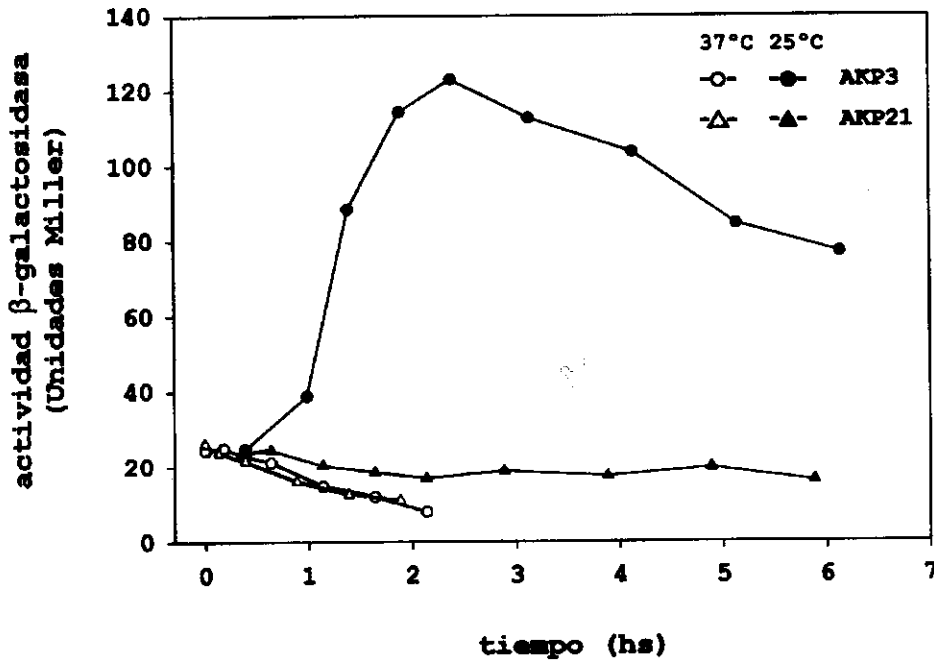


Fig. 24. Perfil de la expresión de la fusión transcripcional *pdes-lacZ* en cepas silvestres y *yocF yocG* de *B. subtilis* a 37 y 25°C. Cultivos de las cepas AKP3 (círculos) y AKP21 (triángulos) fueron crecidos en medio SPI-CAA a 37°C hasta fase logarítmica temprana y luego divididos en dos. Una fracción del cultivo fue transferida a 25°C (símbolos rellenos) y la otra fue mantenida a 37°C (símbolos vacíos). A los tiempos indicados, alícuotas de las distintas fracciones fueron tomadas y procesadas para la determinación de la actividad β -galactosidasa.

en la cepa AKP3 puede ser fácilmente observable en medio sólido conteniendo X-Gal. Como puede observarse en la Fig. 25, panel I, las colonias de la cepa AKP3 en medio LB-X-Gal son blancas a 37°C y se tornan azules a 25°C mientras que las colonias de la cepa AKP21 permanecen blancas a ambas temperaturas. Estos resultados indican que la presencia de ambos genes *yocF* y *yocG* es necesaria para la inducción por frío del gen *des*.

Para verificar que los genes *yocF* y *yocG* son necesarios para la expresión del gen *des*, se construyeron plásmidos conteniendo el operón *yocFG* o el gen *yocG* bajo control del promotor inducible por xilosa *pxil*. Dichos plásmidos fueron integrados por recombinación homóloga en el locus *thrC* de la cepa AKP21 generando así las cepas AKP2147 (*pxil-yocFG*) y AKP2152 (*pxil-yocG*, ver Materiales y Métodos). En la cepa AKP2147, donde los dos genes *yocF* y *yocG* están provistos en *trans*, la inducción por frío de *des* depende de la presencia de xilosa en el medio de cultivo (Fig. 25, panel I). También puede observarse en la Fig. 25 (panel II) que la

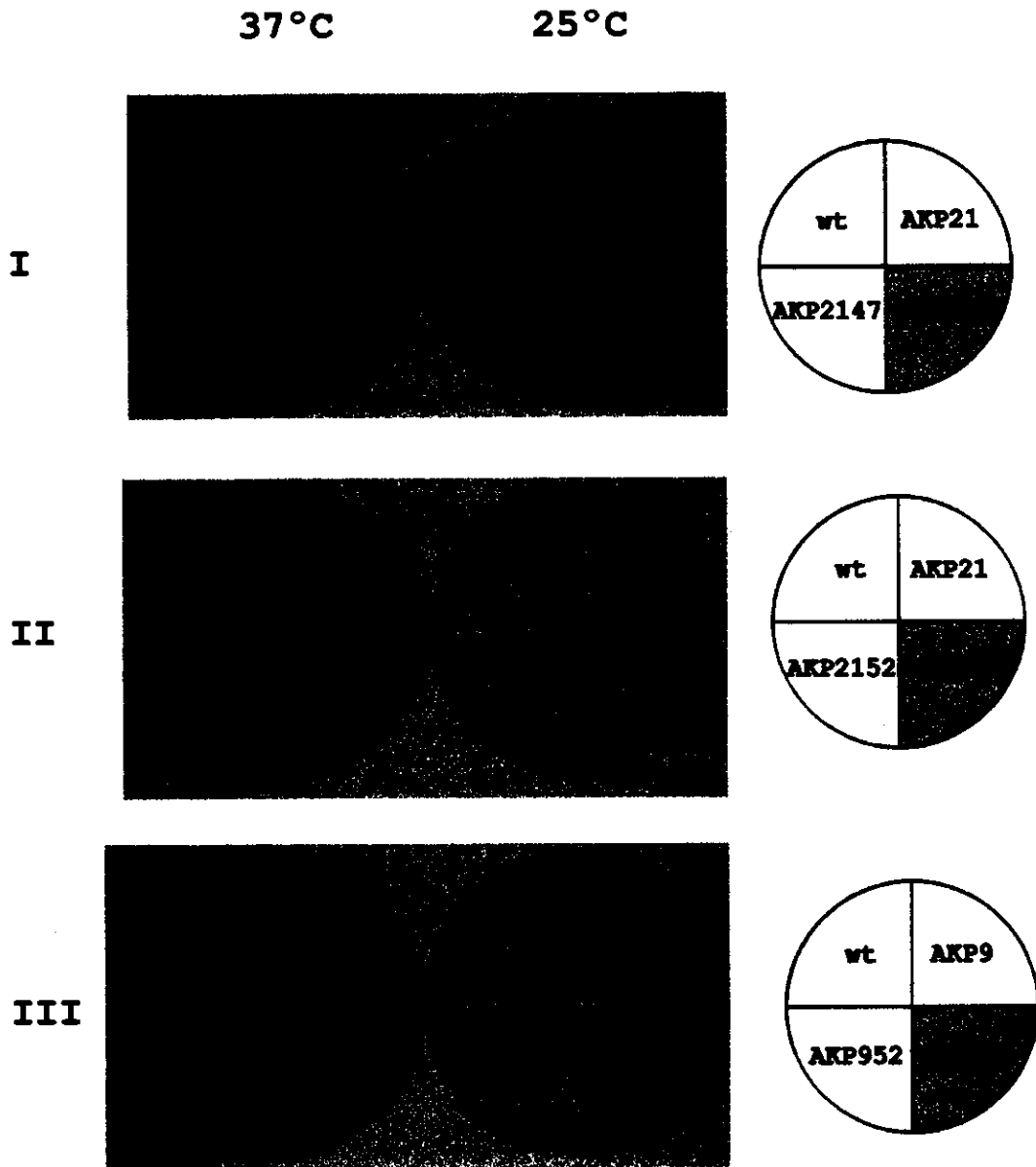


Fig. 25. Fenotipos observables en medio sólido de cepas silvestres y distintos mutantes en los genes *yocF* y *yocG* de *B. subtilis* que contienen la fusión transcripcional *pdes-lacZ*. Las distintas cepas señaladas fueron sembradas en medio LB con X-Gal 30 µg/ml, suplementado (cuarto sombreado) o no con xilosa 0.8% conc. final. Las cajas de Petri fueron incubadas 12 hs a 37°C (columna de la izquierda, 37°C) o 5 hs a 37°C y luego 36 hs a 25°C (columna del medio, 25°C) antes de ser fotografiadas. La columna de la derecha representa la ubicación de las distintas cepas sembradas, sus genotipos se encuentran descritos en la Tabla 3 (ver Materiales y Métodos). Los resultados del panel III fueron gentilmente cedidos por A Erazo (2001).

expresión de únicamente el gen *yocG* en la cepa AKP2152 es insuficiente para restablecer el fenotipo *lac*⁺ a bajas temperaturas. Por otro lado, la interrupción con un "cassette" de kanamicina de únicamente el gen *yocG*, anula también la expresión del gen *des* (Fig 25, panel III). En esta cepa, denominada AKP9, el restablecimiento de la expresión del gen *yocG* bajo control del *pxil*, permite observar el fenotipo *lac*⁺ en presencia de xilosa a bajas temperaturas (Fig. 25, panel III). Estos resultados permiten concluir que tanto *yocF* como *yocG* son esenciales para la inducción por frío del gen *des*.

La inactivación de *yocG* impide la síntesis del ARNm de la desaturasa y de AGIs en *B. subtilis*.

Con el fin de estudiar en mayor detalle la función de los genes *yocF* y *yocG* sobre la expresión del gen *des* se realizaron experimentos de Northern-blot analizando la síntesis del ARNm del gen *des* en la cepa salvaje JH642 y en su isogénica *yocG* (cepa AKP8). Como ha sido previamente descrito, en la cepa salvaje JH642 una caída en la temperatura del cultivo de 37 a 25°C induce la síntesis del ARNm-*des* (Fig. 26 A, calle 1). Por el contrario, se puede observar que en el caso de la cepa AKP8, no se detecta la presencia del mensajero de la desaturasa en iguales condiciones (Fig. 26 A, calle 2). Asimismo, el perfil de ácidos grasos sintetizados por ambas cepas en condiciones de "shock" frío permite concluir que el gen *yocG* es esencial para la síntesis de AGIs. Esto se deduce del hecho de que la cepa salvaje sintetiza AGIs al ser transferida de 37°C a 25°C, mientras que la cepa AKP8 es incapaz de sintetizar AGIs en iguales condiciones (Fig. 26 B).

Similitudes entre YocF, YocG y proteínas de los sistemas de dos componentes.

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *yocF* y *yocG* presentan una clara similitud estructural con las histidin quinastas y los reguladores de respuesta, respectivamente, de los sistemas regulatorios de dos componentes. La secuencia de aminoácidos deducida de *yocF* indica que *YocF* posee 370 aminoácidos y un peso molecular calculado de 43 kDa. Como ha sido ya propuesto (Fabret y col., 1999), *YocF* pertenece al grupo II de quinastas de *B. subtilis*. Este grupo está muy relacionado con la quinasa NarX de *E. coli* e incluye a la proteínas de *B. subtilis* DegS involucrada en degradación enzimática y competencia (Dartois y col., 1998) y a ComP, relacionada con la competencia temprana (Grossman, 1995). El dominio histidin quinasa

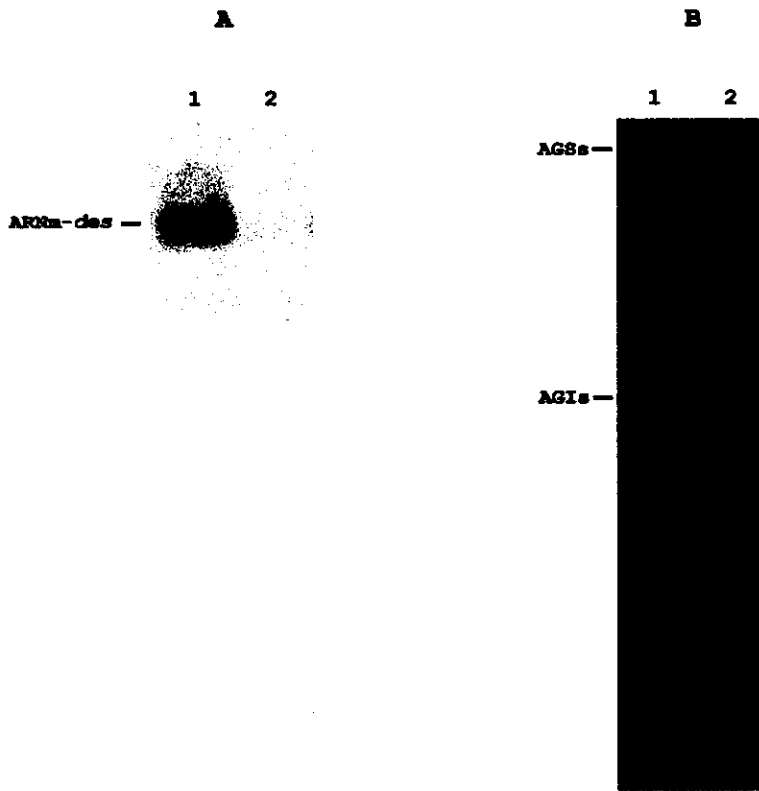


Fig. 26. Producción de ARNm-*des* y de AGIs en la cepa *yocG* de *B. subtilis*. (A) Análisis por "Northern-blot" en geles de formaldehído-agarosa. Se crecieron las cepas silvestre (calle 1) y *yocG* (calle 2) a 37°C hasta mitad de fase logarítmica y luego fueron transferidas a 25°C por 30 min, en ese momento las células fueron recogidas y procesadas para la extracción de ARN totales. Cada calle contiene 10 µg de ARN total. (B) Perfil de AGIs sintetizados por las mismas cepas. Las cepas silvestre (calle 1) y *yocG* (calle 2) fueron cultivadas a 37°C hasta mitad de fase logarítmica y luego a 2 ml de cultivo se le agregaron 10 mCi de acetato [^{14}C] para posteriormente ser transferidos a 25°C. Luego de 12 hs de incubación a 25°C se extrajeron los lípidos totales para su posterior transesterificación. Los metil ésteres resultantes fueron resueltos mediante TLC- AgNO_3 . La muestra de la calle 1 contiene 15.000 y 2000 cpm en las fracciones AGSs y AGIs respectivamente. La muestra de la calle 2 contiene 14.000 cpm en la fracción de AGSs y solo niveles basales de radioactividad en la fracción de AGIs.

se encuentra localizado en el C-terminal y contiene la histidina aceptora del grupo fosfato en la posición 188, mientras que el extremo N-terminal comprende cuatro segmentos de alta hidrofobicidad que se comportarían como dominios transmembrana (Fabret y col., 1999). El gen *yocG* codifica para una proteína de 199 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa. La secuencia deducida de aminoácidos de *yocG* demuestra similitudes con los reguladores de respuesta asociados a las quinasas relacionadas con DesK: DegU (asociada a DegS) y ComA (asociada a ComP). Los reguladores de respuesta han sido clasificados de acuerdo a las similitudes que presentan en sus dominios de unión a ADN (Fabret y col., 1999), para el caso de

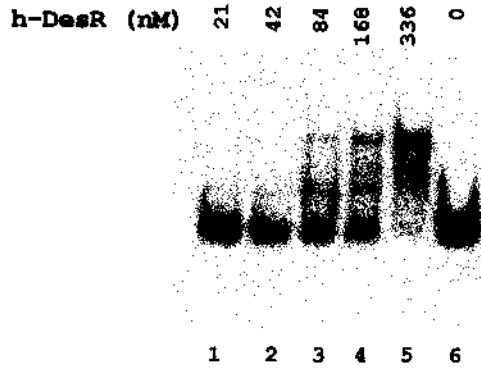
YocG, esta proteína puede ubicarse en el grupo homólogo al regulador NarL de *E. coli* al cual también pertenecen DegU y ComA. En dicho grupo, el sitio de unión al ADN se encuentra en el extremo C-terminal y el sitio receptor de la señal en el dominio N-terminal.

Dado que los genes *yocF* y *yocG* son necesarios para la inducción transcripcional del gen *des* han sido por nosotros renombrados *desK* (por la palabra inglesa Kinase y *desaturasa*) y *desR* (por Regulador y *desaturasa*) respectivamente y, las proteínas que ellos codifican DesK y DesR.

h-DesR es capaz de unir específicamente al promotor del gen *des*.

En la mayoría de los casos descritos para los sistemas reguladores de dos componentes, el regulador de respuesta funciona como regulador transcripcional de los genes cuyos productos son utilizados para responder a la señal que activa al sistema. Los datos genéticos presentados sugieren que DesR puede comportarse como un activador transcripcional del gen *des* y que por lo tanto se uniría a la zona promotora del mismo. No obstante no podemos descartar que la función de *desR* en la regulación transcripcional del gen *des* sea indirecta como sucede en otros sistemas de dos componentes que involucran más de un regulador de respuesta, tal es el caso de el sistema de "phosphorelay" involucrado en la esporulación de *B. subtilis* (Fabret y col., 1999). Para comprobar entonces si DesR tiene una acción directa sobre el gen *des*, se analizó la capacidad de esta proteína de unirse específicamente in vitro a la zona promotora del gen *des*. Para ello se clonó el gen *desR* en un vector de expresión de *E. coli*, introduciendo una cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal de *YocG* (ver Materiales y Métodos). Se sobreexpresó este gen en la célula huésped de *E. coli* y posteriormente se purificó la proteína de fusión 6His-DesR (h-DesR) mediante cromatografía de afinidad con resinas de NTA-níquel (ver Materiales y Métodos). Como ADN blanco se utilizó un fragmento de ADN de 367 pb que contiene el promotor del gen *des* el cual fue purificado y posteriormente marcado con [α - 32 P]dATP (ver Materiales y Métodos). La capacidad de formación de complejos entre *desR* y el ADN que contiene el promotor del gen *des* (*pdes* ADN) fue determinada mediante ensayo de retardo de movilidad en geles (EMSA, por "electrophoresis mobility shift assay") en presencia de un exceso de poli(dI-dC) como competidor inespecífico del *pdes* ADN. Como puede observarse en la Figura 27 A, el *pdes* ADN sufre un cambio en su movilidad en contacto con una concentración 21 nM de h-DesR (calle 1). A medida que se va incrementando la cantidad de h-DesR, el retardo en la movilidad se hace más notorio y ante la mayor concentración de h-

A



B

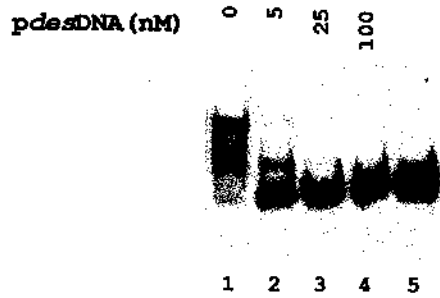


Fig. 27. h-DesR se une específicamente al promotor del gen *des*. (A) Un fragmento de ADN de 367 pb conteniendo al promotor del gen *des* (*pdes*-ADN) fue marcado con ^{32}P y utilizado a una concentración de 1.7 nM en las reacciones de unión con h-DesR. Las distintas concentraciones de h-DesR utilizadas para las reacciones de unión se indican arriba de cada calle. (B) Ensayo de competencia específica utilizando ^{32}P *pdes*-ADN 1.7 nM, h-DesR 336 nM y distintas cantidades de *pdes*-ADN no marcado. La calle 1 presenta los distintos complejos formados en ausencia de *pdes*-ADN frío. Las calles 2 a 4 muestran la disociación del complejo ^{32}P *pdes*-ADN/h-DesR ante el agregado de cantidades crecientes de *pdes*-ADN no marcado. La calle 5 contiene solamente ^{32}P *pdes*-ADN.

DesR ensayada (336 nM), más de un 90% del fragmento de 367 bp se encuentra acomplejado por la proteína (Fig. 27 A, calle 5). Se puede apreciar la presencia de dos bandas con distinta movilidad sugiriendo la existencia de dos complejos posibles h-DesR/*pdes* ADN, uno formado a un bajo cociente proteína/ADN y otro, de menor movilidad favorecido por una mayor concentración de proteína. El agregado de *pdes* ADN no radioactivo en un exceso de 3 veces disminuye apreciablemente la formación del complejo marcado con ADN- ^{32}P (Fig. 27 B, calle 2), un exceso de 15 veces del competidor específico anula la formación del complejo radioactivo (Fig. 27 B, calle 3). Asimismo se determinó que h-DesR es incapaz de unirse al

promotor del operón *repAB* del plásmido pLS1 (del Solar y col., 1990, datos no mostrados). El conjunto de estos resultados nos permite concluir que h-DesR se une a la zona promotora del gen *des* de manera específica.

h-DesR protege segmentos de ADN localizados -28 a -77 nucleótidos con respecto al inicio de la transcripción.

Con el fin de determinar la secuencia del *pdes* ADN reconocida por el regulador de respuesta DesR, se llevaron a cabo experimentos de protección a la degradación por DNasa I con fragmentos de ADN marcado con ^{32}P conteniendo el promotor del gen *des* (ver Materiales y Métodos). El resultado de estos experimentos demuestra que la unión de h-DesR a la zona promotora del gen *des* resulta en una protección de la secuencia de ADN que se extiende del nucleótido -28 al -77 con respecto al inicio de la transcripción (Fig. 28). Además de los sitios protegidos de la degradación por DNasa I, se evidencian varios sitios de hipersensibilidad a la misma, tales sitios sugieren la existencia de deformaciones locales producto posible de una torsión de la doble hélice de ADN ejercida por la unión de h-DesR. El tratamiento con DNasa I del complejo ADN/h-DesR revela 5 regiones protegidas en ambas hebras las cuales se encuentran desplazadas unas de otras hacia el extremo 3' de la hebra codificante. En el centro de la región protegida se pueden observar dos secuencias invertidas repetidas 5'-TCAT-3' separadas por 9 nucleótidos y cuyo eje de simetría diádica se encuentra justo en el centro de la región protegida. La presencia y ubicación de esta simetría diádica junto con la observación de dos complejos *pdes* ADN/h-DesR (Fig. 27) sugiere la unión de más de un monómero de DesR a cada lado del centro de simetría diádica presente en el promotor del gen *des*.

DesK activa y desactiva a DesR en función de la temperatura de crecimiento.

Ha sido previamente reportado que la sobreexpresión de reguladores de respuesta en ausencia de su respectiva quinasa puede llevar a la expresión constitutiva del(los) gene(s) reconocidos por tal regulador (Powell y Kado, 1990). Esto sugiere que altas concentraciones del regulador de respuesta no fosforilado pueden producir la unión del mismo in vivo al promotor blanco y por lo tanto estimular la transcripción de forma constitutiva. Si así fuera el caso para el par DesK/DesR en *B. subtilis*, podríamos

entonces construir una cepa con expresión constitutiva del gen *des* para poder así posteriormente estudiar en más detalle en primer lugar la naturaleza de la

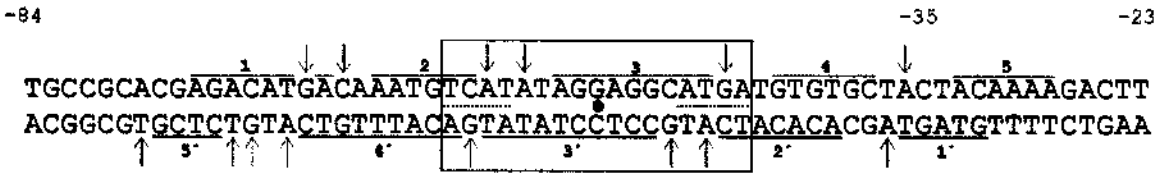
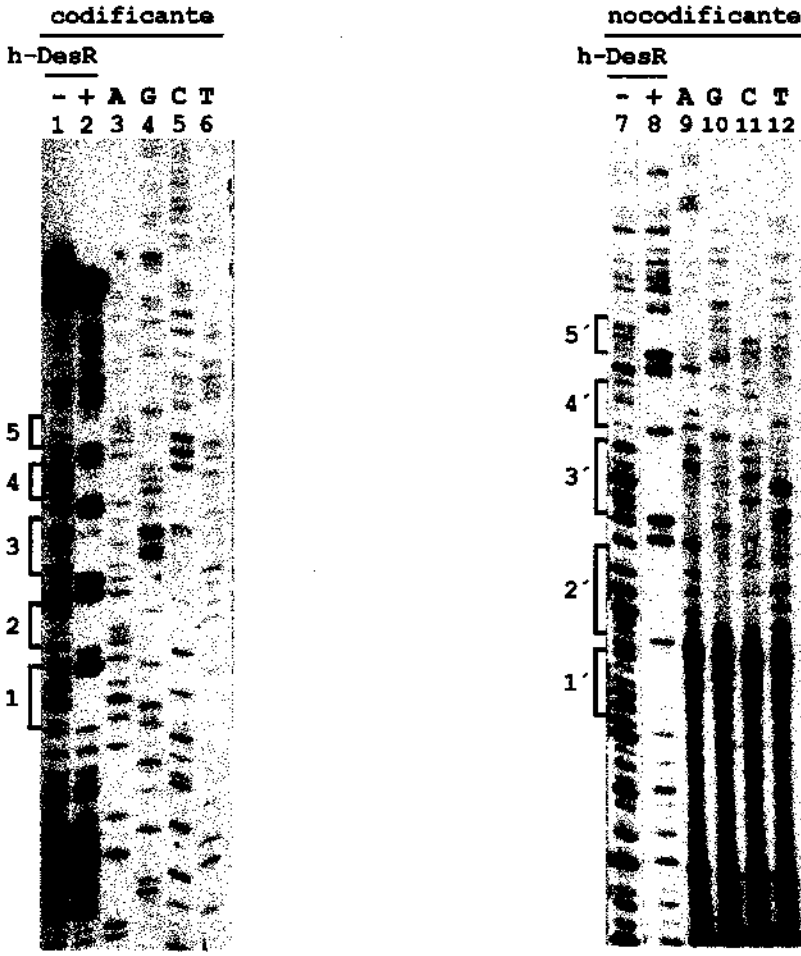


Fig. 28. Ensayo de protección a la degradación por DNasa I del promotor del gen *des*. Un fragmento de ADN de 178 pb que contiene el promotor *des* fue marcado con ³²P en cada hebra y posteriormente sometido a degradación por la DNasa I en presencia (+) o ausencia (-) de h-DesR. Las reacciones de secuencia sobre la hebra codificante (calles 3 a 6) y la no-codificante (calles 9 a 12) del mismo fragmento de ADN permiten identificar las regiones protegidas en ambos (corchetes numerados). La región de 17 pb que presenta simetría diádica se encuentra señalada por la caja y el centro de simetría por un punto negro. Las regiones invertidas repetidas están marcadas con líneas de puntos. Las flechas marcan las regiones de hipersensibilidad a la DNasa I.

interacción entre el regulador de respuesta y su histidin quinasa y en segundo lugar el efecto de la expresión constitutiva del gen *des* a 37°C en la fisiología de *B. subtilis*. Para determinar entonces si un exceso de DesR, en ausencia de DesK, puede activar la transcripción del gen *des* construimos dos cepas derivadas de la cepa silvestre JH642, ambas *desK*⁻, denominadas AKP2152 y AKP20, expresando en trans el gen *desR* bajo el promotor inducible por xilosa *pxil* o bajo el promotor *pKm^f*, respectivamente (ver Materiales y Métodos). Sobre estas cepas y sobre la cepa salvaje se realizaron ensayos de inmunodetección de DesR por "Western-blot". Los intentos de detectar DesR con extractos totales de células lisadas tomadas de cultivos creciendo a 25 y 37°C han sido infructuosos (Fig. 29 A, calles 1 y 2), sugiriendo entonces que los niveles de esta proteína a ambas temperatura son muy bajos. Sin embargo se puede observar que la cepa AKP2152 contiene niveles significativos de DesR si al medio de cultivo se lo suplementa con xilosa 0.8% (Fig. 29 A, calle 5). Puede apreciarse que, a pesar de que la cepa AKP2152 sobreproduce DesR, el gen *des* continua reprimido (Fig. 25 B, panel II) sugiriendo entonces que su promotor depende de la forma fosforilada de DesR para ser activado. En el caso de la cepa AKP20 el análisis por Western Blot revela que posee niveles de DesR cinco veces mayores que los de la cepa AKP2152 (Fig 29 B, calle 6). Asimismo, esta cepa es capaz de expresar la fusión *pdes-lacZ* a 37°C (Fig. 29 C). Este experimento demuestra que altas concentraciones de DesR "omiten" el requerimiento de DesK para la inducción del gen *des*. Este resultado concuerda entonces con otros trabajos donde se ha demostrado que reguladores de respuesta defosforilados pueden activar a sus promotores blanco si se encuentran en cantidad suficiente dentro de la célula. Sin embargo, en directo contraste con esta hipótesis, hemos encontrado que si a la cepa AKP20 se le introduce en trans el operón *desKR*, bajo influencia del promotor *pxil* (generando la cepa AKP2047, ver Materiales y Métodos), la expresión del gen *des* vuelve a ser inducible por las bajas temperaturas (Fig. 29 C). Este efecto no puede ser atribuido a un descenso en los niveles de la proteína DesR ya que como puede verse en la fig. 29 C (calles 4 y 5), los mismos son similares a los de la cepa AKP20. Es decir que la restitución de *desK* restablece el fenotipo silvestre en la cepa que sobreexpresa *desR*. Este resultado podría explicarse de la siguiente manera: a igualdad de niveles de DesR entre ambas cepas, lo más probable sería que la restitución de DesK convierta a DesR en su estado inactivo, es decir, según el paradigma de los sistemas de dos componentes, al estado defosforilado. Dado que en la cepa AKP20 los niveles de DesR son 5 veces mayores que en la cepa AKP2152, DesR se encontraría activo en la

primera cepa, y no en la segunda, debido a que es fosforilado de manera inespecifica por una segunda actividad quinasa independientemente de la temperatura. Esta quinasa putativa tendria

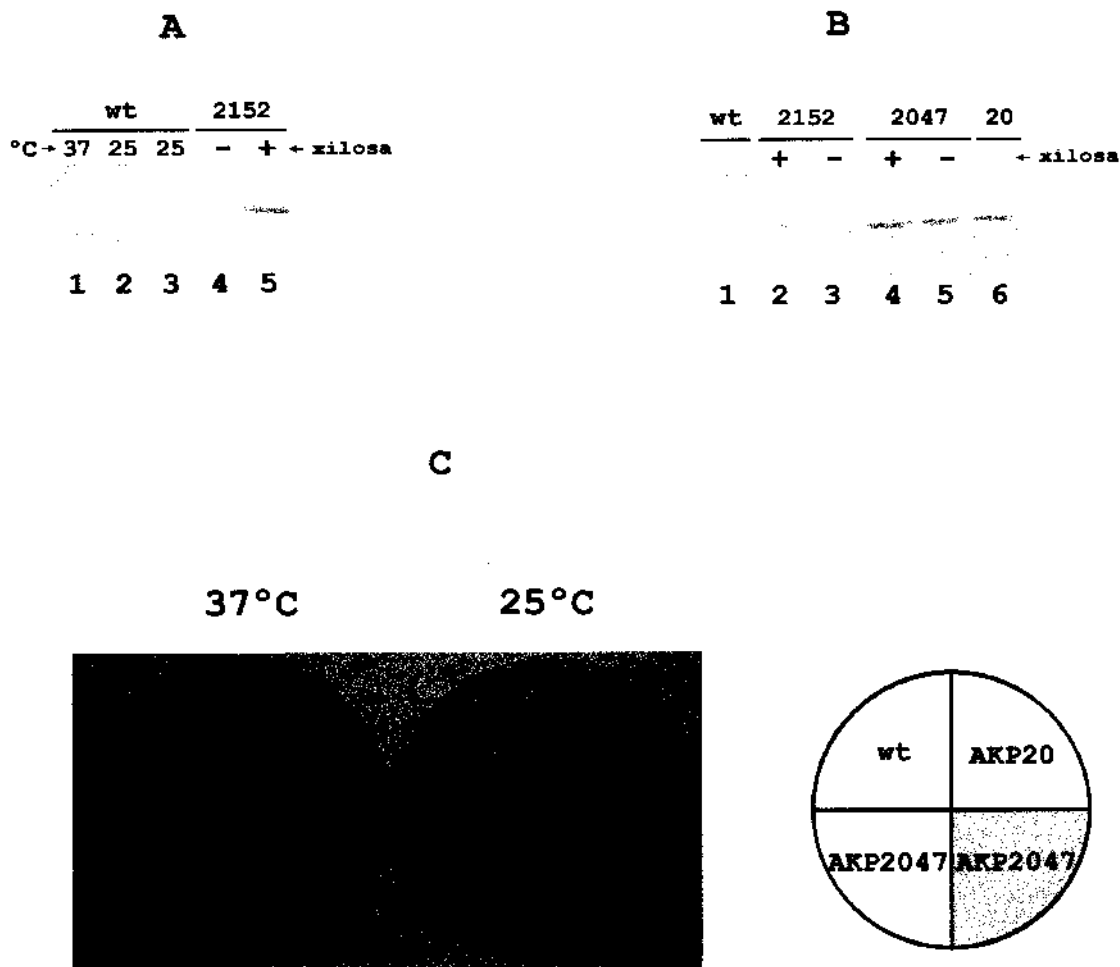


Fig. 29. La sobreproducción de DesR, en ausencia de DesK, lleva a la expresión constitutiva de *des*. (A) Western-blot seguido de inmunodetección de DesR en las cepas salvaje y AKP2152. Células de la cepa JH642 fueron cultivadas a 37°C hasta mitad de fase logarítmica (calle 1) y luego transferidas a 25°C. Las mismas fueron colectadas a los 30 (calle 2) o 180 min (calle 3) de incubación a 25°C antes de ser procesadas. Células de la cepa AKP2152 (2152) fueron cultivadas en presencia (calle 5) o en ausencia (calle 4) de xilosa 0.8 % a 37°C hasta mitad de fase logarítmica y luego transferidas a 25°C por 2 hs antes de su procesamiento. Los extractos proteicos totales fueron preparados según se describe en Materiales y Métodos. (B) Western-blot seguido de inmunodetección de DesR en las cepas salvaje (wt), AKP20 (20), AKP2047 (2047) y AKP2152 (2152). En todos los casos la células de las distintas cepas fueron cultivadas a 37°C hasta mitad de fase logarítmica y luego transferidas a 25°C por 2 hs antes de ser procesadas para la extracción de proteínas totales. Los cultivos de las cepas AKP2152 y AKP2147 fueron suplementados (+) o no (-) con xilosa 0.8 %. (C) Expresión de la fusión *pdes-lacZ* en las cepas AKP3, AKP20 y AKP2047. Las distintas cepas señaladas fueron sembradas en medio LB con X-Gal 30 µg/ml, suplementado (cuarto sombreado) o no con xilosa 0.8% conc. final. Las cajas de Petri fueron incubadas 12 hs a 37°C o 5 hs a 37°C y luego 36 hs a 25°C antes de ser fotografiadas.

entonces una muy baja afinidad por DesR y por lo tanto requeriría de altas concentraciones del mismo para poder fosforilarlo. Todo esto sugiere que DesK se encuentra a 37°C en un estado con actividad predominantemente fosfatasa y que cuando la temperatura del cultivo desciende se comporta

como una quinasa de DesR, resultando en la activación del regulador transcripcional y estimulando por consiguiente la transcripción de *des* sólo a bajas temperaturas.

Los AGIs regulan la expresión del gen *des*.

Hasta aquí hemos descrito experimentos que permiten explicar el “encendido por bajas temperaturas del gen *des*”. Hemos caracterizado genética y molecularmente los componentes responsables de tal inducción, pero también hemos visto que la misma es de carácter transitorio (Fig. 14A, Capítulo II). Tanto de los resultados obtenidos en el análisis de los niveles en estado estacionario del *des* ARNm (ver Capítulo II), como de aquellos obtenidos por medio de fusiones transcripcionales *pdes-lacZ* (ver Capítulo I), se puede inferir, apoyados también por evidencias previas (Grau y de Mendoza, 1993; Fulco, 1967), que el gen *des* sufre al caer la temperatura del cultivo, una rápida activación transcripcional seguida de una inactivación de la transcripción luego de aproximadamente 30 minutos del descenso de la temperatura. Para investigar el mecanismo por el cual la transcripción del gen *des* se inhibe luego de una incubación prolongada a bajas temperaturas se realizaron los siguientes experimentos. Dado de que *desK* y *desR* son necesarios para la inducción de *des* a bajas temperaturas, es razonable postular que una represión de los mismos podría resultar en la inactivación transcripcional del gen *des*. Para probar esta hipótesis se extrajo ARN total de cultivos de la cepa silvestre de *B. subtilis* crecidos hasta mitad de fase logarítmica a 37°C y luego transferidos a 25°C por distintos tiempos. El análisis por “Northern-blot” demostró que los genes *desK* y *desR* son transcriptos como una sola unidad transcripcional (datos no mostrados) a ambas temperaturas (Fig. 30). Dado que los niveles del ARNm de *desKR* se mantienen pasadas las 3 horas de la caída de la temperatura del cultivo podemos suponer que el apagado del gen *des* no se debe a un cese de la transcripción del operón *desKR*. Por lo tanto el carácter transitorio de la inducción del gen *des* podría deberse a una interrupción en el sistema de detección y transducción de la señal que representa la caída de la temperatura. Dado que ha sido reportado que los AGIs constituyen moléculas señales que median una amplia gama de procesos celulares (Dowhan, 1997), incluida la expresión génica

(Choi y col., 1996; Hoppe y col., 200) podemos pensar entonces que en el caso de *B. subtilis* los AGIs generados a bajas temperaturas podrían actuar como reguladores negativos de la

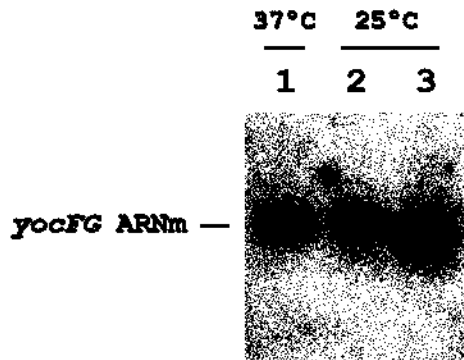


Figura 30. El operón *desKR* se transcribe de manera constitutiva a 37 y 25°C. Análisis por Northern-blot del transcripto de los genes *desK* y *desR*. Células de la cepa salvaje JH642 fueron cultivadas a 37°C hasta mitad de fase logarítmica (calle 1) y luego transferidas a 25°C. Las mismas fueron colectadas a los 30 (calle 2) o 180 min (calle 3) de incubación a 25°C antes de ser procesadas para la extracción de ARN totales. Cada calle contiene 15 µg de ARN. El tamaño del único transcripto observado fue comparado con marcadores de peso molecular de ARN (datos no mostrados). Estos resultados fueron obtenidos en colaboración con A. Erazo (2001)

transducción de señales que lleva a la expresión del gen *des*. Para probar esta hipótesis construimos una mutante nula del gen *des* insertando en el mismo un cassette de kanamicina en la cepa AKP3, la cual posee una fusión ectópica *pdes-lacZ* (ver Materiales y Métodos). Esta nueva cepa, denominada AKP4, permite entonces monitorear la expresión del gen *des* midiendo los niveles de actividad β-galactosidasa en ausencia de la síntesis de AGIs. Determinamos entonces los niveles de actividad β-galactosidasa en las cepas AKP3 (*des*⁺) y AKP4 (*des*⁻) ante una caída de la temperatura del cultivo. En la Figura 31 vemos que mientras los niveles de actividad β-galactosidasa de la cepa AKP3 comienzan a descender pasadas las 5 hs a 25°C, la actividad β-galactosidasa de la cepa AKP4 continúa aumentando en el mismo período de tiempo llegando a valores casi 10 veces mayores que los existentes en la cepa AKP3 al cabo de 8 horas de crecimiento a 25°C. Este experimento demuestra que en ausencia de síntesis de AGIs la inducción por frío de la transcripción del gen *des* deja de ser transitoria. Seguidamente estudiamos si el agregado de AGIs exógenos afecta la inducción por frío del gen *des*. En la figura 32 se puede observar el efecto del agregado de distintos ácidos grasos a cultivos de la cepa AKP4 sobre la transcripción del gen *des*. Para este experimento los cultivos de AKP4

fueron crecidos hasta mitad de fase logarítmica a 37°C, suplementados con distintos ácidos grasos a diferentes concentraciones, y luego transferidos a 25°C por 4 horas para luego ser recogidos y procesados para la determinación de los niveles de actividad β -galactosidasa. Como puede observarse en la Fig. 32 los valores de actividad β -galactosidasa disminuyen

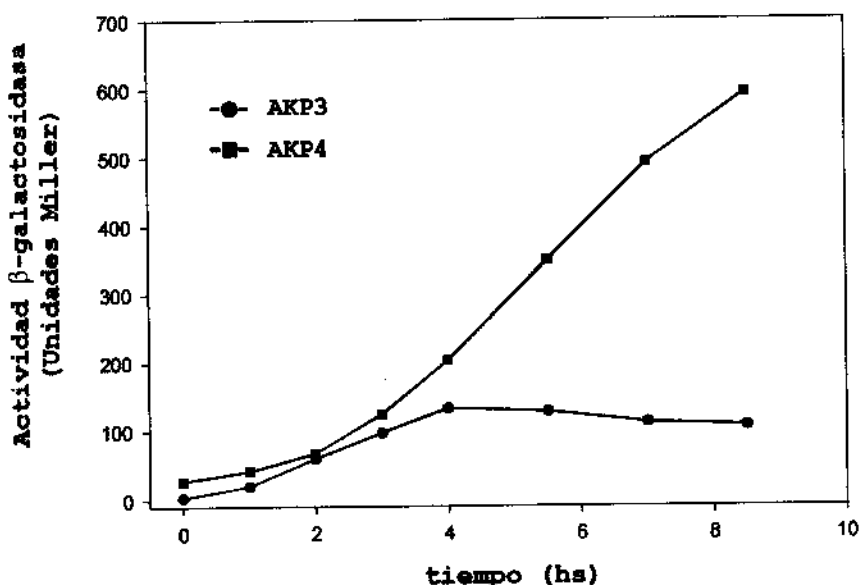


Fig. 31. La transcripción del gen *des* es constitutiva en ausencia de AGIs. El perfil de actividad transcripcional del gen *des* en las cepas *des*⁺ y *des*⁻ ante una caída de la temperatura fue determinado creciendo las cepas AKP3 (círculos) y AKP4 (cuadrados) a 37°C hasta una OD_{525nm}=0.35 (tiempo = 0) y luego transfiriendo los cultivos a 25°C. Alícuotas de los mismos fueron tomadas a los tiempos indicados y procesadas para la determinación de su actividad β -galactosidasa.

significativamente con el agregado de AGIs y no de AGSs. Experimentos control revelaron que los AGIs no afectan la expresión de fusiones transcripcionales al gen *lacZ* a promotores de otros genes involucrados en el metabolismo de los lípidos de *B. subtilis* (datos no mostrados). Se puede observar también que la inhibición de la transcripción es directamente proporcional a la concentración del AGI empleado y que el mayor grado inhibitorio lo alcanza el ácido C 16:1 Δ 5. A concentraciones de 0.5 μ M este ácido graso inhibe en un 75% la transcripción de la fusión *pdes-lacZ*. Es importante destacar que los ácidos grasos Δ 5-monoin saturados son los encontrados naturalmente en *B. subtilis*.

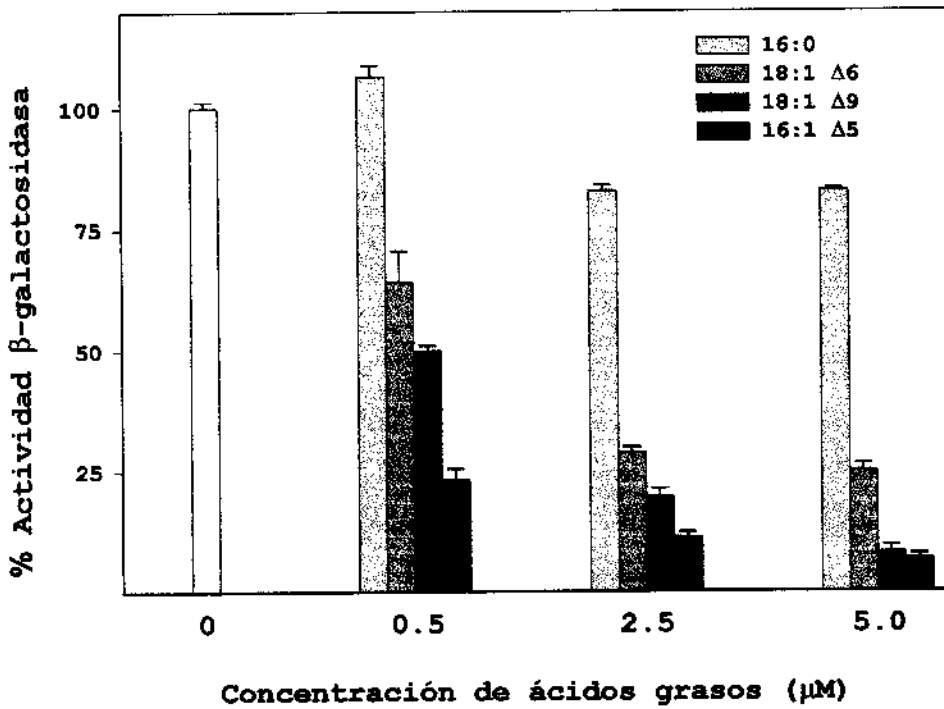


Fig. 32. Los AGIs reprimen la transcripción del gen *des*. Células de la cepa AKP4 fueron cultivadas a 37°C hasta mitad de fase logarítmica y luego distintos ácidos grasos fueron agregados a los medios de cultivo a 3 concentraciones distintas. Posteriormente los cultivos fueron transferidos a 25°C por 4 horas y luego procesados para la determinación de su actividad β -galactosidasa.

DISCUSION

El "encendido" del gen *des*.

Tanto las células procariotas como las eucariotas exhiben una respuesta adaptativa al frío. Esta respuesta se traduce en la regulación de varios genes con la posterior inducción de la síntesis de un amplio rango de distintas actividades enzimáticas para las cuales aún no se ha encontrado una clara conectividad funcional. La identificación de sistemas sensores de la temperatura y reguladores de la expresión de genes inducibles por frío es un paso esencial para el entendimiento en su conjunto de la respuesta y adaptación al "shock" frío. Sin embargo, hasta ahora, los mecanismos moleculares de la percepción de la temperatura han sido escasamente elucidados. La evidencia experimental presentada a lo largo de este trabajo demuestra que a diferencia de otros organismos poiquiloterms tales como cianobacterias (Sakamoto y Bryant, 1997) y plantas (Los y Murata, 1998), *B. subtilis* posee una única actividad desaturasa la cual está codificada por un único gen cuya expresión es estrictamente controlada a nivel transcripcional por la temperatura. Esto hace que la síntesis de AGIs en *B. subtilis* sea un modelo extremadamente atractivo en su simpleza para el estudio de la percepción y la transducción de la temperatura como señal biológica.

Hemos podido identificar un par de proteínas reguladoras pertenecientes a los sistemas de dos componentes, DesK y DesR, capaces de reconocer la temperatura como señal y determinar la regulación del gen de la desaturasa de *B. subtilis*. A pesar de que los sistemas de dos componentes han sido señalados como reguladores de un gran número de respuestas adaptativas ante distintos cambios (Dutta y col., 1999; Hoch, 2000), estos nunca fueron mencionados como partícipes de la respuesta al frío. Los resultados aquí presentados demuestran en primera instancia que *desK* y *desR* son necesarios para la transcripción de *des*. Confirmando este resultado, hemos demostrado que la proteína DesR se une de manera específica al promotor del gen *des* y hemos determinado la región en que lo hace. En esta región se encuentra un elemento de simetría diádica con dos regiones invertidas repetidas 5'-TCAT-3' que sugiere la unión en forma simétrica de más de un monómero de DesR. Es interesante señalar que experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio por L. Cybulski demuestran que la integridad de este elemento de simetría es esencial para la expresión del gen *des*.

A diferencia de lo que se conoce de la respuesta al estrés por calor, no se ha reportado factor transcripcional alguno directamente involucrado en la respuesta al frío (Phadtare y col., 2000). De acuerdo a esto DesR sería el primer regulador transcripcional identificado que está directamente involucrado en la inducción de un gen de respuesta al frío.

Dado que DesK es esencial para la expresión del gen *des* y que su presencia es necesaria para abolir la expresión a 37°C de *des* generada por un exceso de DesR a 37°C, es lícito sugerir que DesK actuaría activando a DesR a bajas temperaturas y desactivándolo a altas temperaturas. Dado que la gran cantidad de evidencias acumuladas hasta el presente indican que la forma activa de los reguladores de respuesta perteneciente a los sistemas reguladores de dos componentes es la forma fosforilada (Hoch, 2000), podemos sugerir que DesK posee una actividad fosfatasa sobre DesR a 37°C produciendo su inactivación. Por otro lado, ante una disminución de la temperatura DesK pasaría a un estado "quinasa dominante" que resultaría en la fosforilación de DesR con la consiguiente activación transcripcional de *des*. Esta hipótesis implica que DesK tendría actividades quinasa y fosfatasa. Esta característica ya ha sido reportada para distintos componentes sensores de sistemas de dos componentes tales como OmpR/EnvZ y CpxR/CpxA de *E.coli*, PhoP/PhoR de *B. subtilis* y PhoP/PhoQ de *Salmonella* (Dutta y col., 1999).

El "apagado" del gen *des*.

En este trabajo de Tesis se demuestra que la actividad transcripcional del promotor *des* es inhibida por AGIs sintetizados endogenamente o agregados al medio de cultivo (Figs. 31 y 32). Resultados similares ya fueron reportados para el caso del gen *ole-1* que codifica para la Δ^9 -desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Choi y col., 1999; Hoppe y col., 2000). Nuestros datos son consistentes con dos posibles modelos que explicarían el control de la expresión de *des* por los AGIs. En un caso, los AGIs podrían inhibir la función de DesR, posiblemente a través de una unión directa al regulador promoviendo su disociación del promotor del gen *des*. Este tipo de regulación por modulación de la capacidad de unión al ADN blanco ha sido descrito para el represor transcripcional Bmr31 de *B. megaterium*, donde la unión del mismo es prevenida por los AGIs (Palmer y col., 1998). En un segundo modelo, la represión podría ser mediada por inhibición de la actividad histidin-quinasa de DesK en presencia de AGIs. Respecto al primer modelo podemos mencionar que mediante experimentos de retardo en geles

no hemos podido observar un desplazamiento de tipo específico de la unión h-DesR/*pdes*ADN en presencia de AGIs (datos no mostrados). Por otro lado, hemos visto que los AGIs no reprimen la transcripción de *des* cuando *desR* es sobreexpresado en ausencia de DesK (resultados no mostrados). Si bien estos datos favorecerían el postulado del segundo modelo, no podemos descartar la posibilidad de que la represión mediada por AGIs necesite de algún factor, todavía no identificado, que pudiera desplazar a DesR-P de su unión al ADN.

En síntesis, el conjunto de resultados descrito en esta Tesis permite proponer un modelo tentativo para el fenómeno de regulación de la síntesis de AGI por la temperatura en *B. subtilis* (Figura 33). Es así que proponemos que DesK puede asumir, en función de la temperatura ambiente, dos estados enzimáticos alternativos frente a DesR. A altas temperaturas de crecimiento DesK presentaría un estado "fosfatasa dominante", mientras que ante un descenso de la temperatura DesK asumiría un estado "quinasa dominante". El perfil de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica deducida de DesK indica que esta proteína posee cuatro dominios transmembrana. Uno o más de estos dominios, inmersos en el entorno lipídico de la membrana celular, podrían sufrir cambios conformacionales ante variaciones de la temperatura que favorezcan alternativamente la actividad quinasa o fosfatasa de DesK. La naturaleza de estos cambios conformacionales estaría gobernada por los cambios en el estado físico de los lípidos

25°C

37°C

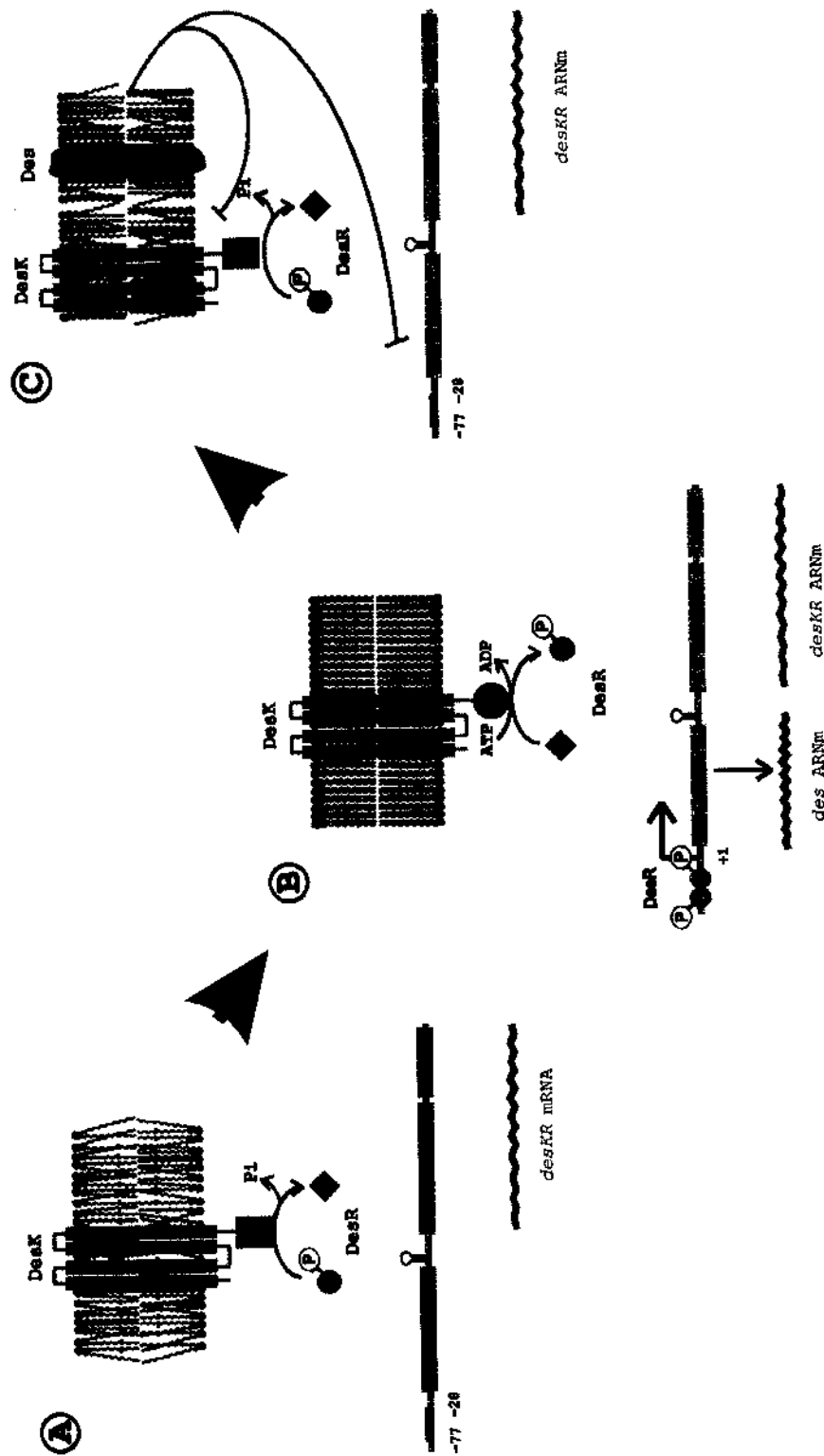


Fig. 33. Modelo propuesto para la regulación terminal del gen *des*. (A) A 37°C el gen *des* se encuentra inactivo debido a que la actividad de *DesK*, influida por el estado desordenado de los lípidos de membrana, mantiene a *DesR* defosforilado. (B) Al caer la temperatura ambiente la membrana se rigidiza y consecuentemente *DesK* incrementa su actividad quinasa y fosforila a *DesR*. *DesR-P* se une al promotor del gen *des* e induce su transcripción. (C) Los AGIs insaturados posteriormente sintetizados causan la represión de *des* a bajas temperaturas ya sea influyendo sobre la actividad de *DesK* o directamente inhibiendo a *DesR-P*.

de la membrana celular. Esta ampliamente documentado que a temperaturas óptimas de crecimiento, las membranas biológicas se encuentran en un estado líquido-cristalino y sufren un cambio hacia el estado similar a un gel si la temperatura ambiente disminuye (Cronan y Rock, 1996; Vigh y col., 1998). Por lo tanto el cambio de un estado fluido (desordenado) a un estado no-fluido (rígido, ordenado) de los lípidos de membrana podría estimular la actividad autoquinasa de DesK la cual resultaría en la autofosforilación del residuo conservado de histidina (His-188) presente en el dominio transmisor de la señal. El grupo fosfato de la His-188 podría entonces ser transmitido a DesR lo que resultaría en el pasaje del regulador a una conformación activa. DesR-P se uniría entonces al promotor del gen *des* estimulando su actividad. La síntesis del ARNm *des* da lugar a la síntesis de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa, la cual introduce un doble enlace en la posición $\Delta 5$ de los restos acilos de los lípidos de membrana en una reacción O_2 dependiente. Esta ruta metabólica presente a bajas temperaturas produce AGIs, los cuales actúan como señales reguladoras negativas que favorecerían la defosforilación de DesR-P o desplazarían a DesR-P de su sitio operador y conducirían a la inhibición del gen *des* en último término.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- A partir de una biblioteca genómica de *B. subtilis* se complementaron cepas de *E. coli* auxótrofas para los AGIs. La secuencia de ADN de *B. subtilis* correspondiente a dichas complementaciones reveló un marco abierto de lectura cuya secuencia aminoacídica presenta características comunes a las de desaturasas de plantas y cianobacterias. El gen identificado, el cual fue denominado *des*, codifica para una única actividad desaturasa en *B. subtilis*.
- 2- Se determinó que el producto del gen *des* presenta actividad $\Delta 5$ desaturasa. También se obtuvieron evidencias experimentales que sugieren que la $\Delta 5$ desaturasa es una acil lípido desaturasa.
- 3- La actividad $\Delta 5$ desaturasa no es esencial para el crecimiento a 20°C en *B. subtilis*.
- 4- El gen *des* se encuentra estrictamente regulado por la temperatura de crecimiento
- 5- Los productos de los genes *desK* y *desR*, los cuales codifican para las proteínas DesK y DesR, pertenecientes a la familia de los sistemas reguladores de dos componentes, son esenciales para la regulación transcripcional por temperatura del gen *des*.
- 6- DesR se une de manera específica al promotor del gen de la desaturasa en la región -28 a -77 respecto al sitio de iniciación de la transcripción.
- 7- DesK sería una enzima bifuncional regulada por la temperatura cuyo sustrato sería el regulador transcripcional DesR. A 37°C se encontraría en un estado "fosfatasa dominante" mientras que ante un descenso de la temperatura cambiaría hacia un estado "quinasa dominante". Esto resultaría en la fosforilación o defosforilación de DesR en función de la temperatura.
- 8- Los AGIs constituyen una señal regulatoria negativa de la transcripción inducida por frío del gen *des*.
- 9- Se postula a DesK como una proteína sensora de la cuya actividad sería regulada por el estado físico de los lípidos de la membrana celular.

RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo de Tesis se ha identificado y caracterizado un conjunto de genes que pertenece a un circuito regulatorio involucrado en la percepción y respuesta al frío en la bacteria Gram positiva *B. subtilis*. Para comenzar a elucidar las bases moleculares de la percepción de la temperatura en bacterias se identificó el gen que codifica para la actividad desaturasa frío inducible de *B. subtilis*. El estudio de este gen, denominado *des*, reveló que es monocistrónico y que *B. subtilis* posee una única actividad desaturasa, del tipo $\Delta 5$ acil lípido desaturasa. Se determinó que la expresión de *des* se encuentra estrictamente regulada por la temperatura de crecimiento. A 37°C su transcripción se encuentra reprimida mientras que al descender la temperatura ambiente se induce su transcripción de manera transitoria. A diferencia de la mayoría de los genes descritos como frío-inducibles en bacterias, el gen *des* no es regulado a través de la estabilidad de su ARNm. La regulación del gen *des* por temperatura es de carácter exclusivamente transcripcional. En la búsqueda de genes involucrados en la regulación del gen *des*, se identificó un operón, denominado *desKR*, cuyos dos genes, *desK* y *desR*, resultaron ser esenciales para la inducción por frío del gen *des*. Este operón codifica para proteínas con homología a las de los sistemas reguladores de dos componentes. DesR, es una proteína soluble que se une específicamente al promotor del gen *des*. DesK presenta homología con histidin quinazas de membrana y la evidencia experimental recogida permite postular que presenta actividades fosfatasa y quinasa sobre DesR en función de la temperatura ambiente. Finalmente, se determinó que los AGIs constituyen una señal negativa en la inducción por frío del gen *des*. Por lo tanto un circuito regulatorio formado por las proteínas DesK y DesR y los AGIs constituye un nuevo mecanismo de control de la expresión génica a bajas temperaturas.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. and de Mendoza, D. (1998)** "A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* 180(8), 2194-2200
- Aguilar, P.S., Lopez, P. and de Mendoza, D. (1999).** "Transcriptional control of the low-temperature inducible *des* gene encoding the $\Delta 5$ desaturase of *Bacillus subtilis*". *J. Bacteriol.*,181(22), 7028-7033.
- Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulsky, L.E., Erazo, A.C. and de Mendoza, D. (2001)** Molecular basis of thermosensing: a two component transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 20 (7): 1-11.
- Alekshun, M.N. and Levy, S.B. (2000)** Bacterial drug resistance: Response to survival threats. pp 323-366. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. (1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul, S. F., L. M. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, , Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S. and Bourret, R.B. (1996)** Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell*, 86: 845-848.
- Ausubel F. M., Brent R., R. E. Kingston , D.D. Moore , J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl. (1987).** Current protocols in Molecular Biology. J. Wiley and Sons. N.Y.
- Bae, W., Jones, P.G. and Inouye, M. (1997)** CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. *J. Bacteriol* 179:7081-7088.
- Bayles, D.O., Annous, B.A. and Wilkinson, B.J. (1996)** Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Env. Microbiol.* 62:1116-1119.
- Bligh, E.G. and Dyer, W. J. (1959)** *Can. J. Biochem. Physiol.* 31:911.
- Bradford, M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (1997)** Biología de los microorganismos, Cap. 13. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Bron, S (1990)** Plasmids. pp 75-138. In C. R. Harwood and SM Cutting (ed.) *Molecular Biological methods for Bacillus* . John Wiley and Sons, New York.

- Cahoon, E. B., Mills, L. A. and Shanklin, J. (1996)** Modification of the fatty acid composition of *Escherichia coli* by coexpression of a plant acyl-acyl carrier protein desaturase and ferredoxin. *J. Bacteriol.* 178: 936-939.
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L. and Maresca, B. (1996)** Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3870-3875.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleeker, A.B. and Meyerhowitz, E.M. (1993)** Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262, 539-544.
- Chapot-Chartier, M.P., Schouler, P.C., Lepeule, A.S., Gripon, J.C. and Chopin, M.C. (1997)** Characterization of *csxB*, a cold-shock inducible gene from *Lactobacillus lactis* and evidence for a family of genes homologous to the *Escherichia coli* *csxA* major cold-shock gene. *J. Bacteriol.* 179:5589-5593.
- Choi, J.Y., Stuke, J., Hwang, S.Y. and Martin, C.E. (1996)** Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 3581-3589.
- Clark, D.P., de Mendoza, D., Polacco, M. and Cronan, J.E., Jr. β -hydroxidecanoyl thioester dehydrase does not catalyze a rate-limiting step in *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis. *Biochemistry* 22 (1983) 5897-5902.**
- Cossins, A. R. (1994)** pp.63-76. Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In Cossins, A. R. (ed), *Temperature adaptation of Biological membranes*. Portland, London, UK,
- Cossins, A. R. and Bowler, K. (1987)** *Temperature biology of animals*. Chapman & Hall, London.
- Cronan, J. E. and Rock, C.O (1996)** Biosynthesis of membrane lipids pp 612-636 In F. C Neidhart et al. (ed) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Csonka, L.N. and Epstein, W. (1996)** Osmoregulation, pp 1210-1223. In F. C Neidhart et al. (ed) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Dartois, V., Djavakhishvili, T. and Hoch, J. A. (1996)** Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 1178-1186.
- Dartois, V., Débarbouillé, M., Kunst, F. and Rapoport, G. (1998)** Characterization of a novel member of the DegS-DegU regulon affected by salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180, 1855-1861.

- de Mendoza, D. and Cronan, J.E., Jr. (1983) Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 86 49-52.
- de Mendoza, D., Klages-Ulrich, A. and Cronan, J. E. Jr. (1983) Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of β -keto-acyl-acyl-carrier protein synthase 1. *J. Biol. Chem* 258:2098-2101.
- de Mendoza, D., Schujman, G. and Aguilar, P.S. (2001) Biosynthesis and function of membrane lipids, in "Bacillus subtilis and its relatives: from genes to cells". J. A. Hoch, R. Losick and A. Sonenshein (Eds). American Society for Microbiology, en prensa.
- del Solar, G.H., Pérez-Martin, J. and Espinosa, M. (1990) Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from repAB promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J. Biol. Chem.*, 265, 12569-12575.
- Drider D., J. M. Santos, C. M. Arraiano and P. López. RNA processing is involved in the post-transcriptional control of the *citQRP* operon from *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *Mol. Gen. Genet.* 258:9-15.
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?. *Annu. Rev. Biochem.*, 66:199-232.
- Dubnau, D., and R. Davidoff-Abelson. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. 1. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56: 209-221.
- Dutta, R., Qin, L. and Inouye, M. (1999) Histidine kinases: diversity of domain organisation. *Mol. Microbiol.*, 34, 633-640
- Erazo, A. C. (2001) Trabajo de Tesina de la Carrera de Licenciatura en Biotecnología, Facultad. de Ciencias. Bioquímicas. y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.
- Fabret, C., Feher, V.A. and Hoch, J.A. (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: How one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181 (7), 1975-1983.
- Falcone, D. L, Gibson, S, Lemieux, B and Somerville, C. (1994) Identification of a gene that complements an *Arabidopsis* mutant deficient in chloroplast omega 6 desaturase activity. *Plant Physiol.* 106: 1453-1459
- Fang, L., Jiang, W., Weonhye, B. and Inouye, M. (1997) Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37°C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol.* 23, 355-364.
- Finkel, S.E., Zinser, E.R. and Kolter, R. (2000) Long-term survival and evolution in the stationary phase. pp 231-238. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Foster, J.W. (2000) Microbial responses to acid stress. Pp 99-115. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.

- Fujii, D. K. and Fulco, A.J. (1977)** Biosynthesis of unsaturated fatty acid in bacilli : hyperinduction and modulation of desaturase synthesis. *J. Biol. Chem.* 252:3660-3670.
- Fulco A.J. (1967)** The effect of temperature on the formation of delta 5-unsaturated fatty acids by bacilli. *Biochim. Biophys. Acta* 144:701-703
- Fulco, A. J. (1972)** The biosynthesis of unsaturated fatty acids by Bacilli: IV. Temperature-mediated control mechanisms. *J. Biol. Chem* 247: 3511-3519.
- Fulco, A.J. (1983)** Fatty acid metabolism in bacteria. *Progr. Lipid Res.* 22: 133-160.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. and Somerville, C. (1994)** Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Physiol.* 106:1615-1621.
- Gonzalez-Pastor, J. E., San Millán, J. L., Ángeles Castilla, M., and Moreno, F. (1995)** Structure and organization of plasmid genes required to produce translation inhibitor Microcin C7. *J. Bacteriol.* 177: 7131-7140.
- Grau, R. and de Mendoza, D. (1993).** Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 8, 535-542.
- Grau, R., D. Gardiol, D., Glikin, G. and de Mendoza, D. (1994)** DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 11: 933-941.
- Graumann, P., Schroder, K., Schmid, R. and Marahiel, M. A. (1996)** Cold-shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 4611-4619.
- Graumann, P. and Marahiel, M. (1996)** Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch. Microbiol.* 166: 293-300,
- Graumann, P., Wndrich, M.H.W., Weber, K, Schroder, K. and Marahiel, M. A. (1997)** A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.* 25:741-756.
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. 1998.** A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends. Biochem. Sci.* 23:286-290.
- Gross, C. A (1996)** Function and regulation of the heat shock proteins, p.206-216. In F. C Neidhart et al. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Grossman, A.D. (1995)** Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 477-508.

- Guerout-Fleury A.M., Shazand K., Frandsen N. and Stragier P. (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene*, 29: 335-336
- Harvey, D. J. (1982) Picolinyl esters as derivatives for the structural determination of long chain branched and unsaturated fatty acids. *Biomed. Mass Spectrometry*, 9: 33- 38.
- Hecker M, and Volker U.(1998) Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. *Mol Microbiol*. 29: 1129-1136.
- Henner, D. J. 1990. Inducible expression of regulatory genes in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol*. 185:223-228.
- Hengge-Aronis, R (1993) Survival of hunger and stress-the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72:165-168.
- Hengge-Aronis, R (2000) The general stress response in *Escherichia coli*. pp 161-178. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Hitz, W. D., Carlson, T. J., Booth, J. R., Jr., Kinney, A. J., Stecca, K. L. and Yadav, N. S. (1994) Cloning of a higher-plant plastid omega-6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacteria. *Plant Physiol*. 105, 635-641
- Hoch, J. A. (1991) Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol*. 204:305-320
- Hoch, J. A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol*. 3, 165-170
- Hoppe, T. Matuschewsky, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, 102: 577-586.
- Huey, R.B. and Bennet, A.F. (1990) Physiological adjustments to fluctuating thermal environments: an ecological and evolutionary perspective. In *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Morimoto, Tissières and Georgopoulos (eds.). Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp. 37-59.
- Hurme, R., Berndt, K. D., Normark, S. J. and Rhen, M. 1997. A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90:55-64.
- Isberg, R.R. (2000) Identification and analysis of proteins expressed by bacterial pathogens in response to host tissues. pp 289-303. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Jiang, W., Jones, P. G. and Inouye, M. (1993). Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, *cspA*. *J. Bacteriol*. 175:5824-5828.

- Jiang, W., Hou, Y and Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* 272:196-202.
- Jones, P. G., Van Bogelen, R.A. and Neihardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperatures in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 2092-2095.
- Jones, P.G. and Inouye, M (1994) The cold-shock response-a hot topic. *Mol. Microbiol.* 11:818-818.
- Kakimoto, T. (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274, 982-985.
- Kaneda T. (1991) Iso- and anteiso- fatty acids in bacteria : biosynthesis, function and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55:288-302
- Klages-Ulrich, A.; de Mendoza, D.; Garwin, J.L. and Cronan, J.E., Jr. (1983) Genetic and biochemical analysis of *Escherichia coli* mutants altered in the regulation of membrane lipid composition by temperature. *J. Bacteriol.* 154: 221-230.
- Klein W.; Weber, M. H.W. and 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.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Levy, S.B. (1998) Multidrug resistance- a sign of the times. *N. Engl. J. Med.* 338: 1376-1378.
- Lizardi, P. Binding and recovery of DNA and RNA using S & S NA 45 DEAE membrane. Application Update, Schleicher & Schuell
- López de Felipe F., C. Magni, D. de Mendoza and, P. López. Citrate utilization gene cluster of the *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*: organization and regulation of expression. 1995. *Mol. Gen. Genet.* 246:590-599
- Los D. A., M. K. Ray and N. Murata. 1997. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 25:1167-1175.
- Los DA and Murata N (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta.*, 1394, 3-15
- Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404: 652-660.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. and R. Randall. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. and Saito, H. (1994)** A two—component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369, 242-245.
- McElhaneey, R. N. (1982)** Effects of membrane lipids on transport and enzymatic activities. *Curr. Top. Membr. Transp.* 17:317-380.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mitta, M., Fang, L. And Inouye, M. (1997)** Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requeriment for the AT-rich UP element for *cspA* transcription, and the downstram box in the coding region for its cold-shock induction. *Mol. Microbiol.* 26:321-335.
- Murata, N. and Wada, H. (1995)** Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimation to cold of cyanobacteria *Biochem. J.* 308:1-8
- Nicholson, W. L. and Setlow, P. (1990)** Sporulation, Germination and Outgrowth. *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Harwood, G. R. and Cutting, S. M. (editors) NYC.
- Nishida, I. and Murata, N. (1996)** Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 541-568.
- Padan, E. and Krulwich, T.A. (2000)** Sodium stress. Pp 117-130. "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Palmer, C.N.A., Axen, E. and Wolf, C. R. (1998)**The repressor protein, Bm3R1, mediates an adaptive response to toxic fatty acids in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 273, 18109-18116.
- Patschkowski, T., Bates, D.M. and Kiley, P.J. (2000)** Mechanisms for sensing and responding to oxygen deprivation. pp 61-79. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Perego, M. (1983)** Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In A.L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick (ed), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp.615-625
- Phadtare, S., Yamanaka, K. And Inouye, M. (2000)** The cold shock response. Pp 33-45. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Powell, B.S. and Kado, C.I. (1990)** Specific binding of VirG to the vir box requires a C-terminal domain and exhibits a minimum concentration threshold. *Mol Microbiol.* 12, 2159-2166.

- Price, C.W. (2000) Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. pp 179-197. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Raivio, T. and Silhavy, T.J. (2000) Sensing and responding to envelope stress. pp 19-32. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Raya, R., J. Bardowski, P. S. Andersen, S. D. Ehrlich, and A. Chopin. 1998. Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis* *trp* operon. J. Bacteriol. 180: 3174-3180.
- Robinson J. R., S. M. Klein, and R. D. Sagers. (1973). Glycine metabolism. Lipoic acid as the prosthetic group in the electron transfer protein P2 from *Peptococcus glycinophilus*. J. Biol. Chem. 248: 5319-5323.
- Sakamoto, T., Wada, H., Nishida, Y., Ohmori, M. and Murata, N. (1994) Identification and conserved domains in the delta 12 desaturases of cyanobacteria. Plant Mol. Biol. 24, 643-650.
- Sakamoto, T. and Bryant, D. A. (1997) Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. Mol. Microbiol. 23: 1281-1292
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning a laboratory manual, 2nd de. Cold Spring Harbor Laboratory, cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
- Schultz, D. J., Cahoon, E. B., Shanklin, J., Craig, R., Cox-Foster, D. L., Mumma, R. O. and Medford, J. I (1996) Expression of Δ^9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of ω^5 anacardic found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8771-8775.
- Sekiguchi, J., N. Takada, and H. Okada. (1975) Genes affecting the productivity of α -amylase in *Bacillus subtilis* Marburg. J. Bacteriol. 121: 688-694
- Shanklin, J., Whittle, E. and Fox, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalitically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. Biochemistry 33: 12787-12794.
- Spizizen, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 1072-1078.
- Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (2000) pp xiii-xv In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.

- Storz, G. and Zheng, M. (2000) Oxidative stress. pp 47-59 In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.
- Stragier, P. And Losick, R. (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.*, 30: 297-341.
- Suzuki I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K. and Murata, N. (2000) The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* 19: 1327-1334.
- Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K. and Murata, N. (1996) Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO Journal* 15, 6416-6425.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G. and Inouye, M. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20:49-57.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J. and Cossins, A.R. (1996) Cold-induced expression of $\Delta 9$ -desaturase in carp by transcriptional and postranslational mechanism. *Science*, 271:815-818.
- Ullrich M., Penaloza-Vazquez A., Bailey A.M. and Bender, C.L. (1995) A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J Bacteriol.* 177: 6160-6169.
- VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5589-5593.
- Viale, A. M., Arakaki, A. K., Soncini, F. C. and Ferreyra, R. G. (1994) Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 527-533.
- Vigh, L., Los, D.A., Horvath, I. and Murata, N. (1993) The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene of *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9090-9094.
- Wada, H., Gombos, Z. And Murata, N. (1990) Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature*, 347:200-203.
- Walker, G.C. (1996) The SOS response of *Escherichia coli*, pp 1400-1416. In F. C Neidhart et al. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Wang, W. and D. H. Bechhofer. 1996. Properties of a *Bacillus subtilis* polynucleotide phosphorylase deletion strain. *J. Bacteriol.* 178:2375-2382.

Willmsky, G., Bang, H., Fischer, G. and Marahiel, M.A. (1992) Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold-shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J. Bacteriol.* 174:6326-6335.

Yamamoto, K., Shibahara, A., Nakayama, T. and Kajimoto, G. (1991) Determination of double-bond positions in methylene-interrupted dienoic fatty acids by GC-MS as their dimethyl disulfide adducts. *Chem. and Phys. of Lipids* 60: 39-50

Yamamoto, K. (1999). The 10th International Conference on Bacillus. Baveno, Italy.

Yamanaka, K., L. Fang and M. Inouye. 1998. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.* 27:247-255.

Yura, T., Kanemori, M and Morita. (2000) The heat shock response: regulation and function. pp 3-18. In "Bacterial Stress Responses" Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds). ASM Press, Washington, D.C.