

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Señalización en bacterias: ¿qué determina la dirección en la transmisión de la señal?

Lic. Juan Andrés Imelio

Orientadores:

Dr. Alejandro Buschiazzo

Dr. Felipe Trajtenberg

Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural

Instituto Pasteur de Montevideo

Programa PEDECIBA Biología - Subárea Biología Celular y Molecular

Universidad de la República

Junio 2017

“El que abandona no tiene premio.”

Patricio Rey

Ninguno de nosotros es tan importante como todos nosotros juntos.

Quiero agradecer de todo corazón a quienes, sin su apoyo y participación, esto jamás hubiese sido posible.

A mi familia, a Flo, a la Banda del Paño y los Vendedores de Humo por la hermandad.

A todo el Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural, a mis orientadores Alejandro, Felipe y Sofía por sus enseñanzas a lo largo de estos años, a los Laboratorios de Inmunovirología, de Investigación en Leucemia Linfocítica Crónica, y de Genómica Funcional por cederme incondicionalmente el espacio de trabajo cuando lo necesité.

A todo el personal del Instituto Pasteur de Montevideo que contribuyó a la realización de esta Tesis mediante la facilitación de materiales, equipamiento, servicios y trámites administrativos.

A los miembros del tribunal, por su tiempo y dedicación.

A PEDECIBA Biología y a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la financiación de este trabajo.

A toda la gente amiga de mi segunda casa, la Facultad de Ciencias.

Somos un equipo y esto es un triunfo de todos, por todos y para todos. Eternas gracias.

Este trabajo fue presentado en los siguientes congresos y jornadas:

- XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias (póster), Piriápolis, Uruguay. Setiembre 2014.
- Primer Encuentro de la Red Uruguaya de Cristalografía (póster), Montevideo, Uruguay. Diciembre 2014.
- IX Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Uruguay (exposición oral), Montevideo, Uruguay. Octubre 2015.
- Segundo Encuentro de la Red Uruguaya de Cristalografía (exposición oral y póster), Montevideo, Uruguay. Agosto 2016. Premio a mejor presentación oral.
- LII Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (exposición oral), Córdoba, Argentina. Noviembre 2016.

Además, contribuyó a las siguientes publicaciones en revistas arbitradas:

- Trajtenberg F, Imelio JA, Machado MR, Larrieux N, Marti M, Obal G, Mechaly AE, Buschiazzo A (2016). Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase:regulator complex in action. *eLife* 5:e21422. doi:10.7554/eLife.21422.
- Imelio JA, Mechaly AE, Larrieux N, Trajtenberg F, Buschiazzo A (2017). Snapshots of a kinase:regulator complex in different functional states, by using rational mutagenesis and X ray crystallography. *Bioprotocols*, en revisión.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
1. Señalización celular en procariontes: los sistemas de dos componentes.....	8
2. Arquitectura de los sistemas de dos componentes	9
2.1. Sistemas de dos componentes clásicos: histidín-quinasa y regulador de respuesta.....	10
2.1.1. Histidín-quinasas	10
2.1.2. Reguladores de respuesta.....	13
2.2. Fosforrelevo: presencia de dominios adicionales.....	15
2.3. Estructuras de complejos HK:RR clásicos y HPt:RR de fosforrelevo	17
3. Importancia de los sistemas de dos componentes en ciencia aplicada.....	18
4. Evolución de los sistemas de dos componentes	20
5. ¿Cómo se regula la conexión entre “estímulo sentido” y “respuesta adaptativa” en sistemas de dos componentes?	21
5.1. Especificidad	21
5.2. Eficiencia y direccionalidad.....	23
6. El sistema DesK-DesR de <i>Bacillus subtilis</i>	24
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
1. Diseño racional de mutantes para estabilizar a DesKC en sus estados fosfatasa y fosfotransferasa* ...	27
2. Diseño racional de mutantes de DesR _{REC} para evaluar fosfotransferencia <i>in vitro</i>	29
3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	31
4. Ensayos de cristalización de los complejos DesKC _{STAB} :DesR _{REC} y DesKC _{H188E} :DesR _{REC}	32
4.1. El complejo DesKC _{STAB} :DesR _{REC}	32
4.2. El complejo DesKC _{H188E} :DesR _{REC}	33
5. Difracción de rayos X, solución de estructuras cristalográficas, refinamiento y análisis	33

6. Ensayos de autodesfosforilación de DesR y de actividades retrofosfotransferasa, fosfotransferasa y fosfatasa del complejo DesKC:DesR <i>in vitro</i>	34
RESULTADOS.....	35
1. Obtención de cristales de los complejos y procesamiento de datos.....	35
2. Estructura del complejo DesKC:DesR en la reacción de desfosforilación	42
3. Estructura del complejo DesKC:DesR en la reacción de fosfotransferencia	44
4. Estructura de DesR _{REC} en ambos complejos	47
5. Análisis del sitio activo de los complejos: búsqueda de mecanismos involucrados en la regulación de la unidireccionalidad.....	49
6. Actividades de fosfotransferencia directa, reversa y autodesfosforilación <i>in vitro</i> de DesKC:DesR	53
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	61
BIBLIOGRAFÍA	67
ABREVIATURAS.....	79

RESUMEN

Los sistemas de dos componentes (SDCs) son importantes vías de señalización en procariontes, confiriéndoles la capacidad de percibir el ambiente. Se encuentran canónicamente constituidos por una histidin-quinasa (HK, por su nombre en inglés “*histidine-kinase*”) sensora de transmembrana, y un regulador de respuesta (RR) citoplasmático. En las vías de señalización mediadas por SDCs canónicos o clásicos, típicamente un estímulo ambiental o intracelular determinado es sentido por una HK específica, lo cual prende o apaga su capacidad catalítica de autofosforilación en una histidina (His) conservada, por transferencia del fosfato y de una molécula de ATP. La HK así fosforilada (P~HK) luego transfiere el grupo fosforilo a un aspartato (Asp) conservado, presente en un RR que actúa de socio específico. El P~RR puede actuar como un factor de transcripción, estimulando la expresión de genes que codifican por proteínas ejecutoras de respuestas adaptativas para el estímulo inicial. Hay otros RRs que presentan dominios enzimáticos ejecutores, o bien ejercen su acción una vez fosforilados uniéndose a otras proteínas y modificando sus funciones. En ausencia de señal, la mayoría de las HKs mantienen a su RR específico en estado desfosforilado, actuando como una fosfatasa específica. Las vías de SDCs clásicas son altamente específicas (los pares HK:RR no se entrecruzan) y eficientes, pues el fosfato sigue una ruta irreversible – unidireccional– de transferencia, desde la His de la HK al Asp del RR, sin reacciones reversas o ciclos fútiles de transferencia y desfosforilación. Sin embargo, existen otros SDCs más complejos denominados fosforrelevo (“*phosphorelays*”) que presentan en sus vías proteínas adicionales, con dominios de enlace (“*shuttle*”) homólogos a los canónicos, y que permiten que el flujo de fosfato sea bidireccional, esto es, también de Asp a His. Los mecanismos por los cuales los SDCs clásicos evitan dicha retrofosforilación, hasta ahora no han sido dilucidados. Mediante el uso de cristalografía de rayos X y ensayos bioquímicos *in vitro*, este trabajo contribuye a revelar los mecanismos moleculares del control del flujo unidireccional y eficiente de la información en SDCs clásicos. Trabajando sobre el SDC modelo DesK-DesR de *Bacillus subtilis*, que funciona como termosensor asegurando la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática, hemos resuelto las estructuras cristalográficas del complejo DesK:DesR, atrapando los pasos de desfosforilación (HK en estado fosfatasa) y de fosfotransferencia (HK como fosfotransferasa). Los complejos muestran que es DesK quien dicta la catálisis mediante arreglos conformacionales que exponen u ocultan la His fosforilable. DesK reconoce en ambos estados un mismo arreglo conformacional de DesR, próximo a su estado activo fosforilado. Las nuevas estructuras reportadas nos llevan a proponer que la distancia entre la His_{HK} y el Asp_{RR}, así como la posición del magnesio catalítico, son determinantes para controlar la (uni/bi)direccionalidad de la reacción. Pudimos identificar varios residuos de la interfaz HK:RR, que parecen contribuir a la regulación del correcto flujo de información en SDCs. Estos residuos fueron sustituidos por alanina haciendo mutagénesis sitio-dirigida, y las hipótesis fueron esencialmente confirmadas monitoreando las diferentes actividades enzimáticas. Los datos estructurales y bioquímicos aquí presentados contribuyen a entender cómo se asegura la unidireccionalidad de la señalización por SDCs en bacterias, conectando en forma precisa y eficiente los estímulos sentidos con sus respuestas adaptativas.

INTRODUCCIÓN

1. Señalización celular en procariontes: los sistemas de dos componentes

Los procariontes -Dominios *Bacteria* y *Archaea*- pueden definirse como aquellos microorganismos unicelulares con transcripción y traducción proteica acopladas tanto espacial como temporalmente, debido a la ausencia de un núcleo que compartimentalice su genoma (Martin & Koonin, 2006). Desde los orígenes de la vida celular, las capacidades fisiológicas de estos organismos, simples pero eficientes, les han permitido colonizar cada nicho ecológico del planeta. Su gran versatilidad es consecuencia de su habilidad de responder a fluctuaciones ambientales e intracelulares, gracias a la presencia de sistemas de señalización proteicos relativamente sencillos: redes moleculares interconectadas capaces de monitorear y responder al ambiente, dirigir su motilidad, y programar su desarrollo (Harshey *et al.*, 2003). De esta manera, la señalización celular procarionte aparece como la primera manifestación de “inteligencia” en los seres vivos, y es la base evolutiva de sistemas eucariotas de señalización, más complejos, pero con estrategias similares a las de sus predecesores: presencia de canales iónicos, receptores intracelulares y de membrana, cascadas de quinasas amplificadoras, factores de transcripción génica, etc. (Marijuán *et al.*, 2010).

Los sistemas moleculares involucrados en señalización bacteriana, entre los cuales se incluyen los sistemas de dos componentes (SDCs), regulan procesos biológicos esenciales: división celular, esporulación, formación de “*biofilms*”, patogénesis, virulencia, quimiotaxis, entre otros (Stock *et al.*, 1990; Marijuán *et al.*, 2010). En este contexto, los SDCs son vías de señalización que se basan en la transmisión de una señal determinada, extra o intracelular, a una respuesta fisiológica (en general homeostática), utilizando un grupo fosforilo que se va transfiriendo en cascada, modificando la estructura y función de las proteínas constituyentes de la vía. En el caso de señales extracelulares que ingresan a la célula, se habla estrictamente de transducción. El término “SDC” fue descrito por primera vez por Nixon *et al.* (1986) como “sistemas regulatorios de dos componentes que evolucionaron de un sistema ancestral común, que involucraba transducción de información sobre el estado del ambiente desde un primer dominio proteico hacia un segundo”, en el contexto del estudio de las proteínas NtrB y NtrC de *Bradyrhizobium* sp. Ese mismo año, Ninfa & Magasanik demostraron que NtrB es una quinasa/fosfatasa que fosforila a NtrC cuando el amonio del ambiente es limitante, y lo desfosforila cuando los niveles de amonio aumentan. En tiempos en donde la transducción de señales vía fosforilación de proteínas se creía prácticamente exclusivo de sistemas eucariotas, estos estudios contribuyeron a entender que, de hecho, este tipo de modificación postraduccional también ocurre de forma expandida en bacterias, posibilitando la apertura de nuevos campos de investigación en la bioquímica fundamental y aplicada.

Los SDCs están presentes en casi todas las bacterias, excepto algunas patógenas (*e.g.*, *Mycoplasma* spp.) y endosimbiontes (*e.g.*, *Amoebophilus* spp.) con genomas reducidos. Además, están representados en

el 50% de los genomas del Dominio *Archaea*, y en menos del 30% de genomas del Dominio *Eukarya* entre los cuales se incluyen algunas especies de hongos y, predominantemente, en plantas (Wuichet *et al.*, 2010). Finalmente, se encuentran completamente ausentes en protistas y metazoos (Wolanin *et al.*, 2002). De esta manera, los SDCs poseen un papel fundamental en la regulación de un sinnúmero de actividades fundamentales para la supervivencia de las bacterias, e incluso, de algunos organismos multicelulares.

2. Arquitectura de los sistemas de dos componentes

Existen varios tipos de SDCs, basándose en la disposición modular de sus dominios proteicos. A continuación se resumirán en dos grandes tipos: SDCs clásicos y fosforrelevo (Figura 1).

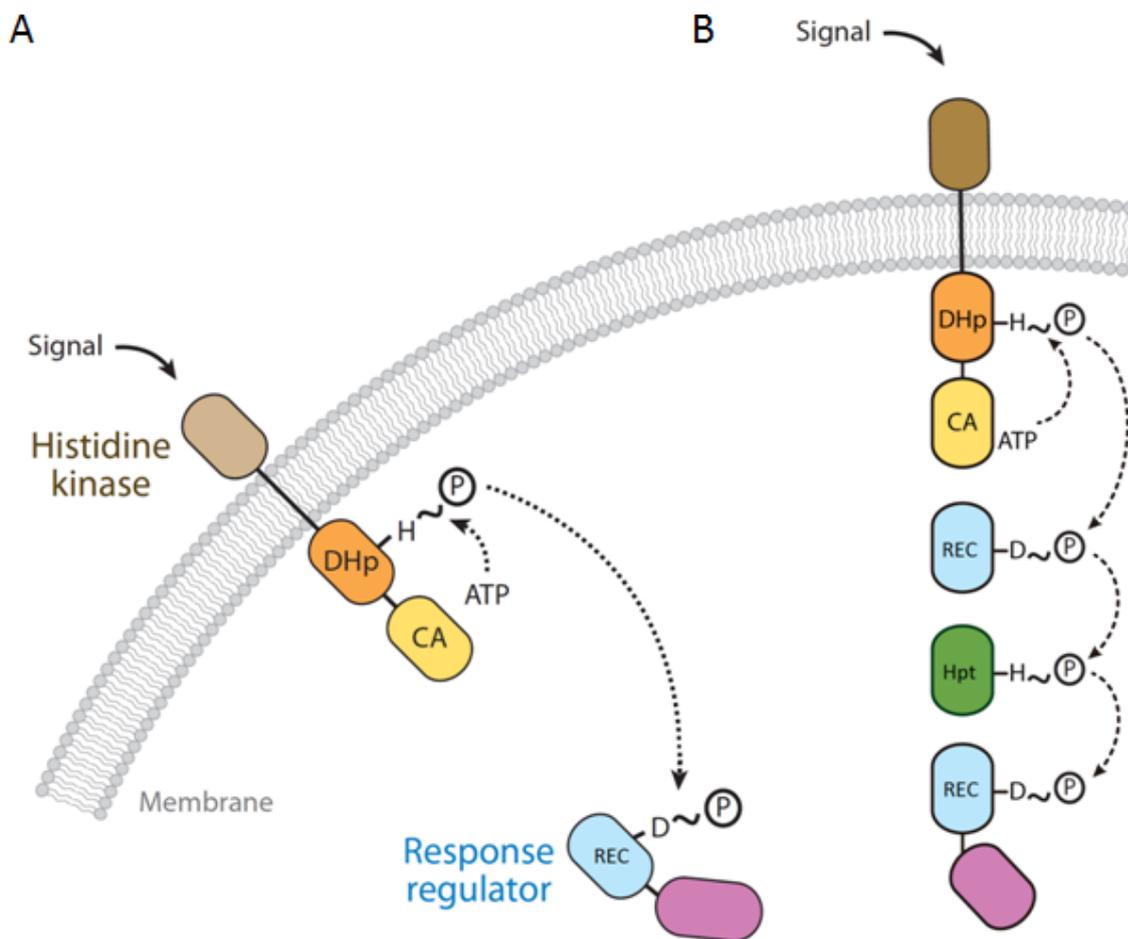


Figura 1. Esquema de un sistema de dos componentes clásico (A) y un fosforrelevo (B). Los primeros se constituyen de una histidín-quinasa y un regulador de respuesta, mientras que los segundos incluyen otros dominios proteicos que agregan pasos adicionales de fosfotransferencia. En general ocurre que la activación por autofosforilación de la histidín-quinasa está regulada por una señal determinada, y el fosfato es luego transferido a un regulador de respuesta directamente (A), o bien, a través de dominios proteicos intermedios (B). Éstos últimos se encargan de regular la expresión de genes que responderán adaptativamente al estímulo inicial. La arquitectura de ambos sistemas se explica con detalle en el punto 2 de la Introducción. Adaptado de Capra & Laub, 2012.

2.1. Sistemas de dos componentes clásicos: histidín-quinasa y regulador de respuesta

2.1.1. Histidín-quinasas

El primer componente de un SDC clásico es una histidín-quinasa (HK, por sus siglas del inglés “*histidine-kinase*”). Las HKs son proteínas homodiméricas, usualmente integrales de membrana (Galperin, 2005), con una región sensora variable hacia el extremo N-terminal, un dominio transmembrana, y una región conservada intracelular C-terminal con actividad catalítica. Ésta última se compone a su vez de un dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp, por “*Dimerization and Histidine phosphotransfer*”), y un dominio catalítico y de unión a ATP (CA) (Figura 2). Así, regulado por el sensado de una señal específica, el dominio CA cargado con adenosina-trifosfato (ATP) se acerca a un residuo de histidina (His) conservado en el dominio DHp, y un grupo fosforilo es transferido desde la posición γ del ATP al Ne de la cadena lateral de la His (Gao & Stock, 2009). Hasta la fecha sólo se ha resuelto una única estructura tridimensional de una HK de transmembrana, correspondiente al sensor de nitrato NarQ de *Escherichia coli* (Gushchin *et al.*, 2017). Si bien no es la proteína entera, pues le falta el dominio HK intracelular propiamente dicho, estas estructuras con y sin ligando incluyen el dominio sensor extracelular, el segmento de transmembrana y el primer dominio intracitoplasmático HAMP. Asimismo, en la última década se ha avanzado sustancialmente en la caracterización de dominios de HKs correspondientes a regiones funcionales separadas (Bhate *et al.*, 2015).

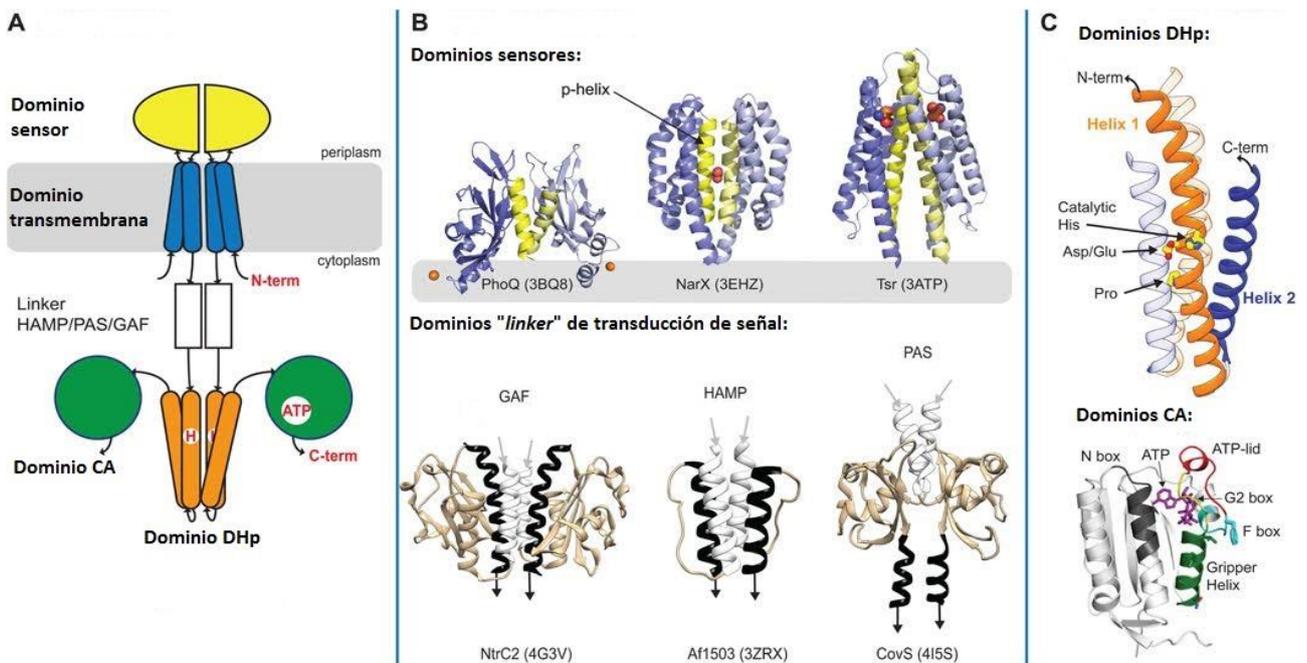


Figura 2. (A) Arquitectura de una histidín-quinasa clásica. (B) Dominios variables de las HKs. Se muestran ejemplos de estructuras cristalógraficas conocidas de dominios aislados. Las flechas en los dominios *linker* indican la dirección hacia la que se transmite la señal. (C) Dominios conservados de las HKs. Para más detalles remitirse al punto 2.1.1 de la Introducción. Adaptado de Bhate *et al.*, 2015.

En general, el dominio sensor se encuentra formado por un dominio periplásmico (en bacterias Gram-) o extracelular (en Gram+), ubicado entre dos segmentos transmembrana, y existen tres tipos principales según su plegamiento: del tipo α/β como el caso de los sensores PDC (de las HKs PhoQ, DcuS y CitA); sensores constituidos sólo por haces de hélices α (por ejemplo, presentes en NarX y TorS); y sensores con plegado similar a proteínas de unión periplásmicas. Adicionalmente, existen HKs con dominios sensores embebidos en la membrana plasmática o citoplásmicos (Cheung & Hendrickson, 2010). Los mecanismos por los cuales los dominios sensores de las HKs responden a estímulos determinados son muy diversos; sin embargo, en general ocurre que la señal es transducida a través de una hélice α periplásmica que conecta el sensor con el dominio transmembrana, y éste a su vez con un dominio intracelular transmisor de la señal (un conector capaz de modular la transmisión río abajo), que puede ser de varias topologías. Dos tipos de dominios transmisores comúnmente encontrados en HKs son, por un lado, los dominios HAMP (encontrado en HKs, adenilatociclasas, proteínas quimiotácticasceptoras de metilo, y en fosfatasa *-phosphatases* en inglés-), que consisten en el empaquetamiento de cuatro hélices paralelas α anfipáticas (Hulko *et al.*, 2006). Por otro lado, los dominios PAS (descubierto en las proteínas Per -“*period circadian protein*”-, Arnt -“*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein*”- y Sim -“*single-minded protein*”-) se componen de una lámina β anti-paralela de cinco hebras, rodeada por tres o más hélices α . Estos dominios PAS también se encuentran jugando el rol de sensor intracelular en algunas HKs (Yamada *et al.*, 2009; Cheung & Hendrickson, 2010). En muchas HKs no hay ningún dominio de transmisión, demostrando que no son esenciales para la señalización en general. Hacia el extremo N-terminal del dominio DHp, las HKs presentan un motivo de tipo “*coiled-coil*” (Singh *et al.*, 1998). Este tipo de superenrollamiento se caracteriza por un patrón repetitivo de motivos de siete residuos o héptadas, cuyas posiciones se denotan con letras de “*a*” hasta “*g*”, y en las cuales los residuos hidrofóbicos ocupan las posiciones “*a*” y “*d*” (Crick, 1953). Este motivo *coiled-coil* juega un papel clave en la transmisión de la señal (Albanesi *et al.*, 2009).

En cualquier caso, la mecánica de los dominios mencionados anteriormente determina el estado funcional de la quinasa: modificaciones conformacionales de esas regiones en presencia o ausencia de un estímulo sentido, se transmiten alostéricamente hacia el extremo citoplásmico de la HK, en donde los dominios CA y DHp ejercerán la actividad catalítica correspondiente. A modo de interruptor, dichos rearrreglos conformacionales definen si la vía se encuentra “apagada” o “encendida”, en función de la presencia del estímulo específico. El dominio DHp es el sitio en donde se producen las tres reacciones catalíticas, según el estado conformacional/funcional: autofosforilación de la His, fosfotransferencia hacia el RR, y en HKs bifuncionales, actividad fosfatasa sobre el P~RR (Bhate *et al.*, 2015). Este dominio DHp consta de cuatro hélices -dos por cada monómero- formando un haz antiparalelo, con las dos hélices de cada monómero conectadas por un bucle. Se ha propuesto que el sentido de giro y el tamaño de dicho bucle es importante para determinar si la HK se autofosforilará en *cis* (*i.e.*, el dominio CA fosforila al DHp del mismo monómero, en una fosforilación intramolecular); o en *trans* (en este caso la fosforilación es

intermolecular, desde el dominio CA de un monómero al DHp del otro) (Ashenberg *et al.*, 2013; Casino *et al.*, 2014). Los residuos del DHp alrededor de la His están conservados y permiten clasificar las HKs en cinco familias (Figura 3). El motivo HDxxxQ que se observa en HKs del grupo II de dicha clasificación, es característico de la familia PFAM (Finn *et al.*, 2016) HisKA_3, mientras que el motivo HE/DxxT/N de los grupos IIIA y IIIB corresponde a HKs de la familia HisKA. Estos motivos incluyen residuos importantes para la actividad fosfatasa de las HKs (Huynh *et al.*, 2010), como veremos más adelante.

<u>Group I</u>		<u>Group IIIA</u>
LytS LQAQVNPHELFNAINTI		YxdK YMNQWVHQVKTPLS
YesM LQAQINPHFLYNTLESI		YvcQ FTNQWVHHMKTPVS
YwpD LQSQIKPHFLYNVLTNTI		YtsB ELMAWIHEVKTPLT
		PhoR FVANVSHELKTPIT
<u>Group II</u>		ResE FIANVSHELRTPIIS
YvfT R..IARDLHDTLGHTLS		YycG FVANVSHELRTPLT
YocF R..IARDLHDTLGQKLS		YclK FIADVSHLKTPLT
YxjM R..IARDIHDSIGHELT		YkoH FVQDASHELKTPLT
YfiJ R..MAREIHDTVGHKMT		YvrG WIAGLSHDLKTPLS
YhcY R..LAQELHDSVNVQMLF		YcbM MLTNMSHDLKTPLT
YvqE R..LARDLHDAVSQQLF		YvqB LLQNISHDLKTPVM
DegS R..VSREIHDPAQMLA		YbdK LLQKLRHDINTPLT
ComP RSGGLARDLHDSVLQDLI		YrkQ LVTEMSHDMRTPLT
YdfH R..MARDLHDTLAQGLV		YccG DVRSRNHDTMKHIT
		<u>Group IIIB</u>
<u>Group IV</u>		KinA LAAGIAHEIRNPLT
YflR DLRAQTHEFSNKLYAI		KinC LAAGIAHEVRNPLT
YufL ALRAQSHEFMNKLHVI		YkrQ LAAGIAHEIRNFMT
YdbF ALRVQNHHEMKNLHTI		YkvD LAASTAHEIRNPLT
YobA LYEETVHLKKTTLKTTE		KinB LAASVAHEVRNPLT

Figura 3. Familias de HKs descrita por Fabret *et al.* (1999), según el motivo conservado de residuos que rodean la His fosforilable (resaltada en gris). Fuente: Fabret *et al.*, (1999).

El dominio CA presenta un plegamiento del tipo α/β , y es capaz de unir ATP y transferir el grupo fosforilo al dominio DHp en *cis* o *trans*, dependiendo del tipo de HK. Al igual que el DHp, el CA presenta secuencias conservadas denominadas cajas “N”, “G1” (también denominada “D”), “F” y “G2” (ver Figura 2C), correspondientes a residuos clave en estos sitios. Entre las regiones F y G2 se encuentra un bucle flexible llamado “ATP-*lid*” que adopta distintas conformaciones según el nucleótido se encuentre unido o no a la cavidad de unión a ATP, definida por residuos conservados en las cajas N, G1, F y G2 (Gao & Stock, 2009). Generalmente, en la reacción de autofosforilación, la HK es hemifosforilada: esto es, sólo se autofosforila en uno de los dos monómeros (Jiang *et al.*, 2000), dando lugar a una asimetría en el dímero (Albanesi *et al.*, 2009). En conjunto con una fenilalanina conservada de la caja F, existe una hélice α denominada “*gripper*” que interactúa con el dominio DHp de diferentes maneras, según el estado funcional de la HK (Albanesi *et al.*, 2009; Bhate *et al.*, 2015).

2.1.2. Reguladores de respuesta

La modulación de las actividades autoquinasa, fosfotransferasa y fosfatasa de la HK establece la activación o no de la vía, mediante la determinación de las concentraciones de las especies fosforilada y desfosforilada del regulador de respuesta (RR), el segundo componente de la vía. Los RRs presentan, por un lado, un dominio **recibidor** (REC) N-terminal, que acepta el grupo fosforilo en su aspartato (Asp) conservado; mientras que hacia el extremo C-terminal puede presentar o no un dominio efector variable, que ejecuta la función de respuesta (Bourret, 2010; Galperin, 2010). Los dominios REC adoptan una topología $(\beta\alpha)_5$, en donde 3 hélices α de un lado y 2 de otro, rodean a una lámina β central de cinco hebras paralelas (Figura 4). El sitio activo del REC se constituye con residuos ubicados en los bucles $\beta 1\alpha 1$, $\beta 3\alpha 3$, $\beta 4\alpha 4$ y $\beta 5\alpha 5$ y consta de un quinteto de residuos altamente conservados: tres Asp (incluyendo el fosforilable), una lisina y una treonina/serina. Los cinco residuos forman un “cluster” de grupos carboxilo, para unir el catión magnesio (Mg^{2+}) esencial para las fosfotransferencias, y que coordina al grupo fosfato cuando éste está unido covalentemente al Asp (Appleby & Bourret, 1998; Bourret, 2010). La geometría del sitio de fosforilación de los RRs, también puede admitir otros cationes bivalentes como calcio, zinc o manganeso, e incluso iones trivalentes (Kar *et al.*, 1992; Needham *et al.*, 1993). Esta geometría del centro catalítico se encuentra conservada en otras familias de proteínas que utilizan Asp como intermediario fosforilable, como la superfamilia de las fosfatasas HAD (por las siglas en inglés “*haloacid dehydrogenases*”), en bombas ATP-*asas* de calcio presentes en el retículo sarcoplásmico de células musculares eucariotas, y en β -fosfoglucomutasas, entre otras. A pesar de presentar grandes diferencias a nivel de secuencia, muestran conservación a nivel de plegamiento, lo cual es importante para definir una misma geometría del sitio catalítico (Figura 5) (Wang *et al.*, 2002; Lahiri *et al.*, 2003; Allen & Dunaway-Mariano, 2004).

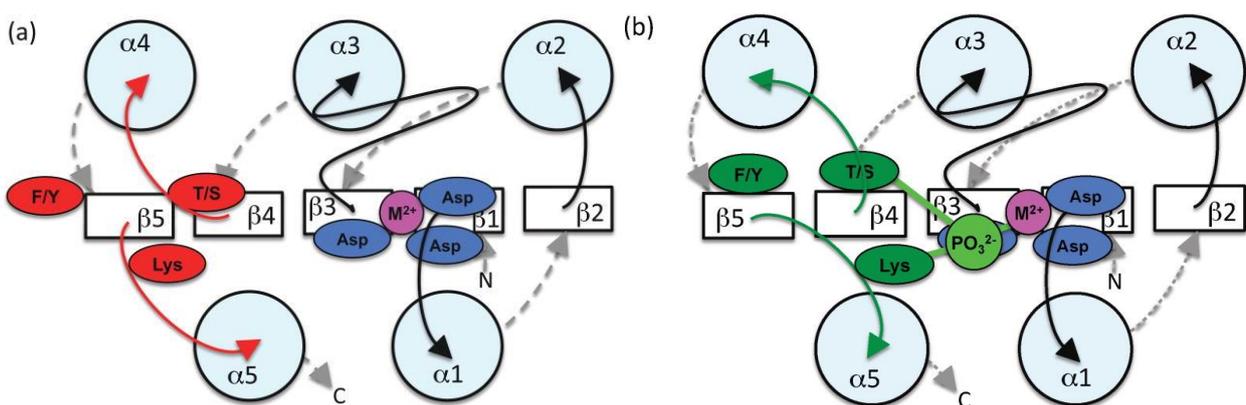


Figura 4. Arquitectura del dominio recibidor (REC) de un regulador de respuesta clásico en su conformación inactiva **(A)** y activa **(B)**. Las flechas indican la conexión física entre los distintos componentes de la estructura secundaria. Fuente: Bourret *et al.*, 2010.

expresión de genes que responderán adaptativamente ante el estímulo inicial (Fabret *et al.*, 1999; Groisman, 2016). Algunos RR efectúan sus funciones regulatorias estableciendo interacciones directas con proteínas (Hengge, 2008), ARN (Shu & Zhulin, 2002) o regulando otros dominios adicionales al REC con actividad enzimática (Gao & Stock, 2009). Excepcionalmente, algunos RR no dependen de ser fosforilados para su activación: en estos casos, la regulación funcional del RR se lleva a cabo de distintas maneras, como por ejemplo el secuestro del RR por otras proteínas que impiden su dimerización, o por competencia directa con las regiones de unión al ADN (Desai & Kenney, 2017), indicando que la evolución ha desarrollado diversas estrategias para regular funcionalmente este tipo de vías.

La activación de los RR mediante fosforilación puede explicarse por el modelo de desplazamiento de equilibrio: los dominios REC desfosforilados se presentan en un equilibrio dinámico entre conformaciones inactivas y activas, siendo las primeras la mayoritaria (Volkman *et al.*, 2001). En presencia de la señal activadora de la vía, se desplaza este equilibrio favoreciendo la conformación activa, para dar lugar a la regulación de la respuesta adaptativa. Estudios previos sugieren que pueden encontrarse conformaciones adicionales intermedias, “pre-activas” o “meta-activas”, de los RR (Dyer & Dahlquist, 2006; Fernández *et al.*, 2015), por lo que se han propuesto modelos adicionales, no mutuamente excluyentes, de activación alostérica de los RR (Dyer & Dahlquist, 2006; McDonald *et al.*, 2012).

En ausencia de la señal, la HK generalmente actúa como una fosfatasa específica de su RR, asegurando que la vía permanezca apagada (Albanesi *et al.*, 2004; Huynh & Stewart, 2011; Gao & Stock, 2017). Esto es particularmente importante considerando las altas concentraciones intracelulares de acetilfosfato, y la posibilidad de fosforilaciones provenientes de HKs inespecíficas. De esta manera, es la proporción $P \sim RR/RR$ la que determina el estado activo o inactivo de la vía. Incluso, algunos SDCs presentan mecanismos autoregulatorios de retroalimentación, que pueden alterar la cantidad de RR y/o modificar la habilidad de la HK (Georgellis *et al.*, 1999; Birck *et al.*, 2009) u otras proteínas (Groisman, 2016) de alterar el estado de fosforilación/defosforilación del RR, dando lugar a una respuesta fisiológica adecuada.

2.2. Fosforrelevo: presencia de dominios adicionales

Algunas vías de SDCs incluyen entre la HK sensora y el RR efector una serie de proteínas intermediarias de tipo REC y HPT (de “*Histidine-containing Phosphotransmitter*”; Bretl *et al.*, 2011), homólogas a los RR y las HKs respectivamente, que pueden estar fusionados o no en un sólo polipéptido integral de membrana. En este caso, la transferencia del grupo fosforilo se da a través de una serie de pasos entre distintos dominios proteicos, en lugar de dos dominios como ocurre en los SDCs clásicos (ver Figura 1); es por esto que a estas vías se les denomina “relevo de fosfato” (de “*phosphorelays*”), o fosforrelevo. Cuando el dominio citoplasmático de la HK se encuentra fusionado a éstos dominios adicionales, e incluso a los dominios correspondientes al RR, se habla de HKs “híbridas” (Wuichet *et al.*, 2010).

Existe una gran diversidad de arquitecturas de fosforrelevo (Appleby *et al.*, 1996). Por ejemplo, en

hongos las HKs son típicamente híbridas y se componen de un dominio integral de membrana, un dominio sensor extracelular, los dominios CA y DHp, y un dominio C-terminal denominado “recibidor”, similar en estructura a los dominios REC de los RRs, pero sin capacidad efectora. Éstos se encargan de recibir el grupo fosforilo en su Asp conservado para luego donarlo a la His de un dominio tipo HPt. Es importante destacar que esto implica que, en fosforrelevos, la fosfotransferencia de Asp a His ocurre y es biológicamente relevante. Finalmente, el grupo fosforilo es transferido a un RR con función efectora (Defosse *et al.*, 2015). Tal es el caso del sistema de osmorregulación SLN1-YPD1-SSK1 presente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Janiak-Spens *et al.*, 2005). El dominio HPt puede ser soluble, como en el ejemplo anteriormente mencionado, o puede estar fusionado a la HK como es el caso del sistema ArcB-ArcA de *Escherichia coli* (Lassak *et al.*, 2013) o BvgS-BvgA de *Bordetella pertusis* (Uhl & Miller, 1996). Existen otros casos, como el del sistema Kin-Spo0F-Spo0B-Spo0A de esporulación de *B. subtilis*, en los que tanto el dominio REC intermediario (Spo0F) como el HPt (Spo0B) son solubles y capaces de libre difusión (Grimshaw *et al.*, 1998; Zapf *et al.*, 1998).

La presencia de estos dominios adicionales agrega múltiples puntos de control sobre la vía, por lo que se encuentran sujetos a una regulación más estricta; es por esto que en general los fosforrelevos están involucrados en la regulación de funciones esenciales como esporulación (Grimshaw *et al.*, 1998), respuesta a niveles de oxígeno en el ambiente (Lassak *et al.*, 2013) o control del estrés osmótico (Janiak-Spens *et al.*, 2005), entre otras. En este contexto, los distintos dominios de la vía de fosforrelevo pueden ser tanto activados por más de una quinasa (Jiang *et al.*, 2000), como también inactivados por defosforilación de los dominios intermediarios mediante fosfatasas auxiliares (Silversmith, 2010; Parashar *et al.*, 2011). Además, a diferencia de lo que ocurre en los SDCs clásicos, en los fosforrelevos el P~RR con función efectora no es directamente defosforilado por la HK río arriba de su vía, sino que esta actividad suele ser llevada a cabo por fosfatasas auxiliares, o bien, revirtiendo la dirección de la transmisión del grupo fosforilo del RR efector hacia el HPt, y finalmente hacia el REC intermediario, siendo éste el sustrato de sus HK específicas o de fosfatasas auxiliares para su defosforilación (Georgellis *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2000; Parashar *et al.*, 2011; Huynh & Stewart, 2011). Como se mencionó anteriormente, al estar activados estos sistemas, el fosforilo migra entre residuos conservados de cada dominio siguiendo un orden His→Asp→His→Asp; esto introduce una diferencia importante de lo que se observa en sistemas clásicos: en lugar de catalizar fosfotransferencias únicamente “de His a Asp”, los módulos intermedios son capaces de catalizar transferencias de fosforilo “de Asp a His”, también. Ésto último es minimizado en SDCs clásicos, de modo de asegurar un flujo eficiente de la información.

Otros tipos de SDCs menos comunes, no necesariamente partes integrales de sistemas de fosforrelevo, incluyen aquellos donde un RR es activado por más de una HK, lo cual permite al regulador efectuar una respuesta convergente, procedente de señales captadas por diversos sensores (Jiang *et al.*, 2000; Botella *et al.*, 2014). En otros casos, una HK sensora puede donar su fosforilo a múltiples RRs, ejerciendo el control simultáneo de la expresión de genes correspondientes a rutas bioquímicas

fisiológicamente relacionadas (Mika & Hengge, 2005).

2.3. Estructuras de complejos HK:RR clásicos y HPt:RR de fosforrelevos

En los últimos años se ha avanzado en la dilucidación de estructuras cristalográficas de complejos HK:RR correspondientes a SDCs clásicos, y también complejos entre dominios HPt y dominios REC pertenecientes a fosforrelevos, homólogos a los clásicos (de aquí en adelante se los denominará “complejos HPt:RR”). En este contexto, la cristalografía de rayos X ha permitido obtener “fotografías” de dichos complejos en determinados estados funcionales o catalíticos, posibilitando el análisis de los mecanismos moleculares implicados en la biología de la conexión estímulo-respuesta. La primera estructura de un complejo HK:RR resuelta por cristalografía de rayos X a alta resolución fue determinada por Casino *et al.* (2009) utilizando el SDC HK853-RR468 de *Thermotoga marítima* (Figura 6). El complejo se resolvió a una resolución de 2,8 Å; esto permitió evaluar no sólo las conformaciones que adoptan los componentes cuando se encuentran en complejo, sino también la interfaz de reconocimiento HK:RR. A su vez, el estudio de dicha interfaz permite dilucidar tanto la contribución de cada componente al ensamblado del sitio activo y el posible mecanismo catalítico subyacente, como la superficie de interacción que permite a la HK reconocer específicamente a su RR. Tomando en cuenta esto, las características estructurales del complejo HK853:RR468 y su comparación con la conformaciones resueltas para RR468 de forma individual, llevaron a postular que se trata de una fotografía de la reacción de desfosforilación, en la que HK853 actúa como fosfatasa sobre P~RR468. También fueron resueltas estructuras de complejos de RRs asociados a fosfatasas auxiliares (Guhaniyogi *et al.*, 2006; Parashar *et al.*, 2011) así como de otro complejo HK:RR a baja resolución (Yamada *et al.*, 2009), indicando la existencia de modos de interacción conservados.

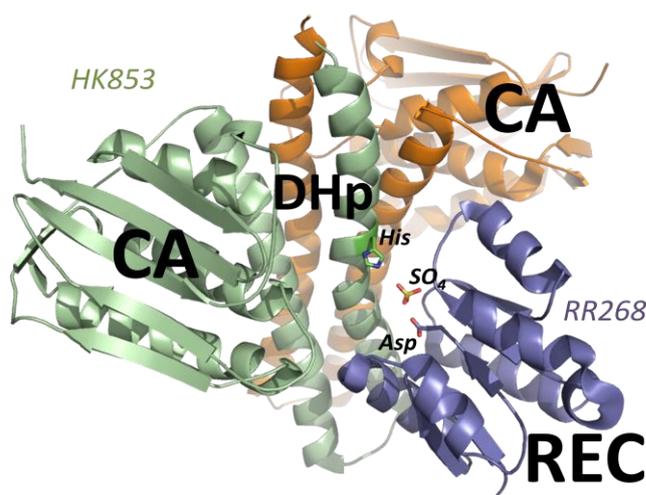


Figura 6. Estructura cristalográfica del complejo HK:RR HK853:RR268 de *Thermotoga marítima* (PDB 3DGE) resuelta por Casino *et al.* (2009). La estructura se resolvió empleando mutantes truncados que constan únicamente de los dominios DHP y CA de HK853, y el dominio REC de RR268. Se observa un sulfato (SO₄) ubicado en el centro catalítico.

Se ha avanzado, también, en la dilucidación estructural de complejos HPT:RR de fosforrelevo como por ejemplo Spo0B:Spo0F de *B. subtilis* (Figura 7) (Zapf et al. 2000; Varughese et al., 2006), y YPD1:SLN1 de *S. cerevisiae* (Zhao et al., 2008). Ambos complejos fueron resueltos a resoluciones de 3 y 1,7 Å, respectivamente, en ausencia y presencia de trifluoruro de berilio (BeF_3^-). Esta molécula actúa como mimético del grupo fosforilo (Wemmer & Kern, 2005), y su utilización permitió capturar a Spo0F y SLN1 en sus estados activos, en sus respectivos complejos. Esto contribuyó a sugerir posibles mecanismos de fosfotransferencia entre estos dominios pertenecientes a fosforrelevo. Además, el análisis de los complejos con y sin BeF_3^- , en comparación con las estructuras de dichos dominios resueltos individualmente, sugirió que existen cambios conformacionales consistentes con modelos de activación alostérica, propuestos previamente para CheY y otros RRs (Dyer & Dahlquist, 2006). En suma, la determinación estructural de complejos pertenecientes a SDCs es un paso fundamental para el entendimiento de cómo estas vías regulan la conexión estímulo-respuesta de manera controlada. En el punto 5 de la Introducción se explicarán con más detalle tres bases de la regulación biológica de la señalización en sistemas de dos componentes: especificidad, eficiencia y direccionalidad.

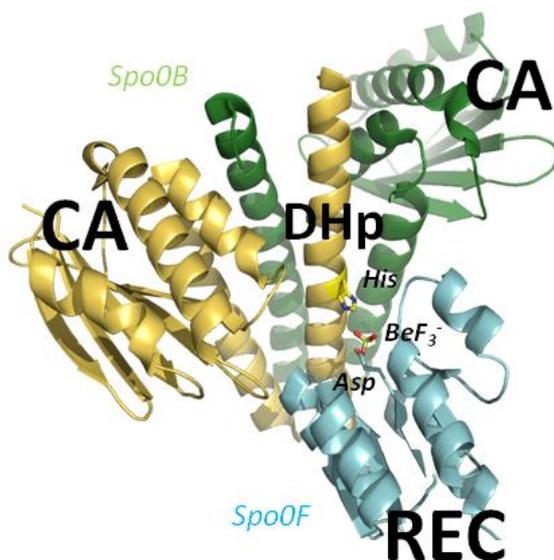


Figura 7. Estructura cristalográfica del complejo HPT:RR Spo0B:Spo0F de *Bacillus subtilis* (PDB 2FTK) resuelta por Varughese et al. (2006). En este organismo, los dominios CA de Spo0B no presentan actividad catalítica. Se observa una molécula de fluoruro de berilio (BeF_3^-) unida al Asp de Spo0F, el cual se emplea en cristalografía como mimético del grupo fosforilo.

3. Importancia de los sistemas de dos componentes en ciencia aplicada

Los SDCs están ausentes en mamíferos, por lo que son interesantes blancos para el diseño racional de drogas. El SDC Walk-WalR, originalmente identificado en *B. subtilis*, es esencial para el crecimiento de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, entre otras, jugando un rol

fundamental en el metabolismo de la pared celular (Dubrac *et al.*, 2007). El compuesto walkmicina B inhibe la autofosforilación de la HK Walk uniéndose con gran afinidad a su dominio citoplasmático (Okada *et al.*, 2010). Por otra parte, se vio que la walricina A estimula la formación de un dímero de WalR con una conformación diferente a la nativa, incapaz de unirse a sus sitios operadores para la expresión de genes esenciales, lo que resulta en la muerte de la bacteria (Gotoh *et al.*, 2010a). En este contexto, existe gran homología entre los dominios CA de las HKs de bacterias Gram+ y Gram-, así como entre los sitios activos de los distintos RRs, sugiriendo que un agente único que tenga como blanco estos sitios podría inhibir múltiples SDCs simultáneamente, y en consecuencia, disminuir la probabilidad de desarrollo de resistencia (Gotoh *et al.*, 2010b; Boibessot *et al.*, 2016).

Otra estrategia para el diseño de antibióticos es identificar agentes que inhiban la virulencia microbiana sin inhibir el crecimiento. Así, éstos presentarán menor presión selectiva para la generación de resistencia (Levy & Marshall, 2004). Tal es el caso de LED209, una molécula capaz de inhibir la unión de ligandos responsables de la activación de la HK QseC, previniendo de esta manera su autofosforilación e impidiendo la activación de genes asociados a virulencia mediados por la vía QseC-QseB (Rasko *et al.*, 2008). Homólogos de QseC se encuentran presentes en *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella typhimurium* y *Francisella tularensis*, entre otra veintena de especies patógenas, por lo que compuestos que tengan como blanco a QseC tienen el potencial de tener un amplio espectro (Rasko *et al.*, 2008; Gotoh *et al.*, 2010b). En *Salmonella*, el SDC PhoQ-PhoP es uno de los reguladores de virulencia más importantes: a partir del sensado de la concentración de Mg²⁺ extracelular, se encarga de controlar la expresión de genes involucrados en supervivencia dentro del macrófago (Miller *et al.*, 1989) y resistencia a péptidos antimicrobianos (Fields *et al.*, 1989). Se ha documentado la inhibición de PhoQ mediante radicicol, que se une al dominio CA impidiendo la activación de su actividad autoquinasa (Guarnieri *et al.*, 2008).

La capacidad de los SDCs para detectar señales específicas las convierte en herramientas ideales en biología sintética. Muchos SDCs no son esenciales para la supervivencia de la bacteria, o bien, regulan un pequeño número de genes (Ninfa, 2010). En este contexto, el diseño racional de redes biológicas sintéticas permite el “recableado” de células para que lleven adelante nuevas funciones biológicas. Por ejemplo, es posible reprogramar el sensor de un SDC para activar la respuesta de quimiotaxis, de modo de inducir el movimiento de una bacteria hacia un estímulo determinado. Luego, la bacteria podrá ser “recableada” para ejecutar una tarea específica una vez que alcance la región de interés, como por ejemplo degradar una sustancia indeseada en el ambiente (Kohanshi & Collins, 2008), de aplicación en biorremediación. La arquitectura modular de los SDCs favorece su uso en biología sintética, gracias a la posibilidad de generar mutantes quiméricos en donde el dominio sensor de una HK se encuentre artificialmente fusionado al dominio citoplasmático de otra HK, creando de este modo una conexión estímulo-respuesta novedosa (Levskaya *et al.*, 2005). En otros casos, se puede modificar un sistema para que sea más sensible ante un estímulo dado, y haciendo que la respuesta fisiológica se vea amplificada, como en el sistema CusR-CusS de *E. coli*, que puede ser modificado artificialmente para presentar un mecanismo autoregulatorio:

introduciendo mediante ingeniería genética a *cusS* en el operón regulado por su producto CusS. CusS es un activador transcripcional que, al activarse, induce la producción de mayor cantidad de sí mismo, amplificando la respuesta a partir de la señal inicial. Este sistema autorregulado de amplificación hace al sistema diez veces más sensible a la detección de concentraciones extracelulares de cobre (Ravikumar *et al.*, 2012).

Es posible cambiar la especificidad de una HK mediante mutagénesis de un número limitado de aminoácidos en los pares HK-RR que han covariado evolutivamente (Skerker *et al.*, 2008). De esta manera, se ha realizado mutagénesis en dichos residuos de la HK EnvZ de *E. coli*, por residuos de otra HK (RstB), y se ha observado *in vitro* que la nueva HK modificada ahora reconoce el RR RstA, y no su RR específico OmpR. Este recableado de la especificidad también se observó *in vivo*, donde se ha reprogramado EnvZ para reconocer al regulador CpxR (Skerker *et al.*, 2008). En suma, es posible utilizar la información acerca de las interacciones que han co-evolucionado para construir racionalmente nuevas vías, no encontradas en la naturaleza.

4. Evolución de los sistemas de dos componentes

Estudios filogenéticos sugieren que los SDCs son de origen bacteriano, adquiridos por los Dominios *Archaea* y *Eukarya* por transferencia lateral génica a partir de bacterias (Koretke *et al.*, 2000), y que comparten un ancestro común con las proteínas Hsp90 de respuesta al “*heat shock*”, MutL de reparación de ADN, y topoisomerasas de tipo II (Dutta *et al.*, 1999). Eventos de duplicación génica y transferencia horizontal de genes proveen la materia prima para producir nuevas proteínas de señalización, y en cualquier caso, la nueva vía debe resultar en una ganancia funcional que confiera una ventaja selectiva al organismo y, así, garantizar su mantenimiento en el genoma (Capra & Laub, 2012). Esto debe ocurrir en un plazo relativamente corto de tiempo, puesto que la pérdida de genes y la formación de pseudogenes ocurre rápidamente en bacterias (Kuo & Ochman, 2010).

Se ha visto que, en general, los eventos de duplicación y divergencia génica de las HKs, restringida a las especies más emparentadas filogenéticamente, está acompañada por rearrreglos en los dominios estructurales (“*domain shuffling*”) de la quinasa, especialmente en el dominio sensor N-terminal, dando lugar a innovaciones en la capacidad de captar estímulos (Alm *et al.*, 2006). Sin embargo, para que exista una ventaja adaptativa innovadora, cambios en el dominio sensor de la HK deben acompañarse de cambios en la especificidad de reconocimiento del RR, de modo tal que el reconocimiento de una nueva señal esté aislada del resto de las vías (Capra & Laub, 2012). En este contexto, se ha propuesto como la forma más eficiente de adquisición de nuevas vías, la transferencia horizontal de los genes de un par HK-RR dado, de una bacteria a otra, incorporando de esta manera nuevas vías de señalización (Zhang & Shi, 2005; Alm *et al.*, 2006). El número de SDCs presentes en un organismo procariota aumenta en forma lineal con el cuadrado de su número total de genes (Galperin, 2005; Ulrich *et al.*, 2005): a mayor número de sistemas de

señalización, mayor es la capacidad del organismo de adaptarse a fluctuaciones en el ambiente.

La formación de HKs híbridas probablemente ocurra por mutaciones del codón de paro de las HKs clásicas cuando éstas se encuentran codificadas río arriba de su RR específico en el operón. El resultado es la expresión génica de una fusión de la HK al RR; se cree que dichas fusiones se han expandido principalmente mediante eventos de transferencia horizontal (Zhang & Shi, 2005). Este tipo de adquisición de nuevos genes es responsable de su presencia en algunos clados eucariotas; de hecho, la mayor parte de HKs eucariotas son híbridas o pertenecen a un fosforrelevo, lo que ha permitido la evolución de vías de señalización más complejas. La ausencia de SDCs en eucariotas superiores y su sustitución por vías de señalización que involucran fosforilaciones en residuos de serina, treonina o tirosina -el enlace covalente fosfoéster es mucho más estable que el fosforamidoato con His o el anhídrido con Asp- podría deberse a la necesidad de respuestas más prolongadas y estables, evitando desfosforilaciones indeseadas en la ruta desde la membrana celular hasta el interior del núcleo (Capra & Laub, 2012).

5. ¿Cómo se regula la conexión entre “estímulo sentido” y “respuesta adaptativa” en sistemas de dos componentes?

5.1. Especificidad

Decenas o hasta centenas de SDCs se coexpresan en una bacteria dada (Galperin, 2005), y tanto las HKs como los RRs forman parte de familias génicas parálogas, con alto grado de similitud entre los miembros de cada familia a nivel de secuencia y estructura (Laub & Goulian, 2007). Sin embargo, cada par HK-RR existente en el citoplasma celular presenta un alto grado de especificidad de reconocimiento entre ambos componentes; esto hace que la frecuencia de “comunicación cruzada” entre pares no específicos sea escasa. Al igual que la mayoría de las vías de señalización, sus componentes dependen en gran medida de los reconocimientos proteína:proteína para asegurar la especificidad de las distintas vías. Los aminoácidos involucrados en la interfaz proteica son característicos de cada par HK-RR, lo cual establece un “código” de especificidad que ha sido en buena medida dilucidado (Skerker *et al.*, 2008; Capra & Laub, 2012). La Figura 8 muestra el esquema general postulado para el surgimiento evolutivo de nuevas vías de SDCs mediante cambios en la especificidad.

En este contexto, se postulan dos modelos no mutuamente excluyentes para la evolución de la especificidad: según el modelo de “mutaciones compensatorias”, debido a pérdida de presión selectiva producto de la duplicación génica de un par HK-RR determinado, ocurrirá que en uno de los componentes de una vía se acumularán mutaciones, que se compensarán con mutaciones en el otro componente, dando lugar al aislamiento de una nueva vía y, de conferir una ventaja adaptativa, asegurará su permanencia en el

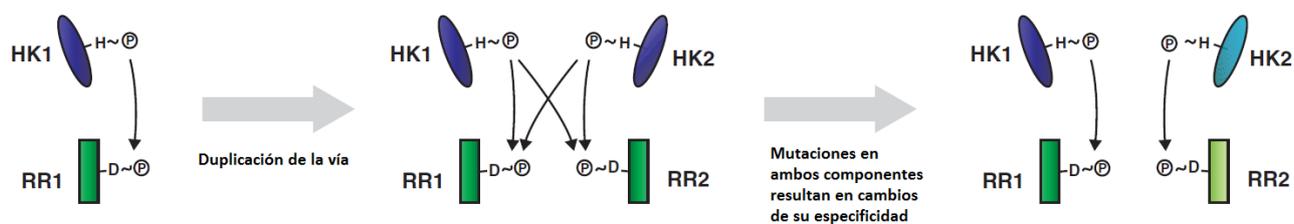


Figura 8. Esquema general de la evolución de los sistemas de dos componentes por duplicación génica, y el cambio en la especificidad que implica el surgimiento de una nueva vía. El camino mutacional que lleva al establecimiento de un nuevo SDC puede explicarse por dos modelos no mutuamente excluyentes, explicados con detalle en el punto 5.1 de la Introducción. Adaptado de Podgornaia & Laub, 2013.

genoma (Capra *et al.*, 2012; Podgornaia & Laub, 2013). El camino mutacional en el cual ocurre una mutación que impide la interacción entre un par HK-RR, llevará a un estado intermedio no funcional, antes de que dicha interacción pueda ser rescatada por otra mutación en el segundo componente de la vía. De cualquier manera, la liberación de presión selectiva producto de que la vía se encuentre fenotípicamente duplicada, puede dar lugar a estos estados no funcionales. Esto llevó a la postulación de un segundo modelo, de "intermediarios promiscuos", que establece que los caminos mutacionales que llevan a estas vías aisladas involucran componentes intermediarios que no sólo toleran variaciones en el set covariante de residuos sin perder especificidad, sino que de hecho son capaces de interactuar con otros componentes. Eventualmente, podrá aparecer una mutación que elimine dicha promiscuidad y establezca la aparición de un nuevo par específico HK-RR; esto es, una nueva vía de señalización. Cabe resaltar que, en ambos modelos, las mutaciones individuales no tienen efectos aditivos o deletéreos sino que son contexto-dependientes (epistasias) y que requieren, evolutivamente, de un orden secuencial o temporal para mantener a la vía funcional o generar una nueva especificidad (Podgornaia & Laub, 2015; Aakre *et al.*, 2015). Si bien la comunicación cruzada de distintas vías de SDCs se encuentra de este modo impedida, existen casos en donde este tipo de interacción ocurre y es biológicamente relevante: por ejemplo, se ha visto que existe una interacción al nivel de la fosfotransferencia de HK a RR entre los SDC HitR-HitS y HssR-HssS de *Bacillus anthracis*, en donde HssS fosforila a HitR *in vitro* e *in vivo*. Estas vías regulan la integridad de la envoltura celular y el sensado del sideróforo hemo, respectivamente, lo que indica que dichas señales se encuentran integradas (Mike *et al.*, 2014).

El reconocimiento molecular es el mecanismo predominante para otorgar especificidad. Sin embargo, la actividad fosfatasa de las HKs, también específica de cada par HK-RR, es un punto de control adicional para evitar la activación indeseada del RR. En ausencia de señal, la HK desfosforila a su P~RR específico, lo cual ejerce un control estricto de especies fosforiladas del RR de modo inespecífico (fosforilación mediada por HKs no específicas, o por donantes de fosfato de bajo peso molecular) (Huynh & Stewart, 2011). Adicionalmente, la abundancia celular de los RRs excede a la de las HKs en aproximadamente un orden de magnitud. Esto implica que, por competencia de sustratos, un RR específico para una HK será más afín que uno inespecífico para la misma quinasa (Podgornaia & Laub, 2013). Se ha

visto que dicha afinidad se encuentra de hecho dictada por la superficie de interacción que conforman los residuos determinantes de la especificidad (Willet *et al.*, 2013).

5.2. Eficiencia y direccionalidad

La bifuncionalidad de la enorme mayoría de HKs, catalizando la fosfotransferencia sobre el RR cuando la vía se activa o promoviendo la desfosforilación del P~RR cuando se encuentra apagada, requiere un control muy estricto para evitar ciclos fútiles y desregulación. Por ejemplo, en presencia del estímulo es necesario que las reacciones de fosfotransferencia y desfosforilación no ocurran simultáneamente y que ambas reacciones sean catalizadas por estados discretos, de forma de garantizar la respuesta en el momento correcto. Por ejemplo, se ha reportado que las HKs pueden adoptar estados estructurales diferentes que se correlacionan con cambios funcionales (Albanesi *et al.*, 2009). Además, una vez ocurrida la fosfotransferencia en el complejo HK:RR, previa a la liberación del P~RR, debería existir algún mecanismo que evite la pérdida del fosfato por hidrólisis indeseada del P~RR. La His fosforilable no parece participar en la reacción de fosfatasa (Skarphol *et al.*, 1997; Albanesi *et al.*, 2004; Willet *et al.*, 2012), sin embargo, la escasa información estructural disponible no permite aún ser concluyentes en cuanto a los mecanismos de control.

Los RRs catalizan su propia desfosforilación. Entonces, para una adecuada transmisión de la señal, es importante la prevención de ciclos fútiles por pérdida de fosfato inorgánico, mediante una regulación apropiada de la vida media del P~Asp. Si bien la geometría del sitio activo de los distintos RRs se encuentra muy conservada, variaciones en dos residuos aminoacídicos de los RRs, en las posiciones D+2 y T/S+2 (es decir, dos residuos hacia el C-terminal respecto al Asp fosforilable y la Thr/Ser conservada del bucle $\beta_4\alpha_4$, respectivamente) resultan en cambios de hasta seis órdenes de magnitud de la vida media del P~Asp (Thomas *et al.*, 2008; Pazy *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2016). Esto sugiere que existen mecanismos intramoleculares que controlan los niveles de RR fosforilado y, en consecuencia, el estado activo/inactivo de la vía. Es importante entender los mecanismos moleculares que evitan la desfosforilación fútil del RR una vez que es fosforilado por su HK específica.

Las HKs y los dominios HPT evolucionaron para catalizar reacciones de fosfotransferencia irreversibles, asegurando el flujo unidireccional de la información *desde* el estímulo *hacia* la respuesta (Bourret & Stock, 2002; Potter *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2008). En SDCs clásicos, es importante minimizar la retrofosfotransferencia de P~Asp a His ya que no es biológicamente relevante; de hecho, sólo es posible observar una pequeña proporción de retrofosfotransferencia basal *in vitro* (Zhu *et al.*, 2000; Albanesi *et al.*, 2004). Esta reacción se favorece en ausencia del metal divalente del sitio activo (Dutta & Inouye, 1996; Albanesi *et al.*, 2004), indicando que el catión juega un papel relevante en asegurar una direccionalidad. Por otro lado, la presión evolutiva también ha permitido la formación de vías de señalización en donde pasos reversibles son simultáneamente requeridos (Grimshaw *et al.*, 1998; Zapf *et al.*, 1998; Janiak-Spens *et*

al., 2005; Lassak *et al.*, 2013). Tales son los casos del sistema Kin-Spo0F-Spo0B-Spo0A de *B. subtilis* o del sistema SLN1-YPD1-SSK1 de *S. cerevisiae*, en donde los dominios HPT funcionan como donantes y como aceptores de fosfato. Los niveles energéticos del grupo fosforilo unido a His ó Asp son similares, por lo tanto es posible que la reacción de fosfotransferencia ocurra de forma directa o reversa, indistintamente. De este modo, es necesario que exista un control por parte de los componentes de la vía, que establezca una direccionalidad definida en el curso de la reacción. Si bien dichos procesos de control de la unidireccionalidad en SDCs juegan un rol importante en la fisiología bacteriana, hasta el presente no se han podido dilucidar los determinantes moleculares.

6. El sistema DesK-DesR de *Bacillus subtilis*

El sistema compuesto por la HK sensora DesK (de la familia HisKA_3) y el RR citoplásmico DesR (de la familia NarL) fue descubierto por Aguilar *et al.* (2001), en el contexto de dilucidar la vía de señalización encargada de regular la síntesis de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa de *B. subtilis*. La desaturasa regula las propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática, y en particular su fluidez a una temperatura dada, introduciendo dobles enlaces en los ácidos grasos saturados de sus fosfolípidos constituyentes. El sistema DesK-DesR (previamente denominado YocF-YocG) controla su expresión en función de la temperatura ambiental: el choque frío ambiental (por ejemplo, una caída de temperatura de 37° C a 25° C) produce un cambio en la composición lipídica de la membrana plasmática, la cual se engrosa producto de la acumulación de ácidos grasos saturados, con puntos de fusión más elevados que los insaturados. Es entonces cuando DesK cambia su conformación tridimensional, lo que posibilita su autofosforilación (reacción autoquinasa) y posterior fosfotransferencia (reacción fosfotransferasa) a DesR, quien actúa como activador de la transcripción de la $\Delta 5$ -desaturasa, reestableciendo la fluidez de la membrana. En ausencia de la señal (choque frío) DesK actúa como fosfatasa de P~DesR, asegurando un total apagado de la vía (Aguilar *et al.*, 2001; Albanesi *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que el dominio transmembrana de DesK, compuesto por 5 hélices α , puede simplificarse en un dominio quimérico de una única hélice, denominado sensor mínimo, que consiste en el extremo N-terminal de la hélice transmembrana 1 fusionado al extremo C-terminal de la hélice 5 (Cybulski *et al.*, 2010). Este sensor mínimo retiene *in vitro* e *in vivo* las propiedades de sensado del sistema parental. Asimismo, se vio que hacia los extremos N- y C-terminales del dominio transmembrana, en las interfaces entre el medio periplásmico/citoplásmico y la membrana plasmática, existen residuos hidrofílicos que, al engrosarse la membrana tras el choque frío, quedan “enterrados” dentro de la misma: en este contexto aparecen nuevas interacciones hidrofóbicas que involucran residuos de lisina hacia el N-terminal, y nuevos enlaces de hidrógeno entre residuos de serina hacia el C-terminal. Estos cambios estabilizarían la conformación autoquinasa de DesK (Cybulski *et al.*, 2015).

Si bien aún no se conoce la estructura tridimensional completa de DesK, que incluya su dominio

sensor de transmembrana, se ha avanzado en la dilucidación de la región citoplasmática en distintos estados funcionales, explicando el mecanismo de transición autoquinasa-fosfotransferasa-fosfatasa (Albanesi *et al.*, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2010; Saita *et al.*, 2015). El dominio citoplasmático DHp de DesK (que carece de dominios PAS ó HAMP) incluye un haz de cuatro hélices, continuado hacia el N-terminal con dos hélices paralelas empaquetadas en un *coiled-coil*, que conecta con el dominio transmembrana. Se cree que a partir de la detección del estímulo, el movimiento que sufren las hélices transmembrana se transmite mecánicamente a dicho *coiled-coil* (Cybulski *et al.*, 2015; Saita *et al.*, 2015) y esto resulta en cambios conformacionales del superenrollamiento, asociados a movimientos de los dominios CA y DHp, que dictan el estado funcional de DesK (Albanesi *et al.*, 2009). Mediante mutagénesis en el motivo *coiled-coil*, más precisamente estabilizándolo o desestabilizándolo, fue posible obtener variantes de DesK “atrapadas” en el estado inactivo y activo, respectivamente (Saita *et al.*, 2015).

El segundo componente de la vía es el RR DesR. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, resolviendo las estructuras 3D de DesR en sus formas inactiva y activa, determinaron que la superficie de dimerización de la forma activa se realiza a través de la superficie constituida por las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 5$, y no mediante la superficie típica $\alpha 4\beta 5\alpha 5$. Además, tras la asociación a los dos sitios de unión en el promotor del gen de la desaturasa, DesR tetrameriza mediante la interfaz $\alpha 4\beta 6\alpha 6$ (especialmente equivalente a la $\alpha 4\beta 5\alpha 5$). Se demostró también, utilizando un mutante no fosforilable de DesR y mediante ensayos microbiológicos *in vivo*, que DesK activa alostéricamente a DesR independientemente de la fosforilación, desplazando el equilibrio hacia la conformación activa de DesR. Luego, el regulador es posteriormente estabilizado mediante su fosforilación por la HK (Trajtenberg *et al.*, 2014). El modelo de activación de la vía DesK-DesR se esquematiza en la Figura 9.

Nuestro laboratorio procura entender cómo los SDCs regulan con precisión la ejecución de respuestas adaptativas a partir de estímulos determinados. En ese contexto, esta Tesis de Maestría busca responder dos preguntas centrales utilizando el SDC DesK-DesR como modelo de estudio: ¿cómo hacen estos sistemas para transferir el grupo fosforilo de manera controlada a lo largo de la vía, evitando fosforilaciones fútiles y defosforilaciones indeseadas? Y, ¿cómo se explica que haya sistemas que permitan únicamente transferencia de fosforilo de His a Asp, y otros que sean bidireccionales?

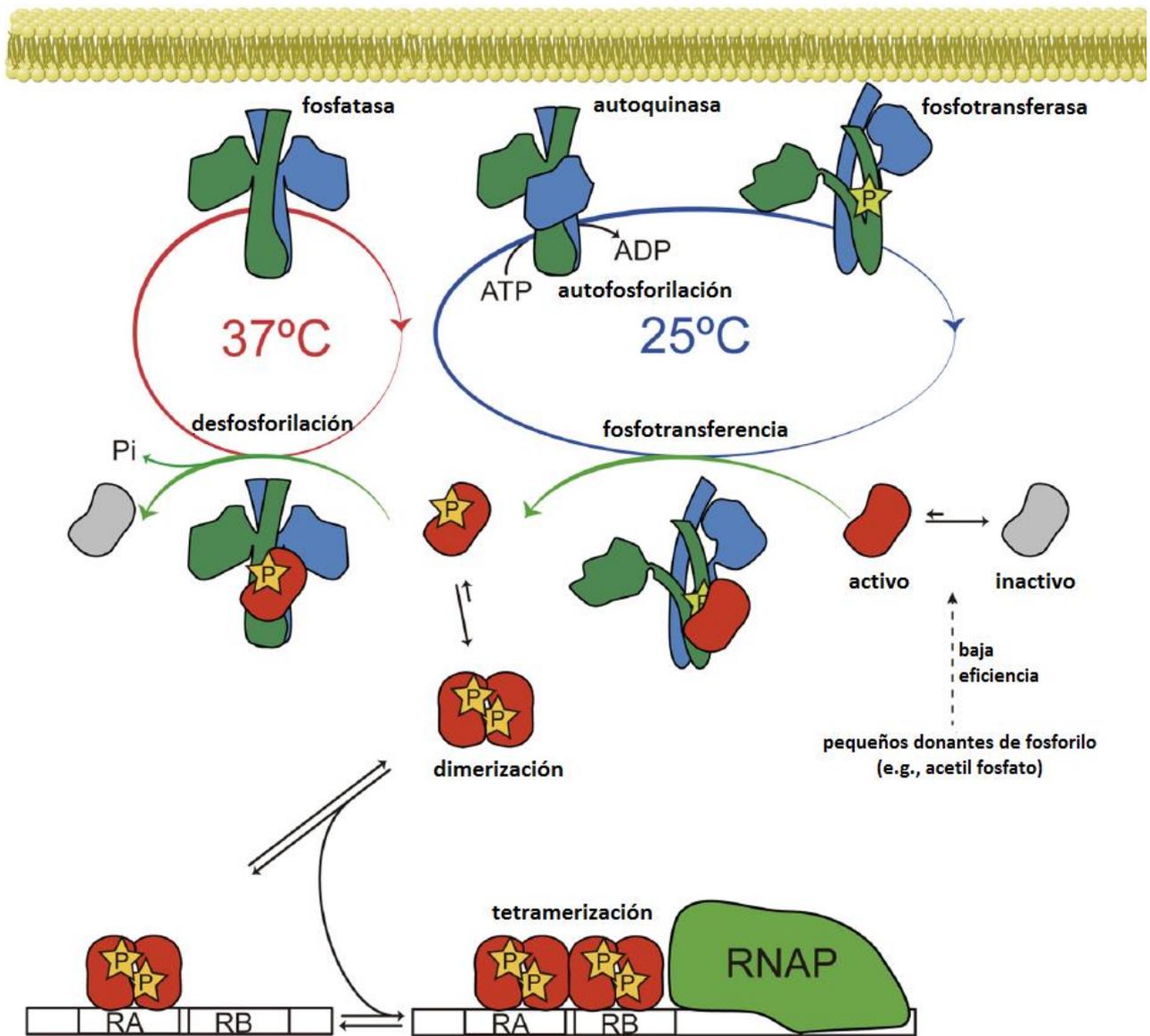


Figura 9. Modelo de activación de la vía DesK-DesR de *Bacillus subtilis*, explicado con detalle en el punto 6 de la Introducción. Adaptado de Trajtenberg *et al.*, 2014. Se esquematiza únicamente el dominio citoplasmático de DesK (verde y azul), dado que se desconoce la estructura tridimensional del dominio sensor transmembrana. Se observa también a DesR en el estado inactivo (gris) y activo (rojo).

HIPÓTESIS

Las interacciones entre las histidin-quinasa y el dominio receptor de fosforilo de los reguladores de respuesta son determinantes para asegurar la correcta señalización en bacterias, lo cual requiere especificidad, eficiencia y unidireccionalidad. La bifuncionalidad de la HK, promoviendo la desfosforilación del RR en el estado inactivo de la vía, o fosforilando al mismo en presencia de la señal, requiere que ambas actividades ocurran en momentos precisos de la vía; esto se encuentra regulado por mecanismos moleculares que evitan que ambas actividades coexistan. El correcto posicionamiento de la His fosforilable determina cómo se configura el centro de reacción.

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar al nivel molecular las interacciones específicas que permiten la asociación histidín-quinasa:regulador de respuesta, y cómo éstas varían de acuerdo a los estados funcionales, controlando la transmisión eficiente y unidireccional de la señal. Se hará foco en residuos del sitio catalítico de las reacciones. Como modelo de estudio, utilizaremos el sistema de dos componentes DesK-DesR de *Bacillus subtilis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producción y purificación a homogeneidad del complejo DesK:DesR utilizando mutantes que estabilicen los estados funcionales fosfatasa y fosfotransferasa.
2. Obtención de la estructura tridimensional del complejo DesK:DesR en los distintos estados catalíticos, mediante cristalografía de rayos X.
3. Análisis computacional de residuos claves en la interacción DesK:DesR en los distintos estados estructurales/funcionales, y posterior mutagénesis, clonado y producción de variantes de DesK y DesR.
4. Ensayos de fosfotransferencia y desfosforilación *in vitro* para probar las hipótesis guiadas por los análisis estructurales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Diseño racional de mutantes para estabilizar a DesKC en sus estados fosfatasa y fosfotransferasa*

* Este punto fue realizado previo a esta Tesis de Maestría (Albanesi et al., 2009; Saita et al., 2015). Sin embargo, a fines de entender el objetivo de este trabajo, es importante explicar aquí el fundamento racional de los mutantes generados para capturar el complejo DesK:DesR en los distintos estados funcionales.

El mutante DesKC corresponde a la región soluble citoplasmática de DesK, sin el dominio sensor transmembrana, pero catalíticamente competente para la fosfotransferencia hacia DesR, así como para desfosforilar a P~DesR. Por otra parte, el mutante DesR_{REC} corresponde al dominio receptor de DesR, sin el dominio de unión al ADN. Como fue mencionado previamente, un “switch” conformacional controla la transición activación-inactivación de DesK, respectivamente mediante la desestabilización-estabilización de

una estructura superenrollada tipo “*coiled-coil*” en el dominio DHp (Albanesi *et al.*, 2009). Dicho dominio consta de un haz de hélices α que conecta el dominio sensor transmembrana con los dominios CA, por tanto el *switch* conformacional del dominio DHp juega un rol fundamental en la transmisión de la señal mediante rearrreglos alostéricos. Para capturar el complejo DesKC:DesR_{REC} en el estado fosfatasa, se generó un triple mutante de DesKC sustituyendo residuos no hidrofóbicos ubicados en posiciones clave de dos de las héptadas del *coiled-coil* (Ser150Ile, Ser153Leu y Arg157Ile) con el objetivo de favorecer el rearrreglo en un *coiled-coil*. Este mutante, denominado DesKC_{STAB}, presenta actividad fosfatasa constitutiva independientemente de la señal, tal como fue demostrado *in vitro* e *in vivo* (Saita *et al.*, 2015), confirmando las hipótesis basadas en las estructuras de DesKC (Albanesi *et al.*, 2009). DesKC_{STAB} es insoluble cuando se sobre-expresa en *E. coli*, por tanto se co-expresó DesKC_{STAB} junto a DesR_{REC} mediante el uso del plásmido pACYC-DesKC_{STAB}:DesR_{REC}. Éste fue generado mediante el subclonado de DesKC_{STAB} del vector pHPKS/Pxyl-desKSTA (Saita *et al.*, 2015), en el plásmido pACYC-DesKC_{H188E}:DesR_{REC} (Trajtenberg *et al.*, 2014) mediante la técnica de clonado sin enzimas de restricción “*Restriction-Free Cloning*” (van den Ent & Löwe, 2006; Unger *et al.*, 2010) y utilizando los cebadores STAB_F (5'-CCTGTATTTTCAGGGATCCGGTATTATAAACTTCGCAAG-3') y STAB_R (5'-GTCAGACACTGTAATCACAACCTCCTCCAG-3'). Así, se empleó pACYC-DesKC_{STAB}:DesR_{REC} para co-expresar las siguientes proteínas:

DesKC_{STAB}:

MGSSHHHHHHGSGSENLYFQSGSIILRKEIERLEEKLEDANERIAELVKLEERQRIARDLHDTLGQKLSLIGLKSDLARKLIYK
DPEQAARELKSVMQARTSLNEVRKIVSSMKGIRLKDDELINIKQILEAADIMFIYEEKWPENISLLNENILSMCLKEAVTNVV
KHSQAKTCRVDIQQLWKEVVITVSDDGTFKGEENSFSKGHLLGMRERLEFANGSLHIDTENGTKLTMAIPNNSK

(Se señala en *itálica* el *HisTag*, en subrayado el sitio de clivaje con TEV, en rojo las mutaciones realizadas para estabiulizar el *coiled-coil*, y en azul subrayado la His conservada fosforilable).

Masa molecular teórica = 27,8 kDa (25,6 luego de clivaje con TEV).

Absorbancia 0,1% (=1 g/L) = 0,55 luego de clivaje con TEV.

DesR_{REC}:

MRGSHHHHHHHGSGSENLYFQSGSMISIFIAEDQQMLLGALGSLNLEDDMEVVGKGTGQDAVDFVKKRQPDVCIMDI
EMPGKTGLEAAEELKDTGCKIILTTFARPGYFQRAIKAGVKGYLLKDSPSEELANAIRSVMMNGKRIYAPELMEDLYSEA

(Se señala en *itálica* el *HisTag*, en subrayado el sitio de clivaje con TEV, y en azul subrayado el Asp conservado fosforilable).

Masa molecular teórica = 17,4 kDa (15,2 luego de clivaje con TEV).

Absorbancia 0,1% (=1 g/L) = 0,40 luego de clivaje con TEV.

Para capturar al complejo DesKC:DesR_{REC} en el estado catalítico fosfotransferasa, se utilizó el mutante puntual fosfomimético DesKC_{His188Glu}. Esta variante, cuando no se encuentra en complejo con DesR,

adopta una estructura conformacional muy similar a DesK_{wt} fosforilada (Albanesi *et al.*, 2009). Contamos con el plásmido pACYC (Novagen) que incluye los marcos de lectura abiertos DesK_{H188E}:DesR_{REC}, que codifican la variante de DesK y el dominio REC de DesR respectivamente, ambos fusionados a una etiqueta de seis histidinas (*HisTag*) y un sitio de clivaje para la proteasa TEV para cortar la etiqueta. Dicho plásmido fue utilizado para co-expresar ambas proteínas, con las siguientes secuencias. Los valores de masas moleculares y coeficientes de extinción fueron determinados mediante el *software* ProtParam (<http://www.expasy.org/tools>):

DesK_{H188E}:

MGSSHHHHHHGIHMENLYFQGRKERERLEEKLEDANERIAELVKLEERQRIARDLEDTLGQKLSLIGLKSDLARKLIYKDPEQ
AARELKSVQQTARTSLNEVRKIVSSMKGIRLKDELINIKQILEAADIMFIYEEEKWPENISLLNENILSMCLKEAVTNVVKHSQ
AKTCRVDIQQLWKEVVITVSDDGTFKGEENSFSKGHLLGMRERLEFANGSLHIDTENGKLTMAIPNNSK

(Se señala en *itálica* el *HisTag*, en subrayado el sitio de clivaje con TEV, y en rojo se indica la mutación His188Glu).

Masa molecular teórica = 27,3 kDa (24,9 luego de clivaje con TEV).

Absorbancia 0,1% (=1 g/L) = 0,56 luego de clivaje con TEV.

DesR_{REC}:

MRGSHHHHHHGSSENLYFQSGSGSMISIFIAEDQQMLLGALGSLNLEDDMEVVGKGTGQDAVDFVKKRQPDVCIMDI
EMPGKTGLEAAEELKDTGCKIIILTTFARPGYFQRAIKAGVKGYLLKDSPSEELANAIRSVMMNGKRIYAPELMEDLYSEA

(Se señala en *itálica* el *HisTag*, en subrayado el sitio de clivaje con TEV, y en azul subrayado el Asp conservado fosforilable).

Masa molecular teórica = 17,4 kDa (15,2 luego de clivaje con TEV).

Absorbancia 0,1% (=1 g/L) = 0,40 luego de clivaje con TEV.

Cabe resaltar que, la absorbancia utilizada para determinar la concentración del complejo purificado fue de 0,5. Este valor corresponde a la absorbancia teórica de ambas secuencias proteicas juntas (ver punto 2 de Estrategia experimental).

2. Diseño racional de mutantes de DesR_{REC} para evaluar fosfotransferencia *in vitro*

Para los ensayos de fosfotransferencia, partiendo del marco abierto de lectura de DesR_{REC} (ver punto 1 de Estrategia experimental) clonado en un plásmido pQE80 (Qiagen) (Trajtenberg *et al.*, 2014), se realizó mutagénesis sitio-dirigida para generar las variantes DesR_{REC-F82A} (que presenta la sustitución Phe82 por Ala) y DesR_{REC-R84A} (con la sustitución Arg84 por Ala), mediante la técnica *Restriction-Free Cloning*: para el primer paso de amplificación exponencial del "*megaprimer*", se utilizaron los cebadores DesR_Fw (5'

GATTAGTATATTTATTGCAGAAGATCAGCAAATGC 3'), F82A_Rev (5' CGGGTCTGGCGGCGGTGGTTAA GATGATAATTTTG 3') y R84A_Rev (5'GAAAGTAACCGGGTGCGGCGAAGGTGGTTAAG 3'). Así, los *megaprimers* generados codifican las mutaciones Phe82Ala y Arg84Ala (codones subrayados) respectivamente, lo que permitió obtener el plásmido recombinante pQE80-DesR_{REC-F82A} por "primer extensión", en un segundo paso de hibridación y amplificación lineal. Las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación se resumen en las Tablas 1 a 4. El plásmido parental sin la mutación se eliminó mediante el agregado de 1 µL de DpnI (stock 20 U) e incubando a 37 °C por 1 hora, seguido de un paso de inactivación a 80 °C por 5 min. La mutagénesis fue confirmada por secuenciación capilar (Macrogen, Corea; o IPM, Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur Montevideo) de colonias transformadas con el producto final del clonado y purificadas por *miniprep* (Qiagen). Todas las proteínas recombinantes presentan un *HisTag* N-terminal y un sitio de corte con TEV en su extremo N-terminal.

Tabla 1. Concentraciones de reactivos para el primer paso de amplificación exponencial de *RF cloning*.

Reactivo	Volumen (µL)	Conc. final	Conc. stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 µM	10 mM
Oligo Fwd	1,25	0,5 µM	20 µM
Oligo Rev	1,25	0,5 µM	20 µM
Plásmido molde	variable	20 ng/50 µL	variable
<i>Phusion HF Pol</i>	0,5	1 U/50 µL	2 U/µL
Total:	50		

Tabla 2. Condiciones de amplificación para el primer paso de amplificación exponencial de *RF cloning*.

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo (seg)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización cíclica	98	10	35
Hibridación	61	30	35
Elongación	72	20	35
Elongación final	72	300	1
<i>Hold</i>	4	-	1

Tabla 3. Concentraciones de reactivos para el segundo paso de amplificación lineal de *RF cloning*.

Reactivo	Volumen (µL)	Conc. final	Conc. stock
Agua	c.s.p. 50	-	-
Buffer HF	10	1x	5x
dNTP	1	200 µM	10 mM
<i>Megaprimer</i>	variable	200 ng/50 µL	variable
Plásmido a clonar	variable	40 ng/50 µL	variable
<i>Phusion HF Polymerase</i>	0,5	1 U/50 µL	2 U/µL
Total	50		

Tabla 4. Condiciones de amplificación para el segundo paso de amplificación lineal de *RF cloning*.

Etapa	Temp. (°C)	Tiempo (seg)	N° ciclos
Desnaturalización inicial	95	30	1
Desnaturalización cíclica	95	30	35
Hibridación	58	60	35
Elongación	72	300	35
Elongación final	72	480	1
<i>Hold</i>	4	-	1

3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Para los ensayos de cristalización, las proteínas recombinantes fueron co-expresadas a partir de los plásmidos pACYC-DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y pACYC-DesKC_{H188E}:DesR_{REC}, transformados en la cepa BL21(DE3) (Novagen) de *E. coli*, a 30 °C por 4 horas y a 20 °C por 16 horas respectivamente, e incubando con 0,5 mM de isopropil- β -tiogalactósido (IPTG) en la fase de crecimiento exponencial. Para los ensayos de fosfotransferencia, las proteínas fueron expresadas a partir de los plásmidos pQE32-DesKC (Albanesi *et al.*, 2009), pQE80-DesR_{REC} (Trajtenberg *et al.*, 2014), pQE80-DesR_{REC-F82A} y pQE80-DesR_{REC-R84A} transformados en la cepa TOP10F' (Invitrogen) de *E. coli*, a 20 °C por 16 horas, e incubando con 0,5 mM de IPTG en la fase de crecimiento exponencial. En todos los casos las células fueron cosechadas centrifugando a 4600 x g por 20 min a 4 °C y resuspendidas en buffer de lisis (Tris.HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM) con inhibidor de proteasas PefaBloc (Roche), utilizando 5 mL de buffer por cada 1 g de peso húmedo de pellet de bacterias. La obtención de la fracción soluble de los extractos celulares sobre-expresados se logró a partir de lisis celular con lizozima (concentración final 0,5 mg/mL) y Tritón X-100 (concentración final 1% v/v) incubando a temperatura ambiente por 30 min, seguido de sonicación con pulsos de 1 s (amplitud 30%) e intervalos de descanso de 3 s, completando tiempos totales de sonicación de 4 min. Esto fue repetido 3-4 veces hasta desaparición de viscosidad. Los extractos totales se centrifugaron finalmente a 12000 x g y 4 °C por 45 min, separando así la fracción sobrenadante de interés que contiene las proteínas solubles sobre-expresadas, de la fracción insoluble. Previo a la purificación se agregó imidazol hasta 40 mM a la fracción soluble, para disminuir la unión de proteínas inespecíficas a la primer columna cromatográfica de afinidad a metal.

La purificación de las proteínas se realizó en una serie de pasos cromatográficos. En primer lugar, y valiéndonos del *HisTag* N-terminal, se realizó una cromatografía de afinidad a un catión metálico inmovilizado (*HisTrap*, GE Healthcare): se utilizó zinc para la purificación de los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC} a modo de evitar la oxidación de cisteínas, fuente de heterogeneidad que previamente impidió la generación de cristales de calidad. Por otro lado, se utilizó níquel para obtener DesKC, DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} y DesR_{REC-R84A} para realizar los ensayos de fosfotransferencia. En ambos casos, se empleó como buffer de lavado Tris.HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM e imidazol 40 mM, y la elución se realizó en un gradiente lineal de imidazol hasta 500 mM final en 30 min, con un flujo de 1 mL/min. Las proteínas eluidas

fueron incubadas con la proteasa TEV (1 mg de proteasa cada 40 mg de proteína eluída) y la proteólisis se realizó *overnight* en bolsas de diálisis, contra 300 volúmenes de buffer de diálisis (Tris.HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, DTT 0,5 mM). Las muestras se recuperaron y fueron sometidas a un segundo paso cromatográfico por afinidad, en donde se colectó el *flow-through* con las proteínas de interés (en este punto, el *HisTag* fue clivado por TEV, proteasa que contiene dicha etiqueta N-terminal y se une a la columna). El paso final consistió en una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75 HiLoad 16/60, GE Healthcare) pre-equilibrada con buffer Tris.HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM y MgCl₂ 10 mM para el complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC}, y 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl para el complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} y las proteínas DesKC, DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} y DesR_{REC-R84A}. Los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC} eluídos fueron concentrados por ultrafiltración en dispositivos de centrifugación (Vivaspin), hasta concentraciones finales de 16 y 19 mg/mL, respectivamente; mientras que las proteínas DesKC, DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} y DesR_{REC-R84A} se concentraron del mismo modo, hasta 10, 25, 9 y 7 mg/mL, respectivamente. Todas las proteínas se guardaron a -80 °C bajo las condiciones de elución descritas.

4. Ensayos de cristalización de los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC}

4.1. El complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC}

La solución *stock* de proteína para cristalogénesis se preparó con el complejo puro a una concentración final de 10 mg/mL, en un volumen final de 150 µL incluyendo el buffer en el que eluyó en la gel filtración junto con AMP-PCP 5 mM, Tris 25 mM pH 8,5 y MgCl₂ 10 mM. El tubo se centrifugó a 16000 x g y 4 °C por 10 min y se empleó el sobrenadante para los ensayos de cristalización. Para acelerar el proceso de cristalogénesis se empleó la técnica de microsembrado (Obmolova *et al.*, 2014): para obtener los microcristales se tomaron 2 µL de gotas con cristales de condiciones previas, y éstos fueron fragmentados manualmente utilizando herramientas para la manipulación de los mismos. Luego, se agregaron 50 µL de una solución con PEG 600 30% (v/v), MES 0,1 M pH 6, MgSO₄ 0,15 M y glicerol 5% (v/v). Esta solución se diluyó al 1/400 en la solución final de aditivo conteniendo PEG 600 27% (v/v), MES 0,1 M pH 6, MgSO₄ 0,15 M y glicerol 5% (v/v). La cristalogénesis por gota colgante se realizó a 20 °C en placas Linbro. Las gotas de cristalización se prepararon con 0,8 µL de reservorio (PEG 4000 30% (w/v), Tris.HCl 0,1 M pH 8,5, Li₂SO₄ 0,2 M), 2 µL de solución *stock* de proteína, y 1,2 µL de solución de aditivo. Se incubaron tres gotas selladas en cada uno de los 24 pocillos. Los cristales aparecieron a los 4 días, y crecieron a los tamaños deseados (0,5 µm) en 10 días aproximadamente. Posteriormente los cristales fueron crio-protectados agregando lentamente 4 µL de solución de crio-protectación con PEG 4000 32% (w/v), Tris.HCl 0,1 M pH 8, Li₂SO₄ 0,2 M, MgCl₂ 20 mM, BeF₃⁻ 18 mM, AMP-PCP 5 mM y glicerol 15% (v/v). La solución de BeF₃⁻ se preparó mezclando 50 µL de una solución *stock* de NaF 0,9 M, con 9 µL de una solución *stock* de BeCl₂ 1 M. Las soluciones que

contenían BeF_3^- fueron manipuladas con extrema precaución, dado que el berilio es venenoso. Finalmente, los cristales fueron brevemente sumergidos en solución de crio-protección, y pescados utilizando *cryoloops* del tamaño adecuado para ser congelados en nitrógeno líquido.

4.2. El complejo *DesKC_{H188E}:DesR_{REC}*

La solución *stock* de proteína para cristalogénesis se preparó con el complejo puro a una concentración final de 8,3 mg/mL, en un volumen final de 110 μL incluyendo el buffer en el que eluyó en la gel filtración junto con AMP-PCP 5 mM, Tris 25 mM pH 8,5, MgCl_2 10 mM y DesR_{REC} 150 μM . Se centrifugó el tubo a 16000 x g y 4 °C por 10 min y se utilizó el sobrenadante para los ensayos de cristalización. La cristalogénesis por gota colgante se realizó a 20 °C en placas Linbro, y las gotas se prepararon con 2 μL de reservorio (PEG 3350 18% (v/v), citrato de tri-potasio 0,3 M) y 2 μL de la solución *stock* de proteína. Se incubaron dos gotas selladas en cada uno de los 24 pocillos. Los cristales aparecieron en aproximadamente 6 días, y crecieron a los tamaños deseados en 15 días. Los cristales fueron crio-protectados sumergiendo en solución de crio-protección conteniendo PEG 3350 20% (v/v), citrato de tri-potasio 0,3 M, AMP-PCP 5 mM, glicerol 25% (v/v), MgCl_2 20 a 150 mM, y BeF_3^- 0 a 5 mM. Los cristales fueron finalmente pescados con *cryoloops* del tamaño adecuado para ser congelados en nitrógeno líquido.

5. Difracción de rayos X, solución de estructuras cristalográficas, refinamiento y análisis

La difracción por rayos X de los cristales se realizó en un generador de ánodo de cobre rotatorio (MicroMax-007HF, Rigaku, Unidad de Cristalografía de Proteínas, Instituto Pasteur de Montevideo) o con radiación sincrotrónica (Soleil, Francia). El procesamiento de datos se llevó a cabo con los programas iMOSFLM (Battye *et al.*, 2011), o autoPROC (Vornhein *et al.*, 2011) (este utiliza el algoritmo de XDS (Kabsch, 2010) internamente) para indexar e integrar; y POINTLESS/AIMLESS (Evans, 2006; Evans, 2011) para el escalado de los datos y la reducción de intensidades a amplitudes. Los datos de $\text{DesKC}_{\text{STAB}}$ en complejo con DesR_{REC} (PDB 5IUN) fueron obtenidos en la línea de luz sincrotrón Proxima I (sincrotrón Soleil, Francia), colectando 180 imágenes con un rango de oscilación de 1°, y 30 segundos de exposición por imagen. Mientras que los datos de $\text{DesKC}_{\text{H188E}}$ en complejo con DesR_{REC} (PDB 5IUL) fueron colectados con el generador de rayos X de nuestro laboratorio, midiendo 593 imágenes con un rango de oscilación de 0,3° y 10 min de exposición por imagen.

Las estructuras fueron resueltas mediante reemplazo molecular con el programa Phaser (McCoy *et al.*, 2007), usando como sonda de búsqueda un modelo generado *in silico* de un complejo $\text{DesKC}:\text{DesR}$ (Trajtenberg *et al.*, 2014). Inicialmente se ubicaron las regiones correspondientes al DHP y REC del complejo, y el resto de los dominios fueron manualmente ubicados en los mapas de densidad electrónica. Luego, el

modelo fue manualmente completado utilizando el programa Coot (Emsley *et al.*, 2010) y refinados con Buster (Bricogne *et al.*, 2009). La validación se realizó durante y hacia el final del refinamiento, utilizando las herramientas de MolProbity (Chen *et al.*, 2010). La visualización de los modelos proteicos, así como el análisis estructural de los complejos y las figuras de este trabajo, se realizaron con PyMol (Schrodinger, 2015).

6. Ensayos de autodesfosforilación de DesR y de actividades retrofosfotransferasa, fosfotransferasa y fosfatasa del complejo DesKC:DesR *in vitro*

Para obtener a DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} y DesR_{REC-R84A} fosforiladas, se autofosforilaron 600 μ M de cada proteína recombinante empleando como dador de fosfato acetil-fosfato 50 mM en buffer Tris.HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM y MgCl₂ 30 mM por 1 h a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron añadiendo EDTA 50 mM, y desalando mediante una columna PD Minitrap G-25 (GE Healthcare). Los ensayos de autodesfosforilación de DesR_{REC} y DesR_{REC-F82A} se realizaron por triplicado a una concentración proteica de 30 μ M e incubadas en presencia de MgCl₂ 30 mM. Las reacciones fueron detenidas a diferentes tiempos, añadiendo buffer de muestra con SDS y DTT 25 mM, incubando por 10 min. El exceso de DTT se bloqueó con iodoacetamida 40 mM incubando por otros 10 min y cargado en un gel desnaturizante de acrilamida (13%) con *PhosTag* (*PhosTag*-SDS-PAGE) (Wako): el uso de la molécula "*PhosTag*" permite observar y determinar cuantitativamente la fracción fosforilada de una proteína dada (Kinoshita *et al.*, 2006). Esta molécula se agrega a la solución concentradora del gel junto con zinc, y se unirá específicamente al fosfato de la fosfoproteína sembrada, lo cual permite observar un retardo en la migración respecto a la fracción de proteína no fosforilada. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, y luego escaneados para la cuantificación de las reacciones mediante densitometría, utilizando el software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). La vida media del fosfoaspartato se calculó ajustando los datos a una linealización logarítmica y tomando el tiempo al cual la cantidad de proteína fosforilada decae a un 50% del valor inicial.

Para los ensayos de fosfotransferencia, se autofosforiló DesKC incubando con ATP 10 mM y MgCl₂ 20 mM, a una concentración proteica de 100 μ M, por 1 h a temperatura ambiente. P~DesKC fue posteriormente purificada por cromatografía de exclusión molecular (Superdex S75 10/300, GE Healthcare), equilibrada en buffer Tris.HCl 20 mM pH 8 y NaCl 300 mM. Las reacciones de fosfotransferencia fueron realizadas por triplicado, combinando 30 μ M de P~DesKC con concentraciones equimolares de DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} ó DesR_{REC-R84A}, a 25 °C en Tris.HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, y MgCl₂ 30 mM ó CaCl₂ 30 mM. Las reacciones correspondientes a la actividad fosfatasa se realizaron en las mismas condiciones, pero utilizando las distintas variantes de P~DesR incubadas con DesKC. Para los controles sin metal se pre-incubó con EDTA 10 mM pH 8. En todos los casos las reacciones se detuvieron a los tiempos 1, 5, 10 y 30 min, añadiendo buffer de muestra con SDS y DTT 25 mM, incubando por 10 min. El exceso de DTT se bloqueó

con iodoacetamida 40 mM incubando por otros 10 min y las muestras fueron analizadas por *PhosTag*-SDS-PAGE y cuantificadas por densitometría.

La cuantificación de la retrofosfotransferencia basal de P-DesR_{REC} hacia DesKC con distintos metales fue realizada por *PhosTag*-SDS-PAGE y densitometría utilizando ImageJ, en las condiciones ya descritas. El experimento consistió en medir la fracción fosforilada de DesKC luego de 1 min de incubación con P~DesR_{REC} ó P~DesR_{REC-R84A} en concentraciones equimolares y empleando MgCl₂, CaCl₂, ó EDTA. Por otro lado, se realizó una medida cualitativa de retrofosfotransferencia de los mutantes de DesR en exceso respecto a DesKC, incubando 30 µM de DesKC con 150 µM de DesR_{REC}, DesR_{REC-F82A} y DesR_{REC-F84A} y acetil fosfato 50 mM, por 1 min a temperatura ambiente.

RESULTADOS

1. Obtención de cristales de los complejos y procesamiento de datos

Las proteínas DesKC_{STAB} y DesR_{REC} se co-expresaron en forma soluble en el sistema de expresión procariota *E. coli* con buenos rendimientos, lográndose purificar 12 mg de complejo por litro de cultivo (Figura 10) para realizar los ensayos de cristalización. El pico mayoritario de elución obtenido en la cromatografía de exclusión molecular corresponde al complejo, y su peso molecular aparente calculado según la calibración de la columna es de 55 kDa. Este valor es significativamente inferior al calculado para la especie esperada, la cual incluye un dímero de DesKC_{STAB} en complejo con una o con dos moléculas de DesR_{REC}, que pronosticaban un peso molecular teórico de 65 u 80 kDa, respectivamente. Mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas se confirmó que la especie que eluye de la cromatografía de exclusión molecular es efectivamente el complejo, y la posterior resolución de la estructura confirmó que éste presenta una estequiometría de 2:2. La diferencia con respecto al peso teórico podría deberse a características de la estructura terciara y cuaternaria de las proteínas en cuestión.

Los primeros ensayos de cristalogénesis permitieron obtener cristales pequeños con forma de placa, pero el análisis por difracción no permitió tener datos a una resolución mayor a 8 Å. La purificación del complejo utilizando zinc en lugar de níquel como metal para la cromatografía de afinidad, junto con la posterior optimización de la cristalogénesis empleando la técnica de microsebrado (para favorecer la nucleación cristalina), el uso de aditivos con el fin de mejorar el empaquetamiento cristalino mediado por interacciones intermoleculares (Rupp, 2010), y la optimización de las condiciones de crioprotección (Alcorn & Juers, 2010), resultaron en el crecimiento de cristales (Figura 11) que generaron patrones de difracción de rayos X de buena calidad, con una resolución máxima de 2,8 Å (Figura 12). Tras el indexado, integración y escalado de las imágenes de difracción, se determinó que los cristales obtenidos para el complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC} pertenecen al grupo de espacio trigonal P3₁21, presentando un complejo y medio en la unidad asimétrica. La mitad restante del segundo complejo, queda reconstruida por aplicación del eje de

orden 2 de simetría cristalográfica, lo que revela que el homo-dímero de DesKC es perfectamente simétrico. Para los análisis estructurales posteriores, se utilizó el complejo completo de la unidad asimétrica.

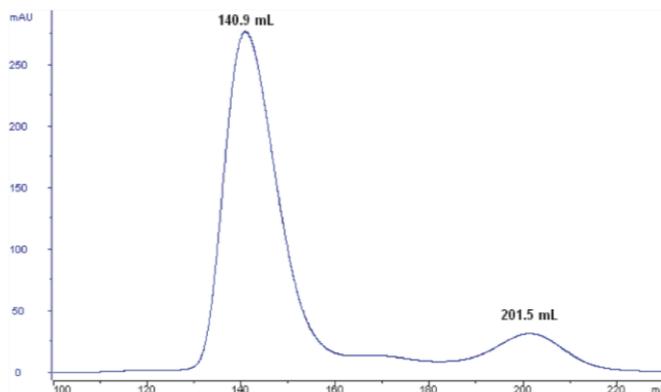


Figura 10. Perfil de elución del complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC} en la columna de gel filtración Superdex 75 pg 26/60. El pico a 140,9 mL corresponde al complejo, mientras que el pico a 201,5 mL corresponde a la forma monomérica de DesR_{REC} en exceso.

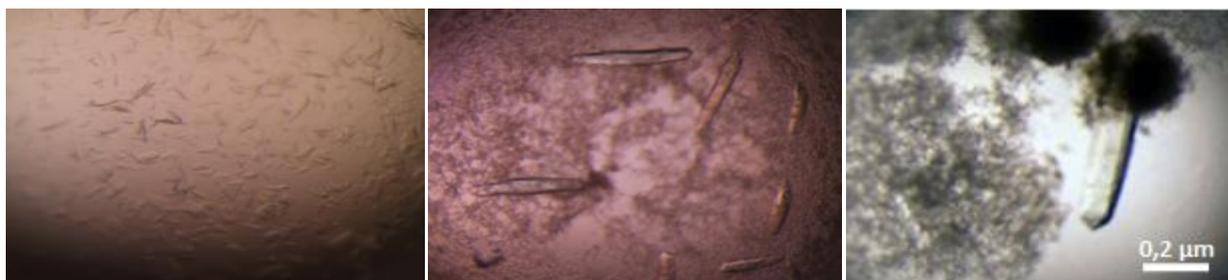


Figura 11. Cristalogénesis del complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC}. Los primeros intentos de cristalizar el complejo resultaron en cristales de insuficiente calidad (izquierda) para obtener patrones de difracción a las resoluciones deseadas. El uso de semillas y aditivos resultaron en una mejora en la calidad de los cristales (centro), y la posterior optimización de las condiciones de crio-cristalización permitió obtener cristales que difractaron a una resolución máxima de 2,8 Å (derecha).

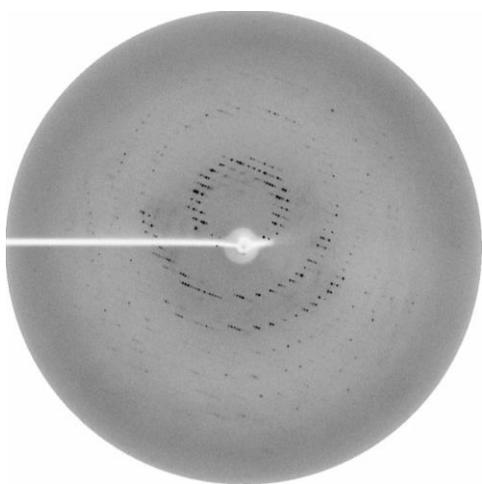


Figura 12. Patrón de difracción representativo del cristal del complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC} (grupo espacial P₃₁21).

En el caso del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC}, se obtuvieron 12 mg de complejo por litro de cultivo en forma homogénea (Figura 13) para los ensayos de cristalización. El pico mayoritario de elución tras cromatografía de exclusión molecular corresponde al complejo, tal como se confirmó mediante análisis por SDS-PAGE y espectrometría de masa. La elución retardada del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} en comparación con DesKC_{STAB}:DesR_{REC} corresponde a diferencias estequiométricas, dado que el primero se encuentra conformado por una relación molar 2:1, tal como mostró la estructura cristalográfica resuelta. Los cristales obtenidos (Figura 14) fueron sometidos a difracción de rayos X, revelando patrones de buena calidad (Figura 15). Tras indexar, integrar y escalar las reflexiones, se determinó que los cristales del complejo pertenecen al grupo espacio monoclinico P2₁, presentando dos complejos en la unidad asimétrica. Ambos complejos son estructuralmente idénticos, presentando un rmsd ("root mean squared deviation") de 0,4 Å (superponiendo 376 Cα).

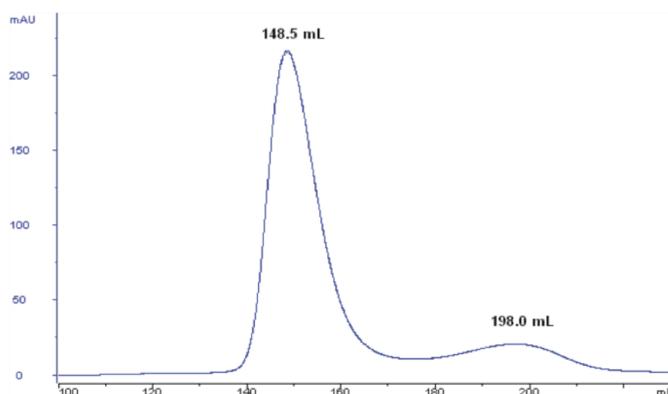


Figura 13. Perfil de elución del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} en la columna de gel filtración Superdex 75 pg 26/60. El pico a 148,5 mL corresponde al complejo, mientras que el pico a 198,0 mL corresponde a la forma monomérica de DesR_{REC} en exceso.

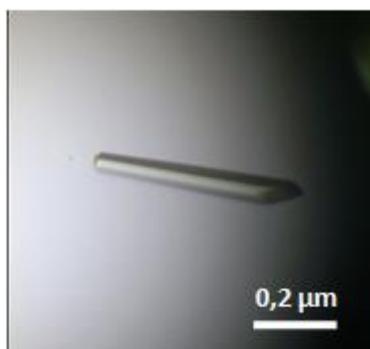


Figura 14. Cristal del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC}. El cristal difractó a una resolución máxima de 3,2 Å.

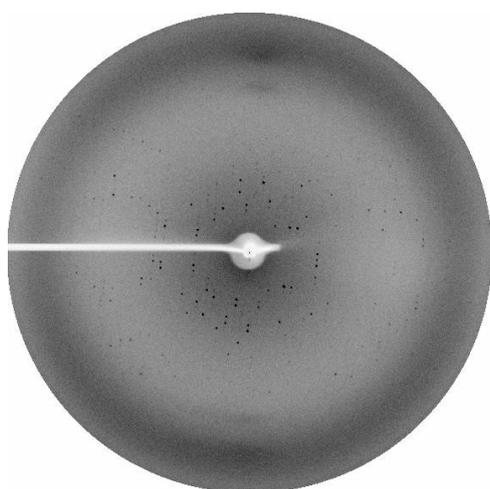


Figura 15. Patrón de difracción representativo del cristal del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} (grupo espacio P2₁).

La Tabla 5 muestra las estadísticas de la colección de datos de difracción para ambos complejos. La calidad del integrado y escalado de datos puede medirse a través de varios índices, entre ellos la relación señal/ruido (I/σ), el coeficiente de correlación entre dos mitades seleccionadas aleatoriamente ($CC_{1/2}$), la completitud, y los indicadores estadísticos R de calidad de ajuste entre intensidades idénticas (medidas múltiples veces, o relacionadas por simetría cristalográfica). Tomando en cuenta todos estos índices, se puede identificar la máxima resolución. I/σ y $CC_{1/2}$ reportan la calidad de las intensidades de las reflexiones en relación al *background* o ruido, y se espera que el $CC_{1/2}$ no sea inferior a 0,14 en la capa de mayor resolución (Karpus & Diederichs, 2012). Por otra parte, R_{meas} indica cuán precisos son los valores de intensidad de cada una de las reflexiones, teniendo en cuenta la multiplicidad con la que se midieron, mientras que R_{pim} mide la precisión del promedio de las intensidades, por lo que refiere al desvío estándar de dicho promedio. Típicamente para un set de datos de buena calidad, se espera que estos valores no sean muy elevados, en especial en las capas de baja resolución sean menores a 0,05 (ó 5% de diferencia en

Tabla 5. Estadística de la colección de datos de difracción de los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC}.

	Complejo DesKC _{STAB} :DesR _{REC}	Complejo DesKC _{H188E} :DesR _{REC}
Grupo espacio	P3 ₁ 21	P2 ₁
Dimensiones de celda		
a, b, c (Å)	94,3 94,3 239,9	88,2 116,7 91,9
α, β, γ (°)	90 90 120	90 117,1 90
Resolución (Å)	48,35-2,79 (2,94-2,79)*	38,59-3,15 (3,32-3,15)
Reflexiones únicas	31510 (4385)	28033 (3944)
R_{meas}	0,1 (2,07)	0,1 (0,57)
R_{pim}	0,03 (0,63)	0,05 (0,29)
$CC_{1/2}$	1,00 (0,56)	1,00 (0,83)
I/σ	15,6 (1,5)	11,8 (2,7)
Completitud (%)	99,5 (96,7)	98 (95,6)
Redundancia	10,8 (10,3)	3,8 (3,8)

*Los valores en paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución.

las reflexiones en promedio). Finalmente, la completitud es una medida de cuán completo es el *set* de datos, esto es, cuántas reflexiones fueron medidas en relación a las reflexiones totales posibles, y depende de la simetría cristalina, la mosaicidad del cristal (si es muy elevada puede haber un grado significativo de superposición entre reflexiones diferentes, no pudiendo ser en definitiva integradas), la oscilación por imagen (directamente vinculada con la mosaicidad y los parámetros de celda) y el rango de rotación total elegida en la estrategia de colecta (Rupp, 2010; Wlodawer *et al.*, 2013).

La densidad electrónica $\rho(xyz)$ de la estructura cristalina, siendo x , y , z las coordenadas de los átomos en la celda unitaria del cristal, puede obtenerse calculando la transformada de Fourier:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) - i\phi(hkl)]$$

donde V es el volumen de la celda unitaria; $|F(hkl)|$ corresponde a la amplitud de los factores de estructura, para cada una de las reflexiones con índices de Miller asignados h , k , l (en otras palabras, F es una función que representa cómo contribuyen los átomos del cristal al patrón de difracción, en una orientación determinada por el conjunto de planos hkl); y $\phi(hkl)$ corresponde a las fases de dichas reflexiones (Drenth, 2007). Las amplitudes calculadas a partir de los datos experimentales de difracción (intensidades) se convirtieron a factores de estructura durante el procesamiento de datos (en el paso llamado de reducción de datos); sin embargo, la información de las fases no se puede medir en el experimento de difracción. Para resolver el problema de las fases se siguió el procedimiento de reemplazo molecular, mediante el cual se obtienen fases aproximadas a partir de un modelo estructural suficientemente similar, que debe ser rotado y trasladado en la celda cristalográfica problema, para superponerse con el modelo real en el cristal; dichas funciones de rotación y de translación son calculadas matemáticamente permitiendo discernir con claridad cuando se encuentra una solución. En nuestro caso, para resolver la estructura del complejo se utilizó como sonda para esta búsqueda, un modelo generado *in silico* (Figura 16) partiendo de las estructuras cristalográficas de los dominios DHp de DesKC y REC de DesR, y utilizando como referencia un complejo entre una HK y su RR de *Thermotoga maritima* (Casino *et al.*, 2009; Trajtenberg *et al.*, 2014). Este proceso de reemplazo molecular fue exitoso, con lo que se entra en radio de convergencia para subsiguientemente refinar el modelo inicial, de modo de ajustar el patrón de difracción calculado al realmente medido. Este proceso de ajuste es denominado refinamiento, y para ello utilizamos el programa Buster. En forma iterativa al refinamiento, se debe ir corrigiendo también manualmente el modelo y reconstruyéndolo, en función de los mapas de densidad electrónica. Este proceso de refinamiento y reconstrucción de modelo se hace cíclicamente, hasta que los índices cuantitativos de ajuste a la difracción son maximizados y convergen de forma estable. Los modelos fueron luego validados y depositados en la base de datos pública Protein Data Bank (PDB). En suma, se resolvió la estructura tridimensional a 2,8 y 3,2 Å de los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC},

respectivamente. Cabe agregar que se resolvieron las estructuras de dos complejos DesK_{H188E}:DesR_{REC} adicionales, depositados también en la PDB (números de acceso 5IUJ, 5IUK). El análisis de estas estructuras se encuentra disponible en el artículo Trajtenberg *et al.*, 2016 (doi: 10.7554/eLife.21422). En la Figura 17 se muestran mapas de densidad electrónica de los complejos, utilizando las fases de los modelos finales.

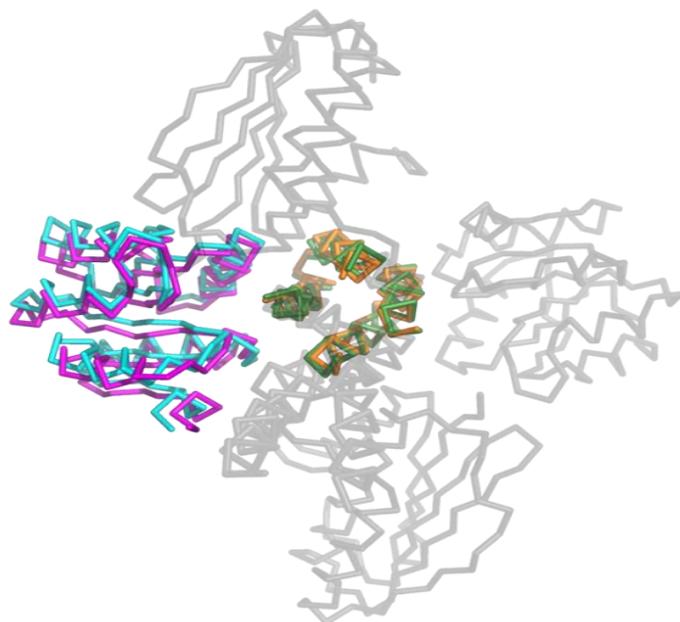


Figura 16. Modelo *in silico* de DesK:DesR utilizado para reemplazo molecular. Se observa la superposición del esqueleto de C α del modelo generado de DesK:DesR (naranja:cyan) (Trajtenberg *et al.*, 2014) sobre la estructura cristalográfica de DesK_{STAB}:DesR_{REC}(verde:magenta).

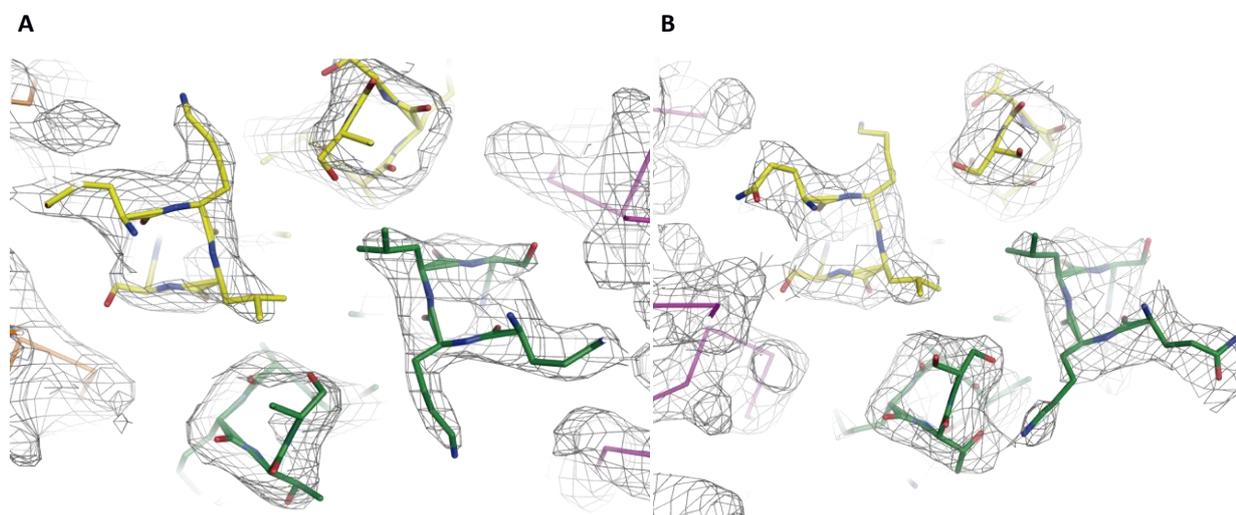


Figura 17. Representación de los mapas de densidad electrónica obtenidos para los complejos DesK_{STAB}:DesR_{REC} (**A**) y DesK_{H188E}:DesR_{REC} (**B**). Se observa el plano transversal del dominio DHP del dímero de DesK (amarillo y verde) y los monómeros de DesR_{REC} (naranja y/o magenta).

Los datos estadísticos del refinamiento se detallan en la Tabla 6. El indicador R_{work} compara las intensidades de difracción calculadas a partir del modelo atómico construido, con las medidas

experimentalmente. A su vez, se utiliza el indicador R_{free} para estimar la sobreinterpretación (“*overfitting*”) de los datos: se selecciona al azar un set de reflexiones (aproximadamente 5% del total) que no se usan nunca en el refinamiento, para ir comparando en cada ciclo de refinamiento con el R_{work} de datos procesados. Si el modelo se va mejorando y construyendo correctamente, el R_{work} y el R_{free} deben disminuir gradualmente ambos de manera similar, y ambos converger en las etapas finales.

Por otro lado, los factores B (medida de desplazamiento medio de los átomos) dan cuenta de la mayor o menor flexibilidad de la proteína: mayor flexibilidad se asocia a mayores valores de factor B. El plot de Wilson permite una estimación del promedio de los factores B de todos los átomos sólo en base a los datos de difracción (antes incluso de tener un modelo atómico); su consistencia con los factores B tomados de promediar todos los átomos del modelo refinado es útil como medida de un apropiado ajuste de factores de escala entre difracción calculada y observada, entre otros parámetros. La obtención de factores B elevados refleja que nuestras proteínas en complejo tienen alta flexibilidad. Finalmente, los rmsd mide diferencias entre valores observados en el modelo y valores esperados para los enlaces químicos en moléculas: son formas de validar el refinamiento; como vemos aquí, el ajuste con valores ideales es excelente. También para ello se observa cómo se disponen los residuos del modelo refinado en un gráfico de Ramachandran, verificando que hay un número ínfimo de *outliers* (Rupp, 2010; Wlodawer *et al.*, 2013).

Tabla 6. Estadística del refinamiento estructural de los complejos DesKC_{STAB}:DesR_{REC} y DesKC_{H188E}:DesR_{REC}.

	Complejo DesKC _{STAB} :DesR _{REC}	Complejo DesKC _{H188E} :DesR _{REC}
N° de reflexiones usadas (N en el set <i>free</i>)	31454 (1568)	26231 (1320)
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0,214/0,249	0,19/0,231
N° de átomos		
proteína	7912	8709
ligandos, iones	93 (AMP-PCP), 6 (Mg ²⁺), 12 (MES), 12 BeF ₃ ⁻ , 5 (SO ₄ ²⁻)	124 (AMP-PCP), 6 (Mg ²⁺), 2 (K ⁺)
aguas estructurales	12	18
Factores B (Å ²)		
deducido del gráfico de Wilson	98,3	84,1
promedio sobre el total de átomos de proteína	118,7	89,6
Rmsd		
distancias de enlace (Å)	0,01	0,01
ángulos de enlace (°)	1,2	1,25
N° de residuos en gráfico de Ramachandran		
favorecidos/ <i>outliers</i>	1025/1	1073/5
PDB ID	5IUN	5IUL

*Los valores en paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución.

2. Estructura del complejo DesKC:DesR en la reacción de desfosforilación

La estructura tridimensional obtenida del complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC} se observa en la Figura 18. La proteína mutante DesKC_{STAB} fue generada como una forma de atrapar la HK en su conformación de fosfatasa. Previamente se demostró que insertando estas mutaciones que estabilizan el *coiled-coil*, efectivamente se genera una forma constitutivamente inactiva como quinasa y capaz de desfosforilar a P~DesR (Saita *et al.*, 2015). La estructura de DesKC_{STAB} en el complejo adopta una conformación muy similar a una variante de DesKC (DesKC_{H188V}) también estabilizada en este estado catalítico (Albanesi *et al.*, 2009).

La estructura de uno de los complejos de la unidad asimétrica muestra la formación del *coiled-coil* hacia el N-terminal del dominio DHp, estabilizada gracias a los mutantes puntuales Ser150Ile, Ser153Leu y Arg157Ile en las posiciones *a-d-a*, respectivamente, en dos héptadas consecutivas estabilizando el superenrollamiento helicoidal (Figura 19). Esto incrementa la rigidez del dímero y consolida la interfaz entre los dominios DHp y CA, estabilizando a estos últimos restringiendo su movilidad (Albanesi *et al.*, 2009). En la estructura se observa que la Phe346, perteneciente a la caja "F" del dominio CA de DesK, posee el rol de "gripper thumb" en la interfaz DHp:CA (ver Figura 23). Este residuo es clave en la interacción diferencial entre los dominios de DesK en los distintos estados catalíticos, y aparece como un mecanismo estructural conservado en un gran número de HKs (Albanesi *et al.*, 2009; Bhate *et al.*, 2015). Además, se observa la presencia de una molécula de AMP-PCP (análogo no hidrolizable de ATP agregado durante la cristalización) unida a cada uno de los dominios catalíticos, alejados de la histidina fosforilable (~27 Å), lo que impide su

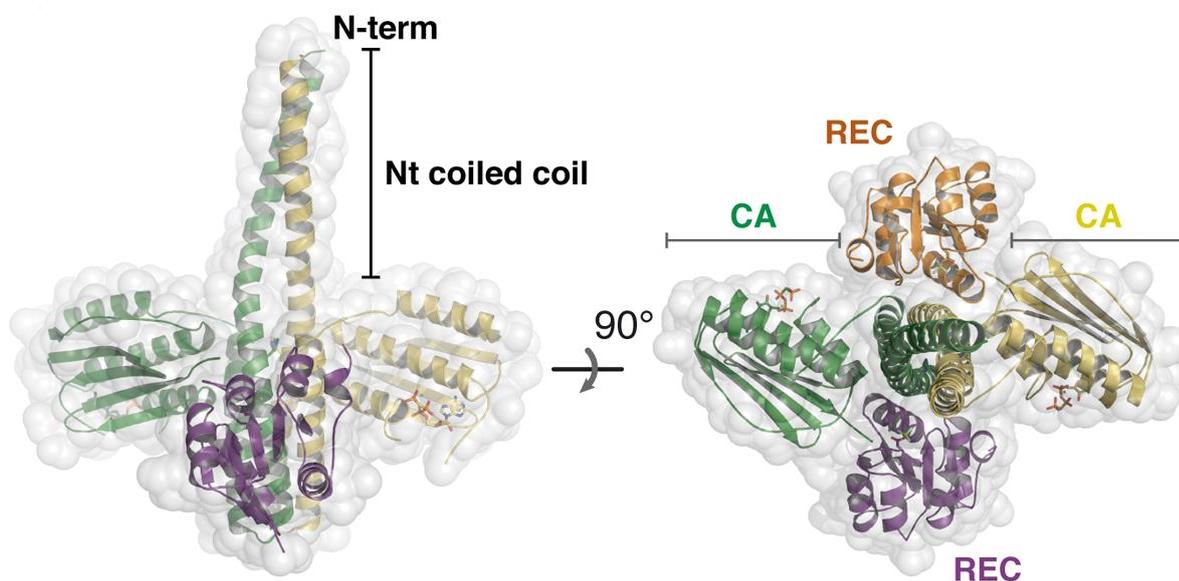


Figura 18. Estructura cristalográfica del complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC}, caracterizado por la disposición simétrica y la formación del superenrollamiento tipo "coiled coil" hacia el extremo N-terminal de DesKC_{STAB}. El dímero de DesKC_{STAB} se observa en verde y amarillo, mientras que los monómeros de DesR_{REC} se observan en magenta y naranja. Adaptado de Trajtenberg *et al.*, 2016.

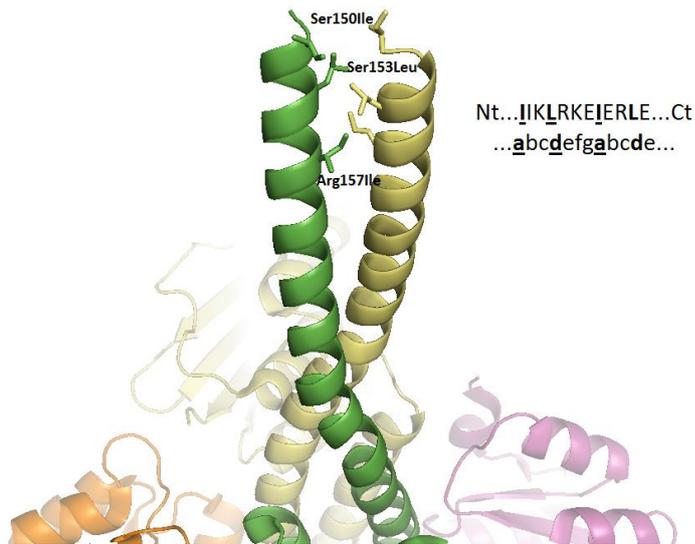


Figura 19. Extremo N-terminal de DesK_{STAB}, donde se muestran las mutaciones Ser150Ile, Ser153Leu y Arg157Ile (subrayadas en negrita en la secuencia) realizadas en las posiciones *a* y *d* de la héptada helicoidal para estabilizar el superenrollamiento *coiled-coil*. En dichas posiciones se ubican residuos hidrofóbicos que apuntan hacia el interior del motivo superenrollado.

trans-autofosforilación (Trajtenberg *et al.*, 2010). Tanto la formación del *coiled-coil* como la extensa complementariedad estructural de los dominios CA y DHp, dan lugar a un alto grado de simetría entre ambos monómeros; esto ya ha sido documentado previamente como una característica estructural de otras HKs capturadas en el estado fosfatasa (Albanesi *et al.*, 2009; Casino *et al.*, 2009).

La adopción de una conformación simétrica por parte de la HK expone dos sitios de unión al RR igualmente disponibles. La estructura del complejo muestra dos monómeros de DesR_{REC} interaccionando uno de cada lado del dominio DHp dimérico, estableciendo una estequiometría HK:RR de 2:2. Ensayos de calorimetría por titulación isotérmica del mutante fosfatasa DesK_{H188V} en complejo con DesR (Trajtenberg, 2011, Tesis doctoral; Trajtenberg *et al.*, 2016) respaldan la relación estequiométrica obtenida en los cristales. Estudios previos muestran que DesK_{H188V} se encuentra estructural y funcionalmente estabilizado en el estado fosfatasa (Albanesi *et al.*, 2004; Albanesi *et al.*, 2009); en este trabajo hemos podido obtener la estructura de DesK en dicho estado, sin modificar la histidina conservada por mutagénesis. Las superposiciones de DesK_{H188V} sobre DesK_{STAB} (Figura 20) revelan rmsds de 1,4 Å (superponiendo los 136 C α del dominio DHp del modelo de DesK_{H188V}, PDB: 3EHH), ó 2,1 Å (por superposición de todos los 370 C α de ambas proteínas), que son valores bajos reflejando gran similitud. Valores de rmsd semejantes se obtienen superponiendo DesK_{STAB} del complejo con otro modelo de DesK_{H188V} (pdb 3EHJ). A diferencia de DesK_{H188V}, DesK_{STAB} presenta la His188 nativa, la cual se observa orientada hacia el interior del *coiled-coil* del dominio DHp, como se detallará más adelante. Esto agrega una evidencia adicional para la definición del estado fosfatasa de la estructura aquí obtenida.

Ambos monómeros de DesR_{REC} en el complejo, presentan una molécula de BeF₃⁻ unida al Asp54 conservado, y coordinando un catión de Mg²⁺. Tomando en cuenta las características estructurales y

funcionales mencionadas, la estructura del complejo DesK_{STAB}:DesR_{REC} (que podemos denominar “complejo fosfatasa”) representa una fotografía de la reacción de desfosforilación, previa a la hidrólisis mediada por DesK del enlace P-Asp en DesR.

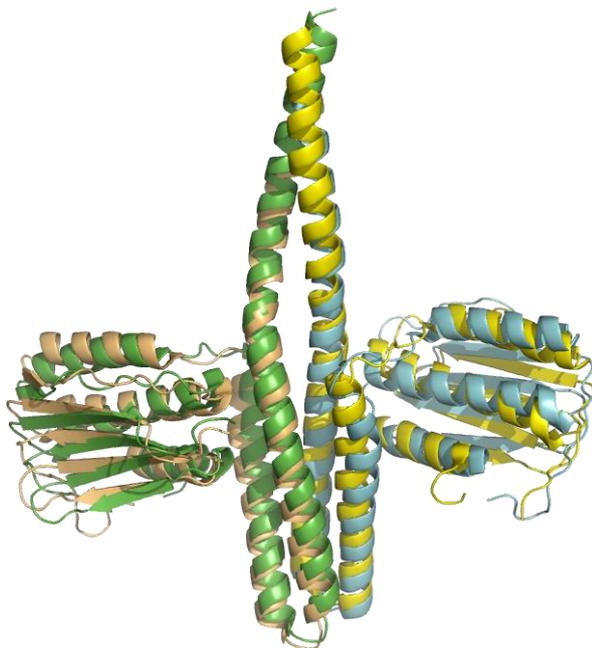


Figura 20. Superposición de DesK_{STAB} (verde y amarillo) con la estructura cristalográfica de DesK_{H188V} (naranja y cyan, PDB: 3EHJ), caracterizada como constitutivamente fosfatasa (Albanesi *et al.*, 2009).

3. Estructura del complejo DesK:DesR en la reacción de fosfotransferencia

Con el objetivo de capturar un complejo DesK:DesR en la etapa de fosfotransferencia, se realizaron intentos de cristalización de P~DesKC en complejo con una variante no fosforilable de DesR_{REC}. Para esto se realizó la co-expresión de DesKC *wild-type* y el mutante DesR_{REC-D54N}, en donde se sustituyó el aspartato conservado por el residuo no fosforilable asparagina, y se intentó cristalizar en presencia de ATP. Sin embargo, el rastreo de 384 condiciones de cristalización diferentes no resultó en la producción de cristales de calidad.

Sí se tuvo éxito utilizando como estrategia alternativa el uso del mutante fosfomimético DesK_{H188E}, en complejo con DesR_{REC}. La estructura tridimensional del complejo DesK_{H188E}:DesR_{REC} se observa en la Figura 21. La superposición de DesK_{H188E} con la de una estructura de DesKC *wild-type* fosforilada (Figura 22), previamente resuelta por nuestro laboratorio, revela conformaciones muy similares en ambos estados: un rmsd de ~0.8 Å alineando los 920 átomos de los dominios DHp de P~DesKC *wild-type* (PDBs 3GIG, 5IUM), y resultados semejantes con DesK_{H188E} libre (PDB 3GIF). Esto sugiere que DesKC en nuestro complejo es una representación *bona fide* de la HK fosforilada.

De aquí en más, los análisis estructurales se realizarán con un modelo de DesKC en estado fosfotransferasa, en donde se sustituyó *in silico* el Glu188 por la His fosforilada del cristal de P~DesKC *wild-*

type. Dicha sustitución fue trivial por superposición de ambas estructuras en el dominio DHp y realizando una minimización restringida con Rosetta (Das & Baker, 2008), con el objetivo de permitir cambios muy pequeños para evitar choques entre cadenas, manteniendo al máximo las coordenadas atómicas experimentales. La estructura de DesKC_{H188E} en el complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} presenta un estado confor-

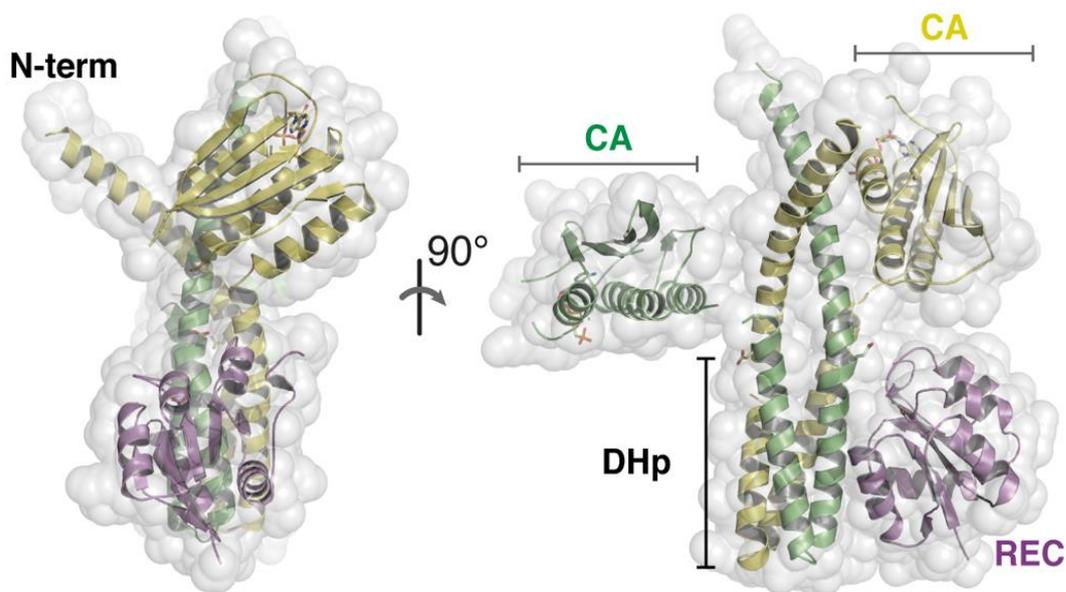


Figura 21. Estructura cristalográfica del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC}. Se observa la liberación de los dominios CA resultado de la desestabilización del “coiled-coil”. El dímero de DesKC_{H188E} se muestra en verde y amarillo, el monómero de DesR_{REC} se observa en magenta. Adaptado de Trajtenberg *et al.*, 2016.

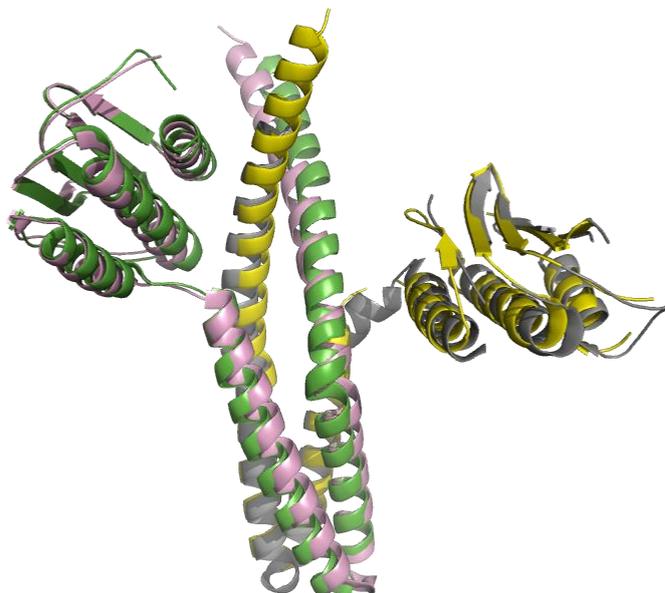


Figura 22. Superposición de DesKC_{H188E} (verde y amarillo) con la estructura cristalográfica de P-DesKC_{wt} (rosado y gris, PDB: 5IUM).

macional muy diferente respecto a la de la estructura de DesKC_{STAB} en el complejo fosfatasa. Los rearrreglos pueden describirse por dos movimientos estructurales importantes: (i) desestabilización del *coiled-coil*, lo

cual se observó también en la estructura autoquinasa de DesKC (Albanesi *et al.*, 2009) y (ii) cambios en la movilidad y disposición de los dominios CA (en ambos complejos estos dominios están interactuando con AMP-PCP). DesKC_{H188E} adopta una conformación asimétrica: esta asimetría fue documentada previamente en otras formas fosforiladas de DesK e incluso de otras HKs activas (Albanesi *et al.*, 2009; Mechaly *et al.*, 2014; Casino *et al.*, 2014). Cambios en la movilidad de los dominios CA juegan un papel importante en la regulación funcional de DesK (Saita *et al.*, 2015). En el estado fosfotransferasa, el dominio CA de un monómero se encuentra completamente móvil, y puede ser observado fortuitamente gracias a que el empaquetamiento cristalino lo mantiene ordenado, permitiendo la obtención de mapas de densidad electrónica claros. El segundo CA se encuentra interactuando con la hélice N-terminal del otro monómero a través del *gripper thumb*. Esta última interacción se observó en todas las estructuras del estado fosfotransferasa previamente resueltas (Albanesi *et al.*, 2009), y tendría gran importancia, ya que liberaría el sitio de unión a DesR evitando que el dominio CA compita por la His fosforilable. En la Figura 23 se observa las distintas disposiciones de este segundo dominio CA, que se encuentra en ambos estados acoplado diferencialmente al DHP. Estas dos formas de interacción DHP:CA están correlacionadas con reordenamientos de las hélices centrales del DHP, las cuales a su vez definen el correcto posicionamiento de la His188 fosforilable.

Como se ha mencionado, la conformación asimétrica de DesK no implica que existan diferencias muy significativas en las superficies de los dos sitios de unión a DesR, que involucraría a la His fosforilable de DesK. Sin embargo, en al menos uno de los dos sitios se ubicaría el regulador para recibir el fosforilo en su Asp conservado (Albanesi *et al.*, 2009). Mediante calorimetría de titulación isotérmica, fue posible identificar estos dos sitios de unión, siendo uno de ellos de muy baja afinidad (Trajtenberg *et al.*, 2016). Esta asimetría estequiométrica puede explicarse considerando la movilidad de los dominios CA, donde la unión de uno de ellos al dominio DHP libera el sitio de unión que presenta la His fosforilable. En cambio, el dominio CA móvil competiría con el RR por la unión al dominio DHP de la HK. Esto hace que un sólo monómero de DesR_{REC} pueda efectivamente interactuar en forma productiva con el dímero de DesKC_{H188E}, estableciendo una estequiometría HK:RR de 2:1, como puede observarse en la estructura cristalina del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC}.

El monómero de DesR_{REC} presenta una conformación casi idéntica a la observada en el estado fosfatasa de la reacción. Sin embargo en el caso del complejo fosfotransferasa no se observó la molécula de BeF₃⁻ unida al Asp54. Además, la estructura de DesR_{REC} en complejo con DesKC_{H188E} muestra al magnesio coordinado por el *cluster* de carboxilatos del regulador. En la siguiente sección se desarrollará con más detalle las características conformacionales de DesR en ambos complejos. En suma, la estructura del complejo mutante DesKC_{H188E}:DesR_{REC}, que podemos denominar “complejo fosfotransferasa”, representa una fotografía de la reacción de fosfotransferencia, previa a la migración del fosforilo desde la P~His_{HK} hacia el Asp_{RR}.

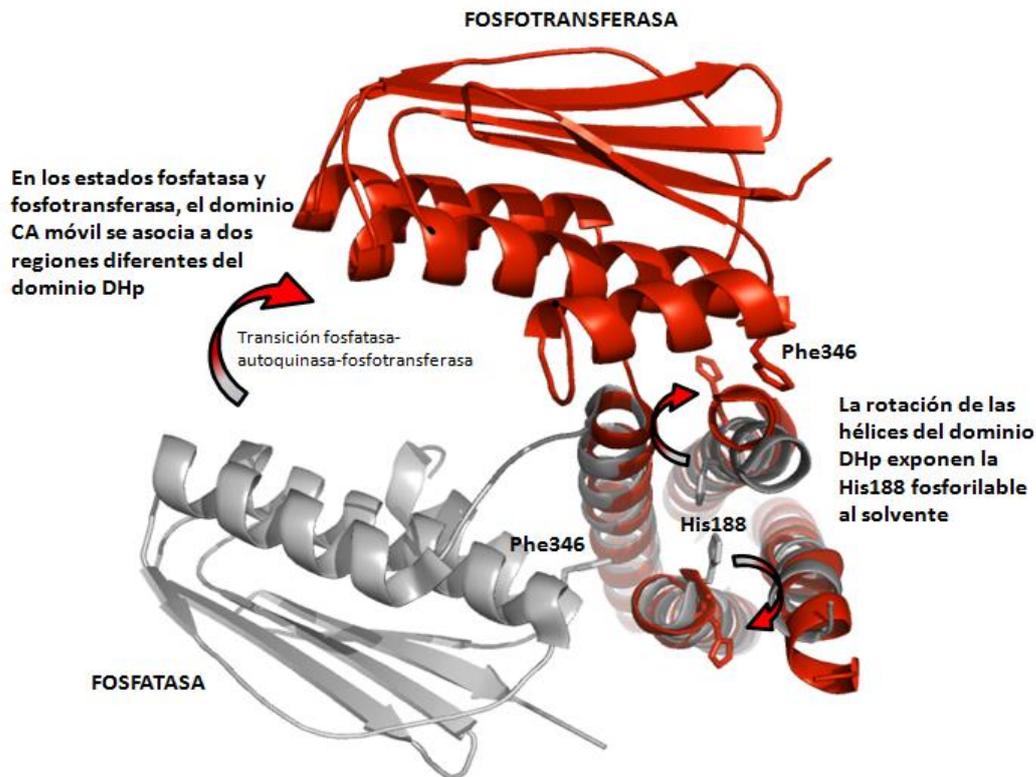


Figura 23. Movimiento del dominio CA y rotación de las hélices centrales del dominio DHP en la transición fosfatasa-fosfotransferasa de DesKC. El dominio CA es liberado para permitir la autofosforilación de DesK mediada por ATP en la reacción autoquinasa, y posteriormente se da la fosfotransferencia hacia DesR. En este último caso el dominio CA pasa a interactuar en la región N-terminal de las hélices centrales del dominio DHP. Se muestra en blanco a DesKC_{STAB} (fosfatasa) y en rojo a DesKC_{H188E} (fosfotransferasa); en este último caso la His188 fue modelada utilizando como molde la estructura P-DesKC (PDB: 5IUM). Por simplicidad se muestra un único dominio CA.

4. Estructura de DesR_{REC} en ambos complejos

Al activarse, DesR dimeriza mediante la superficie conformada por las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 5$ (Trajtenberg *et al.*, 2014). Además, es capaz de tetramerizar a través de la superficie $\alpha 4\beta 6\alpha 6$, en correlación con la asociación al ADN (Trajtenberg *et al.*, 2014). Las estructuras resueltas en este trabajo muestran que la superficie $\alpha 1\alpha 5$ constituye, también, la mayor parte de la superficie de interacción de DesR con DesK en ambos estados funcionales. El análisis de la interfaz HK:RR muestra que las conformaciones de la hélice del dominio DHP en contacto con el regulador, tanto para el estado fosfatasa como fosfotransferasa, son virtualmente idénticas, interactuando así con la hélice $\alpha 1$, el bucle $\beta 5\alpha 5$ y el extremo N-proximal de la hélice $\alpha 5$ de DesR (Figura 24). Se observó que en ambos casos, dicha interfaz está mayoritariamente constituida de interacciones de van der Waals, en las que están involucrados residuos hidrofóbicos de ambos componentes. Como se verá más adelante, las diferencias más significativas entre los distintos estados funcionales se observan a nivel del sitio catalítico y en la disposición de los dominios CA, que

establecen algunos contactos diferenciales.

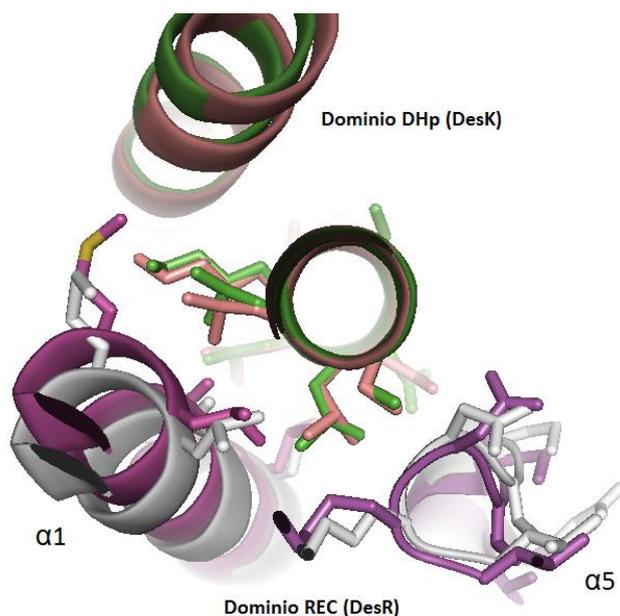


Figura 24. Superposición de las superficies de interacción del dominio DHP de DesK_{STAB} con la hélice $\alpha 1$ y el bucle $\beta 5\alpha 5$ que incluye el extremo N-proximal de la hélice $\alpha 5$ de DesR_{REC} (verde y magenta, respectivamente), y de DesK_{H188E} con DesR_{REC} (rosado y blanco, respectivamente).

La estructura de DesR_{REC} en ambos estados funcionales del complejo es muy similar, con un rmsd de 0,3 Å (881 vs 881 átomos; 0,2 Å tomando en cuenta 124 vs 124 C α únicamente), indicando que DesK reconoce una misma conformación del RR en ambos casos. Los cambios más drásticos entre la forma unida a DesK y las formas libres de DesR, se observan a nivel de algunos bucles entre elementos de la estructura secundaria (Figura 25). Globalmente, DesR_{REC} se asemeja más al estado activo, con un rmsd de 0,5 Å comparando 848 átomos de DesR_{REC} activo (PDB 4LE0); reduciéndose incluso a 0,3 Å tomando en cuenta sólo los 113 C α , en especial si uno considera los bucles $\beta 1\alpha 1$, $\beta 2\alpha 2$, $\beta 3\alpha 3$, la hebra $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$. La disposición de estos bucles en conformación tipo “activo”, permiten la formación del *cluster* de carboxilatos para la coordinación del magnesio en el sitio activo. Sin embargo, los bucles $\beta 4\alpha 4$ y $\beta 5\alpha 5$, así como la posición de la hélice $\alpha 6$, presentan características similares al estado inactivo de DesR (PDB 4LE1), lo cual es importante para asegurar que el Asp54 fosforilable se encuentre expuesto y en condiciones de recibir el fosforilo; o para su hidrólisis, dependiendo del estado funcional de DesK.

A diferencia de lo observado en otros RRs (Birck *et al.*, 1999, Roche *et al.*, 2002), la activación de DesR no está asociada a cambios rotaméricos del residuo aromático conservado de la hebra $\beta 5$ (Trajtenberg *et al.*, 2014): la comparación estructural de DesR en estados activo, inactivo, y en complejo con DesKC, muestra la misma conformación rotamérica de la Tyr99 en los tres casos, con la excepción de la formación de un enlace de hidrógeno del grupo hidroxilo de la Tyr99 con el oxígeno del enlace peptídico de la Phe82 en el estado activo fosforilado del regulador. Este enlace de hidrógeno podría asistir al movimien-

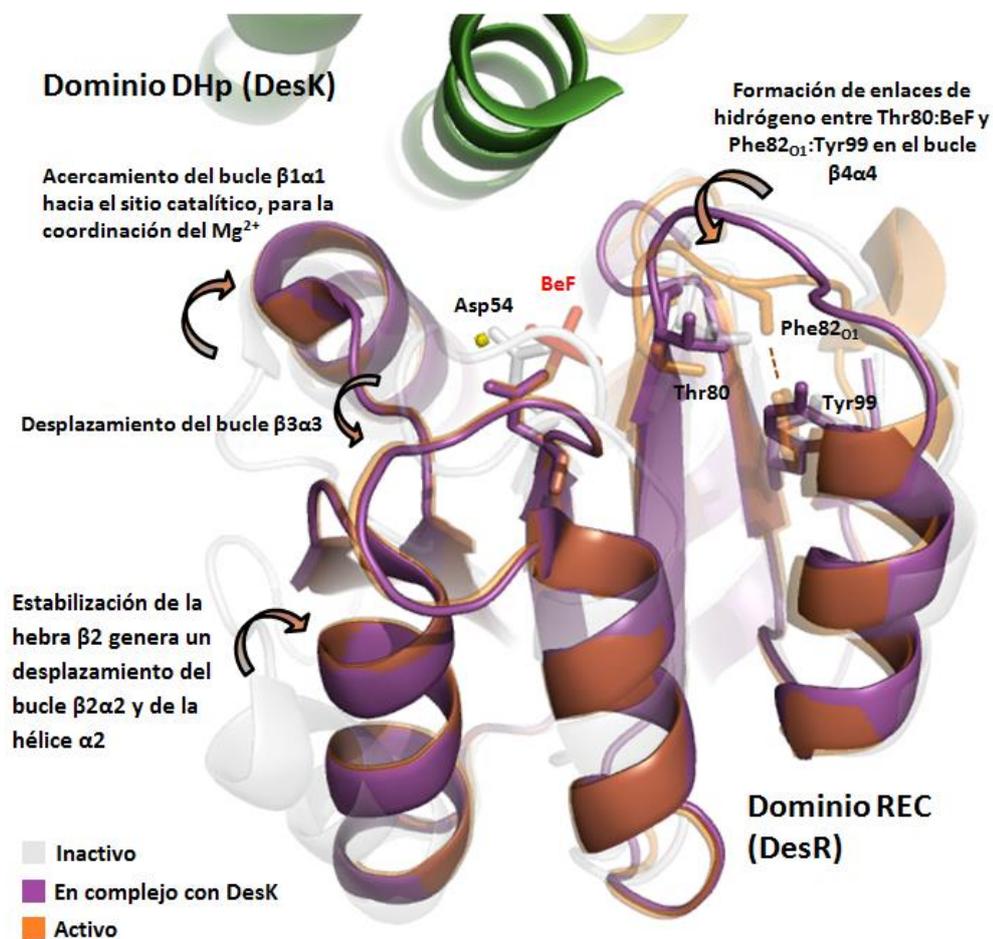


Figura 25. Superposición de la conformación de DesR_{REC} en los estados inactivo (blanco, PDB: 4LE1), activo (naranja, PDB: 4LE0) (Trajtenberg *et al.*, 2014) y el estado intermedio preactivo correspondiente al complejo fosfotransferasa (magenta). Las flechas indican los movimientos estructurales que sufre DesR_{REC} en la transición inactivo-preactivo-activo, detallado en la sección 4 de Resultados. Cabe resaltar que, en el estado inactivo, DesR_{REC} se encuentra en forma monomérica, y en el estado activo dimeriza mediante la misma superficie de interacción con DesKC (verde).

to de la Phe82, que se cierra sobre el P~Asp54 en la conformación activa, como se describirá más adelante. La fosforilación del Asp54 implica que la Thr80 se acerque sobre este sitio, estabilizando las cargas negativas del fosfato mediante un enlace de hidrógeno. Esto facilita el movimiento de la Phe82 del bucle $\beta 4\alpha 4$, que se cierra sobre el P~Asp54. En suma, la estructura de DesR_{REC} resuelta en ambos complejos, fosfatasa y fosfotransferasa, adopta una misma conformación “intermedia” con características tanto del estado inactivo como activo del regulador.

5. Análisis del sitio activo de los complejos: búsqueda de mecanismos involucrados en la regulación de la unidireccionalidad

El sitio catalítico del complejo fosfatasa DesKC_{STAB}:DesR_{REC} (Figura 26) muestra a una molécula de BeF₃⁻ unida covalentemente al Asp54 de DesR_{REC}, estabilizada por un catión de Mg²⁺ y los residuos

conservados Asp9, Thr80 y Lys102. A su vez, los residuos Asp9, Glu56, Asp54, y dos moléculas de agua completan la esfera de coordinación octahédrica del metal divalente. El fosfato se enfrenta a corta distancia de la Gln193 de DesKC_{STAB} (5,4 Å), siendo éste un residuo conservado en HKs de la familia HisKA_3 y que ha demostrado ser esencial para la actividad fosfatasa (Huynh *et al.*, 2010; Huynh & Stewart 2011). Se ha propuesto que la Gln193 posiciona correctamente el hidroxilo catalítico que actúa como nucleófilo en la hidrólisis del P~Asp (Pazy *et al.*, 2010). Cabe destacar que, si bien no se observó este hidroxilo o una molécula de agua en la estructura cristalográfica aquí obtenida, la distancia entre la Gln193 y el P del P~Asp es suficiente para acomodar al hidroxilo nucleofílico. En este trabajo, se intentó obtener el mutante DesKC_{Q193A} y confirmar el rol funcional de dicho residuo, sin embargo por el momento la sobre-expresión de dicha variante en *E. coli* ha resultado en una proteína insoluble. Por su parte, se observa a la His188 fosforilable en una posición orientada hacia el interior del *coiled-coil*, a una distancia de 19 Å del P~Asp; de esta manera, la oclusión de la His188 minimizaría la retrofosfotransferencia mientras se lleva a cabo la reacción fosfatasa.

La superposición estructural de DesKC_{STAB} con el mutante DesKC_{H188V}, muestra que en este último - en ausencia del regulador- la Gln193 se encuentra interaccionando mediante un puente salino con la Asn348 del dominio CA de la quinasa: tras la formación del complejo, la Gln10 de DesR_{REC} pasa a ocupar un bolsillo en la interfaz entre el DHP y el CA, promoviendo que la cadena lateral de la Gln193 se mueva hacia el P~Asp54 del regulador (Figura 27). Esto sugiere que la Gln10 puede ser un residuo clave en la interacción con DesKC en el estado fosfatasa.

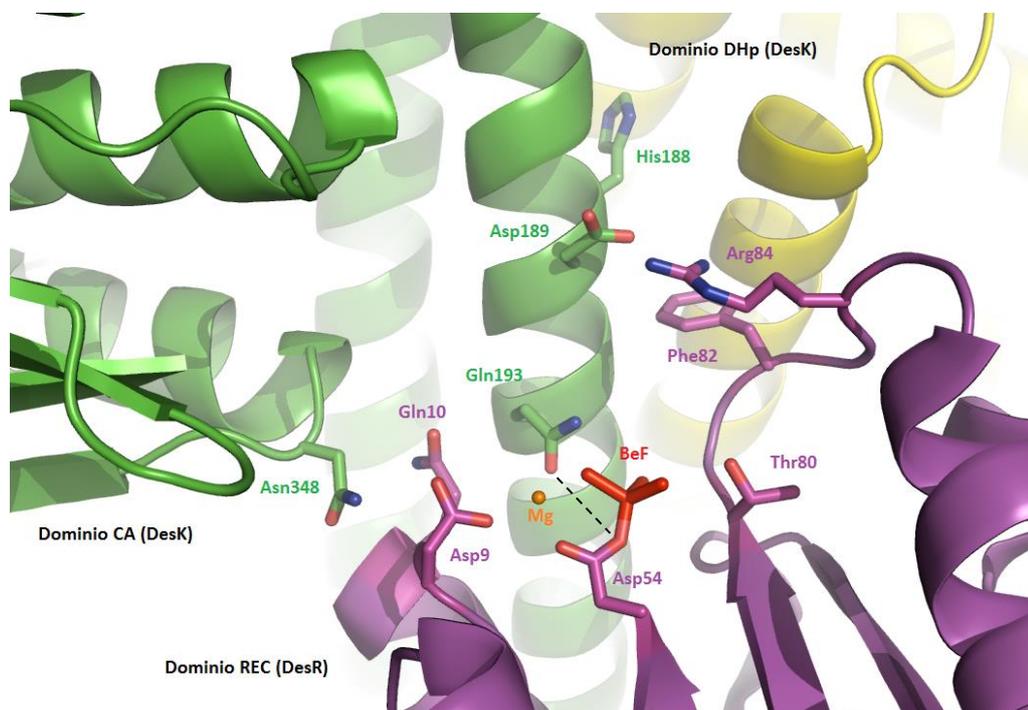


Figura 26. Sitio activo del complejo fosfatasa. Se observa en verde y amarillo el dímero de DesKC_{STAB}, en complejo con DesR_{REC} en magenta.

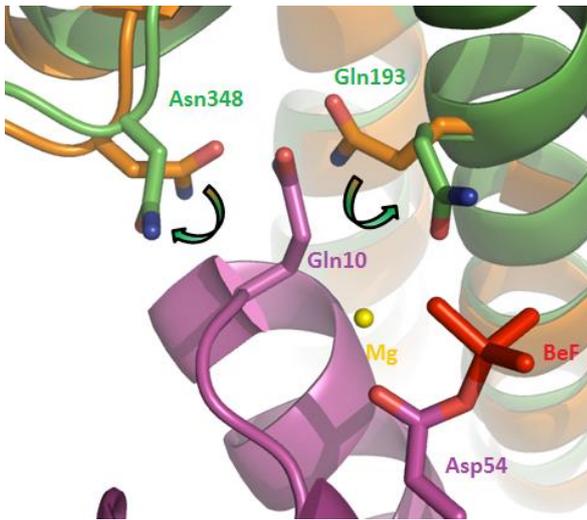


Figura 27. Superposición de DesK_{STAB} (verde) con la estructura cristalográfica de DesK_{H188V} (naranja). En magenta se muestra a DesR_{REC}, cuyo residuo Gln10 desplaza a los residuos Gln193 y Asn348 de DesK_{STAB}, permitiendo que la Gln193 se posicione correctamente cercana al Asp54 de DesR.

En la reacción de fosfotransferencia (Figura 28), la P~His188 se posiciona a distancia de interacción con la Thr80 altamente conservada. Esto sugiere que la Thr80 podría jugar un rol de “escolta” durante la reacción de fosfotransferencia, hasta la fosforilación del Asp54 en donde la interacción de la treonina con el fosfato es esencial. La P~His188 queda asimismo perfectamente alineada con el Asp54, para que ocurra la fosfotransferencia. Sin embargo, la distancia entre el Nε2 de la His188 y el Oδ1 del Asp54 es de 7,6 Å, significativamente mayor de la esperada en función de lo que se había observado para otros complejos de

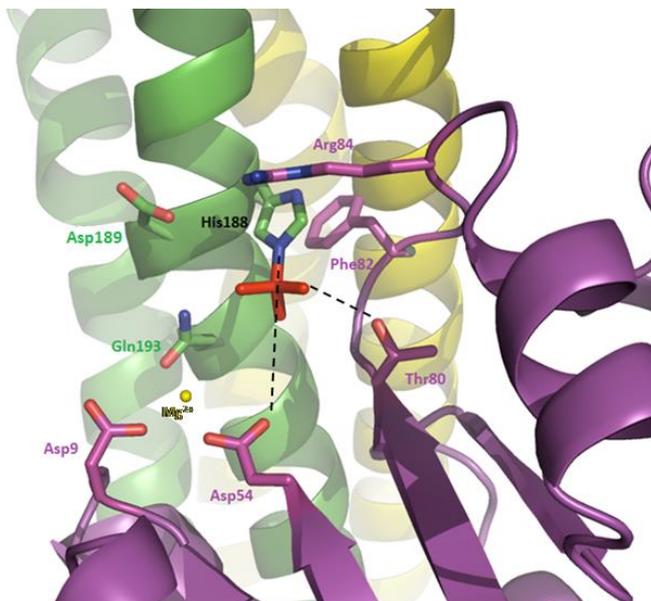


Figura 28. Sitio activo del complejo fosfotransferasa. Se muestran las cadenas de P~DesK_{wt} (verde, amarillo) en complejo con DesR_{REC} (magenta).

fosfotransferencia (Varughese *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008). Esto sugiere que la fosfotransferencia podría

ocurrir a través de un mecanismo disociativo de sustitución nucleofílica (Lassila *et al.*, 2011), o al menos con un mayor carácter disociativo. Esta hipótesis predice un papel importante de la Thr80_{DesR} que está perfectamente posicionada para estabilizar el metafosfato disociado en el estado de transición. Estamos generando mutantes (por Ser y por Ala) para aportar evidencia adicional sobre el rol de la Thr80 en fosfotransferencia.

El sistema de fosforrelevo para regulación de la esporulación en *B. subtilis* ha sido extensamente estudiado funcional y estructuralmente. Spo0F (RR) y Spo0B (HPT) se comportan como intermediarios en la fosfotransferencia, y se ha reportado que la transferencia del fosforilo es reversible *in vitro* (Burbulys *et al.*, 1991), aún cuando biológicamente la transferencia ocurre principalmente en la dirección del Asp de Spo0F a la His de Spo0B. El complejo Spo0B:Spo0F en presencia de BeF₃⁻ reportado por Varughese *et al.*, muestra una distancia entre el Asp y la His de entre 4,9 y 5,2 Å (Figura 29A). Con el objetivo de buscar determinantes comunes y elementos distintivos entre complejos que catalizan la fosfotransferencia reversible e irreversible, es que realizamos un análisis estructural de todos los complejos HK:RR y HPT:RR disponibles. Considerando la distancia entre el Asp y la His, así como sus distancias relativas a la posición del Mg²⁺, es posible agrupar las estructuras de complejos conocidas en dos conjuntos (Figura 29B): (i) complejos que catalizan fosfotransferencia irreversible, y (ii) complejos que fosfotransfieren reversiblemente. En suma, la distancia entre His y Asp fosforilable, así como la posición del Mg²⁺ en el sitio catalítico, parecen ser determinantes en la definición de direccionalidad.

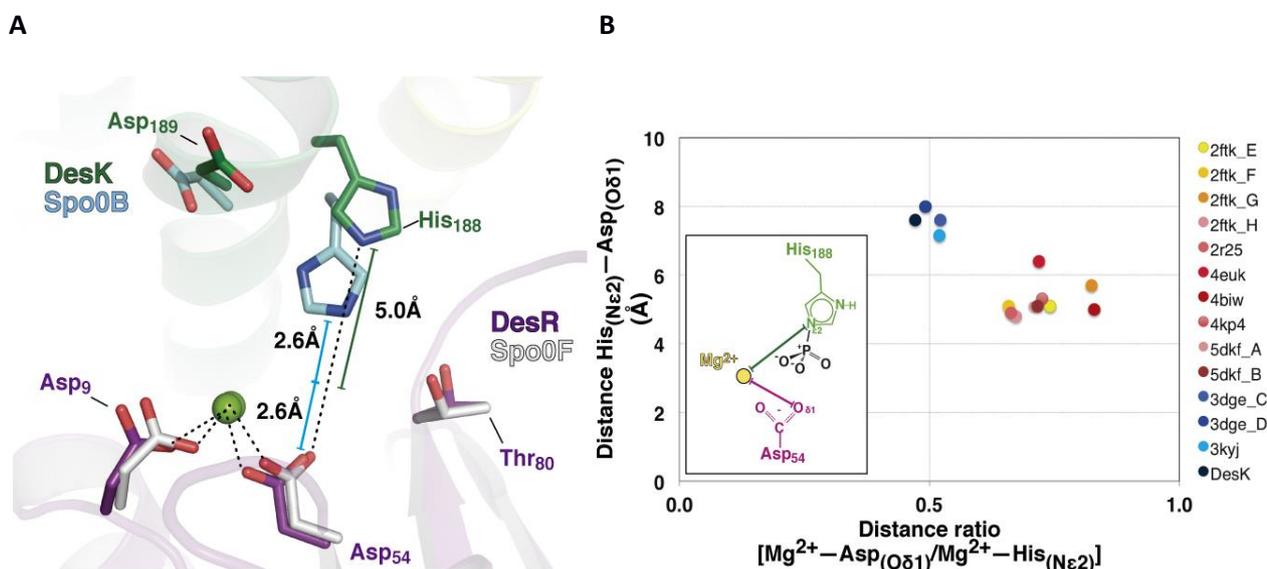


Figura 29. (A) Comparación de la distancia His-Asp en la reacción de fosfotransferencia del par unidireccional canónico DesK-DesR, contra el par bidireccional Spo0B-Spo0F (PDB: 2FTK) perteneciente a un fosforrelevo. DesK: verde; Spo0B: celeste; DesR: violeta; Spo0F: blanco. **(B)** Complejos HK:RR unidireccionales (azul, negro) vs complejos HPT:RR bidireccionales (rojo, naranja, amarillo). El eje de las abscisas muestra la asimetría geométrica producida por la posición del magnesio, representada por el cociente entre la distancia Mg²⁺-Oδ1 del grupo carboxilo de Asp y la distancia Mg²⁺-Nε2 del grupo imidazol de His, esquematizado en el *inset*. El eje de las ordenadas representa la distancia entre Nε2 y Oδ1. A la derecha se indican los números de acceso (PDB) para los complejos utilizados. Fuente: Trajtenberg *et al.*, 2016.

6. Actividades de fosfotransferencia directa, reversa y autodesfosforilación *in vitro* de DesKC:DesR

Para observar la fosfotransferencia directa (desde el P~His188 de DesKC hacia el Asp54 de DesR), se incubó a P~DesKC (sólo se autofosforila uno de los dos monómeros de la HK, de ahí que se observa aproximadamente un 50% de proteína fosforilada (Trajtenberg *et al.*, 2010)), junto con DesR_{REC} en concentraciones equimolares, y un exceso de MgCl₂. La fosfotransferencia directa se completa antes de los 5 min de reacción (Figura 30), cuando la fracción fosforilada de DesKC disminuye a 0%, producto de la transferencia de fosforilo a DesR. Esto no se debe a una potencial autodesfosforilación de la quinasa, ya que la fracción fosforilada de DesKC en ausencia de DesR continúa siendo aproximadamente de un 50% al cabo de 30 minutos (datos no mostrados). A los 5 minutos de reacción, una vez que se completó la fosfotransferencia directa, comienza a observarse una disminución en la fracción fosforilada de DesR_{REC}, producto de la actividad fosfatasa de DesKC sobre el regulador, consistente con reportes previos (Albanesi *et al.*, 2004). Como se verá más adelante, la vida media del P~Asp de DesR es del orden de horas, por lo que esta disminución de la fracción fosforilada de DesR no se debe a su autodesfosforilación. En suma, en los ensayos *in vitro* se observan las actividades catalíticas fosfatasa y fosfotransferasa de DesKC sobre DesR, de forma simultánea. Es importante tener esto en cuenta para el análisis de todos los ensayos realizados en esta sección.

Para observar la fosfotransferencia reversa basal (desde el P~Asp54 de DesR hacia la His188 de DesKC), se incubó a P~DesR_{REC} junto con DesKC en concentraciones equimolares, y un exceso de MgCl₂. Cabe resaltar que en estos experimentos DesKC no se encuentra completamente desfosforilado, sino que presenta una pequeña fracción fosforilada (aproximadamente 10% de P~DesKC sobre el total) proveniente del extracto celular del que se purificó. La reacción se muestra en la Figura 31, donde se observó un leve

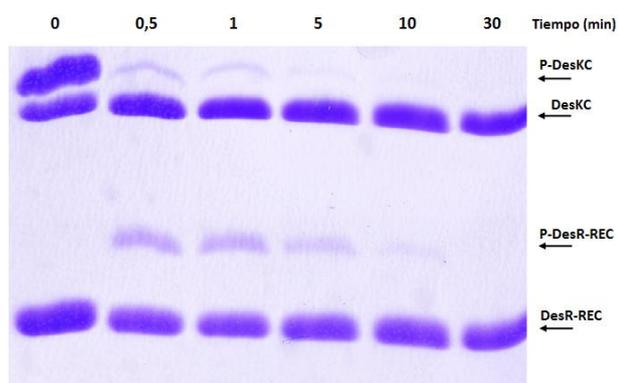


Figura 30. Actividad fosfotransferasa directa de P~DesKC hacia DesR_{REC} y posterior actividad fosfatasa de DesKC sobre P~DesR_{REC}, analizadas en un gel *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó P~DesKC 30 μ M en conjunto con DesR_{REC} 30 μ M y MgCl₂ 30 mM, y se detuvo la reacción a tiempos 0, 0,5, 1, 5, 10 y 30 min.

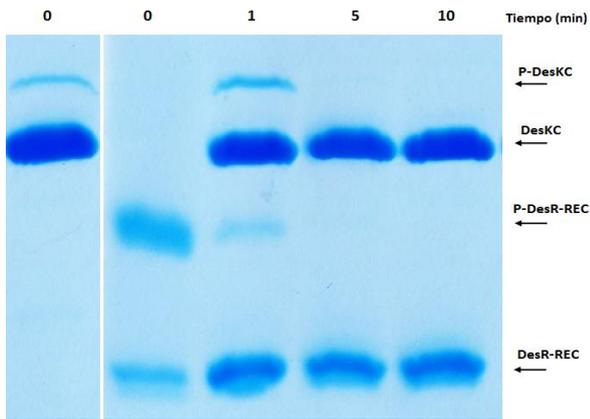


Figura 31. Actividad fosfotransferasa reversa de P~DesR_{REC} hacia DesKC y actividad fosfatasa de DesKC sobre P~DesR_{REC}, analizadas en un gel *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó DesKC 30 μ M en conjunto con P~DesR_{REC} 30 μ M y MgCl₂ 30 mM y se detuvo la reacción a tiempos 1, 5 y 10 min. Se muestra también a DesKC y P~DesR_{REC} a tiempo 0.

pero significativo aumento (ver Figura 34, tiempo 1 min de la cuantificación por densitometría) en la fracción fosforilada de DesKC al minuto de reacción, producto de la retrofosfotransferencia basal de DesR hacia DesK previamente documentada (Albanesi *et al.*, 2004). Posteriormente, la fracción fosforilada de DesKC desaparece, producto de la migración del fosforilo desde DesKC hacia DesR_{REC}, así como también se observa la actividad fosfatasa subsecuente de DesKC sobre DesR.

Estudios previos sugerían que en ausencia del metal divalente, se produce un aumento en la retrofosfotransferencia basal (Dutta & Inouye, 1996; Albanesi *et al.*, 2004). Además, y en función de nuestros datos estructurales, hipotetizamos que la posición del magnesio respecto al oxígeno del carboxilo del Asp del RR y al nitrógeno del imidazol de la His de la HK, puede ser determinante de la direccionalidad de la fosfotransferencia. Para obtener datos directos sobre el rol del catión divalente en la reacción de fosfotransferencia reversa en nuestro sistema de estudio, se incubó a P~DesR_{REC} con DesKC en concentraciones equimolares, y en presencia del quelante de metales EDTA. En dicha reacción se favoreció significativamente la retrofosfotransferencia (Figura 32), mientras que las cinéticas de las actividades fosfotransferasa directa y fosfatasa no son apreciables. Esto demuestra que la actividad retrofosfotransferasa es independiente de la presencia del magnesio catalítico. En segundo lugar, la Figura 33 muestra la reacción de fosfotransferencia reversa en presencia de un exceso de calcio, empleado como metal divalente en la reacción. Estudios previos con otros RRs indican que el calcio puede sustituir al magnesio como metal coordinador del fosforilo (Kar *et al.*, 1992; Needham *et al.*, 1993). Si bien resta evaluar las afinidades de unión de cada uno de estos metales a DesR_{REC}, se observó que la retrofosfotransferencia aumenta hasta fosforilar aproximadamente un 30% de DesKC (ver Figura 34). Por su parte, las actividades fosfotransferasa y fosfatasa posteriores también se ven disminuídas respecto al ensayo con exceso de magnesio. Estos resultados indican que el calcio presenta menor eficiencia que el magnesio para la catálisis de dichas actividades, favoreciendo la retrofosfotransferencia. La Figura 34

muestra la cuantificación por densitometría de la proporción de P-DesKC en función del tiempo.

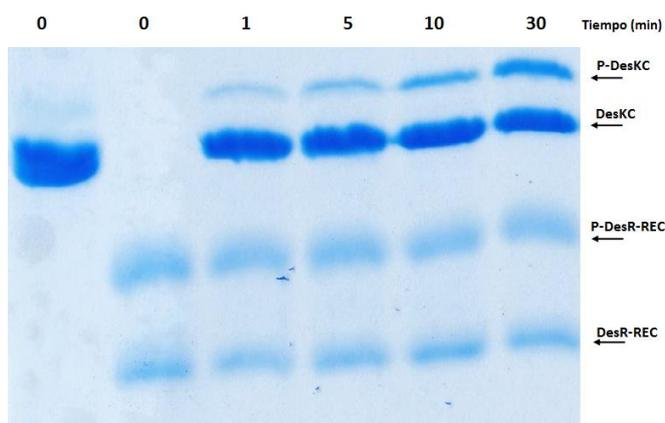


Figura 32. Actividad fosfotransferasa reversa de P~DesR_{REC} hacia DesKC en ausencia de Mg²⁺. Se incubó DesKC 30 μM en conjunto con P~DesR_{REC} 30 μM y EDTA 10 mM, y se detuvo la reacción a tiempos 1, 5, 10 y 30 min. Se muestra también a DesKC y P~DesR_{REC} a tiempo 0.

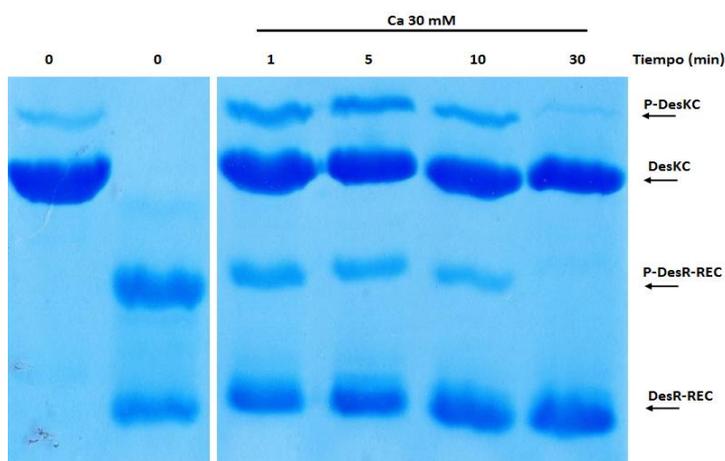


Figura 33. Actividad fosfotransferasa reversa de P~DesR_{REC} hacia DesKC en presencia de calcio. Se incubó DesKC 30 μM en conjunto con P~DesR_{REC} 30 μM y CaCl₂ 30 mM, y se detuvo la reacción a tiempos 1, 5, 10 y 30 min. Se muestra también a DesKC y P-DesR_{REC} a tiempo 0.

El residuo en la posición T+2 del bucle β4α4 de DesR_{REC} (es decir, dos residuos hacia el extremo C-terminal de la Thr80 conservada), juega un papel importante en las cinéticas de autofosforilación y autodesfosforilación de los RRs (Pazy *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2016). En DesR, este residuo es la Phe82, y el análisis estructural sugiere que puede jugar un papel importante, ya que en el estado activo y fosforilado, su cadena lateral forma una “tapa” que protegería de la hidrólisis espontánea del P~Asp (Trajtenberg *et al.*, 2014). En el complejo DesKC_{STAB}:DesR_{REC}, la Phe82 se inserta en un bolsillo hidrofóbico entre las hélices α1 y α2 de DesK. Esta configuración implica que en la interacción, DesK en estado fosfatasa promueve la apertura de esta tapa (Figura 35), exponiendo el fosfato al solvente y promoviendo su consecuente hidrólisis. Para evaluar la importancia de este residuo en estabilizar la forma fosforilada de DesR_{REC} se realizó mutagénesis puntual por alanina generando el mutante DesR_{REC}-F82A. La

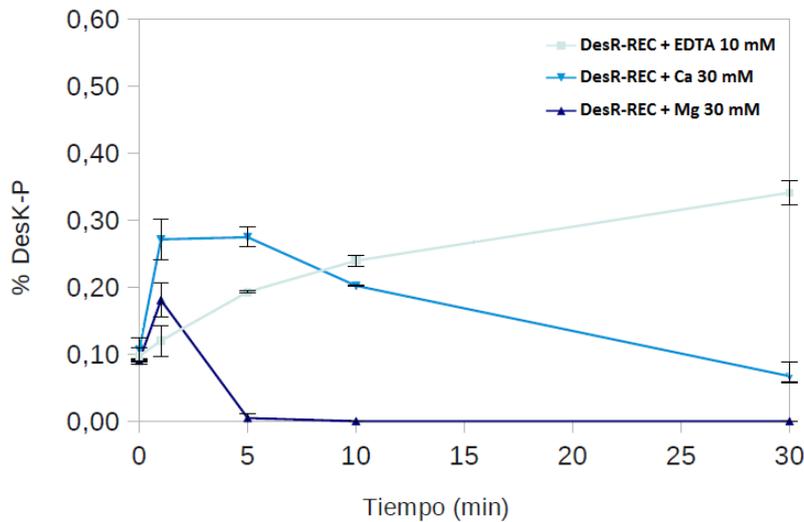


Figura 34. Cuantificación por densitometría de la fracción fosforilada de DesKC en función del tiempo al incubarse con DesR_{REC} en presencia de EDTA, exceso de calcio y exceso de magnesio. El aumento de la fracción fosforilada de DesKC al primer minuto de reacción se debe a la actividad retrofosfotransferasa de P[~]DesR_{REC} sobre la HK. Los ensayos se realizaron por triplicado.

fosforilación de DesR_{REC} y DesR_{REC-F82A} se realizó mediante incubación de las mismas con acetil fosfato, y posteriormente fueron purificadas por desalado. El decaimiento de las especies fosforiladas se analizó mediante *PhosTag*-SDS-PAGE (Figura 36): el ajuste a la escala logarítmica mostró que la vida media del fosfoaspartato en DesR_{REC-F82A} es tres órdenes de magnitud inferior a la del fosfoaspartato del dominio receptor sin modificar (Figura 37), confirmando el rol de la Phe82 en evitar la autodesfosforilación del regulador.

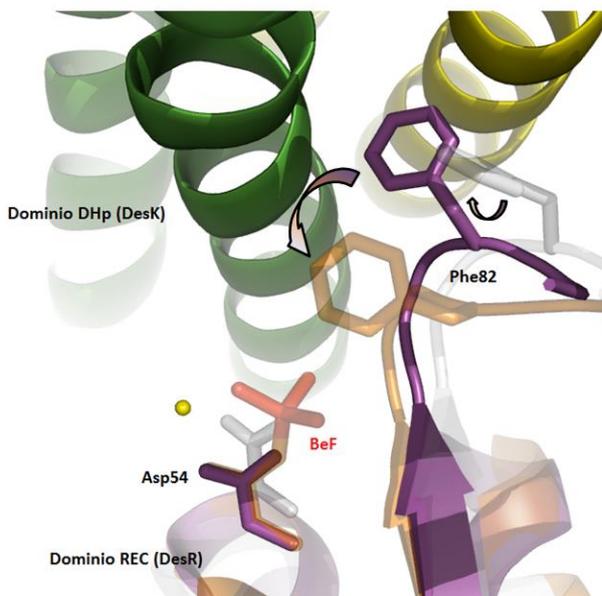


Figura 35. Comparación estructural de los distintos estados funcionales de DesR_{REC}. Al estar desfosforilado e inactivo (blanco), la Phe82 presenta una conformación “abierta”; cuando DesR_{REC} interactúa con DesKC en ambos complejos (magenta), la Phe82 se inserta en un bolsillo hidrofóbico del dominio DHp y se da la fosfotransferencia. Finalmente, al fosforilarse DesR en el estado activo (naranja), la Phe82 se “cierra” sobre el fosfoaspartato.

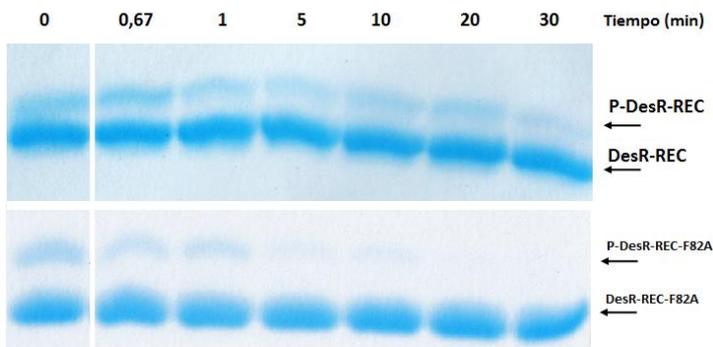


Figura 36. Autodesfosforilación de DesR_{REC-wt} y DesR_{REC-F82A} analizadas por *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó DesR-REC (*wt*) ó DesR-REC-F82A con acetil fosfato por una hora y luego el exceso del dador de fosfato fue eliminado utilizando una columna de desalado *MiniTrap* G-25. En ambos casos se partió de una muestra con aproximadamente 30% de fracción fosforilada (ver Figura 37). La reacción de autodesfosforilación se detuvo a los tiempos 0.67, 1, 5, 10, 20 y 30 min.

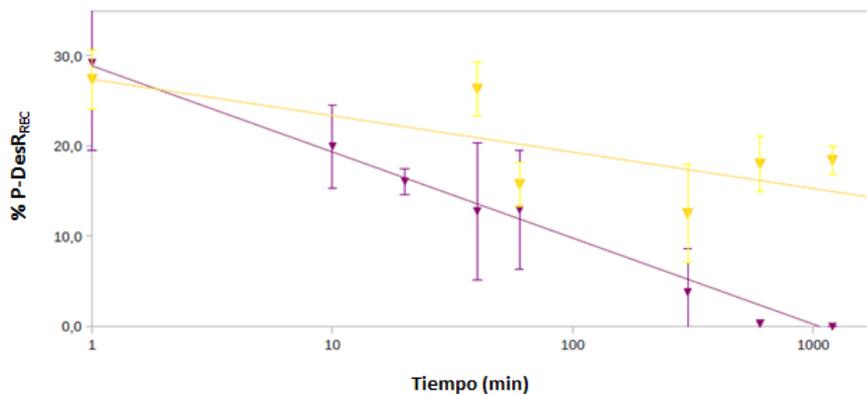


Figura 37. Cuantificación por densitometría de los gels de la Figura 35, donde se muestra el decaimiento por autodesfosforilación de la fracción fosforilada de DesR_{REC} (amarillo) y DesR_{REC-F82A} (magenta). La vida media está representada por los valores de las pendientes de los gráficos. Los valores obtenidos se ajustaron a una linealización logarítmica. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En el complejo en estado fosfotransferasa, la Phe82 ocupa una posición equivalente, muy cercana a la P[~]His188. En función del papel protector de este residuo, es pertinente preguntarse si además es importante para evitar reacciones fútiles de retrofosfotransferencia o desfosforilación inmediata, posterior a la transferencia directa en el complejo fosfotransferasa. Para el ensayo de fosfotransferencia, se incubó a DesKC fosforilada junto con el mutante DesR_{REC-F82A}, y se compararon las cinéticas de fosfotransferencia (Figura 38): se observó una disminución en la transferencia de fosforilo desde DesKC hacia el mutante respecto a la proteína *wild-type*, sugiriendo que la Phe82 podría estar afectando el entorno de la His fosforilada, y por ende en su capacidad de ser un donante de fosfato. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las cinéticas de desfosforilación de DesR_{REC} y DesR_{REC-F82A}, por parte de DesKC. La disminución de la velocidad de fosfotransferencia en el mutante Phe82Ala podría también ser resultado

de una pérdida de afinidad de DesR_{REC-F82A} por DesKC, aunque esta opción parece menos probable: si bien no hemos realizado aún ensayos de calorimetría por titulación isotérmica, las actividades fosfatasa de DesKC sobre ambas variantes de DesR son similares; si la afinidad de DesR_{REC-F82A} por DesKC disminuyera, esperaríamos observar también una disminución en la actividad fosfatasa sobre el RR mutante (Gao & Stock, 2013).

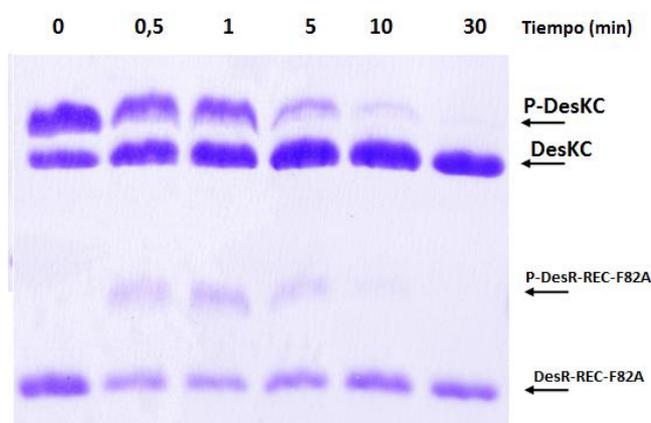


Figura 38. Actividad fosfotransferasa directa de P~DesKC hacia DesR_{REC-F82A} y posterior actividad fosfatasa de DesKC sobre P~DesR_{REC-F82A}, analizadas en un gel *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó P~DesKC 30 μ M en conjunto con DesR_{REC-F82A} 30 μ M y MgCl₂ 30 mM, y se detuvo la reacción a tiempos 0, 0,5, 1, 5, 10 y 30 min.

Dado que la estabilidad del P~Asp54 es sensiblemente más baja en el mutante DesR_{REC-F82A}, para analizar si la Phe82 participa en evitar la reacción de retrofosfotransferencia una vez que DesK transmitió el fosforilo a DesR, se incubó un exceso de P~DesR_{REC} o de P~DesR_{REC-F82A} (previamente fosforilados con acetilfosfato), en presencia de DesKC, en una relación molar HK:RR de 1:6, con el fin de observar diferencias en la reacción de retrofosfotransferencia. En ambos casos ocurre la retrofosfotransferencia basal previamente documentada, aunque sin diferencias significativas entre las formas *wild-type* y mutante de DesR_{REC} (Figura 39). En suma, los ensayos sugieren que la Phe82, si bien es importante para regular la velocidad de auto-desfosforilación de DesR_{REC}, así como la de fosfotransferencia de P~DesKC al regulador, no juega un rol importante en asegurar la unidireccionalidad del flujo de información.

La Arg84 de DesR muestra una interacción diferencial en ambos complejos (Figura 40): mientras que interacciona con el Asp189 de DesK_{STAB} en el complejo fosfatasa, en el caso del fosfotransferasa se encuentra interaccionando con el Glu188, que reemplaza a la fosfo-histidina en DesK_{wt}. Dicho cambio en la interacción es producto de la rotación de las hélices en la transición fosfatasa-fosfotransferasa, que aleja al Asp189 de su interacción con la Arg84. En otras estructuras del complejo fosfotransferasa resueltas por nuestro laboratorio, dicha arginina no se encuentra modelada por carecer de densidad electrónica definida en la cadena lateral de este residuo. Esto podría sugerir que la Arg84 cumple un papel en el reconocimiento específico de la HK en su estado fosfatasa, aun cuando debemos hacer notar que no es una posición conservada entre todos los RRs. Para estudiar la importancia de esta posición, se evaluó la actividad fosfatasa de DesKC sobre DesR_{REC} y una variante con la sustitución de la Arg84 por alanina (DesR_{REC-R84A}). Pa-

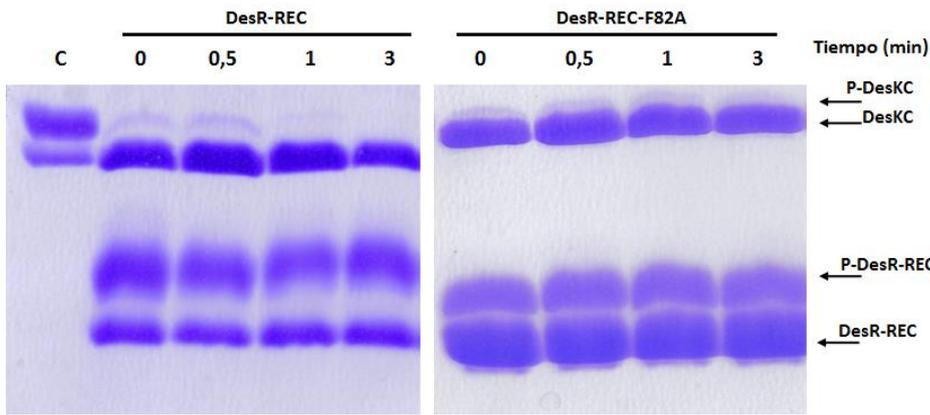


Figura 39. Análisis de retrofosfotransferencia desde las variantes de DesR hacia DesKC, mediante la incubación de un exceso de P^{\sim} DesR (relación molar HK:RR 1:6), en un gel *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó ambas variantes de DesR con acetil fosfato por una hora y se realizó una cromatografía de gel filtración (PD MiniTrap G-25), para obtener a P^{\sim} DesR_{REC}. Se observa a P^{\sim} DesKC fosforilado como referencia (C), y las reacciones con P^{\sim} DesR_{REC} y P^{\sim} DesR_{REC-F82A}, detenidas a tiempos 0, 0.5, 1 y 3 min.

ra ello, se incubó P^{\sim} DesR_{REC-R84A}, previamente fosforilado con acetil fosfato, en presencia de DesKC en concentraciones equimolares. La reacción se detuvo a distintos tiempos y la cinética se analizó mediante *PhosTag*-SDS-PAGE y cuantificación por densitometría, como se desarrolló anteriormente (Figura 41). El ensayo mostró una disminución significativa en la cinética fosfatasa de DesKC sobre P^{\sim} DesR_{REC-R84A}, en comparación con P^{\sim} DesR_{REC}. Adicionalmente, la cuantificación por densitometría de las actividades fosfatasa en ambos casos mostró un comportamiento bifásico, en donde hay una primera etapa de desfos-

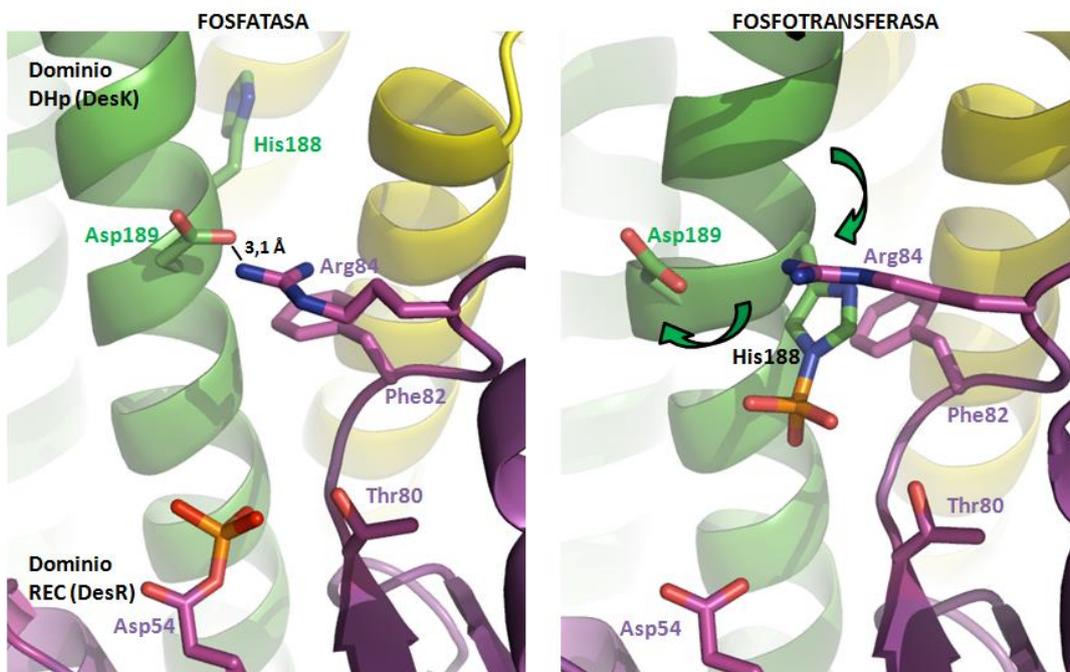


Figura 40. Comparación estructural de la interacción Asp189(DesK, verde-amarillo):Arg84(DesR, magenta) a nivel del sitio catalítico. Se observa que en el complejo fosfatasa (izquierda), la Arg84 interacciona mediante un puente salino con el Asp189. Esta interacción se pierde en el complejo fosfotransferasa (derecha), producto de la rotación de las hélices centrales del dominio DHP de DesK que exponen la P^{\sim} His188.

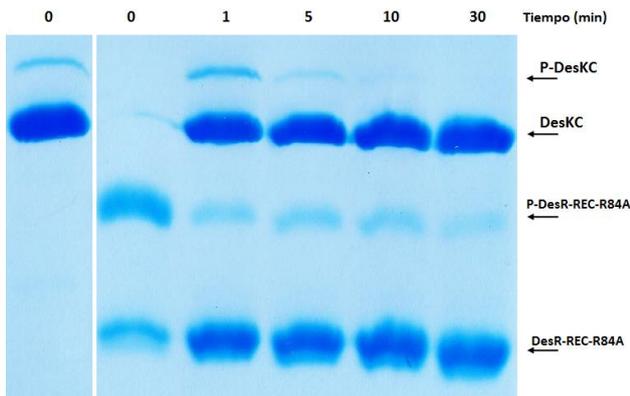


Figura 41. Actividad fosfatasa de DesKC sobre P~DesR_{REC-R84A}, analizada en un gel *PhosTag*-SDS-PAGE 13% acrilamida. Se incubó DesKC 30 μ M en conjunto con P~DesR_{REC-R84A} 30 μ M y MgCl₂ 30 mM y se detuvo la reacción a tiempos 1, 5 y 10 min. Se muestra también a DesKC y P~DesR_{REC} a tiempo 0.

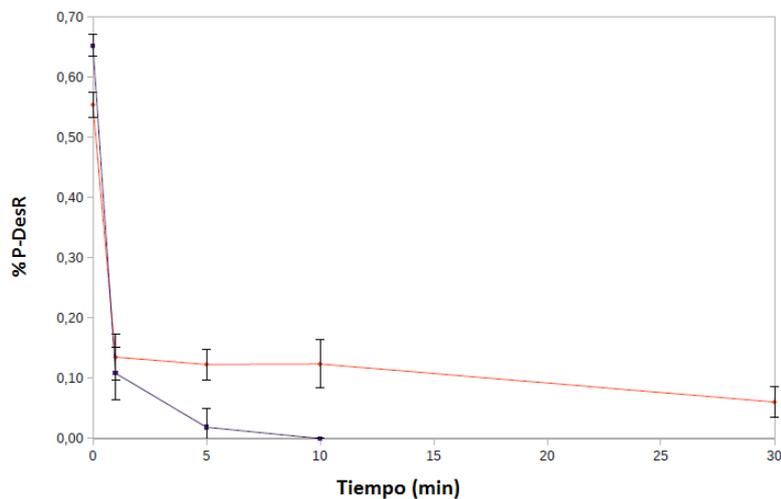


Figura 42. Cuantificación por densitometría de la fracción fosforilada de DesR_{REC} (azul) y DesR_{REC-R84A} (rojo) en función del tiempo al incubarse con DesKC en presencia de MgCl₂ 30 mM. Los ensayos se realizaron por triplicado.

forilación acelerada, seguido de una segunda etapa de desfosforilación más lenta; este comportamiento es más notorio en el caso de DesR_{REC-R84A} (Figura 42). Es importante resaltar que las cinéticas de esta primera etapa de desfosforilación son muy similares en ambas variantes de DesR; asimismo, la actividad fosfotransferasa directa no sufre cambios significativos en ambos casos, lo que sugiere que la diferencia entre la actividad fosfatasa sobre una y otra variante se debe a la ausencia del residuo de arginina, y no a cambios en la afinidad de reconocimiento de la HK sobre el RR. En suma, estos resultados indican que el residuo Arg84 es importante para la actividad fosfatasa de la HK sobre el RR.

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La señalización celular requiere de *especificidad*, para asegurar que un estímulo dado se conecte a una respuesta adaptativa definida, al mismo tiempo que se minimice la comunicación cruzada; *eficiencia*, para evitar el desperdicio de energía celular mediante ciclos fútiles; y *direccionalidad*, para garantizar el flujo correcto de información desde el estímulo hacia la respuesta adaptativa. En este contexto, los SDCs constituyen un modelo biológico interesante para entender los mecanismos involucrados en el control de la señalización, al consistir en vías sencillas y ampliamente estudiadas en sus respectivos contextos bioquímicos y biológicos. Mediante una estrategia experimental basada en mutagénesis racional, producción y purificación de proteínas recombinantes, cristalografía de rayos X, y ensayos de fosfotransferencia y desfosforilación *in vitro*, esta Tesis de Maestría ha aportado un significativo avance en la comprensión de los mecanismos moleculares de la transmisión específica, eficiente y direccional de la información en SDCs. Las características estructurales y funcionales descritas, permiten concluir que las estructuras cristalográficas presentadas en este trabajo, DesK_{STAB}:DesR_{REC} y DesK_{H188E}:DesR_{REC}, representan fotografías instantáneas de las reacciones de desfosforilación y de fosfotransferencia, respectivamente. Estos complejos han sido generados a partir de la utilización de mutantes de la HK DesK, estabilizados en dichos estados funcionales (Albanesi *et al.*, 2009; Saita *et al.*, 2015). Las variantes presentan mutaciones que apuntan a hiperestabilizar ciertas interacciones intramoleculares (DesK_{STAB}), o bien, a mimetizar el estado fosforilado (DesK_{H188E}), con el fin de atrapar a la HK en conformaciones discretas con relevancia funcional (distintos estados catalíticos o de señalización). Esta aproximación abre la posibilidad de aplicar ingeniería de proteínas a otras HKs, de manera de obtener estructuras de complejos HK:RR representativos de otras familias (diferentes a DesK y DesR), para poder discernir principios generales de aquellos específicos de este SDC.

El complejo fosfatasa DesK_{STAB}:DesR_{REC} se caracteriza por una simetría intrínseca, resultado de la estabilización del superenrollamiento tipo *coiled-coil* y una extensa interfaz entre los dominios CA y DHp de la HK. En el contexto celular, la estabilización del *coiled-coil* se produce a temperaturas mayores a 30 °C, donde las características de la membrana plasmática (*i.e.*, membrana más fluida y de menor grosor) estabilizarían una cierta organización del dominio sensor de transmembrana, que a su vez consolida esta conformación “rígida” de la región intracelular de la quinasa, manteniendo a los dominios CA imposibilitados de autofosforilar la His188. Esto inhibe las actividades autoquinasa y fosfotransferasa, manteniendo a DesK en un estado “apagado” (Martin & de Mendoza, 2013). *B. subtilis* es una bacteria mesófila, por lo que las temperaturas a las que se enfrenta suelen variar entre los 15 y los 35 °C, sugiriendo que en condiciones fisiológicas el estado “apagado” de la vía alterna con el estado “encendido”. Albanesi y colaboradores, previamente demostraron que la His188 de DesK no es requerida para la actividad fosfatasa (Albanesi *et al.*, 2004). Consistente con dichos hallazgos, el complejo fosfatasa muestra a la His188 fosforilable de DesK orientada hacia el interior del dominio DHp, a 19 Å aproximadamente del sitio de

fosforilación en DesR. Esta disposición constituye simultáneamente un mecanismo eficaz para minimizar la retrofosfotransferencia.

En la estructura cristalográfica de DesK_{H188V} resuelta previamente (Albanesi *et al.*, 2009), el *coiled-coil* N-terminal está presente a pesar de carecer de las mutaciones hidrofóbicas hiperestabilizantes. En este caso la sustitución de la His188 por una Val favorece el posicionamiento de este residuo hacia el interior del DHp generando una rotación en las hélices. Teniendo en cuenta estos resultados, es posible sugerir un mecanismo en el cual dicha rotación helicoidal se encuentre alostéricamente acoplada a la estabilización del *coiled-coil* y a la formación de una interfaz estable entre los dominios CA y DHp en este estado catalítico. La Gln193, que previamente ha sido reportada como esencial para la actividad fosfatasa de NarX (Huyhn *et al.*, 2010), se ubica a una distancia cercana, de 5,4 Å al P~Asp54 de DesR_{REC}. El motivo conservado DxxxQ, ubicado un residuo hacia el C-terminal de la His fosforilable de HKs de la familia HisKA_3 (como DesK), es análogo al motivo ExxN, ubicado en la misma posición, y presentes en HKs de la familia HisKA. Los complejos CheZ:CheY de *E. coli* (CheZ presenta el motivo DxxxQ; Pazy *et al.*, 2010), RapH:Spo0F de *B. subtilis* (RapH presenta dicha Gln catalítica; Parashar *et al.*, 2011) o CheX:CheY3 de *Borrelia burgdorferi* (CheX en cambio presenta el motivo ExxN; Pazy *et al.*, 2010) muestran que el sitio catalítico entre estas fosfatasas auxiliares y sus respectivos reguladores presentan grandes similitudes a las observadas en el complejo DesK:DesR, independientemente de sus diferencias estructurales, lo que representa un claro ejemplo de evolución convergente. Se ha propuesto que la glutamina participa posicionando a la molécula de agua catalítica, pero se desconoce qué residuo actuaría como base general para la activación nucleofílica de la misma. También se ha postulado que este residuo podría ser el responsable de remover un protón del agua (Khrenova *et al.*, 2015); sin embargo no existen pruebas suficientes, y es más que discutible que pueda actuar como base general, a sabiendas de que se trata de un grupo amida. Nosotros proponemos que la amina del grupo amida de la Gln, podría ser un excelente dador de puente de hidrógeno a la molécula de agua catalítica, de modo que uno de los oxígenos de coordinación del Mg²⁺ actúe de base general con mayor eficiencia sobre la misma, transformando dicha agua (un pobre nucleófilo) en un hidroxilo catalítico eficaz para atacar al fósforo del fosfato saliente. Este escenario es consistente con todos nuestros datos, y podría explicar su importancia en los ensayos con mutantes (Lasilla *et al.*, 2011).

Se sabe que la disminución de la temperatura ambiental a <25 °C resulta en un engrosamiento de la membrana plasmática y una pérdida en su fluidez. Estas modificaciones bien pueden estabilizar cambios conformacionales en el dominio transmembrana sensor de DesK, que se pueden luego transmitir directamente a lo largo del haz de hélices α que constituyen el dominio DHp citoplasmático. Se ha visto que HKs que presentan dominios HAMP pueden ser activadas mediante este tipo de movimientos rotacionales (Hulko *et al.*, 2006) y más recientemente se ha demostrado que movimientos de tipo pistón pueden transducirse a movimientos rotacionales (Gushchin *et al.*, 2017). Esto es de hecho lo que se observa comparando las estructuras de DesKC desde el estado fosfatasa hacia el estado quinasa-competente (pre-fosforilación) o fosfotransferasa (con la HK ya fosforilada) (Albanesi *et al.*, 2009); dichos movimientos de

rotación expondrían la histidina para permitir que se autofosforile y luego poder enfrentar al aspartato fosforilable de DesR_{REC}. La acción de la desaturasa, inducida por P~DesR, introduce dobles enlaces en los ácidos grasos saturados de los fosfolípidos *in situ* (la desaturasa es una enzima de transmembrana, dependiente de O₂), recuperando fluidez en la membrana como respuesta homeostática, y en definitiva llevando al apagado de la vía DesK-DesR.

La plasticidad conformacional de DesK modula su actividad catalítica, mediante la rotación de sus hélices centrales, y reconociendo una única conformación intermedia de DesR_{REC} con características tanto del estado activo como inactivo. Esta estructura en este contexto es más similar a la forma activa de DesR_{REC} libre. El RR, por su parte, aporta la maquinaria catalítica necesaria para llevar a cabo las reacciones, al presentar los residuos conservados para la coordinación del magnesio. ¿Cómo se explica que las distintas conformaciones funcionales de DesK, reconozcan una única conformación de DesR? La conformación de DesR, en el contexto de la interacción con DesK, presenta características estructurales que posibilita que DesK catalice cualquiera de las dos reacciones, de fosfotransferencia o desfosforilación. Sin embargo, es DesK quien en definitiva dictará la catálisis de una u otra reacción, mediante: (i) la reconfiguración del centro de reacción, basado en el posicionamiento diferencial de la His en ambas reacciones actuando como un “interruptor”, y (ii) contactos diferenciales con DesR_{REC}, que involucran a los dominios DHp y CA de la HK. Se ha mencionado previamente que existen argumentos a favor de la existencia de estados conformacionales intermedios de los RRs (Dyer & Dahlquist, 2006; Stock & Guhaniyogi, 2006; Fernández *et al.*, 2015), adicionales a los extremos “inactivo” y “activo”, lo cual establece un panorama más complejo en el entendimiento de cómo estas vías son reguladas.

La distancia His-Asp observada en el complejo fosfotransferasa es significativamente mayor que las distancias His-Asp observadas para complejos HPT:RR bidireccionales. ¿Qué papel juega esta distancia en el mecanismo de transferencia de fosforilo, y/o en la direccionalidad de la reacción? La geometría del sitio catalítico observada en el complejo fosfotransferasa, más precisamente la distancia de 7,6 Å entre la His188 y el Asp54, sugiere un mecanismo de transferencia del grupo fosforilo con marcado carácter disociativo. La estructura cristalográfica de una HK:RR representativa de la actividad fosfatasa (Casino *et al.*, 2009), en la cual la histidina fosforilable enfrenta al aspartato durante la reacción, manteniendo una distancia de 7,9 Å entre los residuos y evitando la retrofosfotransferencia, mantiene abierta la pregunta sobre la importancia de la distancia entre His y Asp como factor determinante en la direccionalidad de la señal. Otros complejos HK:RR típicamente unidireccionales muestran también distancias His-Asp de este orden (Bell *et al.*, 2010). Adicionalmente, estructuras cristalográficas a alta resolución de complejos HPT:RR de fosforrelevo, que permiten transferencia de fosforilo P~His→Asp y P~Asp→His, muestran distancias siempre menores a 6 Å entre estos residuos, consistentes con mecanismos de fosfotransferencia mayormente asociativos, es decir, una sustitución nucleofílica con un fosforano intermediario pentacoordinado estable (Varughese *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Lassila *et al.*, 2011; Willet *et al.*, 2015). La diferencia en las distancias His-Asp existentes entre SDC típicos y fosforrelevo, abre la posibilidad de que éste sea, en sí mismo, un mecanismo

de control en la capacidad potencial de un P~Asp de transferir el fosforilo a una His: a mayores distancias, menor la proporción de retrofosfotransferencia.

La presencia y posición del Mg^{2+} en el sitio catalítico es un factor adicional en la determinación de la direccionalidad de la señal: estudios previos muestran que al estar ausente el metal, la reacción de fosfotransferencia reversa del RR a la HK aumenta considerablemente (Dutta & Inouye 1996; Albanesi et al., 2004). En este trabajo, demostramos que la retrofosfotransferencia es de hecho independiente de la presencia del metal. Además, en una sustitución disociativa, el metafosfato intermediario se estabilizaría migrando hacia las cargas positivas del Mg^{2+} y la Lys102 del RR. La posición de estas cargas positivas, cercanas al sitio de fosforilación de DesR_{REC}, introduce una asimetría de distribución de cargas en el centro catalítico, y por tanto, una reducción en la probabilidad de retrofosfotransferencia P~Asp→His en estos sistemas. Análogamente, los centros catalíticos asociativos presentan una distribución de cargas mayormente simétrica, posibilitando que el grupo fosforilo tenga el potencial energético de tomar tanto un rumbo His→Asp como Asp→His. En este contexto, la utilización de calcio como metal catalítico (un ion con menor densidad de carga positiva que el magnesio, haciendo “más simétrico” el centro de reacción) resultó en un aumento de la retrofosfotransferencia basal. Por otro lado, las actividades fosfatasa y fosfotransferasa se vieron disminuídas en presencia de dicho metal. Esto sugiere que el calcio es ineficiente como metal catalítico en comparación al magnesio. De esta manera, el aumento en la retrofosfotransferencia se ve favorecida debido a la disminución de las cinéticas de dichas actividades. En suma, la comparación de estructuras cristalográficas a alta resolución de complejos HK:RR unidireccionales vs complejos HPT:RR bidireccionales, sugiere que la distancia entre His y Asp fosforilables, así como la posición relativa del Mg^{2+} en el sitio catalítico, serían efectivamente determinantes en la definición de direccionalidad.

El uso de BeF_3^- captura intermediarios proteicos fosforilados, por lo que no nos permite analizar al detalle estructural los estados de transición de alta energía, cuyo estudio ha resultado tan dificultoso a lo largo de la historia. El uso de fluoruro de aluminio (AlF_3^-), análogo del estado de transición metafosfato, permitiría capturar estos complejos transitorios (Wang *et al.*, 2002), por lo que obtener un complejo HK:RR en este contexto indudablemente contribuiría en esta exploración mecanística relativa a las fosfotransferencias en SDCs típicos. El análisis de la importancia de la distancia His-Asp en la direccionalidad de la reacción, podrá también abordarse mediante ingeniería de proteínas: realizando mutagénesis racional de complejos bidireccionales (*e.g.*, utilizando el sistema modelo Spo0B-Spo0F descrito anteriormente, un área en la que nuestro laboratorio está ahora trabajando activamente), de manera que dichos mutantes permitan “alejarse” la distancia His-Asp en estos sistemas. En este caso se espera observar que los mutantes presenten una dirección de transmisión del fosforilo unidireccional, únicamente de P~His a Asp.

La actividad de autodesfosforilación de los RRs ha sido exhaustivamente estudiada, y es considerada un punto de control importante de la eficiencia en la señalización bacteriana: más precisamente, el residuo en la posición T+2 de los RRs, ha mostrado ser importante en las cinéticas de autofosforilación y

autodesfosforilación (Pazy *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2013; Page *et al.*, 2016). Nuestro trabajo demostró la importancia de la Phe82 (residuo T+2 en DesR) en impedir la desfosforilación fútil del regulador al ser fosforilado, evitando que el agua se posicione para el ataque nucleofílico, a modo de una “tapa” para el fosfato. El mecanismo de acción de la Phe82 está respaldado por estructuras cristalográficas resueltas previamente por el laboratorio (Trajtenberg *et al.*, 2014). En la reacción de fosfotransferencia, Phe82 podría incrementar el pKa del átomo Nδ1 del grupo imidazol de la His188 debido a interacciones catión-π

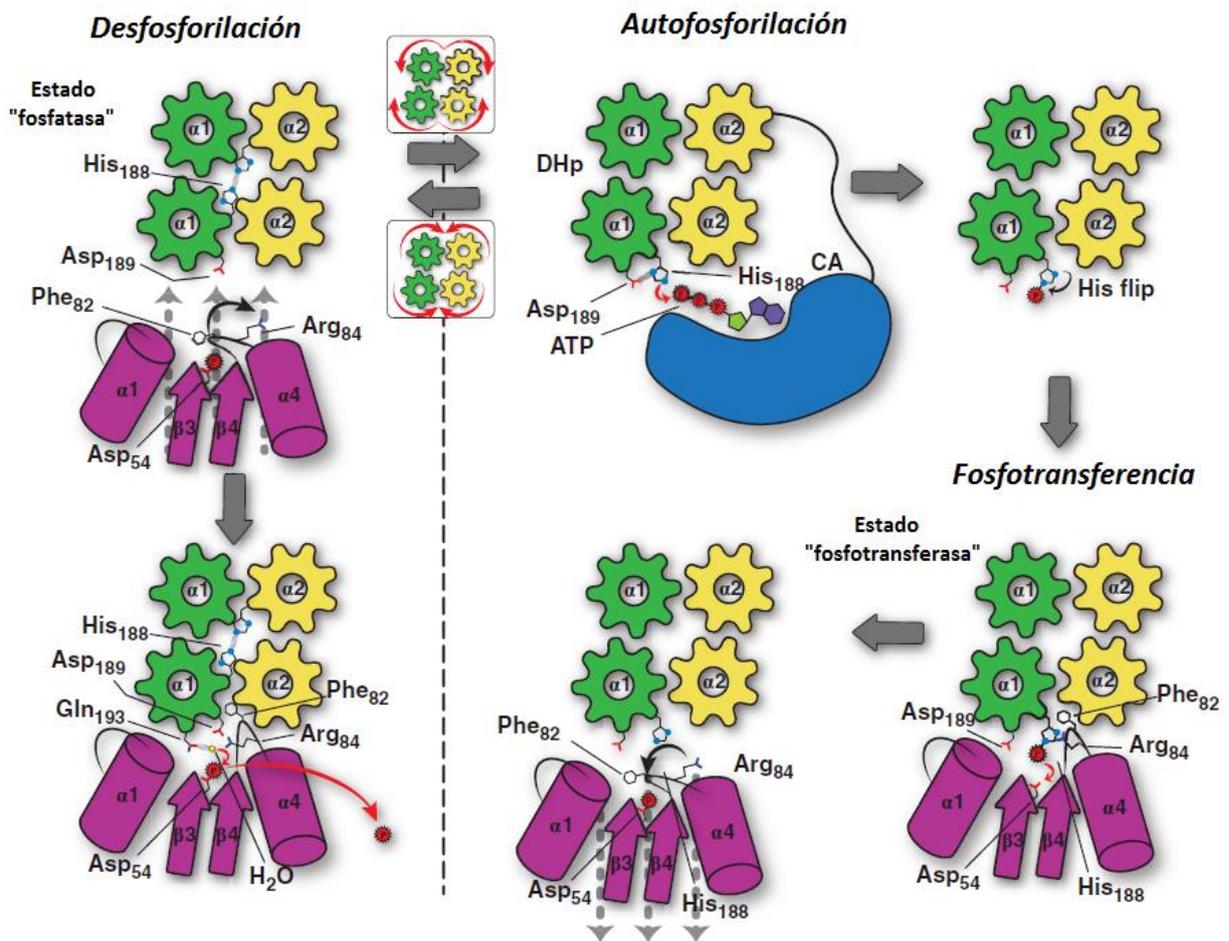


Figura 43. Modelo mecánico de transmisión de la señal en DesK-DesR. En el estado fosfatasa, DesK presenta la His188 orientada hacia el interior del *coiled-coil*, evitando la retrofosforilación fútil durante la catálisis. En la interacción, DesK induce la apertura del “escudo” Phe82 del bucle $\beta 4\alpha 4$ para la desfosforilación del regulador, en conjunto con el Asp189 que interactúa con la Arg84 del mismo bucle del RR. Luego, la Gln193 enfrenta al P-Asp54 de DesR y alinea el agua nucleofílica para el ataque (probablemente activada como un hidroxilo, por acción de un oxígeno de coordinación del Mg^{2+} como base general) sobre el P del fosfato. Tras el “switch” conformacional, que involucra rotación de las hélices centrales del dominio DHp para exponer a la His188, ésta se autofosforila mediante ATP (asistido por el Asp189 quien protonaría al Nδ1 para la autofosforilación). Posteriormente, el conformero de la P~His188 rota, y P~DesK transfiere el fosforilo al Asp54 de DesR mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica mayormente disociativa. Al fosforilarse el regulador, Phe82 se cierra sobre el P~Asp54 para excluirlo del solvente, evitando desfosforilaciones fútiles. Adaptado de Trajtenberg *et al.*, 2016.

(Loewenthal *et al.*, 1992). En ausencia de este residuo, podría haber una menor protonación del N δ 1, y por consiguiente, un enlace fosforamida más fuerte que resulte en una disminución de la cinética de fosfotransferencia (Attwood *et al.*, 2007). Asimismo, en el estado fosfatasa, la Arg84 de DesR interacciona con el Asp189 de DesK, a diferencia de lo observado en la estructura fosfotransferasa en donde dicha interacción se pierde, producto de la rotación de las hélices centrales del dominio DHP en la transición fosfatasa-fosfotransferasa. Los ensayos bioquímicos mostraron que la Arg84 es efectivamente importante en la cinética de la actividad fosfatasa de DesK sobre DesR. En cuanto a la autofosforilación de la HK, se ha propuesto que el Asp189 funciona de ácido general protonando a la His188 en N δ 1, haciendo del N ϵ 2 un nucleófilo eficaz para atacar al fosforilo del ATP en un mecanismo asociativo (Mechaly *et al.*, 2014; Casino *et al.*, 2014). Combinando nuestros propios datos del complejo fosfotransferasa con este escenario de autofosforilación, predecimos la importancia central de un cambio conformacional en la propia His entre los estados autoquinasa y fosfotransferasa, de forma de posicionar correctamente el fosfato en cada reacción por rotación de 180° en su cadena lateral. Queda abierta la necesidad de continuar explorando el rol funcional de residuos específicos de DesK y DesR que interaccionan diferencialmente en los dos complejos aquí descritos, tales como el Asp189 y Gln193 de DesK, y los residuos Gln10 y Thr80 de DesR, para confirmar las hipótesis generadas en este trabajo. La Figura 43 procura resumir el modelo mecanístico consistente con los datos generados en esta Tesis y en la literatura.

En conclusión, en esta Tesis de Maestría nos propusimos realizar un abordaje a escala molecular para estudiar cómo se regulan las vías de señalización celular. En definitiva, son estos mecanismos basales los que posibilitan que un subconjunto dado de biomoléculas confinadas en una célula, interaccionen activa y correctamente para asegurar una conexión estímulo-respuesta dada, y llevar ulteriormente a la adaptación del individuo a su ecosistema. La literatura nos permite afirmar que los mecanismos moleculares presentados en esta Tesis son extrapolables a un gran número de SDCs, particularmente a aquellos más emparentados filogenéticamente con DesK-DesR. Si bien cada vía de señalización ha evolucionado en un contexto histórico, bioquímico y fisiológico determinado, y es la consecuente diversidad biológica quien constituye el motor evolutivo de la naturaleza, también es claro que las distintas vías han establecido mecanismos comunes, generales, para regular la transmisión de las señales. Este balance entre “variabilidad” y “conservación” ha posibilitado, a lo largo de la vida desde sus inicios, el desarrollo de vías de señalización cada vez más efectivas a la hora de conectar un estímulo con una respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

Aakre CD, Herrou J, Phung TN, Perchuk BS, Crosson S, Laub MT (2015). Evolving New Protein-Protein Interaction Specificity through Promiscuous Intermediates. *Cell* 163, 594-606.

Aguilar P, Hernández-Arriaga A, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal* 20 (7), 1681-1691.

Albanesi D, Mansilla MC, de Mendoza D (2004). The Membrane Fluidity Sensor DesK of *Bacillus subtilis* Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator. *Journal of Bacteriology* 186 (9), 2655-2663.

Albanesi D, Martín M, Trajtenberg F, Mansilla MC, Haouz A, Alzari PM, de Mendoza D, Buschiazzi A (2009). Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38), 16185-16190.

Alcorn T, Juers DH (2010). Progress in rational methods of cryoprotection in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 4), 366-373.

Allen KN, Dunaway-Mariano D (2016). Catalytic scaffolds for phosphoryl group transfer. *Current Opinion in Structural Biology* 41, 172-179.

Alm E, Huang K, Arkin A (2006). The Evolution of Two-Component Systems in Bacteria Reveals Different Strategies for Niche Adaptation. *PLoS Computational Biology* 2 (11), 1329-1342.

Appleby JL, Bourret RB (1998). Proposed signal transduction role for conserved CheY residue Thr87, a member of the response regulator active-site quintet. *Journal of Bacteriology* 180 (14), 3563-3569.

Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB (1996). Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell* 86, 845-848.

Attwood PV, Piggott MJ, Zu XL, Besant PG (2007). Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* 32, 145-156.

Ashenberg O, Keating AE, Laub MT (2013). Helix Bundle Loops Determine Whether Histidine Kinases Autophosphorylate in *cis* or in *trans*. *Journal of Molecular Biology* 425, 1198-1209.

Barbieri CM, Stock AM (2008). Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Analytical Biochemistry* 376, 73-82.

Battye TG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AG (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67 (Pt 4), 271-281.

Bell CH, Porter SL, Strawson A, Stuart DI, Armitage JP (2010). Using structural information to change the phosphotransfer specificity of a two-component chemotaxis signaling complex. *PLoS Biology* 8:e1000306.

Bhate MP, Molnar KS, Goulian M, DeGrado WF (2015). Signal Transduction in Histidine-Kinases: Insights from New Structures. *Structure* 23 (6), 981-994.

Birck C, Mourey L, Gouet P, Fabry B, Schumacher J, Rousseau P, Kahn D, Samama JP (1999). Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* 7 (12): 1505-15.

Boibessot T, Zschiedrich CP, Lebeau A, Bénimèlis D, Dunyach-Rémy C, Lavigne JP, Szurmant H, Benfodda Z, Meffre P (2016). The Rational Design, Synthesis, and Antimicrobial Properties of Thiophene Derivatives That Inhibit Bacterial Histidine Kinases. *Journal of Medical Chemistry* 59 (19), 8830-8847.

Botella E, Devine SK, Hubner S, Salzberg LI, Gale RT, Brown ED, Link H, Sauer U, Codée JD, Noone D, Devine KM (2014). PhoR autokinase activity is controlled by an intermediate in wall teichoic acid metabolism that is sensed by the intracellular PAS domain during the PhoPR-mediated phosphate limitation response of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 94, 1242-1259.

Bourret RB, Stock AM (2002). Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* 277 (12), 9625-8.

Bourret RB (2010). Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion in Microbiology* 13, 142-149.

Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC (2011). Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75 (4), 566-582.

Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek W., Roversi P, Sharff A, Smart OS, Vornrhein C, Womack T (2009). BUSTER version 2.8.0. *Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.*

Capra EJ, Laub MT (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Biochemistry* 66, 325-347.

Capra EJ, Perchuk BS, Lubin EA, Ashenberg O, Skerker JM, Laub MT (2010). Systematic Dissection and Trajectory-Scanning Mutagenesis of the Molecular Interface That Ensures Specificity of Two-Component Signaling Pathways. *PLoS Genetics* 6 (11), e1001220.

Capra EJ, Perchuk BS, Ashenberg O, Seid CA, Snow HR, Skerker JM, Laub MT (2012). Spatial tethering of kinases to their substrates relaxes evolutionary constraints on specificity. *Molecular Microbiology* 86 (6), 1393-1403.

- Casino P, Miguel-Romero L, Marina A (2014). Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature Communications* 5:3258, doi 10.1038/ncomms4258.
- Casino P, Rubio V, Marina A (2009). Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell* 139, 325-336.
- Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt. 1), 12-21.
- Cheung J, Hendrickson WA (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology* 13, 116-123.
- Cock PJA, Whitworth DE (2007). Evolution of Prokaryotic Two-Component System Signaling Pathways: Gene Fusions and Fissions. *Molecular Biology and Evolution* 24 (11), 2355-2357.
- Crick FHC (1953). The Packing of α -Helices: Simple Coiled Coils. *Acta Crystallographica* 6, 689-697.
- Cybulski LE, Martín M, Mansilla MC, Fernández A, de Mendoza D (2010). Membrane Thickness Cue for Cold Sensing in a Bacterium. *Current Biology* 20, 1539-1544.
- Cybulski LE, Ballering J, Moussatova A, Inda ME, Vazquez DB, Wassenaar TA, de Mendoza D, Tieleman DP, Killian JA (2015). Activation of the bacterial thermosensor DesK involves a serine zipper dimerization motif that is modulated by bilayer thickness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (20), 6353-6358.
- Das R, Baker D (2008). Macromolecular modeling with rosetta. *Annu Rev Biochem* 77, 363-82.
- Defosse TA, Sharma A, Mondal AK, de Bernonville TD, Latgé JP, Calderone R, Giglioli-Guivarc'h N, Courdavault V, Clastre M, Papon N (2015). Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Molecular Microbiology* 95 (6), 914-924.
- Desai SK, Kenney LJ (2017). To \sim P or not to \sim P? Non-canonical activation by two-component response regulators. *Molecular Microbiology* 103(2), 203-213.
- Drenth J (2007). Principles of X-ray Crystallography. *Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, 326 pp.*
- Dubrac S, Boneca IG, Poupel O, Msadek T (2007). New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 189 (22), 8257-8269.

- Dutta R, Inouye M (1996). Reverse Phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a Kinase-/Phosphatase+ Mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a Bifunctional Signal Transducer of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 271 (3), 1424-1429.
- Dutta R, Qin L, Inouye M (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molecular Microbiology* 34 (4), 633-640.
- Dyer CM, Dahlquist FW (2006). Switched or Not?: the Structure of Unphosphorylated CheY Bound to the N Terminus of FliM. *Journal of Bacteriology* 188 (21), 7354-7363.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66(Pt 4), 486-501.
- Evans PR (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62 (Pt 1), 72-82.
- Evans PR (2011). An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67 (Pt 4), 282-292.
- Fabret C, Feher VA, Hoch JA (1999). Two-Component Signal Transduction in *Bacillus subtilis*: How One Organism Sees Its World. *Journal of Bacteriology* 181 (7), 1975-1983.
- Fernández I, Otero LH, Klinke S, Carrica MC, Goldbaum FA (2015). Snapshots of Conformational Changes Shed Light into the NtrX Receiver Domain Signal Transduction Mechanism. *Journal of Molecular Biology* 427, 3258-3272.
- Fields PI, Groisman EA, Heffron F (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243, 1059-1062.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44 (D1), D279-85, doi: 10.1093/nar/gkv1344.
- Galperin MY (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiology*, doi: 10.1186/1471-2180-5-35.
- Galperin MY (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology* 13 (2), 150-159.
- Gao R, Stock AM (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Biochemistry* 63, 133-154.
- Gao R, Stock AM (2010). Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response

regulator activity. *Current Opinion in Microbiology* 13, 160-167.

Gao R, Stock AM (2017). Quantitative Kinetic Analyses of Shutting Off a Two-Component System. *MBio* 8 (3), doi 10.1128/mBio.00412-17.

Georgellis D, Kwon O, De Wulf P, Lin ECC (1998). Signal Decay through a Reverse Phosphorelay in the Arc Two-component Signal Transduction System. *Journal of Biological Chemistry* 273 (49), 32864-32869.

Georgellis D, Kwon O, Lin ECC (1999). Amplification of Signaling Activity of the Arc Two-component System of *Escherichia coli* by Anaerobic Metabolites. *Journal of Biological Chemistry* 274 (50), 35950-35954.

Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, Okamoto S, Doi A, Utsumi R (2010) Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 13, 232-239.

Gotoh Y, Doi A, Furuta E, Dubrac S, Ishizaki Y, Okada M, Igarashi M, Misawa N, Yoshikawa H, Okajima T, Msadek T, Utsumi R (2010). Novel antibacterial compounds specifically targeting the essential WalR response regulator. *Journal of Antibiotics* 63 (3), 127-134.

Grimshaw CE, Huang S, Hanstein CG, Strauch MA, Burbulys D, Wang L, Hoch JA, Whiteley JM (1998). Synergistic Kinetic Interactions between Components of the Phosphorelay Controlling Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 37, 1365-1375.

Groisman EA (2016). Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annual Review of Biochemistry* 70, 103-124.

Guarnieri MT, Zhang L, Shen J, Zhao R (2008). The Hsp90 inhibitor radicicol interacts with the ATP-binding pocket of bacterial sensor kinase PhoQ. *Journal of Molecular Biology* 379 (1), 82-93.

Guhaniyogi J, Robinson VL, Stock AM (2006). Crystal structures of beryllium fluoride-free and beryllium fluoride-bound CheY in complex with the conserved C-terminal peptide of CheZ reveal dual binding modes specific to CheY conformation. *Journal of Molecular Biology* 359 (3): 624-45.

Gushchin I, Melnikov I, Polovinkin V, Ishchenko A, Yuzhakova A, Buslaev P, Bourenkov G, Grudinin S, Round E, Balandin T, Borshchevskiy V, Willbold D, Leonard G, Büldt G, Popov A, Gordeliy V (2017). Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science* 356:eaah6345, doi:10.1126/science.aah6345.

Gutu AD, Wayne KJ, Sham LT, Winkler ME (2010). Kinetic characterization of the WalRKSpn (VicRK) two-component system of *Streptococcus pneumoniae*: dependence of WalkSpn (VicK) phosphatase activity on its PAS domain. *Journal of Bacteriology* 192 (9), 2346-2358.

Harshey RM, Kawagishi I, Maddock J, Kenney LJ (2003). Function, diversity, and evolution of signal transduction in prokaryotes. *Developmental Cell* 4 (4), 459-465.

- Hengge R (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 631, 40-53.
- Hsing W, Silhavy TJ (1997). Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179 (11), 3729-3735.
- Hulko M, Berndt F, Gruber M, Linder JU, Truffault V, Schultz A, Martin J, Schultz JE, Lupas AN, Coles M (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell* 126, 929-940.
- Huynh TN, Stewart V (2011). Negative control in two-component signal transduction by transmitter phosphatase activity. *Molecular Microbiology* 82 (2), 275-286.
- Huynh TN, Noriega CE, Stewart V (2010). Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (49), 21140-21145.
- Janiak-Spens F, Cook PF, West AH (2005). Kinetic Analysis of YPD1-Dependent Phosphotransfer Reactions in the Yeast Osmoregulatory Phosphorelay System. *Biochemistry* 44, 377-386.
- Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 38 (3), 535-542.
- Kabsch W (2010). Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66 (Pt 2), 125-132.
- Kar L, Matsumura P, Johnson ME (1992). Bivalent metal binding to CheY protein: Effect on protein conformation. *Biochemical Journal* 287, 521-531.
- Karplus PA, Diederichs K (2012). Linking crystallography model and data quality. *Science* 336 (6084), 1030-1033.
- Khrenova MG, Grigorenko BL, Mironov VA, Nemukhin AV (2015). Why does mutation of Gln61 in Ras by the nitro analog NGln maintain activity of Ras-GAP in hydrolysis of guanosine triphosphate? *Proteins* 83 (11), 2091-2099.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5 (4), 749-57.
- Klein AH, Shulla A, Reimann SA, Keating DH, Wolfe AJ (2007). The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *Journal of Bacteriology* 189 (15), 5574-5581.
- Kohanshi MA, Collins JJ (2008). Rewiring Bacteria, Two Components at a Time. *Cell* 133, 947-948.

Koretke KK, Lupas AN, Warren PV, Rosenberg M, Brown JR (2000). Evolution of two-component signal transduction. *Molecular Biology and Evolution* 17 (12), 1956-1970.

Kuo CH, Ochman H (2010). The Extinction Dynamics of Bacterial Pseudogenes. *PLoS Genetics* 6 (8), e1001050.

Lahiri SD, Zhang G, Dunaway-Mariano D, Allen KN (2003). The Pentacovalent Phosphorus Intermediate of a Phosphoryl Transfer Reaction. *Science* 299, 2067-2070.

Lassak J, Bubendorfer S, Thormann KM (2013). Domain Analysis of ArcS, the Hybrid Sensor Kinase of the *Shewanella oneidensis* MR-1 Arc Two-Component System, Reveals Functional Differentiation of its Two Receiver Domains. *Journal of Bacteriology* 195 (3), 482-492.

Lassila JK, Zalatan JG, Herschlag D (2011). Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. *Annual Review of Biochemistry* 80, 669-702.

Laub MT, Goulian M (2007). Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annual Review of Genetics* 41, 121-145.

Leonard PG, Golemi-Kotra D, Stock AM (2013). Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 110, 8525-8530.

Levskaya A, Chevalier AA, Tabor JJ, Simpson ZB, Lavery LA, Levy M, Davidson EA, Scouras A, Ellington AD, Marcotte EM, Voigt CA (2005). Engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* 438, 441-442.

Levy SB, Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10 (12), 5122-5129.

Loewenthal R, Sancho J, Fersht AR (1992). Histidine-aromatic interactions in barnase: elevation of histidine pKa and contribution to protein stability. *Journal of Molecular Biology* 224, 759-770.

Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (2), 718-722.

Marijuán PC, Navarro J, del Moral R (2010). On prokaryotic intelligence: Strategies for sensing the environment. *BioSystems* 99, 94-103.

Martin M, de Mendoza D (2013). Regulation of *Bacillus subtilis* DesK thermosensor by lipids. *Biochemistry Journal* 451 (2), 269-275.

Martin W, Koonin EV (2006). Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization. *Nature* 440,

41-45.

McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40 (Pt 4): 658-674.

McDonald LR, Boyer JA, Lee AL (2012). Segmental Motions, Not a Two-State Concerted Switch, Underlie Allostery in CheY. *Structure* 20, 1363-1373.

Mika F, Hengge R (2005). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of S (RpoS) in *E. coli*. *Genes & Development* 19, 2770-2781.

Mike LA, Choby JE, Brinkman PR, Olive LQ, Dutter BF, Ivan SJ, Gibbs CM, Sulikowski GA, Stauff DL, Skaar EP (2014). Two-Component System Cross-Regulation Integrates *Bacillus anthracis* Response to Heme and Cell Envelope Stress. *PLoS Pathogens* 10 (3), e1004044.

Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 5054-5058.

Needham JV, Chen TY, Falke JJ (1993). Novel Ion Specificity of a Carboxylate Cluster Mg(II) Binding Site: Strong Charge Selectivity and Weak Size Selectivity. *Biochemistry* 32, 3363-3367.

Ninfa AJ, Magasanik B (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (16), 5909-5913.

Ninfa AJ (2010). Use of two-component signal transduction systems in the construction of synthetic gene networks. *Current Opinion in Microbiology* 13, 240-245.

Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (20), 7850-7854.

Ohashi K, Yamashino T, Mizuno T (2005). Molecular Basis for Promoter Selectivity of the Transcriptional Activator OmpR of *Escherichia coli*: Isolation of Mutants That Can Activate the Non-Cognate *kdpABC* Promoter. *Journal of Biochemistry* 137, 51-59.

Okada A, Igarashi M, Okajima T, Kinoshita N, Umekita M, Sawa R, Inoue K, Watanabe T, Doi A, Martin A, Quinn J, Nishimura Y, Utsumi R (2010). Walkmycin B targets Walk (YycG), a histidine kinase essential for bacterial cell growth. *Journal of Antibiotics* 63, 89-94.

Obmolova G, Malia TJ, Teplyakov A, Sweet RW, Gilliland GL (2014). Protein crystallization with microseed matrix screening: application to human germline antibody Fabs. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70

(Pt 8), 1107-1115.

Page SC, Immormino RM, Miller TH, Bourret RB (2016). Experimental Analysis of Functional Variation within Protein Families: Receiver Domain Autodephosphorylation Kinetics. *Journal of Bacteriology* 198 (18), 2483-2493.

Pandini A, Fornili A, Fraternali F, Kleinjung J (2012). Detection of allosteric signal transmission by information-theoretic analysis of protein dynamics. *The FASEB Journal* 26, 868-881.

Parashar V, Mirouze N, Dubnau DA, Neiditch MB (2011). Structural Basis of Response Regulator Dephosphorylation by Rap Phosphatases. *PLoS Biology* 9 (2), e1000589.

Pazy Y, Wollish AC, Thomas SA, Miller PJ, Collins EJ, Bourret RB, Silversmith RE (2009). Matching Biochemical Reaction Kinetics to the Timescales of Life: Structural Determinants That Influence the Autodephosphorylation Rate of Response Regulator Proteins. *Journal of Molecular Biology* 392, 1205-1220.

Pazy Y, Motaleb MA, Guarnieri MT, Charon NW, Zhao R, Silversmith RE (2010). Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (5), 1924-1929.

Podgornaia AI, Laub MT (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* 16, 156-162.

Podgornaia AI, Laub MT (2015). Pervasive degeneracy and epistasis in a protein-protein interface. *Science* 347 (6222), 673-677.

Porter SL, Roberts MA, Manning CS, Armitage JP (2008). A bifunctional kinase-phosphatase in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18531-18536.

Potter CA, Ward A, Laguri C, Williamson MP, Henderson PJ, Phillips-Jones MK (2002). Expression, purification and characterisation of full-length histidine protein kinase RegB from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Biology* 320, 201-213.

QuezadaCM, Hamel DJ, Gradinaru C, Bilwes AM, Dahlquist FW, Crane BR, Simon MI (2005). Structural and chemical requirements for histidine phosphorylation by the chemotaxis kinase CheA. *Journal of Biological Chemistry* 280 (34), 30581-30585.

Raghavan V, Groisman EA (2010). Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Current Opinion in Microbiology* 13, 226-231.

Rasko DA, Moreira CG, De Run L, Reading NC, Ritchie JM, Waldor MK, Williams N, Taussig R, Wei S, Roth M, Hughes DT, Huntley JF, Fina MW, Falck JR, Sperandio V (2008). Targeting QseC Signaling and Virulence for

Antibiotic Development. *Science* 321, 1078-1080.

Ravikumar S, Pham VD, Lee SH, Yoo IK, Hong SH (2012). Modification of CusSR bacterial two-component systems by the introduction of an inducible positive feedback loop. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39, 861-868.

Roche P, Mouawad L, Perahia D, Samama JP, Kahn D (2002). Molecular dynamics of the FixJ receiver domain: movement of the β 4- α 4 loop correlates with the in and out flip of Phe101. *Protein Science* 11, 2622-2630.

Rupp B (2010). Biomolecular Crystallography: Principles, Practice and Application to Structural Biology. *Garland Science, 711 Third Avenue, New York, 809 pp.*

Saita E, Abriata LA, Tsai YT, Trajtenberg F, Lemmin T, Buschiazzo A, Dal Peraro M, de Mendoza D, Albanesi D (2015). A coiled coil switch mediates cold sensing by the thermosensory protein DesK. *Molecular Microbiology*, doi: 10.1111/mmi.13118.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9 (7): 671-675.

Schrodinger LLC (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrodinger, LLC.

Skarphol K, Waukau J, Forst SA (1997). Role of His243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 179 (4), 1413-1416.

Shu CJ, Zhulin IB (2002). ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 27 (1), 3-5.

Silversmith RE (2010). Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* 13, 177-183.

Singh M, Berger B, Kim PS, Berger JM, Cochran AG (1998). Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinases linker domains. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95 (6), 2738-43.

Skerker JM, Perchuk BS, Siryaporn A, Lubin EA, Ashenberg O, Goulian M, Laub MT (2008). Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* 133 (6), 1043-1054.

Stock JB, Stock AM, Mottonen JM (1990). *Signal transduction in bacteria.* *Nature* 344 (6265), 395-400.

Thomas SA, Brewster JA, Bourret RB (2008). Two variable active site residues modulate response regulator phosphoryl group stability. *Molecular Microbiology* 69 (2), 453-465.

Thomas SA, Immormino RM, Bourret RB, Silversmith RE (2013). Nonconserved active site residues

modulate CheY autophosphorylation kinetics and phosphodonor preference. *Biochemistry* 52, 2262-2273.

Trajtenberg F, Graña M, Ruétalo N, Botti H, Buschiazzo A (2010). Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 285, 24892-24903.

Trajtenberg F, Albanesi D, Ruétalo N, Botti H, Mechaly AE, Nieves M, Aguilar PS, Cybulski L, Larrieux N, de Mendoza D, Buschiazzo A (2014). Allosteric Activation of Bacterial Response Regulators: the Role of the Cognate Histidine Kinase Beyond Phosphorylation. *mBio* 5 (6), e02105-14.

Trajtenberg F, Imelio JA, Machado MR, Larrieux N, Marti MA, Obal G, Mechaly AE, Buschiazzo A (2016). Regulation of signaling directionality revealed by 3D snapshots of a kinase:regulator complex in action. *eLife* 5.e21422. doi:10.7554/eLife.21422.

Uhl MA, Miller JF (1996). Central Role of the BvgS Receiver as a Phosphorylated Intermediate in a Complex Two-component Phosphorelay. *Journal of Biological Chemistry* 271 (52), 33176-33180.

Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology* 13 (2), 52-56.

Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* 172 (1), 34-44.

Varughese KI, Tsigelny I, Zhao H (2006). The Crystal Structure of beryllofluoride Spo0F in Complex with the Phosphotransferase Spo0B Represents a Phosphotransfer Pretransition State. *Journal of Bacteriology* 188 (3), 4970-4977.

Volkman BF, Lipson D, Wemmer DE, Kern D (2001). Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* 291 (5512): 2429-2433.

Vornhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, Paciorek W, Womack T, Bricogne G (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67 (Pt 4), 293-302.

Wang W, Cho HS, Kim R, Jancarik J, Yokota H, Nguyen HH, Grigoriev IV, Wemmer DE, Kim SH (2002). Structural Characterization of the Reaction Pathway in Phosphoserine Phosphatase: Crystallographic "snapshots" of Intermediate States. *Journal of Molecular Biology* 319, 421-431.

Willet JW, Kirby JR (2012). Genetic and biochemical dissection of a HisKA domain identifies residues required exclusively for kinase and phosphatase activities. *PLoS Genetics* 8(11):e1003084. doi: 10.1371/journal.pgen.1003084.

Willet JW, Tiwari N, Müller S, Hummels KR, Houtman JCD, Fuentes EJ, Kirby JR (2013). Specificity Residues

Determine Binding Affinity for Two-Component Signal Transduction Systems. *mBio* 4 (6), e00420-13.

Wlodawer A, Minor W, Dauter Z, Jaskolski M (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS Journal* 280 (22), 5705-5736.

Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* 3 (10), doi: 10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013.

Wuichet K, Cantwell BJ, Zhulin IB (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology* 13, 219-225.

Yamada S, Sugimoto H, Kobayashi M, Ohno A, Nakamura H, Shiro Y (2009). Structure of PAS-Linked Histidine Kinase and the Response Regulator Complex. *Structure* 17, 1333-1344.

Zapf J, Madhusudan, Grimshaw CE, Hoch JA, Varughese KI, Whiteley JM (1998). A Source of Response Regulator Autophosphatase Activity: The Critical Role of a Residue Adjacent to the SpoOF Autophosphorylation Active Site. *Biochemistry* 37, 7725-7732.

Zapf J, Sen U, Madhusudan, Hoch JA, Varughese KI (2000). A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* 8 (8): 851-62.

Zhang W, Shi L (2005). Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* 151, 2159-2173.

Zhao X, Copeland DM, Soares AS, West AH (2008). Crystal Structure of a Complex between the Phosphorelay Protein YPD1 and the Response Regulator Domain of SLN1 Bound to a Phosphoryl Analog. *Journal of Molecular Biology* 375, 1141-1151.

Zhu Y, Qin L, Yoshida T, Inouye M (2000). Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (14), 7808-7813.

ABREVIATURAS

SDC – Sistema de dos componentes

HK – Histidin-quinasa

RR – Regulador de respuesta

ATP – Adenosina-trifosfato

ADN – Ácido desoxiribonucleico

P[~]- Fosforilo unido a proteína o residuo

HK:RR – Refiere al complejo transitorio entre histidin-quinasa y regulador de respuesta

HK-RR – Refiere a una vía de sistema de dos componentes en particular

His (H) – Histidina

Asp (D) – Aspartato

Gln (Q) – Glutamina

Val (V) – Valina

Leu (L) – Leucina

Asn (N) – Asparagina

Gly (G) – Glicina

Arg (R) – Arginina

Lys (K) – Lisina

Tyr (Y) – Tirosina

Phe (F) – Fenilalanina

Ile (I) – Isoleucina

Glu (E) – Glutamato

Ser (S) – Serina

Thr (T) – Treonina

Ala (A) – Alanina

DHp – Dominio de dimerización y fosfotransferencia mediada por histidina (*“Dimerization and histidine phosphotransfer”*)

CA – Dominio catalítico de unión a ATP

REC – Dominio receptor de fosforilo

Mg²⁺ – Magnesio divalente

Ca²⁺ – Calcio divalente

HPt – Dominio de transmisión de fosfato mediada por histidina (*“Histidine-containing phosphotransmitter”*)

TEV – Proteasa del virus del grabado del tabaco (*“Tobacco Etch Virus”*)

NaCl – Cloruro de sodio

MgCl₂ – Cloruro de magnesio

CaCl₂ – Cloruro de calcio
BeF₃⁻ - Fluoruro de berilio
SEC – Cromatografía de exclusión molecular (“*Size-exclusion chromatography*”)
HCl – Ácido clorhídrico
DTT – Ditioneitol
PEG – Polietilenglicol
MgSO₄ – Sulfato de magnesio
MES – Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
Li₂SO₄ – Sulfato de litio
NaF – Fluoruro de sodio
BeCl₂ – Cloruro de berilio
AMP-PCP – β,γ-metiladenosina-trifosfato
SDS – Dodecil sulfato sódico
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
Rmsd – Desvío cuadrático medio (“*root mean square deviation*”)
Cα – Carbonos alfa
Nε – Nitrógeno épsilon
Nδ1 – Nitrógeno gamma
Oδ – Oxígeno gamma
PDB – Banco de Datos de Proteínas (“*Protein Data Bank*”)
Wt – “*wild-type*”