



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

**Mecanismos moleculares implicados en la
direccionalidad de la fosfotransferencia en el sistema
de señalización DesK-DesR de *Bacillus subtilis***

Lic Sofia Lima

Orientador: Dr. Felipe Trajtenberg
Co-Orientador: Dr. Alejandro Buschiazzo

Laboratorio de Microbiología Molecular y Estructural
Institut Pasteur de Montevideo

Facultad de Ciencias - Universidad de la República
Programa PEDECIBA Biología - Subárea Biología Molecular y Celular

Tribunal:
Presidente: Dra. Lucia Turell
Vocales: Dr. Martin Fló
Dr. Mariano Martínez

Montevideo, 7 de diciembre de 2022

Resumen

Los sistemas a dos componentes (SDC) son vías de señalización ampliamente distribuidas en la naturaleza, en particular en bacterias y arqueas, cumpliendo un papel central en la percepción del entorno. En estas vías, la información se transmite química y mecánicamente, involucrando reacciones de fosfotransferencias y rearrreglos conformacionales, respectivamente. Estos últimos, constituyen sofisticados mecanismos alostéricos que controlan diferentes actividades enzimáticas y son centrales para asegurar una estricta regulación del proceso y la correcta transmisión del mensaje. Las reacciones de fosfotransferencia involucradas en la señalización implican, en primera instancia, la auto-fosforilación de una histidina conservada en una histidina quinasa y la fosfotransferencia de este grupo fosforilo desde la histidina hacia un aspartato conservado de un regulador de respuesta específico, que actúa como efector de la vía. Por último, la hidrólisis del fosfo-aspartato, reacción que ocurre espontáneamente o promovida por la histidina quinasa, aseguran el correcto apagado del sistema. El objetivo de esta tesis es comprender los mecanismos moleculares que confieren direccionalidad en la fosfotransferencia. Para abordar esto utilizamos como modelo el sistema termosensor DesK-DesR de *B.subtilis*, el cual constituye un mecanismo homeostático de respuesta rápida a los cambios sufridos por la membrana celular como consecuencia del descenso brusco en la temperatura ambiente. Esta vía de señalización está constituida por la histidina quinasa DesK, que funciona como un termómetro molecular, y su regulador respuesta DesR. Este sistema ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista estructural y funcional. En función de esta información disponible es de esperar que deban existir mecanismos que aseguren la acumulación de fosfato en DesR. Para esto se diseñaron diferentes sustituciones aminoacídicas en posiciones claves de DesK y DesR, con el fin de modular la direccionalidad del sistema. Mediante ensayos funcionales se analizó la distribución del grupo fosforilo entre ambas proteínas. En función de los resultados proponemos que uno de los determinantes de direccionalidad que identificamos es la dimerización de DesR, lo cual evitaría la interacción DesK por competencia. Estos hallazgos aportan información relevante para entender cómo se transmite la información en este tipo de sistemas de señalización. En particular, puede ser un gran aporte en el diseño de vías sintéticas.

Agradecimientos

Me resulta muy difícil poner en palabras lo que significa haber escrito esta tesis más allá del trabajo aquí presentado. Mudarme a Uruguay, empezar de cero en otro país, sin conocer a nadie, estar lejos de mi familia y afectos: aprender a ser mi propio sostén. Por eso quiero empezar por agradecer a este hermoso país que me ha enseñado a echar raíces que continúan creciendo.

Gracias Ale y Feli por darme la oportunidad de realizar este posgrado en el LMME. Palabras aparte para Feli, quien estuvo más de cerca guiando esta tesis. Realmente fuiste un Maestro para mí, me has enseñado que puedo dar más de lo que pienso. Aprendí mucho de tu manera de hacer ciencia: hacer buenas preguntas, diseñar experimentos para responderlas y complementar con mucha lectura para estimular la creatividad y así profundizar (a veces demasiado jaja) en el análisis de la interpretación de resultados.

Por otro lado quisiera agradecer al Instituto Pasteur que se ha convertido en mi segundo hogar en todo este tiempo. Realmente es un privilegio trabajar en esta institución que es un oasis dentro de la comunidad científica de la región. Pero más allá de la infraestructura y la organización, me llevo muchísimos vínculos que se han transformado en grandes amistades que han sido fundamentales en este viaje. A mis compañeros y compañeras del LMME: Juan, Fabi, Joaco, Nicky, Marcos y Sonia por darme una mano con los experimentos, y por compartir conmigo tanto festejos como situaciones difíciles. También quisiera agradecer a los laboratorios UBP y UPR, en particular a Fede, Martín, Clau y el Colo por asistirme en algún momento con la purificación de proteínas. Además, por su buena onda para crear un lindo ambiente laboral, por la música y los chistes: han hecho mis días más amenos.

Por último quisiera agradecer a mi familia: Tere, Jor, Jose y Juli, que me bancan siempre y aunque la distancia muchas veces sea difícil sostener, los llevo siempre conmigo en mi mente y corazón. También quiero agradecerle a Andrés, quien me ha aguantado la cabeza y las angustias en este desafiante proceso con mucho amor.

ÍNDICE

Introducción	4
Sistemas a Dos Componentes: una de las principales vías de señalización bacteriana	4
Histidina quinasa como sensores y enzimas multifuncionales	6
Los dominios REC de los RR constituyen versátiles dominios de señalización	8
Especificidad, eficiencia y direccionalidad en la señalización	9
Sistema DesK-DesR de <i>B. subtilis</i> como modelo de estudio	10
HIPÓTESIS	13
Estrategia experimental	14
Clonado de mutantes puntuales en DesK y DesR mediante la técnica RF cloning	14
Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	18
Análisis in vitro de las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa del complejo DesK:DesR utilizando Phostag SDS-PAGE	19
Ensayo de cristalización del complejo DesK _{H188E} :DesR _{REC-Q10A} , colecta de datos y construcción del modelo	20
Resultados	21
Actividades de fosfotransferencia y fosfatasa entre DesKC y DesR _{REC}	21
El residuo Gln193 de DesK es esencial para la actividad fosfatasa	23
Sustitución de la Thr80 de DesR en la fosfotransferencia	24
El Asp189 no participa de la fosfotransferencia reversa desde el RR a la HQ	26
La reversibilidad de la fosfotransferencia afectando la interacción de DesR con DesK en el estado fosfatasa	27
El efecto en el equilibrio oligomérico de DesR _{REC-Q10A} puede modular la direccionalidad del fosfato	30
Discusión	35
Referencias	38

Introducción

Sistemas a Dos Componentes: una de las principales vías de señalización bacteriana

Una de las principales características que definen a los seres vivos es la capacidad de comunicarse con su entorno. Esto resulta particularmente importante para las bacterias, cuyo hábitat suele estar constantemente sujeto a cambios. Las mismas han desarrollado vías de transducción de señales que acoplan la detección de cambios en el medio interno o externo con una respuesta específica que posibilita adaptarse al nuevo escenario.

Los llamados Sistemas a Dos Componentes (SDC) constituyen cascadas de señalización bacteriana, en su mayoría formados por dos componentes (de allí se deriva su nombre), que tienen la capacidad de percibir, muchas veces directamente desde el espacio periplasmático, y transducir la información hacia el interior celular (Buschiazzo y Trajtenberg 2019). Están involucrados en regular comportamientos muy diversos, como procesos altamente complejos, que requieren de la coordinación poblacional para la formación de biofilms (Parsek y Greenberg 2005), la regulación de mecanismos de virulencia o resistencia a antibióticos (Kleerebezem et al. 1997), la división y diferenciación celular, cambios en el metabolismo bacteriano (Gao y Stock 2009), etc. Se encuentran mayormente distribuidos en bacterias y arqueas, donde una misma célula puede expresar simultáneamente docenas de SDC diferentes (Capra y Laub 2012). También se identifican en ciertos eucariotas inferiores (hongos) y plantas, pero en una abundancia significativamente menor, aunque igualmente regulando procesos claves (Wuichet, Cantwell, y Zhulin 2010; Galperin et al. 2017).

Desde su descubrimiento hace más de 30 años (Nixon, Ronson, y Ausubel 1986), estos sistemas se han estudiado exhaustivamente dada su relevancia biológica (Goulian 2010). La comprensión detallada de los mecanismos moleculares involucrados en la señalización bacteriana podría contribuir al desarrollo de novedosos compuestos antimicrobianos (Jacob-Dubuisson et al. 2018) así como en interesantes herramientas en diversas aplicaciones en el área de la Biología Sintética (Cravens, Payne, y Smolke 2019; Landry et al. 2018).

En su versión más simple, los SDC están compuestos por dos proteínas: una histidin-kinasa (HQ), que actúa como sensor detectando la señal en forma específica, y un regulador de respuesta (RR), que ejecuta la respuesta celular adaptativa. Ante la presencia de una señal, del medio interno o externo, la HQ sufre una serie de arreglos

estructurales, promoviendo su activación, la cual implica la autofosforilación de un residuo de histidina a expensas de ATP. Una vez fosforilada, la HQ transfiere el grupo fosforilo a un aspartato conservado en el dominio receptor del RR específico, quien dispara la respuesta de salida (Figura 1). Además de catalizar las reacciones autoquinasa y fosfotransferasa, en su mayoría, las HQ pueden promover la hidrólisis del P~RR en ausencia de la señal. Esta actividad fosfatasa de las HQ es muy relevante para asegurar el efectivo apagado de la vía una vez que la señal no está más presente (Gao y Stock 2017), así como también para minimizar reacciones cruzadas entre diferentes SDC que coexisten en las células (Siryaporn y Goulian, 2008). Además, esta bifuncionalidad de las HQs genera robustez en el sistema en la relación *input-output* (Hart y Alon 2013). Los niveles de los estados fosforilados y no fosforilados del RR, por lo tanto, estarán determinadas principalmente por el balance entre estas tres reacciones enzimáticas, y es lo que define si se dispara la respuesta efectora o no.

Los SDC pueden tener una organización más compleja, incluyendo más componentes como intermediarios en las fosfotransferencias o como moduladores del proceso de señalización, y se denominan sistemas de fosfo-relevos (Figura 1). En este tipo de vía de señalización las fosfotransferencias ocurren en forma alternada entre residuos de histidina y aspartato presentes en dominios (intra-fosfotransferencia) o proteínas (inter-fosfotransferencia), para finalmente llegar al RR terminal que ejecuta la respuesta adaptativa (Gao, Bouillet, y Stock 2019b). Al contener estos pasos intermedios a lo largo de la vía, se generan puntos de control adicionales, permitiendo una mayor capacidad de procesamiento e integración de diferentes señales (Alves et al. 2021).

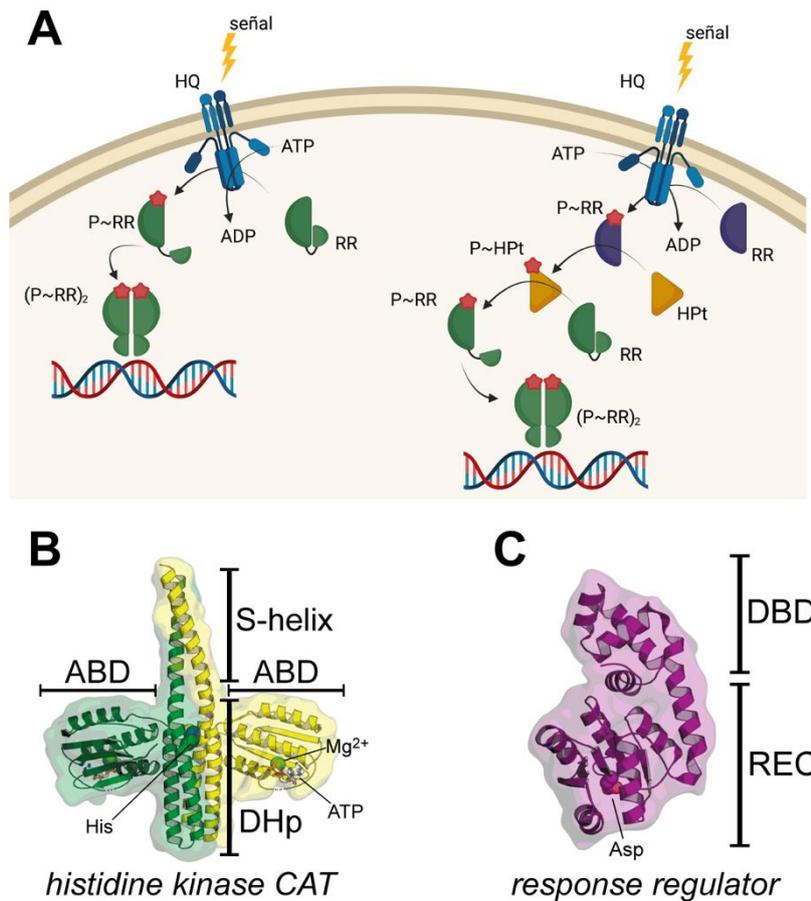


Figura 1. Sistemas a dos componentes. A) Ilustración que representa dos tipos de SDC: a la izquierda un SDC canónico de dos componentes. A la derecha, un sistema de fosfo-relevos, donde participan más intermediarios en la fosfotransferencia desde la HQ que detecta la señal hasta el regulador efector. B) Módulo catalítico de HQ de tipo I. Las HQ son típicamente homodímeros (en la figura los monómeros están coloreados en amarillo y verde). Hacia el extremo N-terminal las α -hélices que conectan con los dominios sensores pueden estar superenrolladas (estructuras tipo “*coiled-coil*” denominada helice S). Además se señala el dominio DHp que contiene la His fosforilable y hacia el extremo C-terminal el dominio ABD. C) Regulador de respuesta con el dominio REC hacia el extremo N-terminal y un dominio DBD hacia el C-terminal. Los paneles B y C fueron extraídos de Buschiazzo y Trajtenberg 2019.

Histidina quinasas como sensores y enzimas multifuncionales

Las HKs son proteínas en su mayoría homodiméricas de arquitectura modular, y estructuralmente puede subdividirse en diferentes regiones o dominios con características estructurales/funcionales particulares (Buschiazzo y Trajtenberg 2019). Las HQs se agrupan en tres clases principales (I-III) (Adebali et al. 2017), siendo las de clase I la gran mayoría y la cual describiremos en mayor detalle en este trabajo. Este tipo de HQs está formado por tres módulos: sensor, transmisor y catalítico. El módulo

sensor se ubica hacia el extremo N-terminal. Éstos han evolucionado en formas muy diversas, consistente con la gran variedad de señales ambientales que pueden ser detectados por estos sistemas. La señal puede ser reconocida por un dominio sensor (periplasmático, de membrana o citosólico) o mediante proteínas auxiliares (Krell et al. 2010). Por otro lado, el módulo transmisor conecta al dominio sensor con la región catalítica. Dependiendo de si la HQ es de membrana o soluble, puede incluir dos o más hélices transmembrana, así como diferentes tipos de dominios, como HAMP (presentes en Histidin-quinasas, Adenilato ciclasas, proteínas aceptoras de metilo y fosfatasa), PAS (Per--ARNT--Sim) o GAF (fosfodiesterasas cGMP específicas, adenilato ciclasas y FhIA), entre otros (Bhate et al. 2015). Finalmente, el módulo catalítico es la región donde ocurren las 3 reacciones catalíticas: auto-fosforilación de la histidina, fosfotransferencia hacia el RR y actividad fosfatasa sobre P~RR (si se trata de una HQ bifuncional).

Las HQs de clase I contienen en el módulo catalítico dos dominios (Figura 1B), uno de Dimerización y Fosfotransferencia de Histidina (DHP, de sus siglas en inglés) y otro de unión a ATP (ABD de "ATP binding domain"). El DHP forma un homodímero de 4 α -hélices antiparalelas, donde cada protómero está formado por 2 α -hélices unidos por un bucle (Figura 1B). La mayoría de las HQs, sino todas, hacia el extremo N-terminal del dominio DHP presentan uno o más motivos de tipo *coiled-coil* imperfectos (Singh et al. 1998) (Anantharaman, Balaji, y Aravind 2006). Estos motivos cumplen roles claves en la transmisión de la señal, ya que pueden alternar entre dos tipos de conformaciones, funcionando como un interruptor molecular (D. Albanesi et al. 2009). El *coiled-coil* se forma gracias a la presencia de un patrón de secuencia repetitivo en heptadas (posiciones identificadas con letras de la a hasta la g), donde las posiciones *a* y *d* son generalmente residuos hidrofóbicos (Lupas y Bassler 2017). A continuación de este *coiled-coil* se ubica la histidina fosforilable, en un motivo de secuencia conservado (caja H) aproximadamente en el primer tercio del DHP en la hélice α_1 . De acuerdo a este motivo H las HQs también se pueden clasificar en 5 familias diferentes: HisKA (Pfam PF00512), HisKA_3 (PF07730), HisKA_2 (PF07568), H-kinase_dim (PF02895) y HWE_HK (PF07536). Las 2 primeras representan el 80% y 15% aproximadamente de todas las HKs con dominio DHP (Buschiazzo y Trajtenberg 2019).

El dominio ABD forma un plegamiento tipo sándwich α - β altamente conservado con 3 hélices empaquetadas contra 5 hebras β antiparalelas de la familia de ATPasas lentas tipo Hsp90 (Figura 1B). El ATP-Mg⁺² se une entre 2 hélices, involucrando unos motivos de aminoácidos conservados (las cajas N-,G1-,F-,G2 y G3). El nucleótido es contenido por un bucle que actúa como "tapa", formando un bolsillo de longitud variable.

Las HQs de clase II (HQII) se encuentran por ejemplo en los sistemas de quimiotaxis, que es un tipo particular de sistema a dos componentes muy estudiados (Adebali et al.

2017). CheA de *Escherichia coli* fue una de las primeras HQs de clase II en ser estudiada en gran detalle. Esta carece de dominio sensor (Bilwes et al. 1999) y es regulada mediante la interacción con quimiorreceptores (Muok, Briegel, y Crane 2020).

Finalmente, las HQs de clase III (HQIII) está formada por una familia de proteínas que comparte propiedades de HQI y HQII. Las mismas poseen un módulo sensor N-terminal típico de HQI, pero también tienen un dominio Hpt hacia el N-terminal del dominio quinasa, similar a CheA (Wuichet y Zhulin 2010).

Los dominios REC de los RR constituyen versátiles dominios de señalización

Los RR son las proteínas encargadas de efectuar la respuesta adaptativa, que en muchos casos es regular la transcripción de uno o más genes. Independientemente de la familia a la que pertenezcan siempre contienen un dominio receptor (REC). Este dominio presenta un plegamiento tipo α/β Rossmann: 5 α -hélices rodean a una lámina β central de 5 hebras paralelas (Figura 1C). Si bien existe una gran variabilidad entre las secuencias del dominio REC, se distinguen regiones conservadas, como por ejemplo, la zona central de las hebras β , donde se ubica el aspartato fosforilable, y ciertos aminoácidos en los bucles β - α que constituyen el sitio activo (Gao, Bouillet, y Stock 2019b). Estos residuos (3 aspárticos, una lisina y una serina/threonina) forman el sitio de interacción con el grupo fosfato y la coordinación del Mg^{2+} , esenciales en la fosfotransferencia y en los mecanismos alostéricos controlados por el estado de fosforilación del RR (Bourret 2010). Por otro lado, la región más variable se encuentra en las hélices y bucles periféricos.

Aproximadamente un cuarto de los RRs están formados únicamente por este dominio REC. Generalmente regulan procesos por interacciones con otros componentes celulares, como por ejemplo CheY, participando de la quimiotaxis o formación de biofilms (Nesper et al. 2017). También pueden actuar como intermediarios en la fosfotransferencia en sistemas de fosfo-relevos, como SdrG y MrrA en respuesta general al estrés (Gottschlich et al. 2018), o Spo0F en esporulación (Lori et al. 2018), como reguladores alostéricos de HQs (Childers et al. 2014) o como adaptadores de proteasas (Lau et al. 2015). Sin embargo, la mayoría de los RR tienen hacia el extremo C-terminal del dominio REC un dominio efector, de los cuales los más representados incluyen un dominio de unión al DNA (DBD: DNA Binding Domain). Otros tipos de dominios efectores pueden estar presentes, como por ejemplo dominios con actividad enzimática, de unión a otras proteínas/ligandos o con arquitecturas más complejas unidos a dominios de señalización tipo PAS, GAF, HisKA, HATPasa, etc (Gao, Bouillet,

y Stock 2019b). La gran variedad de RR tanto en sus estructuras como en las funciones que llevan a cabo, es consistente con la diversidad de respuestas que regulan.

Los dominios REC existen en dos conformaciones predominantes, inactiva y activa, que se encuentran en equilibrio (Gardino et al. 2009). En la mayoría de los casos, la fosforilación desplaza ese equilibrio, estabilizando la conformación activa. El pasaje del estado inactivo a activo involucra cambios conformacionales que se inician en el sitio de fosforilación y se propagan hacia otras regiones efectoras involucradas en la interacción con otras proteínas o dominios (Gao, Bouillet, y Stock 2019).

Es importante resaltar que el dominio REC tiene actividad enzimática, catalizando reacciones de fosfotransferencia y autodesfosforilación. La fosfotransferencia puede ocurrir de dos maneras: desde la HQ, o mediante pequeños dadores de grupo fosforilo como el acetil fosfato o fosforamidato (Lukat et al. 1992), que pueden encontrarse en la célula (Wolfe 2010). Sin embargo, en general la velocidad de autofosforilación es mucho menor que el de la fosfotransferencia mediada por la HQ (McCleary 1996; Gao y Stock 2017). Se ha visto que la velocidad de la fosfotransferencia puede acelerarse mediante interacciones que estabilizan la conformación activa del REC (Gao, Bouillet, y Stock 2019a). Por ejemplo, la unión al DNA, para aquellos RR que tengan ese dominio efector (Barbieri, Wu, y Stock 2013), interacción con proteínas efectoras (Barbieri et al. 2010; Fernández et al. 2015), a su propia HQ específica (Trajtenberg et al. 2014) o la dimerización a altas concentraciones de proteína (Creager-Allen, Silversmith, y Bourret 2013; Trajtenberg et al. 2014).

Especificidad, eficiencia y direccionalidad en la señalización

Comprender los procesos de detección y procesamiento de la señal implica entender cómo las proteínas que participan en la vía son capaces de transmitir eficientemente la información (Buschiazzo y Trajtenberg 2019). Para esto, la regulación alostérica mediante rearrreglos conformacionales de sus componentes, las modificaciones post-traduccionales basadas en la fosforilación y desfosforilación de residuos específicos y las interacciones proteína:proteína y ADN:proteína deben estar adecuadamente configuradas para asegurar que el sistema conecte una respuesta adaptativa con una señal en forma eficiente y específica.

En el contexto celular, si bien pueden existir docenas de SDCs actuando en simultáneo, en la mayoría de los casos cada HQ interactúa con uno o dos RR, minimizando la reacción cruzada entre las diferentes vías (Laub y Goulian 2007). Para que cada estímulo detectado genere la respuesta fisiológica correspondiente, es necesario un reconocimiento específico entre pares HQ:RR que permita la fosfotransferencia.

Mediante análisis de covariación fue posible identificar un conjunto de regiones determinantes de especificidad, alejadas del sitio de fosforilación, en las hélices $\alpha 1$ de ambas proteínas y algunos residuos también en la hélice $\alpha 2$ del DHp y el bucle $\beta 4\alpha 4$ del REC (Skerker et al. 2008; Weigt et al. 2009; Buschiazzo y Trajtenberg 2019; Skerker et al. 2008; Weigt et al. 2009). Por otro lado, otros dominios de la HQ pueden estar involucrados en la interacción, teniendo implicancias en la funcionalidad del sistema (Yamada et al. 2009; Xie, Wu, y Han 2020) (Lima et al. 2021).

El hecho de que muchas de las HQs promuevan la fosforilación y desfosforilación del RR implica que deben existir mecanismos regulatorios que impidan ciclos fútiles y pérdida improductiva de energía celular. La evidencia experimental, tanto estructural como funcional, indican que las HQs adoptan ciertas conformaciones que se asocian a diferentes estados funcionales (Buschiazzo y Trajtenberg 2019). Esto permite aislar cada una de las actividades y entenderlo como mecanismo que evita desregulaciones improductivas del sistema.

Por otro lado, la mayoría de los sistemas canónicos HQ:RR catalizan la reacción de fosfotransferencia en sentido His \rightarrow Asp, siendo despreciable la reacción reversa (Buschiazzo y Trajtenberg 2019). Por el contrario, los sistemas fosfo-relevos requieren, en algunas de las reacciones de fosfotranferencia, ocurra en la dirección Asp \rightarrow His para poder construir cascadas de señalización (Burbulys, Trach, y Hoch 1991; Janiak-Spens, Cook, y West 2005; Lassak, Bubendorfer, y Thormann 2013; Lori et al. 2018). Nuestro grupo, a partir de la comparación de estructuras 3D de complejos HQ:RR tanto reversibles como irreversibles, propuso que la direccionalidad podría estar vinculada a la distancia entre el nucleófilo (Asp) y el dador del grupo fosforilo (His) en el centro de reacción (Trajtenberg et al. 2016). En otras palabras, a mayor distancia His-Asp, las reacciones de fosfotransferencia se desplazan hacia el P~Asp (fosfo-aspartato). Esto implicaría mecanismo de sustitución nucleofílica con un carácter más disociativo y mayor asimetría en la posición del Mg²⁺.

Sistema DesK-DesR de *B. subtilis* como modelo de estudio

El SDC DesK-DesR de *Bacillus subtilis* participa de la homeostasis de la membrana celular ante el descenso brusco de temperatura ambiente. En esta vía participa una histidina-quinasa DesK, perteneciente a la familia de HisKA_3, la cual presenta un dominio sensor transmembrana en su extremo N-terminal. Se ha propuesto que este dominio es capaz de detectar cambios en el grosor de la bicapa lipídica (Cybulski et al. 2010), un proceso dependiente de la temperatura y composición lipídica. El descenso

brusco de la temperatura dispara rearrreglos conformacionales en DesK, que son alostéricamente transmitidos a través de dos largas α -hélices hacia la región catalítica (D. Albanesi et al. 2009). La activación de DesK por la señal promueve la autofosforilación de la histidina en la posición 188 (His₁₈₈), para luego transferir este mismo grupo fosfato al Asp₅₄ de DesR, el regulador de respuesta efector (Figura 2). DesR, perteneciente a la familia LuxR-NarL, una vez fosforilado actúa como activador de la transcripción del gen *des*, que codifica a la $\Delta 5$ -desaturasa de membrana. Esta desaturasa fluidifica la bicapa por desaturación *in situ* de los ácidos grasos de los fosfolípidos (Mendoza 2014). De esta manera, se recupera la fluidez de la membrana como respuesta adaptativa a un choque frío. Cuando la bacteria se encuentra a 37°C, el sistema se encuentra apagado, ya que DesK actúa como fosfatasa específica sobre P-DesR. Esto asegura que la vía no se prenda inespecíficamente por otras HQ o pequeños dadores de fosfato (Aguilar 2001; Daniela Albanesi, Mansilla, y de Mendoza 2004).

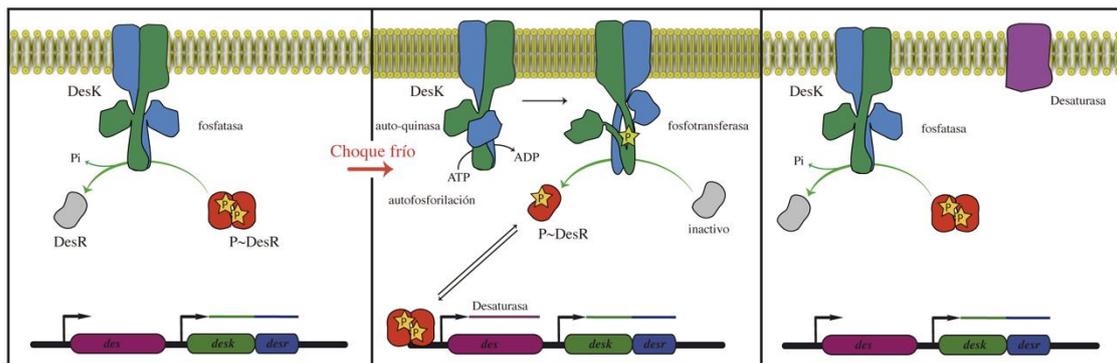


Figura 2. Funcionamiento del sistema de señalización DesK-DesR: en ausencia de señal, DesK actúa como fosfatasa sobre P-DesR y el sistema se encuentra apagado. Ante el choque frío, la membrana se rigidiza y el sistema se activa: DesK se autofosforila y luego fosfotransfiere a DesR, que dimeriza. El regulador se une a la región promotora del gen *des*, donde tetrameriza y activa la expresión de la desaturasa que actúa sobre la membrana plasmática, reestableciendo su fluidez. Figura modificada de Trajtenberg et al. 2014.

El sistema DesK-DesR es uno de los SDCs estudiados en mayor profundidad desde el punto de vista estructural y funcional. Por ejemplo, disponemos de estructuras experimentales en la mayoría de los estados funcionales de DesK y DesR, tanto solas (D. Albanesi et al. 2009; Trajtenberg et al. 2014) como en complejos (Trajtenberg et al. 2016), la cual hace de este sistema un excelente modelo para estudiar algunos aspectos moleculares en mayor detalle.

A partir de las estructuras cristalográficas de DesKC (región citoplasmática soluble), se ha propuesto que DesK adopta al menos tres estados estructurales y funcionales diferentes de acuerdo a la presencia/ausencia de la señal (Figura 3) (Albanesi et al 2009). El mecanismo alostérico que controla la transición fosfatasa/quinasa implicaría la formación/ruptura de una estructura de *coiled-coil* en la hélice-S, lo cual estaría acoplado a movimientos rotacionales del dominio DHp (D. Albanesi et al. 2009). Estos movimientos harían que, en el estado fosfatasa, la histidina fosforilable se encuentre inaccesible, en el interior del dominio DHp. Cuando DesK es activada por la señal, el motivo *coiled-coil* se desarma exponiendo la histidina al solvente, mediante movimientos de rotación de las hélices α (D. Albanesi et al. 2009; Trajtenberg et al. 2014; Saita et al. 2015; Trajtenberg et al. 2016).

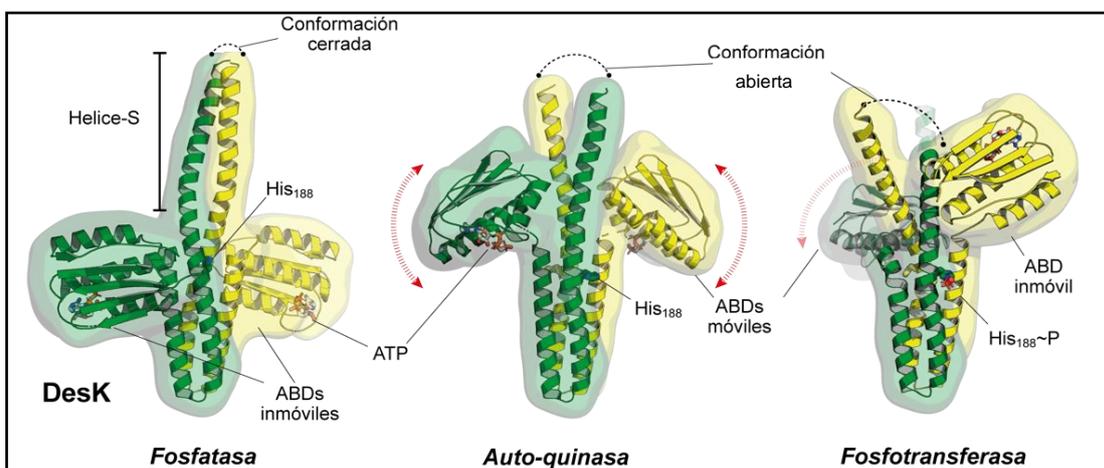


Figura 3. Diferencias estructurales en DesKC en sus 3 estados funcionales: En el estado fosfatasa las hélices forman el *coiled-coil*, la His188 se posiciona hacia el interior del DHp y los dominios CA se ubican simétricamente e inmóviles al DHp. En los estados autoquinasa y fosfotransferasa, el *coiled-coil* se desarma exponiendo a la His 188. En el estado autoquinasa, ambos dominios CA se liberan y en el fosfotransferasa sólo uno de ellos. (Figura modificada de Imelio, Trajtenberg y Buschiazzi 2021).

En esta tesis nos propusimos estudiar posibles determinantes de direccionalidad en la fosfotransferencia, evaluando *in vitro* las reacciones de transferencia de fosfato para diferentes variantes de DesK y DesR, diseñados racionalmente en función de la información estructural disponible. En la misma hemos podido identificar ciertos residuos claves para favorecer la fosforilación de DesR.

HIPÓTESIS

Las reacciones de fosfotransferencia entre HQ y RR se diferencian de otros tipos de reacciones de fosforilación involucradas en sistemas de señalización, como las catalizadas por Ser/Thr o Tyr quinasas, en que la direccionalidad de la transmisión de información puede ser configurada. Esta propiedad no solo permite construir sistemas eficientes de señalización, sino que además permite configurar cascadas de fosfotransferencias más complejas. Nuestra hipótesis es que mediante la modificación de ciertos residuos o motivos sería posible alterar la direccionalidad del sistema.

Objetivo general:

La información en SDCs se transmite químicamente mediante una serie de reacciones de transferencia de fosfato, para las cuales se requiere un estricto control de las mismas, que aseguren la correcta transmisión del mensaje al mismo tiempo que se minimiza la pérdida de energía celular. El objetivo es comprender los mecanismos moleculares que confieren direccionalidad en la fosfotransferencia. Para esto utilizaremos como modelo el sistema DesK-DesR, ya que disponemos de una abundante información estructural y funcional, que nos guiarán en el diseño y evaluación de variantes de ambas proteínas.

Objetivos específicos:

1) Evaluar la reversibilidad en el contexto de mutaciones de residuos conservados del sitio activo del complejo HQ:RR en el estado fosfotransferasa

La reacción de fosfotransferencia entre la HQ y el RR implica el ataque nucleofílico del Asp fosforilable sobre el fosfato covalentemente unido al Nε2 de la His. El centro de reacción se conforma con la unión de ambas proteínas y en el mismo se posicionan una serie de residuos muy conservados que permiten coordinar un catión de Mg²⁺ así como estabilizar al P~Asp una vez completada la reacción (Gao, Bouillet, y Stock 2019). Para entender el papel de estos residuos conservados en la reacción de fosfotransferencia, se decidió evaluar la direccionalidad analizando reacciones de fosfotransferencia para variantes donde se sustituyeron el Asp189 y la Gln193 en DesK por Ala, o la Thr80 en DesR por Ala o Ser.

2) Estudiar el efecto de sustituciones en posiciones claves del complejo DesK:DesR en el estado fosfatasa.

Las HQ adoptan diferentes conformaciones de acuerdo con los estados funcionales del sistema. En función de la información estructural disponible decidimos analizar la direccionalidad utilizando variantes de DesR que afecten diferencialmente la interacción

con DesK, únicamente en el estado fosfatasa. Por ejemplo, se sustituyó los residuos Arg84 y Gln10 de DesR por Ala. También se evaluó funcionalmente a una variante de DesK que presenta el motivo *coiled-coil* N-terminal desestabilizado (DesK_{DEST}).

Estrategia experimental

Clonado de mutantes puntuales en DesK y DesR mediante la técnica *RF cloning*

A partir de los plásmidos pQE80-DesR_{REC} (Trajtenberg et al. 2014) y pQE32-DesKC (Daniela Albanesi, Mansilla, y de Mendoza 2004) se diseñaron las mutantes pQE80-DesR_{REC-T80A}, pQE80-DesR_{REC-T80s}, pQE80-DesR_{REC-R84A}, pQE80-DesR_{REC-Q10A}, pQE32-DesKC_{Q193A} y pQE32-DesKC_{D189A} mediante la técnica de clonado libre de enzimas de restricción (*Restriction-Free Cloning*) (Unger et al. 2010).

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de las proteínas salvajes, señalando en magenta el *tag* de histidinas, en verde el sitio de corte para la proteasa TEV y en amarillo la secuencia final luego del corte. Además, se mencionan los valores de masa molecular y coeficientes de extinción, extraídos del *software* Benchling (<http://www.benchling.com>):

DesR_{REC}:

MRGS **HHHHHH** GSGS **ENLYFQ** GSGSMISIFIAEDQQMLLGALGSLNLEDDMEVVGKGTGQD
 AVDFVKKRQPDVCMIDIEMPGKTGLEAAEELKDTGCKIIILTTFARPGYFQRAIKAGVKGYLLKDS
 PSEELANAIRSV MNGKRIYAPELMEDLYSEA

Masa molecular (KDa)	15.1
Abs 0.1% (1 g/L)	0.4

DesKC:

MRGS **HHHHHH** GIHM **ENLYFQ** GRKERERLEEKLEDANERIAELVKLEERQRIARDLHDTLGQKL
 SLIGLKSDLARKLIYKDPEQAARELKS VQQTARTSLNEVRKIVSSMKGIRLKDDELINIKQILEADI
 MFIYEEEEKWPENISLLNENILSMCLKEAVTNVVKHSQAKTCRVDIQQLWKEVVITVSDDGTFFKG
 EENSFSKGGHLLGMRRERLEFANGSLHIDTENGTKLTMAIPNNSK

Masa molecular (KDa)	24.9
Abs 0.1% (1 g/L)	0.56

La técnica de clonado libre de enzimas de restricción se realizó en dos pasos de amplificación por PCR para insertar mutaciones de dos o tres bases en la secuencia a partir del plásmido parental. De acuerdo a la ubicación del residuo a sustituir en la proteína, se diseñó un par de cebadores donde uno de ellos (puede ser Fw o Rv) contiene el codón que codifica para la sustitución del aminoácido de interés. Luego se realizó la primer PCR utilizando dichos cebadores y el plásmido molde (pQE80-DesR_{REC} o pQE32-DesKC). Como resultado se obtuvo un producto entre 250-400 pb, que llamamos *megaprimer*. A continuación (Tabla 1) se detallan los primers y DNA moldes utilizados para clonar cada construcción. En rojo se señalan las mutaciones incluidas para generar las sustituciones puntuales.

Tabla 1- Diseño de mutantes puntuales DesK y DesR

Construcción generada	Primer Fw	Primer Rev	Plásmido de origen
pQE80-DesRREC_T80A	5'-ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCA-3'	5'-GCGAAGGTGGCTAAGATGATAATTTGCAGC-3'	pQE80-DesRREC
pQE80-DesRREC_T80S	5'-ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCA-3'	5'-GCGAAGGTGCTTAAGATGATAATTTGCAGC-3'	pQE80-DesRREC
pQE80-DesRREC_R84A	5'-GATTAGTATATTTATTGCAGAAGATCAGCAAA TGC-3'	5'-GAAAGTAACCGGGTGGCGGAAGGTGGTTAAG-3'	pQE80-DesRREC
pQE80-DesRREC_Q10A	5'-GTATATTTATTGCAGAAGATGGCAAATGCTG CTGG-3'	5'-GCTTCGCTGTATAAGTCCTCCATCAG-3'	pQE80-DesRREC
pQE32-DesKC_Q193A	5'-GATACGCTTGGGGCAAAGCTTTCTC-3'	5'-GAATTATTAGGAATTGCCATGGTAAGCTTGGTC-3'	pQE32-DesKC
pQE32-DesKC_D189A	5'-CGATCTCCATGGACGCTTGGGCAAAAG-3'	5'-GAATTATTAGGAATTGCCATGGTAAGCTTGGTC-3'	pQE32-DesKC

En las Tablas 2 y 3 se detallan los reactivos y las condiciones de amplificación utilizadas en la PCR I:

Tabla 2- Reactivos utilizados en la reacción de PCR I

Reactivos	1 X	Concentración final
Agua		
Buffer 5X HF	10	
dNTPs (10 mM)		1 mM de c/u
Primer Fw (10 µM)	1.25	
Primer Rev (10 µM)	1.25	
Phusion	0.5	
DNA molde		1 ng
Volumen Total (µL)	50	

Tabla 3- Condiciones amplificación PCR I

Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
98 °C	3'	1X
98 °C	10''	25X
62 °C	10''	
72 °C	15''	
72 °C	3'	1X

Una vez obtenidos los Megaprimers, se procedió a la segunda amplificación lineal por PCR, de acuerdo con el protocolo resumido en Tablas 4 y 5:

Tabla 4- Reactivos utilizados en la reacción de PCR II

Reactivos	1 X	Concentración final
Agua		
Buffer 5X HF	10	
dNTPs (10 mM)		1 mM de c/u
Megaprimer		1 ng/ μ L
Phusion	0.5	
DNA molde		20 ng/50 μ L
Volumen Total (μ L)	50	

Tabla 5- Condiciones amplificación PCR II

Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
98 °C	3'	1X
98 °C	20''	30X
60 °C	1'	
72 °C	4'	
72 °C	10'	1X

Una vez finalizada la PCR II, se realizó un tratamiento con la enzima Dpn I durante 45' a 37 °C seguido de una inactivación de la misma a 80 °C durante 20 min, para descartar el plásmido parental. Con el producto de esta PCR II se transformó células quimiocompetentes DH5 α mediante shock térmico a 42 °C. Luego se sembraron las células transformadas en placas de LB ampicilina (ambos tipos de plásmidos utilizados poseen esta resistencia) y se incubó en estufa a 37 °C. Se seleccionaron 3 colonias de cada transformación para amplificar y purificar plásmidos. Finalmente las secuencias de los plásmidos fueron confirmados por secuenciación (Macrogen).

Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes fueron expresadas a partir de los plásmidos: pQE80-DesR_{REC}, pQE80-DesR_{RECT80A}, pQE80-DesR_{REC-T80S}, pQE80-DesR_{REC-R84A}, pQE80-DesR_{REC-Q10A}, pQE32-DesKC, pQE32-DesKC_{Q193A} y pQE32-DesKC_{D189A} transformados en la cepa *E. coli* TOP 10 F'. La inducción se realizó con 0.5 mM IPTG durante 4 hs a 30 °C. Luego los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm y las células se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5M NaCl, inhibidor de proteasas PEFABLOC (Roche), 0.5 mg/ml lisozima y 1% Triton X-100). Por cada gramo de pellet se utilizaron 5 ml de buffer de lisis. Luego las muestras fueron tratadas por sonicado (pulsos 1" 40% amplitud con intervalos de descanso de 3" durante 5') o prensa francesa y centrifugadas a 12000g por 40 min a 4°C para separar la fracción soluble que contiene las proteínas sobre-expresadas de interés. La purificación de las proteínas se realizó en una serie de pasos cromatográficos. Dado que todas las proteínas recombinantes tienen hacia su N-terminal un *His-tag*, se realizó un primer paso de cromatografía de afinidad a un catión metálico inmovilizado (IMAC) (HisTrap, GE Healthcare). La unión de la proteína y el lavado de la columna se realizó con buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5M NaCl y 20 mM imidazol). La elución se realizó haciendo un gradiente lineal en 10 volúmenes de columna con Buffer B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5M NaCl, 500 mM imidazol). Luego las proteínas eluidas se incubaron con la proteasa TEV (1 mg por cada 40 mg de proteína) dentro de una membrana de diálisis en un buffer 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5M NaCl, 0.5mM DTT durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó una 2° IMAC donde se colectó la fracción no unida, de forma de separar la proteína de interés de TEV (que queda retenida en la columna). El último paso de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75 HiLoad 16/60 GE Healthcare) pre-equilibrada en buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.3M NaCl. Finalmente, las proteínas se concentran por ultracentrifugación utilizando centricones (Vivaspin) hasta ~10 mg/mL y almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso.

Análisis *in vitro* de las actividades de fosfotransferencia y fosfatasa del complejo DesK:DesR utilizando Phostag SDS-PAGE

1) Ensayo funcional fosfotransferencia de P~DesKC sobre DesR_{REC}

El ensayo comienza con la obtención de P~DesKC: DesKC (wtype o mutante Q193A) mediante incubación con 10 mM ATP y 10 mM MgCl₂ en un buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 0.3 mM NaCl, durante una hora a 24°C. Luego se proteína fue inyectada en una columna Superdex 75 HiLoad 10/300 (GE Healthcare) pre-equilibrada en buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 0.3 mM NaCl y se colectó la fracción correspondiente al dímero de DesKC. La reacción de fosfotransferencia se realizó incubando P~DesKC a 26 μM en presencia de cantidades equimolares de DesR_{REC} (wtype o mutante) en un buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. A diferentes tiempos se obtuvieron muestras: 0, 20", 40", 1', 1.5', 2.5', 5', 10', 20', 30'. La reacción se frenó tomando alícuotas de 15 μL y agregando 15 μL de *Sample Buffer 2X* con 2.5 mM DTT, y conservadas en hielo. Luego se agregó 40 mM de iodoacetamida para bloquear el exceso de DTT y se dejó actuar 10' a temperatura ambiente. Las muestras se sembraron en un Phos-tag 12% SDS-PAGE (preparado con 100 μM de Phostag y 100 μM ZnCl₂) para evaluar la aparición y desaparición de especies proteicas fosforiladas por retardo electroforético (Trajtenberg et al. 2014). Los geles fueron luego incubados en coomassie coloidal, y posteriormente se hizo un análisis de las bandas por densitometría para cuantificar el grado de fosforilación de cada proteína (P~proteína/proteína total). Esto último se realizó con el programa ImageJ.

1) Ensayo funcional fosfatasa de DesKC sobre P~DesR_{REC}

El ensayo se inició con la obtención de P~DesR_{REC}: DesR_{REC}(wtype o mutante) se incubó con 50 mM acetil-fosfato (AcP) y 30 mM MgCl₂ en un buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 0.3 mM NaCl, durante una hora a 24°C. Luego la forma fosforilada y dimerica se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 75 HiLoad 10/300 (GE Healthcare) pre-equilibrada en buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 0.3 mM NaCl. La reacción de fosfatasa consistió en incubar 26 μM de P~DesR_{REC} (wtype o mutante) con cantidades equimolares de DesKC en un buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Luego se procede de igual manera que el ensayo anterior para realizar el análisis.

Ensayo de cristalización del complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC-Q10A}, colecta de datos y construcción del modelo

Para preparar el complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC-Q10A} se mezclaron proteínas puras (como se mencionó previamente) a concentraciones finales de cada una de 300 μ M de DesKC_{H188E} y 165 μ M de DesR_{REC-Q10A}. Al complejo se agregó MgCl₂ y AMP-PCP a concentraciones finales de 20 y 5 mM, respectivamente. Se iniciaron varios experimentos de cristalización en placas Limbro, a diferentes concentraciones de PEG 3350 (14%, 16%, 18%, 20%, 22% y 24%) y citrato de potasio (0.25 M, 0.3 M, 0.35 M, 0.4 M) para encontrar la condición óptima de formación de cristales, basándonos en lo reportado previamente para el complejo DesKC_{H188E}:DesR_{REC} (Trajtenberg et al. 2016). La cristalogénesis se realizó mediante la técnica de gota colgante. Para ello, las gotas se formaron mezclando 2 μ L de solución de reservorio + 2 μ L del complejo de proteínas. Luego de 7 días aparecieron pequeños cristales en la condición PEG 3350 20% (w/v) y 0.35 M citrato de potasio. Para la optimización del crecimiento de cristales se utilizó la técnica de *microseeding*. Para esto se prepararon gotas frescas de cristalización y se dejó equilibrar con el reservorio hasta el siguiente día. Utilizando una fibra (en este caso un bigote de gato) se sumergió en una gota de cristales pequeños de la placa inicial y luego se esparció sobre cada gota fresca preparada el día anterior. Al cabo de 2 días se formaron cristales de tamaño suficiente para hacer experimentos de difracción. Los cristales fueron pescados y sumergidos por un tiempo breve en una solución crioprotectora con 20% PEG 3350, 0.35 M citrato de potasio, 5 mM AMP-PCP, 25% (v/v) glicerol y (20-150) mM MgCl₂ + 5mM BeF³⁻.

La difracción de rayos X del cristal se llevó a cabo en el generador de ánodo de cobre rotatorio de la Unidad de Cristalografía de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo. El patrón de difracción obtenido se procesó con el programa autoProc (Vonrhein et al. 2011). La estructura fue resuelta por reemplazo molecular en Phaser (McCoy et al. 2007) utilizando cada una de las moléculas del modelo de DesKC_{H188E}:DesR_{REC} (PDB Id 5IUU). El refinamiento se realizó con el programa Buster (Bricogne et al., 2009) y las modificaciones manuales al modelo se realizaron con Coot (Emsley et al. 2010). La validación se realizó durante y hacia el final del refinamiento, utilizando las herramientas de MolProbity (Chen et al. 2010). La visualización y análisis estructural de los modelos proteicos se realizaron con Pymol (Schrodinger, 2015).

Resultados

Actividades de fosfotransferencia y fosfatasa entre DesKC y DesR_{REC}

Con el objetivo de analizar la direccionalidad en el sistema de señalización DesK:DesR, se obtuvieron variantes de DesKC y DesR_{REC} con sustituciones aminoacídicas en ciertas posiciones para evaluar su efecto en las reacciones de fosfotransferencia. Esto consistió en expresar y purificar las proteínas recombinantes (salvajes y mutantes) para luego realizar los ensayos de actividad. Los protocolos de expresión y purificación de DesKC y DesR_{REC} fueron previamente optimizados en el laboratorio (D. Albanesi et al. 2009).

El primer paso fue expresar y purificar las proteínas salvajes (Figura 4A y B) como se detalla en la sección de Estrategia Experimental. Brevemente, la purificación consiste en dos pasos de cromatografía de afinidad por metales (IMAC) (incluida la digestión con proteasa TEV) y un último paso de cromatografía de exclusión molecular (Figura 4A). Para los ensayos de actividad, fue necesario la preparación previa de las formas fosforiladas de DesKC y DesR_{REC}. Las mismas fueron obtenidas mediante incubación con ATP o acetil-fosfato, respectivamente, en presencia de MgCl₂ y a temperatura ambiente (22°C). El exceso de ATP o acetil-fosfato es luego descartado mediante cromatografía de exclusión molecular.

En este trabajo se realizaron dos tipos de reacciones: i) **Reacción de fosfotransferencia**, la cual se inicia incubando DesKC fosforilada con DesR_{REC}, y ii) **Reacción fosfatasa**, comenzando la reacción con DesR_{REC} fosforilada e incubando con DesKC. A distintos tiempos se obtienen muestras de la reacción, la cual es frenada en presencia de altas concentraciones del detergente desnaturalizante SDS (sodium dodecyl sulfate). Luego las reacciones fueron analizadas mediante Phostag SDS-Page y se cuantifica el grado de fosforilación por densitometría (Ver Estrategia Experimental).

En la figura 4, se puede apreciar ensayos de fosfotransferencia (DesKC~P en presencia de DesR_{REC}, Figura 4C) y fosfatasa (DesR_{REC}~P en presencia de DesKC figura 4D) con las proteínas salvajes. A la derecha se incluyen las cuantificaciones realizadas por densitometría de al menos dos repeticiones por reacción. Es importante resaltar que, en este tipo de reacciones, debido a que estamos utilizando una variante de DesK que carece del dominio sensor transmembrana, esta se encuentra desregulada (Daniela Albanesi, Mansilla, y de Mendoza 2004). Por ende, en estas reacciones, ocurre en forma simultánea la fosforilación y la desfosforilación de DesR, tanto intrínseca como promovida por DesK. En la figura se puede observar cómo DesK rápidamente transfiere el fosfato a DesR_{REC} para luego promover su desfosforilación, algo que ya había sido

previamente observado por Albanesi et al (Daniela Albanesi, Mansilla, y de Mendoza 2004). En la reacción de fosfatasa, se observa primordialmente la rápida desfosforilación de DesR_{REC} y una baja fosfotransferencia reversa, o sea muy poco fosfato es transferido desde DesR a DesKC. Esto está de acuerdo con observaciones previas hechas por el grupo de Diego de Mendoza (Daniela Albanesi, Mansilla, y de Mendoza 2004) y nuestro laboratorio (Trajtenberg et al. 2016).

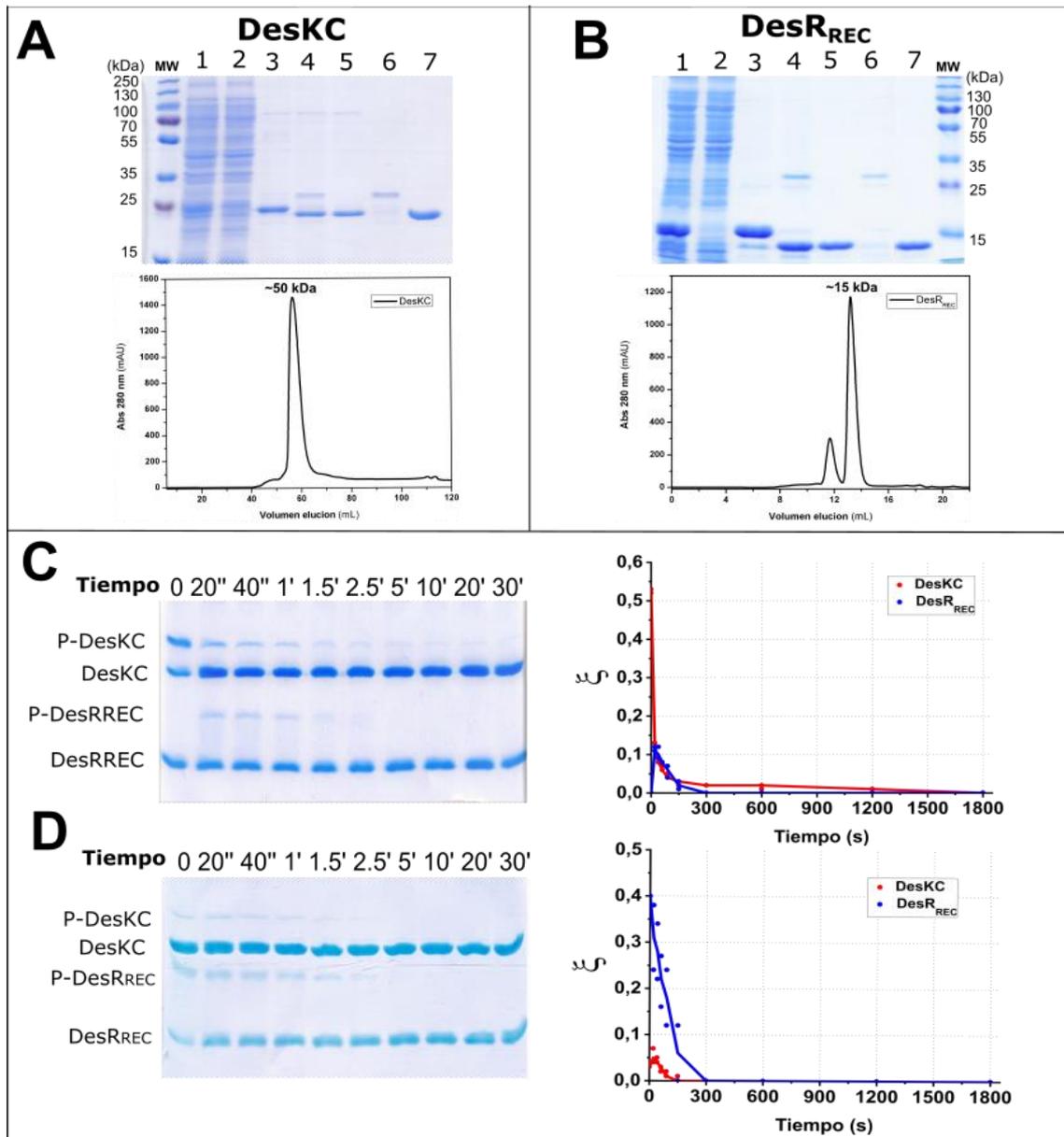


Figura 4. DesKC y DesR_{REC}: purificación y ensayos de fosfotransferencia. A) y B) SDS-PAGE de las diferentes etapas de purificación (1: soluble post lisis celular; 2: fracción no retenida 1°IMAC; 3: elución 1° IMAC; 4: post diálisis y corte con TEV; 5: fracción no retenida 2°IMAC; 6: elución 2°IMAC; 7: elución pico mayoritario SEC) y cromatograma de SEC del último paso cromatográfico de DesKC y DesR_{REC}, respectivamente. C) Ensayo de fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC} por Phostag-SDS-PAGE. A la izquierda se muestra una foto del gel

Phostag. A la derecha: Curso temporal de la reacción, donde se grafica el grado de fosforilación de DesKC (en rojo) y DesR_{REC} (en azul) en función del tiempo, de acuerdo a la cuantificación por densitometría de los geles. D) Ensayo de fosfatasa DesR_{REC}~P + DesKC por Phostag-SDS-PAGE. A la izquierda se muestra una foto del gel Phostag. A la derecha: Curso temporal de la reacción, donde se grafica el grado de fosforilación de DesKC (en rojo) y DesR_{REC} (en azul) en función del tiempo, de acuerdo a la cuantificación por densitometría de los geles.

El residuo Gln193 de DesK es esencial para la actividad fosfatasa

En función de estos resultados, decidimos evaluar la direccionalidad en un contexto de ausencia de actividad fosfatasa. La desfosforilación por hidrólisis del P~Asp ocurre por ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el fosfato del RR (Pazy et al. 2010). Esta reacción puede ocurrir por una actividad intrínseca del propio RR o ser promovida por la acción de la HQ (actividad fosfatasa). Un residuo clave en esta actividad fosfatasa es una Gln o Asn muy conservada en la posición H+5 (a 5 residuos a continuación de la His fosforilable) en el dominio DHP de la HQ (Huynh, Noriega, y Stewart, s. f., 2010). Para esto disponemos de un plásmido codificante para la variante DesKC_{Q193A}, la cual expresamos y purificamos siguiendo los protocolos ya establecidos. Realizamos las reacciones de fosfotransferencia (Figura 5A) y fosfatasa (Figura 5B) con DesR_{REC} que fueron analizados mediante SDS-PAGE PhosTag.

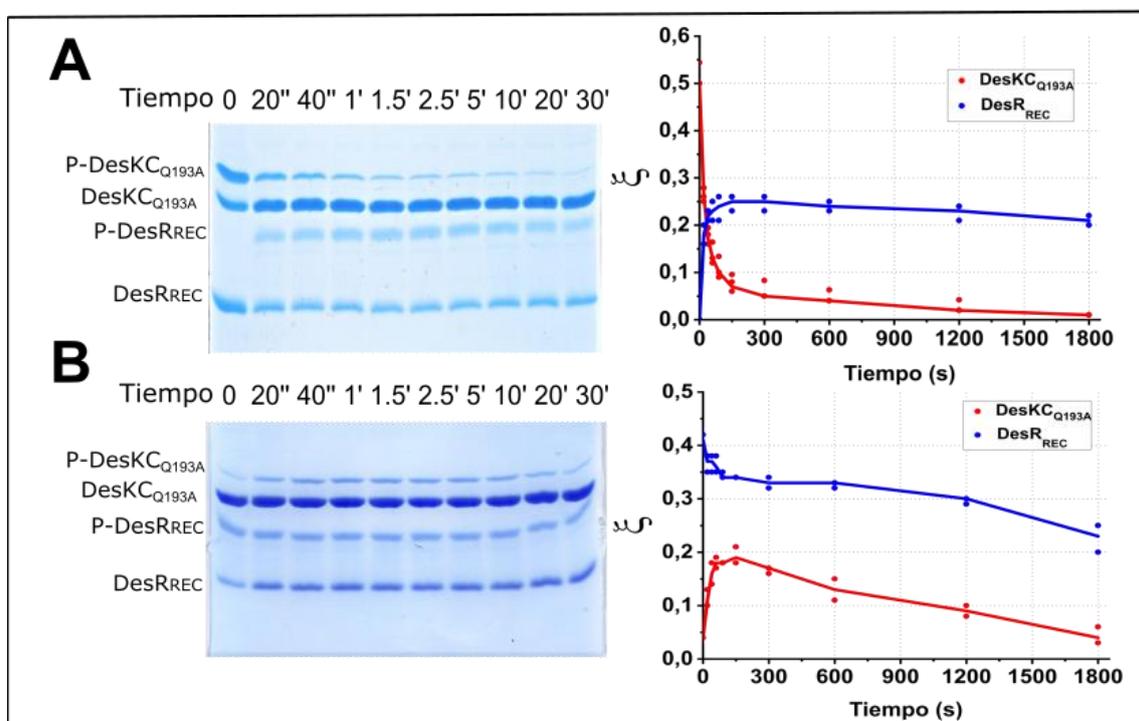


Figura 5. DesKC_{Q193A} + DesR_{REC}: Ensayos de fosfotransferencia y fosfatasa. A) Ensayo fosfotransferencia DesKC_{Q193A}~P + DesR_{REC}: Phostag SDS-PAGE (izquierda) y curso temporal

de la reacción (derecha). B) Ensayo fosfatasa DesR_{REC}~P + DesKC_{Q193A}: Phostag SDS-PAGE (izquierda) y curso temporal de la reacción (derecha).

En la reacción de fosfotransferencia se observa que el fosfato es rápidamente transferido hacia DesR_{REC}, pero luego el fosfato no es hidrolizado, sino que buena parte se mantiene fosforilado durante los 30' de reacción. En el ensayo fosfatasa, partiendo desde P~DesR_{REC}, se observa que en el primer minuto de la reacción, hay un ~15% del fosfato que va hacia DesKC_{Q193A}, y el resto se mantiene unido al regulador durante todo el curso temporal. Por lo tanto, al sustituir el residuo Gln193 de DesKC por Ala, se pierde la actividad fosfatasa manteniendo la fosfotransferencia inalterada. Esto es consistente con el importante rol de esta amida en la reacción fosfatasa. En estas condiciones se puede observar cierto grado de reversibilidad en la fosfotransferencia. Sin embargo, el fosfato se distribuye mayoritariamente en DesR, indicando que el equilibrio está desplazado hacia la fosforilación del aspartato.

Sustitución de la Thr80 de DesR en la fosfotransferencia

La posición 80 de DesR se encuentra muy conservada en todos los RR, siendo generalmente ocupado por una Thr o una Ser (Figura 6B). La Thr80 de DesR se ubica al inicio del bucle $\beta 4\alpha 4$, adyacente al sitio de fosforilación. La interacción mediante puente de hidrógeno con el fosfato le confiere un rol de "sensor" del estado de fosforilación, ya que provoca un reposicionamiento de la Thr, el cual genera un cambio estructural en el bucle $\beta 4\alpha 4$ (Trajtenberg et al. 2014). Mediante estas reorganizaciones, este residuo está involucrado en el mecanismo alostérico de activación del RR (Cho et al. 2000; Birck et al. 1999; Hastings et al. 2003). Además, en el complejo DesK:DesR en el estado fosfotransferasa, construido mediante modelización a partir de la estructura experimental DesK_{H188E}:DesR_{REC} (PDB Id 5IUK) (Trajtenberg et al. 2016), la Thr80 queda a distancia de interacción del fosfato unido covalentemente a la His, previo a la fosfotransferencia (Figura 6C). Por ende, la Thr80 podría estar involucrada en la estabilización del P~Asp y/o participar de la fosfotransferencia. Decidimos estudiar variantes que incorporan la sustitución de la Thr80 por Ala o por Ser. A priori, se espera un efecto más drástico para la sustitución por Ala ya que es un residuo pequeño y no polar, a diferencia de la Ser que contiene un grupo hidroxilo al igual que la Thr. Además, muchos RR presentan una Ser en esta posición lo que indicaría que es compatible con estas reacciones.

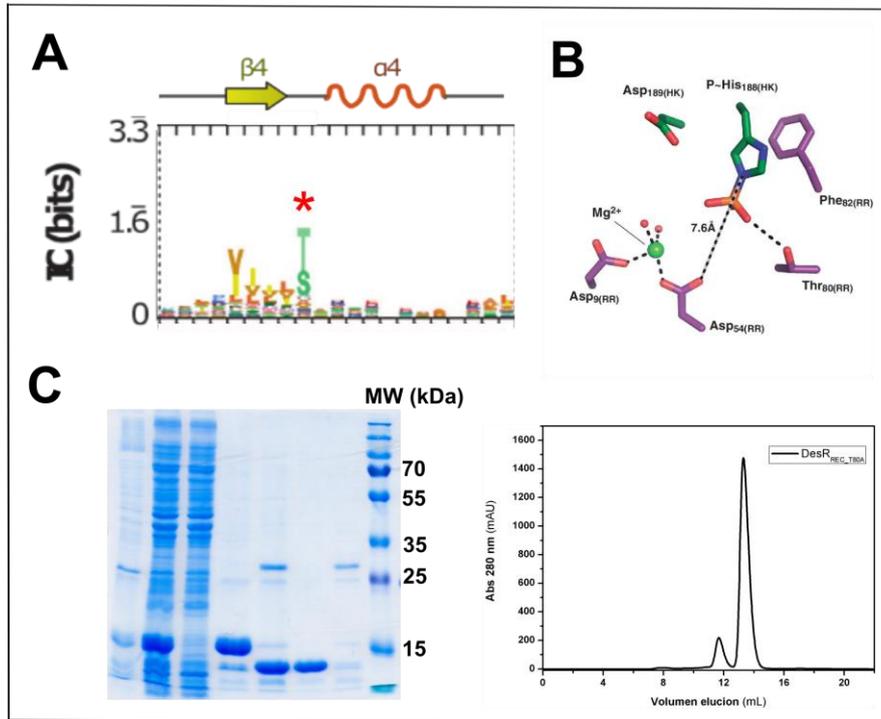


Figura 6. Importancia de la sustitución de Thr80 en DesR_{REC} – (A) Esquema logo (Wheeler 2014) mostrando la conservación de secuencia de la familia REC (Pfam PF 00072) en la región donde se ubica la Thr80_{DesR} (marcada con *). Además, se muestran los elementos de estructura secundaria correspondientes. (B) Sitio activo de la reacción de fosfotransferencia de acuerdo al complejo DesK-DesR fosfotransferasa. Se muestra a la Thr80 a distancia de interacción de puente de H con el grupo fosforilo de la His188_{DesK} (Figura extraída de Trajtenberg et al 2016). (C) Purificación de DesR_{REC-T80A} recombinante: SDS-PAGE y cromatograma SEC de la última etapa del proceso.

Para poder expresar en forma recombinantes estas variantes de DesR se sustituyó el codón que codifica para la Thr80 del plásmido que permite la expresión de la forma salvaje de DesR_{REC}. Mediante mutagénesis sitio dirigida, utilizando el método de RF clonaje como se explica en la sección de Estrategia Experimental, se generaron dos plásmidos que codifican para DesR_{REC-T80A} y DesR_{REC-T80S}. Estas modificaciones en el ADN fueron confirmadas por secuenciación. Las proteínas fueron luego expresadas y purificadas (Figura 6A) siguiendo los protocolos establecidos. En la figura 7, se puede apreciar los ensayos de fosfotransferencia entre DesK_C~P y DesR_{REC-T80A} (figura 7A) o DesR_{REC-T80S} (Figura 7B). A pesar de la alta conservación de esta Thr y su posicionamiento en el sitio activo, la fosfotransferencia ocurre en ambas variantes. Por otro lado, la comparación con las reacciones utilizando la forma salvaje de DesR (Figura 4A), se observa que la defosforilación del RR está significativamente disminuida, especialmente en la forma DesR_{REC-T80S}, ya que el fosfato persiste por más tiempo.

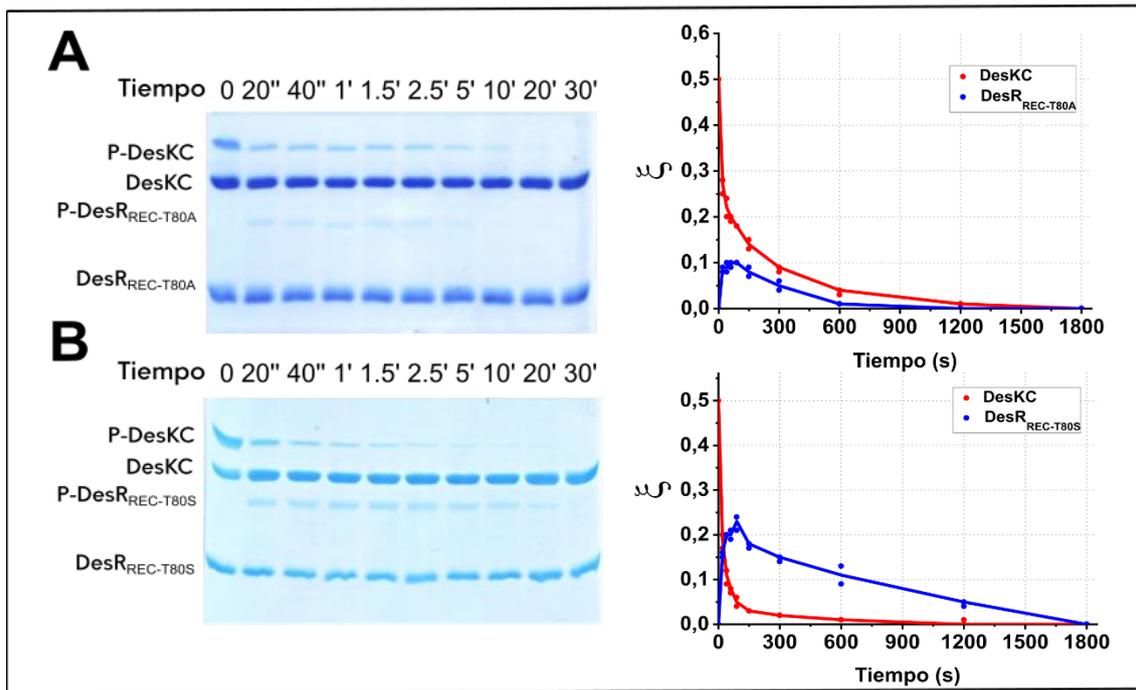


Figura 7. Ensayos de fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC-T80A} / DesR_{REC-T80S}. A) Ensayo fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC-T80A}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción. B) Ensayo fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC-T80S}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción

Un elemento diferencial que notamos en el ensayo de fosfotransferencia con la variante DesR_{RECT80A}, es que el fosfato se distribuye más equitativamente entre ambas proteínas durante toda la reacción. Sin embargo, en presencia de DesR_{RECT80S} el fosfato es mayoritariamente transferido al RR, indicando que la estabilización del fosfato por la interacción con el oxidrilo de la Thr o Ser en esta posición es importante para desplazar el equilibrio hacia el mismo. La actividad fosfatasa para evaluar la reversibilidad utilizando la variante DesR_{RECT80A} no pudo ser medida ya que esta no es capaz de autofosforilarse con acetil-fosfato (resultados no mostrados).

El Asp189 no participa de la fosfotransferencia reversa desde el RR a la HQ

La reacción de autofosforilación en las HQ implica el ataque nucleofílico del N ϵ 2 de una His al fosfato gama del ATP. Esta reacción requiere de un Asp o Glu, estrictamente conservado a continuación de la misma His, el cual mediante un puente de H con el N δ 1, sustrae un protón, haciendo de la His un mejor nucleófilo (Mechaly et al. 2014). Dado que el Asp189 de DesK debería cumplir este rol en la autofosforilación, nos preguntamos si también podría estar involucrado en la fosfotransferencia reversa, ya que ambas reacciones implican la fosforilación de la His. De acuerdo con el complejo fosfotransferasa (Trajtenberg et al 2016), la orientación de la His188 sugeriría que este residuo no debería

participar de la reacción. Para confirmar que este residuo no contribuye, se substituyó al Asp189 por Ala. La reacción de fosfotransferencia no fue posible analizar ya que, como esperábamos, la variante DesKC_{D189A} no es capaz de autofosforilarse a expensas de ATP. Pero al evaluar la actividad fosfatasa pudimos apreciar un grado de fosfotransferencia reversa, sugiriendo que este residuo no participa en esta reacción.

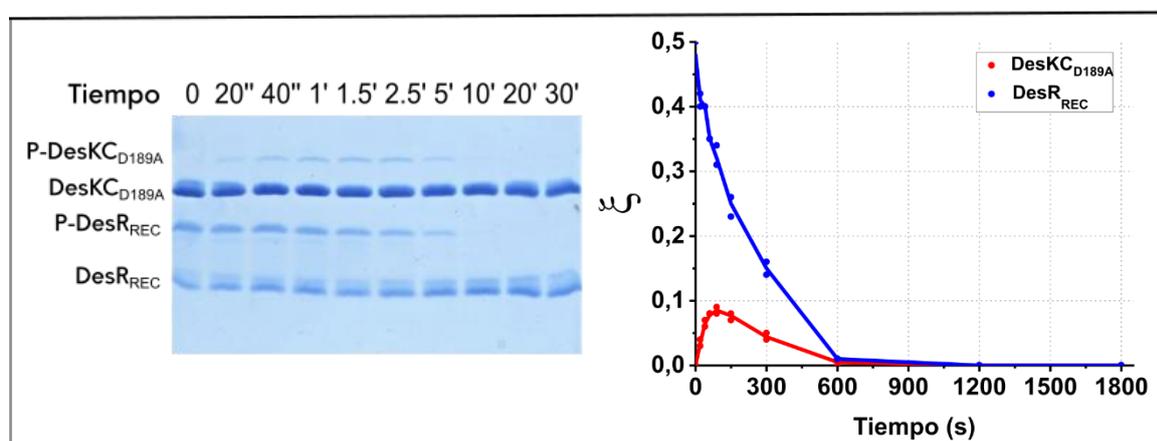


Figura 8. Ensayo fosfatasa P-DesR_{REC} + DesKC_{D189A}: Phostag SDS-PAGE (izquierda) y curso temporal de la reacción (derecha).

La reversibilidad de la fosfotransferencia afectando la interacción de DesR con DesK en el estado fosfatasa

A continuación nos propusimos evaluar un mecanismo que podría estar involucrado en evitar la fosfotransferencia reversa. Suponiendo que exista un equilibrio conformacional fosfatasa/quinasa de DesK muy desplazado hacia el primero, la fosfotransferencia reversa de DesR~P hacia DesK no sería posible. Esto se sustenta en que en el estado fosfatasa, como se describió previamente, la His188 se encuentra hacia el interior del dominio DHP, completamente inaccesible para recibir un fosfato. Para evaluar esta hipótesis decidimos seguir dos estrategias diferentes: i) utilizar una variante de DesK, denominada DesK_{DEST}, que tiene este equilibrio desplazado hacia el estado activo (Saita et al. 2015); ii) analizar sustituciones en residuos, Arg84 y Gln10 en DesR, que están involucrados en la interacción DesR:DesK en el estado fosfatasa, pero que no están implicados en el estado fosfotransferasa.

DesK_{DEST} incluye las sustituciones Ala167Arg, Ile171Gly y Leu174Gly, que promueven la desestabilización del motivo *coiled-coil* N-terminal y por ende favorecen la activación de la HQ (Saita et al. 2015). Las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa (Fig 9A y B, respectivamente) muestran importantes diferencias con respecto a la forma salvaje (Figura 4), ya que se puede apreciar un mayor grado de fosforilación de DesR y éste no

es inmediatamente eliminado. Sin embargo, no se observa una fosfotransferencia reversa en el ensayo fosfatasa.

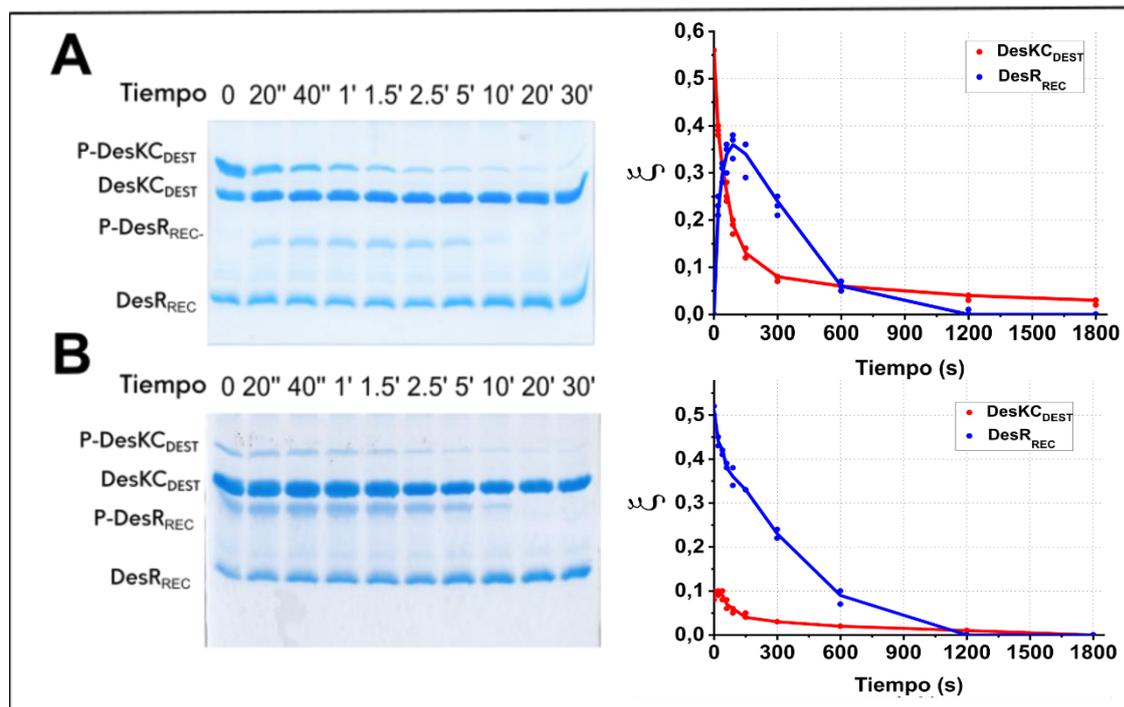


Figura 9: DesKC_{DEST} + DesR_{REC}: ensayos de fosfotransferencia y fosfatasa. A) Ensayo fosfotransferencia DesKC_{DEST}~P + DesR_{REC}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción. B) Ensayo fosfatasa DesR_{REC}~P + DesKC_{DEST}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción.

El residuo Arg84 forma parte del bucle $\beta 4\alpha 4$ y se encuentra formando un puente salino con el Asp189 de DesK en el complejo fosfatasa (PDB Id 5IUN, ver Fig 10). Esta interacción no puede ocurrir en el complejo fosfotransferasa debido a la rotación de las hélices en el Dhp, que forma parte del mecanismo alostérico de activación de DesK, el cual modifica la posición del Asp189. Este movimiento aleja al Asp189 de la Arg84 y, por lo tanto, se predice que esta interacción podría ser importante para favorecer la interacción con el estado fosfatasa de DesK. En el ensayo fosfotransferasa entre DesKC~P y DesR_{REC_R84A} (Fig 11A), se observa que DesK transfiere rápidamente el grupo fosforilo a DesR_{REC_R84A}, pero este permanece más tiempo si lo comparamos con DesR_{REC_{WT}} (Figura 4). Es decir, la fosfotransferencia no se ve afectada pero sí la actividad fosfatasa. Esto también lo observamos más claramente en el segundo ensayo, partiendo de P~DesR_{REC_R84A} e incubando con DesKC (Fig 11B). Desde la perspectiva de la direccionalidad, si bien esta modificación interfiere con la actividad fosfatasa, como era esperado, no promueve la transferencia reversa del grupo fosfato hacia DesK.

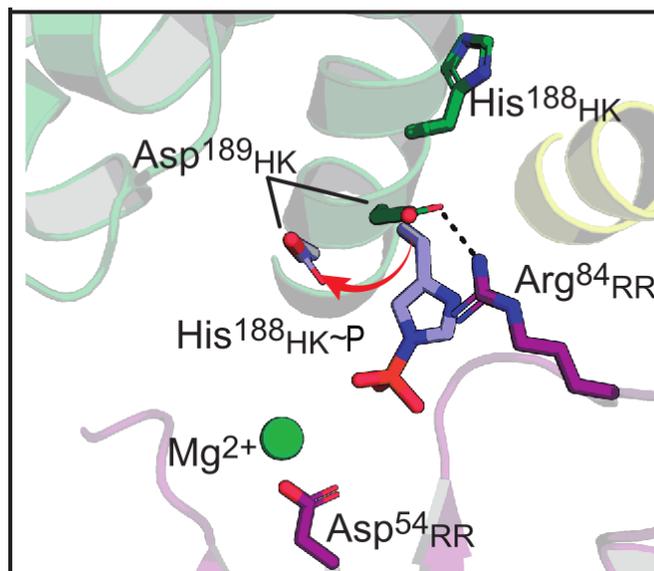


Figura 10. Interacción Arg84_{DesR}:Asp189_{DesK} diferencial del estado fosfatasa: Comparación estructural entre los complejos DesK-DesR fosfotransferasa (residuos coloreados en celeste) y fosfatasa (residuos en verde) en el centro de reacción. Se muestra la interacción Arg84_{DesR}:Asp189_{DesK} únicamente en el estado fosfatasa.

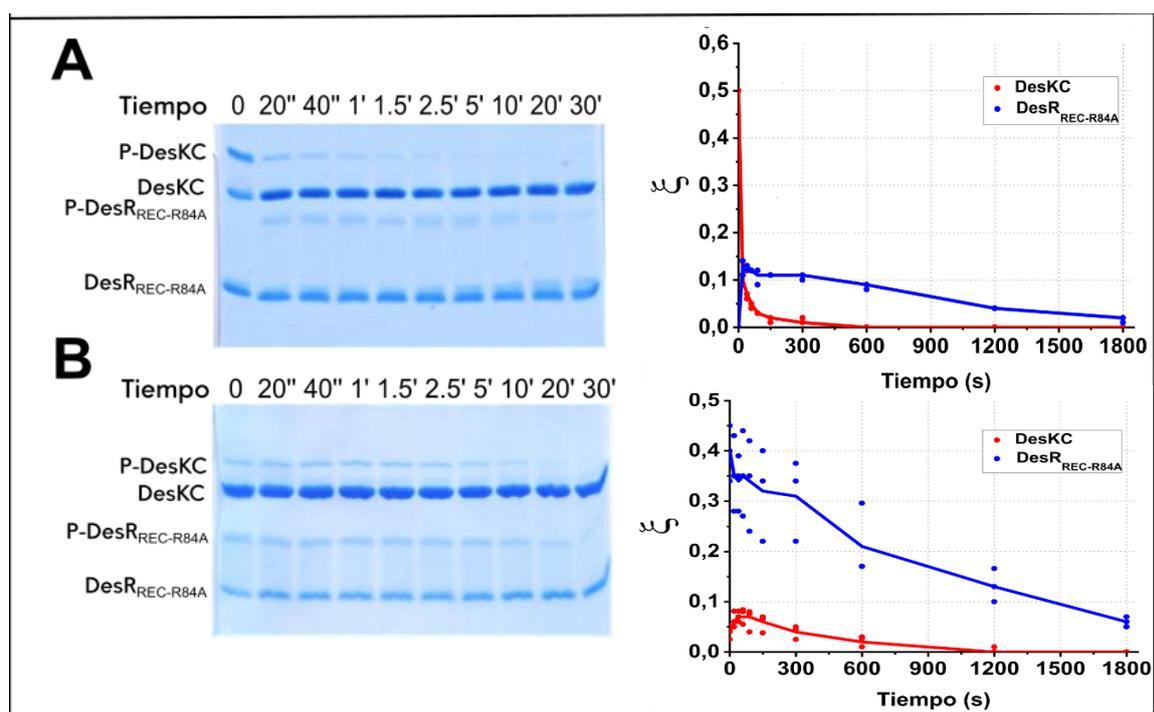


Figura 11. DesKC + DesR_{REC-R84A}: ensayos de fosfotransferencia y fosfatasa. A) Ensayo fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC-R84A}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción. B) Ensayo fosfatasa DesR_{REC-R84A}~P + DesKC: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción

El efecto en el equilibrio oligomérico de DesR_{REC-Q10A} puede modular la direccionalidad del fosfato

La unión de DesR a DesK en el estado fosfatasa posiciona a la Gln10 en un bolsillo, que se forma en la interfaz de la interacción DHp:ABD, formando un puente de H con la Lys194 (Figura 12). Este bolsillo DHp:ABD es un elemento estructural particular del estado fosfatasa, ya que una vez activada la HQ, el dominio ABD se libera (Albanesi et al 2009). En la reacción de fosfotransferencia utilizando la variante DesR_{REC-Q10A} se observa que hay fosfotransferencia hacia DesR_{REC-Q10A}, pero luego, a diferencia de DesR salvaje o DesR_{R84A}, el fosfato se distribuye equitativamente entre ambas proteínas durante el curso temporal (Figura 13 A). En el ensayo fosfatasa, se observa que hay fosfotransferencia reversa desde P~DesR_{REC-Q10A} a DesKC en el primer minuto de reacción y luego, como en el caso anterior, ambas van perdiendo el fosfato a lo largo del tiempo con igual pendiente (Figura 13 B). Reacciones similares, pero utilizando DesKC_{Q913A}, o sea en ausencia de la actividad fosfatasa, se aprecia el mismo efecto de reversibilidad (Figura 14), lo que indicaría que la fosfotransferencia puede ser más reversible. Este resultado es inesperado, ya que el residuo Gln10 se encuentra alejado del sitio de fosforilación. Además, los ensayos utilizando las variantes DesR_{REC-R84A} y DesKC_{DEST} que buscaban afectar diferencialmente el estado fosfatasa no generaron un efecto similar. Por ende, decidimos estudiar en profundidad este mutante para identificar si constituye un determinante de direccionalidad en la fosfotransferencia.

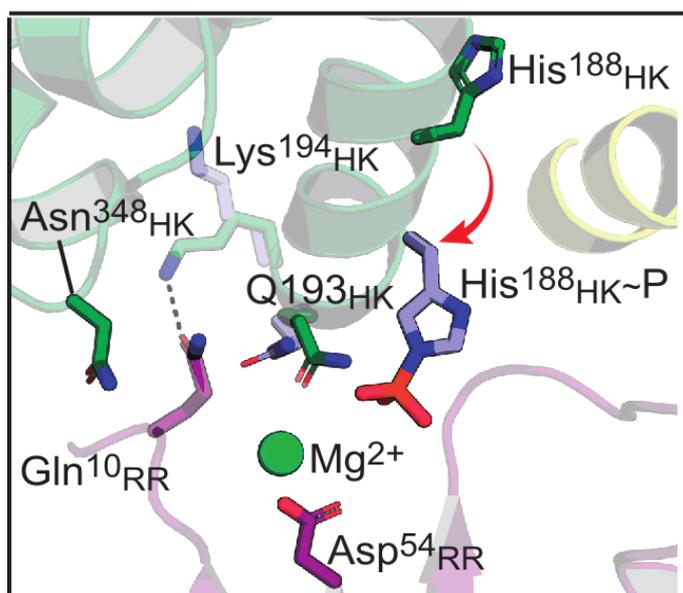


Figura 12- Interacción Gln10_{DesR}:Lys194_{DesK} diferencial del estado fosfatasa. Comparación estructural entre los complejos DesK-DesR fosfotransferasa (residuos coloreados en celeste) y fosfatasa (residuos en verde) en el centro de reacción. Se observa la Gln10_{DesR} insertada en el bolsillo creado entre la superficie ABD:DHp e interactuando con la Lys194_{DesK}

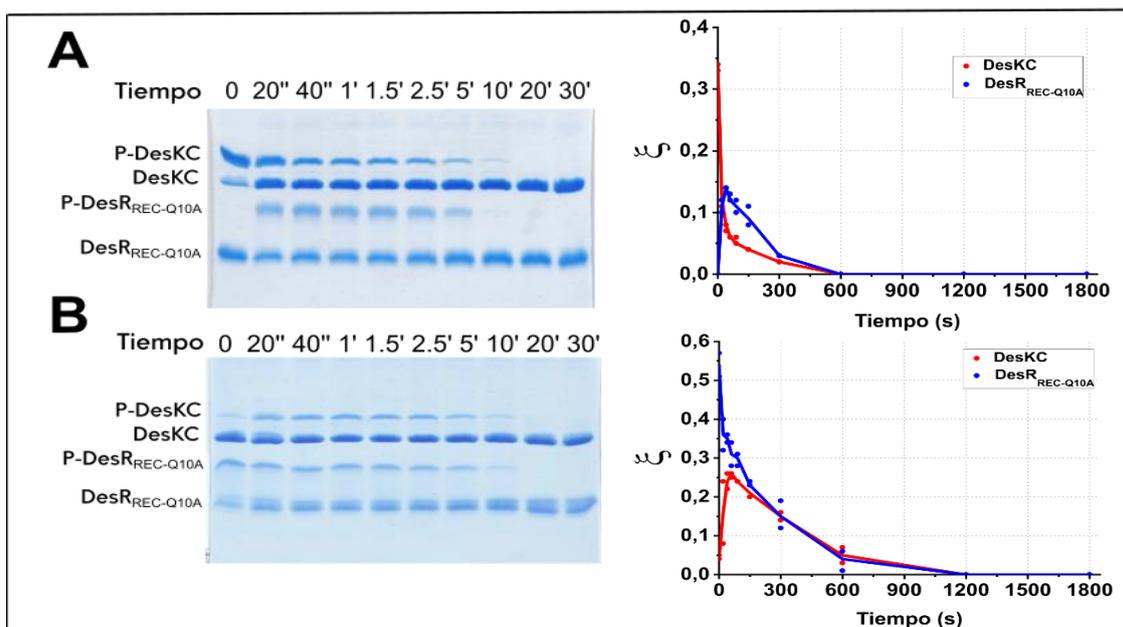


Figura 13: DesKC + DesR_{REC-Q10A}: ensayos fosfotransferencia y fosfatasa A) Ensayo fosfotransferencia DesKC~P + DesR_{REC-Q10A}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción. B) Ensayo fosfatasa DesR_{REC-Q10A}~P + DesKC: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción.

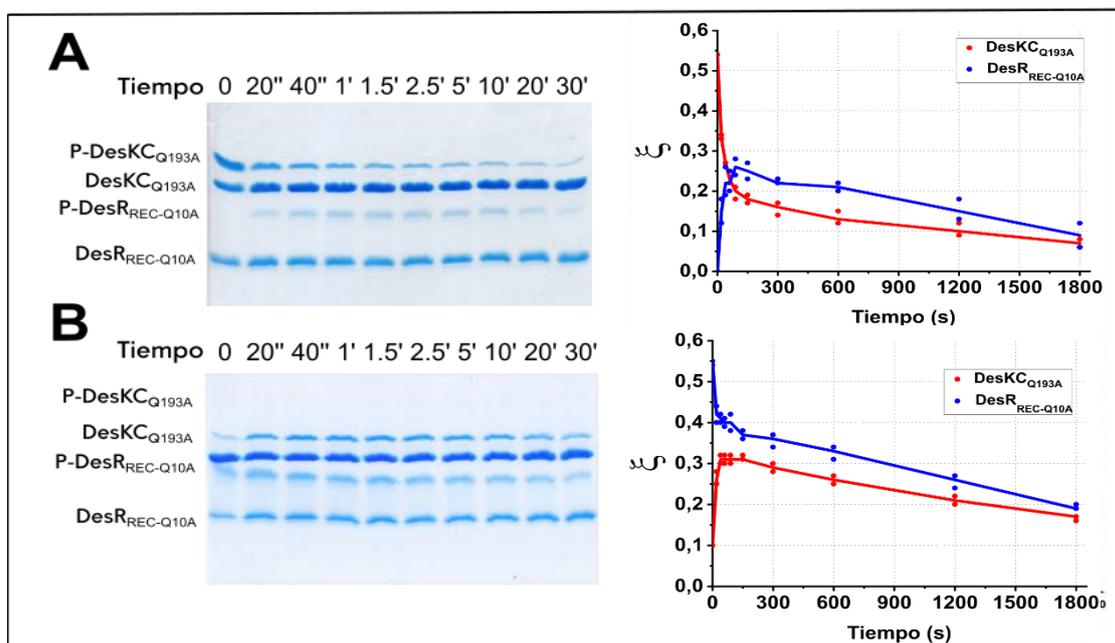


Figura 14: DesKC_{Q193A} + DesR_{REC-Q10A}: ensayos fosfotransferencia y fosfatasa. A) Ensayo fosfotransferencia DesKC_{Q193A}~P + DesR_{REC-Q10A}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción. B) Ensayo fosfatasa DesR_{REC-Q10A}~P + DesKC_{Q193A}: Phostag SDS-PAGE y curso temporal de la reacción.

Previamente en el grupo se había propuesto que la distancia entre los residuos dador y aceptor del grupo fosforilo podría contribuir a desplazar el equilibrio por una asimetría en el centro de reacción (Trajtenberg et al. 2016). Para estudiar el efecto en la reversibilidad de la sustitución Gln10Ala en DesR decidimos analizar si había algún cambio estructural en el complejo fosfotransferasa $\text{DesKC}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC_Q10A}}$.

Con ese objetivo, se realizó la cristalización del complejo $\text{DesKC}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC_Q10A}}$. En la sección de Estrategia Experimental se detalla el diseño de la placa de cristalización y la preparación de las gotas con el complejo de proteínas. Luego de 5 días aparecieron algunos pequeños cristales (Figura 15 A y B). Se hizo un seguimiento del crecimiento de los mismos, buscando que tengan un tamaño. A los 20-25 días algunos alcanzaron un tamaño de más de 10 μm . Las condiciones en las que se formaron contenían PEG 3350 20/24% (w/v) y 0.3/0.35 M citrato de potasio. En algunas gotas aparecieron pocos de diferentes tamaños (Figura 15 C) y en otras en mayores cantidades de tamaños similares (Figura 15 D), todos en forma de barra.

En paralelo se probó la técnica de *microseeding* incorporando pequeños cristales que sirven de núcleo a partir del cual se forman nuevos cristales. Como se describe en la Estrategia Experimental, se diseña una nueva placa de cristalización y nuevas gotas del complejo de proteínas. Una vez que la fibra se sumerge en la gota con pequeños cristales, se esparce dibujando un trazo sobre las gotas con solución fresca. Al cabo de 2 días se observaron grandes cantidades de cristales “hijos” en forma de aguja a lo largo del trayecto marcado por la fibra (Figura 15 E y F).

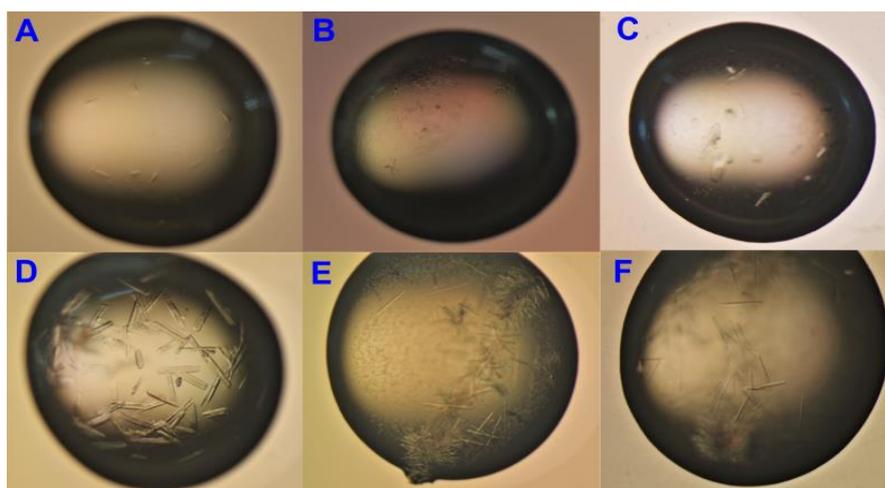


Figura 15. Fotos de diferentes gotas del ensayo de cristalización del complejo $\text{DesKC}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC_Q10A}}$ en distintos tiempos. A y B: Cristales formados luego de 5 días. C: Cristales luego de 20 días. D: Cristales luego de 30 días. E y F: Cristales formados 2 días después del *microseeding*.

Cristales únicos fueron difractados en el equipo de difracción de rayos X de la plataforma de Cristalografía de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo. Con la ayuda de Felipe Trajtenberg, estos datos fueron procesados y la estructura resuelta a una resolución de 3.4 Å. A partir de la comparación entre esta nueva estructura y las resueltas previamente en el laboratorio del complejo $\text{DesK}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC}}$ se puede concluir que la sustitución puntual no afecta el posicionamiento del RR en el complejo (Figura 16).

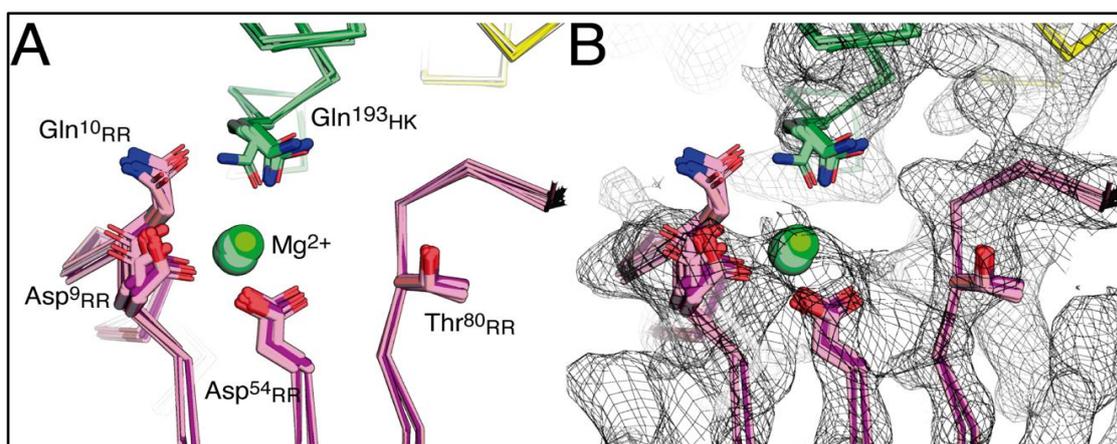


Figura 16- Estructura cristalográfica del complejo $\text{DesK}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC-Q10A}}$ en estado fosfotransferasa. (A) Alineamiento estructural del modelo $\text{DesK}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC-Q10A}}$ (dos complejos independientemente refinados dentro de la unidad asimétrica representados en violeta) contra $\text{DesK}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC}}$ (representado en magenta claro) al superponer los segmentos delimitados entre el residuo 190 hasta el 230 del DHp de DesK (representada en verde y amarillo). (B) El mismo alineamiento (A) mostrando la densidad electrónica correspondiente al complejo $\text{DesK}_{\text{H188E}}:\text{DesR}_{\text{REC-Q10A}}$.

La direccionalidad de la fosfotransferencia hacia DesR podría estar favorecida por la dimerización de DesR ya que existe una competencia por la misma superficie entre la oligomerización y la interacción con DesK. Por lo tanto, si se favorece la formación de dímero, hay menos fosfotransferencia reversa porque el sustrato DesR-P monomérico está menos disponible.

El residuo Gln10 se ubica al comienzo de la hélice $\alpha 1$ y forma parte de la superficie de dimerización. Debido a esto, la sustitución del mismo podría estar desestabilizando la forma dimérica de DesR. Para poner a prueba este supuesto, realizamos la reacción de autofosforilación de DesR_{REC} y $\text{DesR}_{\text{REC-Q10A}}$ y comparamos la distribución del equilibrio dimero:monómero mediante cromatografía de exclusión molecular. El ensayo consiste en incubar 1.3 mM de cada proteína con 50 mM AcP y 30 mM de MgCl_2 durante 1 hora. Luego se inyecta en una SEC S 75 10/300 para evaluar la cantidad de dímero formado en cada caso (Figura 17A).

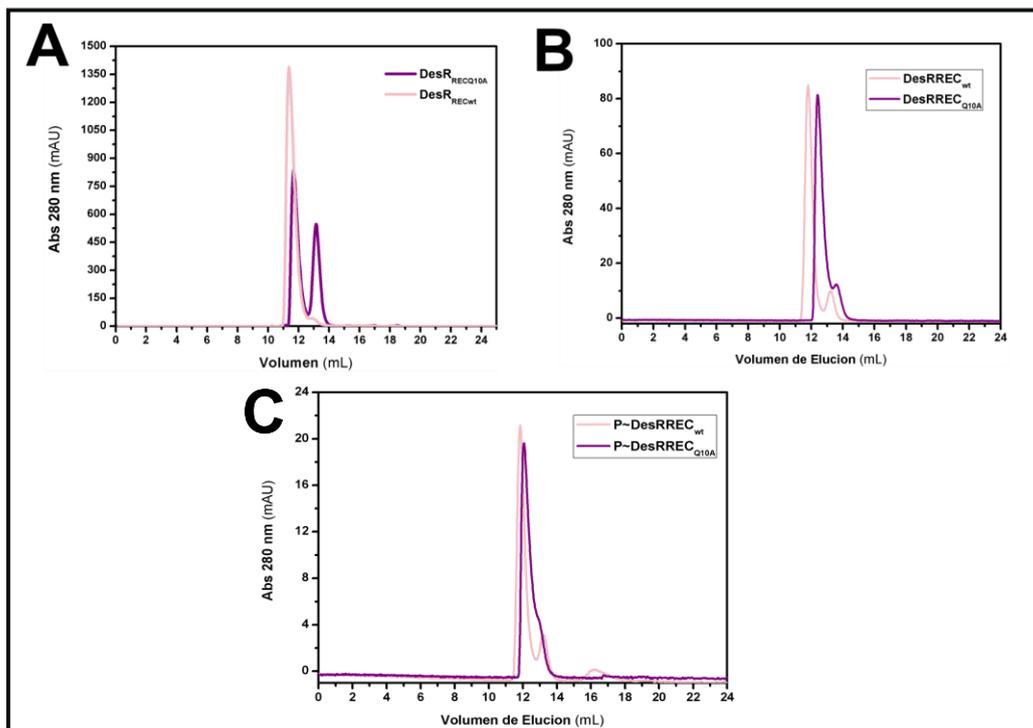


Figura 17. Comparación del equilibrio oligomérico entre DesR_{REC} y DesR_{REC-Q10A} post incubación con AcP. (A) Cromatograma SEC de la inyección de 1.3 mM de DesR_{REC} (en rosa) o DesR_{REC-Q10A} (en violeta). (B) Cromatograma SEC a 100 μM de proteína fosforilada: DesR_{REC} (en rosa) o DesR_{REC-Q10A} (en violeta) (C) Idem (B) a 25 μM de proteína.

Como se ha mencionado previamente, la fosforilación del regulador promueve su dimerización. En el cromatograma de la figura 17A se observa que DesR_{REC} se encuentra mayoritariamente en forma dimérica, mientras que DesR_{REC-Q10A} muestra una fracción dimérica y otra monomérica. Esto último podría explicarse o bien porque es más difícil formar el dímero y/o porque la fosforilación con AcP no es tan eficiente, entonces el grado de fosforilación alcanzado no sería el adecuado para disparar los cambios alostéricos que promueven la dimerización. Para descartar esta última opción, se purificaron las formas diméricas de ambas proteínas y se analizó por SDS-PAGE Phostag para asegurarse que ambas presentan el mismo grado de fosforilación, lo cual fue confirmado. A continuación, se realizaron nuevas cromatografías SEC para ambas proteínas a 100 μM y 25 μM de cada proteína fosforilada (Figura 17B y C). La cromatografía a 100 μM de proteína indica que DesR_{REC} se comporta mayoritariamente como dímero. En el caso de DesR_{REC-Q10A}, las proporciones de dímero/monómero son similares a las salvaje pero hay un corrimiento de las curvas hacia el monómero y los picos están más solapados entre sí. Esto último se observa con más claridad en la inyección a 25 μM de proteína, donde ambos picos están más solapados a diferencia de la forma salvaje que se resuelven mejor. Esto es una evidencia que muestra que el equilibrio dímero-monómero en P~DesR_{REC-Q10A} es más dinámico y se encuentra afectado.

Discusión

Los sistemas de señalización requieren de una regulación estricta que permita a las bacterias adaptarse eficientemente ante perturbaciones en su entorno. Los SDC son interesantes modelos biológicos para entender cómo se transmite la información bioquímica debido a la abundante información estructural y funcional disponible.

En este trabajo nos preguntamos si es posible modular la direccionalidad de la fosfotransferencia mediante modificaciones en posiciones claves de una HQ y su RR. Desde el punto de vista evolutivo, es necesario que estos sistemas puedan configurar diferentes direccionalidades en la fosfotransferencia para generar cascadas de señalización más complejas. Para abordar esta pregunta decidimos utilizar el sistema DesK-DesR como modelo, evaluando el efecto de sustituciones específicas en las reacciones de fosfotransferencia y fosfatasa.

La direccionalidad de la reacción podría modularse mediante diferentes mecanismos cinéticos y termodinámicos, incluyendo cuestiones alostéricas en las proteínas hasta cambios sutiles en los centros de reacción. La sustitución DesKC_{Q193A} fue realizada de forma de eliminar la amida de la Gln193 con el objetivo de estudiar la reversibilidad en ausencia de la actividad fosfatasa. El mecanismo catalítico involucrado en la hidrólisis del grupo fosforilo aún no está bien comprendido, ya que es difícil pensar que una Gln pueda actuar como base para “activar” al agua reactiva. Sin embargo, el rol clave de este residuo en la actividad fosfatasa ya se ha demostrado para otras HQs (Huynh, Noriega, y Stewart, s. f.) o fosfatasas estructuralmente relacionadas (Zhao et al. 2002; Pazy et al. 2010). En la familia GTPasas de tipo Ras/GAP, una glutamina es posicionada en un lugar equivalente a la Gln193 de DesK, y esta contribuye entrópicamente en la formación del complejo Michaeliano (Calixto et al. 2019). Por lo tanto, en sintonía con esa explicación, es probable que la Gln193_{DesK} disminuya el componente entrópico de la barrera de activación de la reacción al pre-orientar el OH⁻ dentro del sitio activo. Los ensayos analizados en ausencia de la actividad fosfatasa al usar este mutante revelaron, por un lado, que el fosfato tiende a acumularse en el RR y por el otro, que no sería la rápida hidrólisis del fosfato lo que impide observar la reacción reversa.

Los residuos Asp189 de DesK y la Thr80 en DesR fueron analizados ya que podrían ser determinantes claves en la fosfotransferencia, tanto favoreciendo la nucleofilicidad de la His fosforilable o estabilizando el estado fosforilado del RR, respectivamente. Estudios realizados en otros reguladores de respuesta, como FixJ, CheY, OmpR, CovR y DevR, revelaron que, en la mayoría de los casos, la sustitución del residuo equivalente a la Thr80 de DesR afecta significativamente la autofosforilación así como la estabilidad del fosfo-

aspartato (Appleby y Bourret 1998; Gautam, Sikri, y Tyagi 2011; Mattison et al. 2002; Weinstein et al. 1992). Por ejemplo, para el regulador DevR (de la misma familia de DesR) se hicieron ensayos de fosforilación *in vitro* para la mutante DevR_{T87A}, observándose que la fosfotransferencia es más lenta pero una vez que DevR_{T87A} recibe el fosfato, éste se mantiene por más tiempo unido en comparación a DevR wt (Gautam, Sikri, y Tyagi 2011). Esto último coincide con lo observado para la mutante DesR_{T80A} cuando el fosfato proviene de la quinasa. En el caso de DesR, la sustitución Thr80Ala hace a la proteína incapaz de autofosforilarse con AcP. Sin embargo, no impide que si pueda ser fosforilada por la acción de DesK. Esto es consistente con la idea de que la HQ actúa como modulador funcional del RR (Trajtenberg et al 2014), promoviendo su activación y favoreciendo la fosforilación. Un elemento interesante que notamos en la reacción de fosfotransferencia, es que el fosfato se distribuye más equitativamente en comparación con DesRwt. Esto podría explicarse con el rol estabilizador de la Thr80 en la coordinación del sitio de fosforilación, desplazando el equilibrio de fosfotransferencia.

En el caso del Asp (que en muchos casos es un Glu), un residuo a continuación de la histidina fosforilable en HQs (Asp189 en DesK), se ha propuesto que es clave en la reacción de autofosforilación. Mediante la sustracción de un protón del N-δ de la His fosforilable, participa incrementando la nucleofilicidad de la misma (Alexandre et al. 2010; Quezada et al. 2005). En el complejo DesK:DesR en fosfotransferasa la His188 se dispone de tal manera que impide la interacción de su N-δ con Asp189 (Trajtenberg et al 2016). Esto indicaría que el Asp no debería estar involucrado en la fosfotransferencia reversa. Esto fue comprobado experimentalmente utilizando el mutante DesK_{C_{D189A}} en presencia de P~DesR_{REC}.

Por otro lado, y en función de los estudios estructurales previos, una hipótesis que hemos considerado es si el equilibrio conformacional de DesK se encuentra desplazado hacia el estado fosfatasa, lo cual haría al sistema menos reversible por no tener acceso a la histidina fosforilable. Como se mencionó previamente, en el estado fosfatasa la His188 se ubica hacia el interior del dominio DHp, y sólo es accesible para la autofosforilación o las reacciones de fosfotransferencia una vez que los movimientos rotacionales la posicionan en un sitio expuesto al solvente.

Con el objetivo de modificar el equilibrio conformacional de DesK sin cambiar residuos conservados y claves en las reacciones, decimos analizar los ensayos funcionales utilizando las variantes de DesK_{DEST}, DesR_{REC-R84A} y DesR_{REC-Q10A}. DesK_{DEST} incluye tres mutaciones que desestabilizan la formación del coiled-coil N-terminal, por ende, generando una variante constitutivamente activa (Saita et al. 2015). En cambio, los residuos R84_{DesR} y Q10_{DesR} buscan desestabilizar la interacción de DesR con DesK

únicamente en el estado fosfatasa. Los ensayos que utilizaron estas variantes mostraron que cada una de ellas afecta la funcionalidad del sistema en forma diferente. Las reacciones que incluyen DesKC_{DEST} muestran un perfil similar a DesKC_{wt}, aunque la acumulación de DesR_{REC} fosforilado es mayor, lo cual era esperable. En cambio, la sustitución R84A_{DesR} reduce notoriamente la actividad fosfatasa. En ambos casos no se registra un cambio en la direccionalidad, ya que el fosfato se acumula en el regulador únicamente. Por el contrario, la variante DesR_{Q10A}, sí afecta la direccionalidad, ya que el fosfato se distribuye igualmente entre las dos proteínas, haciendo la reacción más reversible. Es sorprendente que una mutación puntual en esta posición altere la direccionalidad del sistema. Mediante la resolución de la estructura cristalina del complejo DesKC_{H188E}-DesR_{REC-Q10A} descartamos que la causa de este fenómeno esté asociado a un acortamiento de la distancia entre la His188_{DesK}-Asp54_{DesR}. Los experimentos de SEC comparando DesR_{wt} y DesR_{Q10A} ambas en estado fosforilado, muestran un desplazamiento del equilibrio oligomérico hacia el monómero en DesR_{Q10A}. Por ende, la dimerización de DesR podría estar actuando como un mecanismo de secuestro de fosfato, compitiendo con DesK y de esta forma evitar la fosfotransferencia reversa.

Este trabajo permitió identificar uno de los determinantes de direccionalidad en la transmisión de información en SDC. Profundizar en estas preguntas generaría herramientas útiles en el diseño de vías sintéticas. Hemos encontrado ciertas mutaciones puntuales en ambos componentes del sistema que le confieren al mismo propiedades particulares que podrían utilizarse con ese fin.

Como perspectiva nos imaginamos que entender los mecanismos que han evolucionado los sistemas vivos para señalizar y dirigir la información permitirán construir sistemas complejos de procesamiento de información en organismos vivos, un área de intenso trabajo en Biología Sintética.

Durante el transcurso de esta tesis de maestría, en colaboración con el grupo de Marcelo Marti (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina) exploramos algunos aspectos de los mecanismos de reacción mediante simulaciones computacionales utilizando QM/MM. Además, se realizó una modelización cinética del sistema utilizando las reacciones reportadas en esta tesis, lo cual aportó información adicional acerca de los determinantes de direccionalidad en la fosfotransferencia entre DesK y DesR. Estos resultados fueron recientemente publicados en la prestigiosa revista *Science Signaling* (Lima et al. 2023) y creemos será un gran aporte dentro del área.

Referencias

- Adebali, Ogun, Marharyta G. Petukh, Alexander O. Reznik, Artem V. Tishkov, Amit A. Upadhyay, y Igor B. Zhulin. 2017. «Class III Histidine Kinases: A Recently Accessorized Kinase Domain in Putative Modulators of Type IV Pilus-Based Motility». Editado por Thomas J. Silhavy. *Journal of Bacteriology* 199 (18). <https://doi.org/10.1128/JB.00218-17>.
- Aguilar, P. S. 2001. «Molecular Basis of Thermosensing: A Two-Component Signal Transduction Thermometer in *Bacillus Subtilis*». *The EMBO Journal* 20 (7): 1681-91. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1681>.
- Albanesi, D., M. Martin, F. Trajtenberg, M. C. Mansilla, A. Haouz, P. M. Alzari, D. de Mendoza, y A. Buschiazzo. 2009. «Structural Plasticity and Catalysis Regulation of a Thermosensor Histidine Kinase». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38): 16185-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906699106>.
- Albanesi, Daniela, María Cecilia Mansilla, y Diego de Mendoza. 2004. «The Membrane Fluidity Sensor DesK of *Bacillus Subtilis* Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator». *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2655-63. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2655-2663.2004>.
- Alexandre, Maxime T. A., Erin B. Purcell, Rienk van Grondelle, Bruno Robert, John T. M. Kennis, y Sean Crosson. 2010. «Electronic and Protein Structural Dynamics of a Photosensory Histidine Kinase». *Biochemistry* 49 (23): 4752-59. <https://doi.org/10.1021/bi100527a>.
- Alves, Rui, Baldiri Salvadó, Ron Milo, Ester Vilaprinyo, y Albert Sorribas. 2021. «Maximization of Information Transmission Influences Selection of Native Phosphorelay Architectures». *PeerJ* 9 (junio): e11558. <https://doi.org/10.7717/peerj.11558>.
- Anantharaman, Vivek, S Balaji, y L Aravind. 2006. «The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins». 2006. *Biol Direct.*;1(1):25. doi: 10.1186/1745-6150-1-25.
- Appleby, Jeryl L., y Robert B. Bourret. 1998. «Proposed Signal Transduction Role for Conserved CheY Residue Thr87, a Member of the Response Regulator Active-Site Quintet». *Journal of Bacteriology* 180 (14): 3563-69. <https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3563-3569.1998>.
- Barbieri, Christopher M., Timothy R. Mack, Victoria L. Robinson, Matthew T. Miller, y Ann M. Stock. 2010. «Regulation of Response Regulator Autophosphorylation through Interdomain Contacts». *Journal of Biological Chemistry* 285 (42): 32325-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.157164>.
- Barbieri, Christopher M., Ti Wu, y Ann M. Stock. 2013. «Comprehensive Analysis of OmpR Phosphorylation, Dimerization, and DNA Binding Supports a Canonical Model for Activation». *Journal of Molecular Biology* 425 (10): 1612-26. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.003>.
- Bhate, Manasi P., Kathleen S. Molnar, Mark Goulian, y William F. DeGrado. 2015. «Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures». *Structure* 23 (6): 981-94. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>.

- Bilwes, Alexandrine M., Lisa A. Alex, Brian R. Crane, y Melvin I. Simon. 1999. «Structure of CheA, a Signal-Transducing Histidine Kinase». *Cell* 96 (1): 131-41. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80966-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80966-6).
- Birck, Catherine, Lionel Mourey, Patrice Gouet, Béatrice Fabry, Jörg Schumacher, Philippe Rousseau, Daniel Kahn, y Jean-Pierre Samama. 1999. «Conformational Changes Induced by Phosphorylation of the FixJ Receiver Domain». *Structure* 7 (12): 1505-15. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88341-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88341-0).
- Bourret, Robert B. 2010. «Receiver Domain Structure and Function in Response Regulator Proteins». *Current Opinion in Microbiology* 13 (2): 142-49. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.015>.
- Burbulys, David, Kathleen A. Trach, y James A. Hoch. 1991. «Initiation of Sporulation in *B. Subtilis* Is Controlled by a Multicomponent Phosphorelay». *Cell* 64 (3): 545-52. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90238-T](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90238-T).
- Buschiazzo, Alejandro, y Felipe Trajtenberg. 2019. «Two-Component Sensing and Regulation: How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level?» *Annual Review of Microbiology* 73 (1): 507-28. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>.
- Calixto, Ana R., Cátia Moreira, Anna Pabis, Carsten Kötting, Klaus Gerwert, Till Rudack, y Shina C.L. Kamerlin. 2019. «GTP Hydrolysis Without an Active Site Base: A Unifying Mechanism for Ras and Related GTPases». *Journal of the American Chemical Society* 141 (27): 10684-701. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b03193>.
- Capra, Emily J., y Michael T. Laub. 2012. «Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems». *Annual Review of Microbiology* 66 (1): 325-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>.
- Chen, Vincent B., W. Bryan Arendall, Jeffrey J. Headd, Daniel A. Keedy, Robert M. Immormino, Gary J. Kapral, Laura W. Murray, Jane S. Richardson, y David C. Richardson. 2010. «MolProbity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66 (1): 12-21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- Childers, W. Seth, Qingping Xu, Thomas H. Mann, Irimpan I. Mathews, Jimmy A. Blair, Ashley M. Deacon, y Lucy Shapiro. 2014. «Cell Fate Regulation Governed by a Repurposed Bacterial Histidine Kinase». Editado por Ann M. Stock. *PLoS Biology* 12 (10): e1001979. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001979>.
- Cho, Ho S., Seok-Yong Lee, Dalai Yan, Xiaoyu Pan, John S. Parkinson, Sydney Kustu, David E. Wemmer, y Jeffrey G. Pelton. 2000. «NMR Structure of Activated CheY». *Journal of Molecular Biology* 297 (3): 543-51. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3595>.
- Cravens, Aaron, James Payne, y Christina D. Smolke. 2019. «Synthetic Biology Strategies for Microbial Biosynthesis of Plant Natural Products». *Nature Communications* 10 (1): 2142. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w>.
- Creager-Allen, Rachel L., Ruth E. Silversmith, y Robert B. Bourret. 2013. «A Link between Dimerization and Autophosphorylation of the Response Regulator PhoB». *Journal of Biological Chemistry* 288 (30): 21755-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.471763>.

- Cybulski, Larisa E., Mariana Martín, María C. Mansilla, Ariel Fernández, y Diego de Mendoza. 2010. «Membrane Thickness Cue for Cold Sensing in a Bacterium». *Current Biology* 20 (17): 1539-44. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.06.074>.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott, y K. Cowtan. 2010. «Features and Development of Coot». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66 (4): 486-501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
- Fernández, Ignacio, Lisandro H. Otero, Sebastián Klinke, Mariela del Carmen Carrica, y Fernando A. Goldbaum. 2015. «Snapshots of Conformational Changes Shed Light into the NtrX Receiver Domain Signal Transduction Mechanism». *Journal of Molecular Biology* 427 (20): 3258-72. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.010>.
- Galperin, Michael Y., Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, y Eugene V. Koonin. 2017. «Phyletic Distribution and Lineage-Specific Domain Architectures of Archaeal Two-Component Signal Transduction Systems». Editado por Ann M. Stock. *Journal of Bacteriology* 200 (7): e00681-17, [/jb/200/7/e00681-17.atom](https://doi.org/10.1128/JB.00681-17). <https://doi.org/10.1128/JB.00681-17>.
- Gao, Rong, Sophie Bouillet, y Ann Stock. 2019. «Structural Basis of Response Regulator Function». *Annu Rev Microbiol.* 73:175-197. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115931
- Gao, Rong, Ann M. Stock. 2017. «Quantitative Kinetic Analyses of Shutting Off a Two-Component System». *mBio.* 16;8(3):e00412-17. doi: 10.1128/mBio.00412-17
- Gao, Rong, y Ann M. Stock. 2009. «Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins». *Annual Review of Microbiology* 63 (1): 133-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>.
- Gardino, Alexandra K., Janice Villali, Aleksandr Kivenson, Ming Lei, Ce Feng Liu, Phillip Steindel, Elan Z. Eisenmesser, et al. 2009. «Transient Non-Native Hydrogen Bonds Promote Activation of a Signaling Protein». *Cell* 139 (6): 1109-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.022>.
- Gautam, U. S., K. Sikri, y J. S. Tyagi. 2011. «The Residue Threonine 82 of DevR (DosR) Is Essential for DevR Activation and Function in Mycobacterium Tuberculosis Despite Its Atypical Location». *Journal of Bacteriology* 193 (18): 4849-58. <https://doi.org/10.1128/JB.05051-11>.
- Gottschlich, Lisa, Miriam Bortfeld-Miller, Christoph Gäbelein, Sebastian Dintner, y Julia A. Vorholt. 2018. «Phosphorelay through the Bifunctional Phosphotransferase PhyT Controls the General Stress Response in an Alphaproteobacterium». *PLoS Genetics* 14 (4): e1007294. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007294>.
- Goulian, Mark. 2010. «Two-Component Signaling Circuit Structure and Properties». 2010. *Current Opinion in Microbiology*;13(2):184-9. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.009.6.
- Hart, Yuval, y Uri Alon. 2013. «The Utility of Paradoxical Components in Biological Circuits». *Molecular Cell* 49 (2): 213-21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.004>.
- Hastings, Curtis A., Seok-Yong Lee, Ho S. Cho, Dalai Yan, Sydney Kustu, y David E. Wemmer. 2003. «High-Resolution Solution Structure of the Beryll fluoride-Activated NtrC Receiver Domain †». *Biochemistry* 42 (30): 9081-90. <https://doi.org/10.1021/bi0273866>.

- Huynh, TuAnh Ngoc, Chris E Noriega, y Valley Stewart. s. f. «Conserved Mechanism for Sensor Phosphatase Control of Two-Component Signaling Revealed in the Nitrate Sensor NarX», 6.
- Imelio Juan Andrés, Trajtenberg Felipe, Buschiazzi Alejandro. «Allostery and protein plasticity: the keystones for bacterial signaling and regulation». 2021. *Biophys Rev.* 10;13(6):943-953. doi: 10.1007/s12551-021-00892-9.
- Jacob-Dubuisson, Françoise, Ariel Mechaly, Jean-Michel Betton, y Rudy Antoine. 2018. «Structural Insights into the Signalling Mechanisms of Two-Component Systems». *Nature Reviews Microbiology* 16 (10): 585-93. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0055-7>.
- Janiak-Spens, Fabiola, Paul F. Cook, y Ann H. West. 2005. «Kinetic Analysis of YPD1-Dependent Phosphotransfer Reactions in the Yeast Osmoregulatory Phosphorelay System». *Biochemistry* 44 (1): 377-86. <https://doi.org/10.1021/bi048433s>.
- Kleerebezem, Michiel, Luis E. N. Quadri, Oscar P. Kuipers, y Willem M. De Vos. 1997. «Quorum Sensing by Peptide Pheromones and Two-component Signal-transduction Systems in Gram-positive Bacteria». *Molecular Microbiology* 24 (5): 895-904. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4251782.x>.
- Krell, Tino, Jesús Lacal, Andreas Busch, Hortencia Silva-Jiménez, María-Eugenia Guazzaroni, y Juan Luis Ramos. 2010. «Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 539-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134054>.
- Lima Sofia, Blanco J, Olivieri F, Imelio JA, Nieves M, Carrion F, Alvarez B, Buschiazzi A, Marti MA, Trajtenberg F. An allosteric switch ensures efficient unidirectional information transmission by the histidine kinase DesK from *Bacillus subtilis*. *Sci Signal.* 2023 Jan 24;16(769):eabo7588. doi: 10.1126/scisignal.abo7588.
- Landry, Brian P., Rohan Palanki, Nikola Dyulgyarov, Lucas A. Hartsough, y Jeffrey J. Tabor. 2018. «Phosphatase Activity Tunes Two-Component System Sensor Detection Threshold». *Nature Communications* 9 (1): 1433. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03929-y>.
- Lassak, J., S. Bubendorfer, y K. M. Thormann. 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): 482-92. <https://doi.org/10.1128/JB.01715-12>.
- Lau, Joanne, Lisa Hernandez-Alicea, Robert H. Vass, y Peter Chien. 2015. «A Phosphosignaling Adaptor Primes the AAA+ Protease ClpXP to Drive Cell Cycle-Regulated Proteolysis». *Molecular Cell* 59 (1): 104-16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.014>.
- Laub, Michael T., y Mark Goulian. 2007. «Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways». *Annual Review of Genetics* 41 (1): 121-45. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>.
- Lori, C., A. Kaczmarczyk, I. de Jong, y U. Jenal. 2018. «A Single-Domain Response Regulator Functions as an Integrating Hub To Coordinate General Stress Response and Development in Alphaproteobacteria». Editado por Susan Gottesman. *MBio* 9 (3): e00809-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00809-18>.

- Lukat, G S, W R McCleary, A M Stock, y J B Stock. 1992. «Phosphorylation of Bacterial Response Regulator Proteins by Low Molecular Weight Phospho-Donors.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (2): 718-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.2.718>.
- Lupas, Andrei N., y Jens Bassler. 2017. «Coiled Coils – A Model System for the 21st Century». *Trends in Biochemical Sciences* 42 (2): 130-40. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.007>.
- Mattison, Kirsten, Ricardo Oropeza, Nicole Byers, y Linda J Kenney. 2002. «A Phosphorylation Site Mutant of OmpR Reveals Different Binding Conformations at OmpF and OmpC 1 1Edited by R. Ebright». *Journal of Molecular Biology* 315 (4): 497-511. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5222>.
- McCleary, W. R. 1996. «The Activation of PhoB by Acetylphosphate». *Molecular Microbiology* 20 (6): 1155-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02636.x>.
- McCoy, Airlie J., Ralf W. Grosse-Kunstleve, Paul D. Adams, Martyn D. Winn, Laurent C. Storoni, y Randy J. Read. 2007. «Phaser Crystallographic Software». *Journal of Applied Crystallography* 40 (4): 658-74. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- Mechaly, Ariel E., Nathalie Sassoon, Jean-Michel Betton, y Pedro M. Alzari. 2014. «Segmental Helical Motions and Dynamical Asymmetry Modulate Histidine Kinase Autophosphorylation». Editado por Frederick Hughson. *PLoS Biology* 12 (1): e1001776. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001776>.
- Mendoza, Diego de. 2014. «Temperature Sensing by Membranes». *Annual Review of Microbiology* 68 (1): 101-16. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103612>.
- Muok, Alise R., Ariane Briegel, y Brian R. Crane. 2020. «Regulation of the Chemotaxis Histidine Kinase CheA: A Structural Perspective». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (1): 183030. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183030>.
- Nesper, Jutta, Isabelle Hug, Setsu Kato, Chee-Seng Hee, Judith Maria Habazettl, Pablo Manfredi, Stephan Grzesiek, Tilman Schirmer, Thierry Emonet, y Urs Jenal. 2017. «Cyclic Di-GMP Differentially Tunes a Bacterial Flagellar Motor through a Novel Class of CheY-like Regulators». *ELife* 6 (noviembre): e28842. <https://doi.org/10.7554/eLife.28842>.
- Nixon, B T, C W Ronson, y F M Ausubel. 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): 7850-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7850>.
- Parsek, Matthew R., y E.P. Greenberg. 2005. «Sociomicrobiology: The Connections between Quorum Sensing and Biofilms». *Trends in Microbiology* 13 (1): 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>.
- Pazy, Y., M. A. Motaleb, M. T. Guarnieri, N. W. Charon, R. Zhao, y R. E. Silversmith. 2010. «Identical Phosphatase Mechanisms Achieved through Distinct Modes of Binding Phosphoprotein Substrate». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (5): 1924-29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911185107>.

- Quezada, Cindy M., Damon J. Hamel, Cristian Grădinaru, Alexandrine M. Bilwes, Frederick W. Dahlquist, Brian R. Crane, y Melvin I. Simon. 2005. «Structural and Chemical Requirements for Histidine Phosphorylation by the Chemotaxis Kinase CheA». *Journal of Biological Chemistry* 280 (34): 30581-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505316200>.
- Saita, Emilio, Luciano A. Abriata, Yi Ting Tsai, Felipe Trajtenberg, Thomas Lemmin, Alejandro Buschiazzi, Matteo Dal Peraro, Diego de Mendoza, y Daniela Albanesi. 2015. «A Coiled Coil Switch Mediates Cold Sensing by the Thermosensory Protein DesK: Signal Sensing and Transduction by DesK». *Molecular Microbiology* 98 (2): 258-71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13118>.
- Singh, Mona, Bonnie Berger, Peter S. Kim, James M. Berger, y Andrea G. Cochran. 1998. «Computational Learning Reveals Coiled Coil-like Motifs in Histidine Kinase Linker Domains». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 2738-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2738>.
- Siryaporn A, Goulian M. 2008. «Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in *E. coli*». *Mol Microbiol.* ;70(2):494-506. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06426.x.
- Skerker, Jeffrey M., Barrett S. Perchuk, Albert Siryaporn, Emma A. Lubin, Orr Ashenberg, Mark Goulian, y Michael T. Laub. 2008. «Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems». *Cell* 133 (6): 1043-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.040>.
- Trajtenberg F, Graña M, Ruétalo N, Botti H, Buschiazzi A. Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. 2010. *J Biol Chem.* 6;285(32):24892-903. doi: 10.1074/jbc.M110.147843.
- Trajtenberg, Felipe, Daniela Albanesi, Natalia Ruétalo, Horacio Botti, Ariel E. Mechaly, Marcos Nieves, Pablo S. Aguilar, et al. 2014. «Allosteric Activation of Bacterial Response Regulators: The Role of the Cognate Histidine Kinase Beyond Phosphorylation». Editado por Vanessa Sperandio. *MBio* 5 (6): e02105-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02105-14>.
- Trajtenberg, Felipe, Juan A Imelio, Matías R Machado, Nicole Larrieux, Marcelo A Marti, Gonzalo Obal, Ariel E Mechaly, y Alejandro Buschiazzi. 2016. «Regulation of Signaling Directionality Revealed by 3D Snapshots of a Kinase:Regulator Complex in Action». *ELife* 5 (diciembre): e21422. <https://doi.org/10.7554/eLife.21422>.
- Unger, Tamar, Yossi Jacobovitch, Ada Dantes, Reut Bernheim, y Yoav Peleg. 2010. «Applications of the Restriction Free (RF) Cloning Procedure for Molecular Manipulations and Protein Expression». *Journal of Structural Biology* 172 (1): 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.016>.
- Vonrhein, Clemens, Claus Flensburg, Peter Keller, Andrew Sharff, Oliver Smart, Wlodek Paciorek, Thomas Womack, y Gérard Bricogne. 2011. «Data Processing and Analysis with the *AutoPROC* Toolbox». *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 67 (4): 293-302. <https://doi.org/10.1107/S0907444911007773>.
- Weigt, M., R. A. White, H. Szurmant, J. A. Hoch, y T. Hwa. 2009. «Identification of Direct Residue Contacts in Protein-Protein Interaction by Message Passing». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (1): 67-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805923106>.

- Weinstein, Michael, Augusto F. Lois, Ellen K. Monson, Gary S. Ditta, y Donald R. Helinski. 1992. «Isolation of Phosphorylation-Deficient Mutants of the Rhizobium Meliloti Two-Component Regulatory Protein, FixJ». *Molecular Microbiology* 6 (15): 2041-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01377.x>.
- Wheeler TJ, Clements J, Finn RD. «Skylign: a tool for creating informative, interactive logos representing sequence alignments and profile hidden Markov models». 2014. *BMC Bioinformatics*. 15:7. doi: 10.1186/1471-2105-15-7
- Wolfe, Alan J. 2010. «Physiologically Relevant Small Phosphodonors Link Metabolism to Signal Transduction». *Current Opinion in Microbiology* 13 (2): 204-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.002>.
- Wuichet, Kristin, Brian J Cantwell, y Igor B Zhulin. 2010. «Evolution and Phyletic Distribution of Two-Component Signal Transduction Systems». *Current Opinion in Microbiology* 13 (2): 219-25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.12.011>.
- Wuichet, Kristin, y Igor B. Zhulin. 2010. «Origins and Diversification of a Complex Signal Transduction System in Prokaryotes». *Science Signaling* 3 (128). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000724>.
- Xie, Mingquan, Mengyuan Wu, y Aidong Han. 2020. «Structural Insights into the Signal Transduction Mechanism of the K⁺-Sensing Two-Component System KdpDE». *Science Signaling* 13 (643): eaaz2970. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaz2970>.
- Yamada, Seiji, Hiroshi Sugimoto, Miki Kobayashi, Ayako Ohno, Hiro Nakamura, y Yoshitsugu Shiro. 2009. «Structure of PAS-Linked Histidine Kinase and the Response Regulator Complex». *Structure* 17 (10): 1333-44. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.07.016>.
- Zhao, Rui, Edward J. Collins, Robert B. Bourret, y Ruth E. Silversmith. 2002. «Structure and Catalytic Mechanism of the E. Coli Chemotaxis Phosphatase CheZ». *Nature Structural Biology*, junio. <https://doi.org/10.1038/nsb816>.