



**Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
PEDECIBA Biología  
TESIS DE DOCTORADO  
Opción Biofísica**



# **“Mecanismos alostéricos en la regulación funcional de un termosensor bacteriano”**

**MSc. Felipe Trajtenberg**

**Orientador: Dr. Alejandro Buschiazzo**

**Unidad de Cristalografía de Proteínas  
Institut Pasteur de Montevideo**

**Tribunal**

**Presidente: Dr. Luis Acerenza**

**Vocales: Dr. Alberto Marina  
Dr. Pablo Aguilar**

**30 de mayo de 2011**

# AGRADECIMIENTOS

A Alejandro por confiar en mí. Todo lo que me enseñó, su dedicación y apoyo, el entusiasmo en las discusiones que me hicieron dar cuenta de su calidad científica y humana. Todo esto fue fundamental para aprender, pero más importante aún, para disfrutar de este trabajo.

A Nicky por creer en mí, por su amor y apoyo incondicional, y también por las horas que dedicó a este trabajo en la mesada y “soportandome” en casa.

A mis viejos y mis hermanos, Nico y Guille, que en cada momento de mi vida fueron un soporte esencial, por creer en mí y por representar mucho más que familia...amigos.

A Gonza, Horacio, Martín y Naty por el esfuerzo y el trabajo que dedicaron.

A Diego de Mendoza, Pedro Alzari y Daniela Albanesi los cuales contribuyeron de manera fundamental en este trabajo y con quienes compartimos una muy rica colaboración.

A los miembros del Tribunal: Luis, Alberto y Pablo por la dedicación a la ardua tarea realizada, pero también por las discusiones y sugerencias.

A Matías y al Chapa por su invaluable ayuda.

A las unidades UByPA, UPR, UBP y UGC.

A Otto y Pablo por las charlas y experiencias que compartimos.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto: Ale, Bruno, Ceci, Colo, Flopi, Gonza, Horacio, Hugo, Lore, Male, Matías, Momia, Mora, Naty, Nicky, Otto, Pablo, Pili, Rama, Sergio y Sofi, por hacer del día a día una divertida experiencia...

A mis amigos Laura, Ana Victoria, Alejandro, Matías y Arturo por estar siempre no importa que tan lejos estén!

A mis tíos Carlos y Anita por todo su apoyo.

A todo el Institut Pasteur de Montevideo.

A la ANII y PEDECIBA.

y a todos los que colaboraron con la realización de este trabajo.

# 1. RESUMEN

Los mecanismos moleculares que permiten a las proteínas sensoras detectar señales externas y transmitir las hacia el interior celular son poco conocidos y de gran relevancia biológica. En este trabajo se buscó profundizar en su estudio mediante un enfoque estructural de la región citoplasmática de la histidin-quinasa DesK de *Bacillus subtilis*, el componente sensor de una vía de transducción de señales que actúa como un termómetro molecular. Esta proteína puede alternar entre actividades autoquinasa y fosfatasa, dependiendo de la fluidez de la membrana. En presencia de un descenso brusco de la temperatura, la enzima cataliza la autofosforilación de una histidina conservada, para luego transferir este grupo fosfato a un aspártico igualmente conservado de su regulador respuesta específico, DesR. Esta fosfotransferencia provoca un cambio alostérico de DesR que pasa a actuar como un activador de la transcripción, controlando la expresión de la  $\Delta 5$ -desaturasa (catalizando la desaturación de fosfolípidos de membrana). Por el contrario, el aumento en la fluidez de la membrana se correlaciona con la inducción de la actividad fosfatasa de DesK sobre DesR-P, acelerando el apagado de la vía. Para comprender como se transmite la información en la propia molécula de DesK, se resolvieron varias estructuras cristalográficas de su región citoplasmática completa en distintos estados funcionales. Esto se complementó con abordajes bioinformáticos y ensayos funcionales para capturar conformaciones transitorias funcionalmente relevantes. Los diferentes estados conformacionales se estabilizaron usando mutaciones en residuos clave, fosforilación y/o complejos con ligandos. La comparación estructural de los distintos modelos, en combinación con evidencias bioquímicas, permite proponer un modelo de tres estados funcionales y estructurales (fosfatasa / quinasa / fosfotransferasa) regulados por el dominio sensor transmembrana. La señal ('input') es transmitida hacia el interior celular a través de un "coiled-coil" de dos hélices  $\alpha$ , que conecta el dominio sensor con el núcleo catalítico. Dichas hélices sufren rearrreglos importantes, incluyendo en particular movimientos rotacionales, en definitiva capaces de controlar las actividades quinasa/fosfatasa de salida ('output'), que definen el ciclo regulatorio. Otros eventos importantes en la transmisión de la información que fueron estudiados son: la determinación de una geometría específica en la interacción entre los dos dominios de la quinasa para permitir su autofosforilación, los cambios alostéricos que conducen a la activación del regulador de respuesta y la formación del complejo entre este último con su histidin-quinasa específica. Se resolvieron dos estructuras 3D del dominio fosforilable de DesR, sugiriendo la presencia de un tetrámero que permitiría proponer un modelo de interacción con el ADN. Por otro lado, a partir del estudio biofísico en solución y bioinformático del complejo entre ambas proteínas es posible predecir diferentes complejos DesK-DesR según el estado funcional de la quinasa.

## 2. INDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INDICE .....	2
3. INTRODUCCION .....	4
3.1. Sistemas de dos componentes (SDC) .....	7
3.1.1. Clasificación de HQs y RRs.....	10
3.1.2. Organización de vías de transducción de señales .....	12
3.2. Estudios estructurales en SDC .....	14
3.2.1. Histidin-quinasas.....	15
3.2.1.1 Estructura de la región citoplasmática de las quinasas de histidina.....	16
3.2.1.2 Estructura de dominios sensores de HQs.....	19
3.2.1.3 Relación estructura:función en las HQs.....	20
3.2.1.3.1 Autofosforilación .....	20
3.2.1.3.2 Actividad fosfatasa.....	21
3.2.1.3.3 Actividad fosfotranserasa.....	22
3.2.2. Reguladores de respuesta.....	23
3.2.3. Proteínas de “phosphorelays” .....	28
3.2.4. Complejos HQ-RR.....	28
3.3. Mecanismos de transducción de señales en SDC .....	30
3.4. Sistema DesK-DesR: un termómetro molecular.....	35
4. OBJETIVO GENERAL.....	41
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5.1.1. Resolver estructuras 3D de DesK en distintos estados funcionales.....	41
5.1.2. Caracterizar el mecanismo de autofosforilación de DesK.....	41
5.1.3. Resolver la estructura tridimensional de DesR.....	42
5.1.4. Realizar una caracterización biofísica del complejo DesK-DesR en solución.....	42
5.1.5. Realizar estudios estructurales del complejo DesK-DesR.....	42
6. MATERIALES Y METODOS.....	43
6.1. Construcción de plásmidos de expresión y mutagénesis dirigida.....	43
6.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	46
6.3. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño .....	47
6.4. Cristalización de proteínas.....	47
6.5. Difracción de rayos X, resolución de estructuras y refinamiento .....	51
6.6. Análisis estructurales .....	52
6.7. Ensayo de actividad: cinética de autofosforilación.....	53
6.8. Análisis de conservación de secuencia .....	54
6.9. Estudios <i>in silico</i> de simulación de interacciones proteína:proteína .....	54
6.10. Entrecruzamiento químico de proteínas.....	56
6.11. Calorimetría de titulación isotérmica.....	57

7. RESULTADOS .....	59
7.1. Expresión y purificación de proteínas.....	59
7.2. Análisis por cromatografía de exclusión molecular.....	60
7.3. Estructuras del dominio ABD en complejo con ATP a alta resolución.....	60
7.4. Estructuras de mutantes de DesKC en el estado fosfatasa.....	68
7.5. Estructuras de DesKC en el estado quinasa y fosfotransferasa .....	73
7.6. Caracterización funcional de la autofosforilación de DesKC.....	80
7.7. Alineamientos estructurales entre los distintos modelos .....	81
7.8. Relevancia del <i>coiled-coil</i> N-terminal en la transmisión de la señal.....	85
7.9. Autofosforilación en DesK: docking y entrecruzamiento específico.....	90
7.10. Estructura del dominio receptor de DesR.....	98
7.11. Análisis estructural de las superficies de asociación del dominio receptor de DesR: relevancia en su estructura cuaternaria .....	102
7.12. Conservación de secuencia y posible estado funcional de DesR-N136 .....	104
7.13. Caracterización biofísica del complejo DesK-DesR.....	112
7.14. Cristalización del complejo DesK-DesR .....	120
8. DISCUSION .....	122
8.1. Estudios estructurales de DesKC .....	124
8.1.1. Análisis estructural de cada estado conformacional de DesKC: vínculo conformación-función.....	128
8.1.1.1 Estado quinasa .....	128
8.1.1.2 Estado fosfatasa .....	128
8.1.1.3 Estado fosfotransferasa .....	129
8.1.2. Reacción de autofosforilación en DesK.....	132
8.2. Caracterización estructural de DesR.....	133
8.3. Complejo DesK-DesR .....	138
9. REFERENCIAS.....	143
10. ANEXOS .....	163

### 3. INTRODUCCION

Durante gran parte del siglo XX, la bioquímica fundó su progreso mediante el enfoque reduccionista, que motorizó el estudio detallado de cada una de las moléculas que se identificaban como mediadores importantes de procesos biológicos centrales. De algún modo la aproximación más utilizada consistió en la purificación de los componentes y su estudio en forma aislada, para luego generar hipótesis mecanísticas que se ponían a prueba reconstituyendo los distintos ensamblajes funcionales a partir de sus componentes moleculares. La biología estructural no escapó a este espíritu, que de hecho resultó ser extremadamente productivo, iluminando por primera vez sistemas biológicos de enorme complejidad. Alimentado justamente por el gran progreso en la identificación y análisis de una gigantesca diversidad de moléculas, y el armado consecuente de “rompecabezas” parciales correspondientes a las vías metabólicas más importantes de las células, el paradigma central sobre la aproximación experimental para comprender los mecanismos biológicos ha cambiado sustancialmente. Al comienzo del siglo XXI es claro por ejemplo que las proteínas funcionan muy excepcionalmente, si es que alguna lo hace, como elementos aislados. La imagen que tenemos ha cambiado significativamente: las proteínas funcionan prácticamente todo el tiempo en interacción con otras macromoléculas y/o pequeñas moléculas, interacciones de mayor o menor especificidad, pero que en todo caso ejercen acciones moleculares precisas sobre su función.

Las concentraciones de macromoléculas en la célula suelen ser órdenes de magnitud superiores a las que se suponían, y en este medio superpoblado la concentración efectiva del agua como solvente está correlacionadamente disminuida. En este nuevo escenario, poblado de complejos macromoleculares en constante asociación y disociación, el fenómeno de alosterismo deja de ser una característica peculiar de algunas pocas proteínas, para pasar a ser un mecanismo que parece cada vez más general, a la hora de entender cómo es regulada la función de las mismas en su medio fisiológico. Entendemos alosterismo como el proceso por el cual las macromoléculas biológicas (fundamentalmente las proteínas) transmiten los efectos regulatorios inducidos por la unión de un ligando desde un sitio de unión (regulador), hasta otro diferente, funcional (por ejemplo el sitio activo de una enzima o el sitio de interacción de un receptor), frecuentemente muy alejados entre sí. La naturaleza del efector alostérico, que puede activar o inhibir el estado del sitio funcional, es enormemente variada, pudiendo ser desde una pequeña molécula, una modificación post-traducciona, hasta una segunda proteína o incluso un ensamblado molecular. Sabemos que todo cambio funcional de una proteína tiene un fundamento estructural. En este proyecto se propuso así dilucidar las bases estructurales de mecanismos alostéricos en proteínas, seleccionando un modelo en el que este modo de regulación juegue un papel central.

Más allá de una serie de ejemplos en los que se profundizó tempranamente como modelos de regulación alostérica, y a pesar de la enorme relevancia biológica del fenómeno, aún hoy carecemos de una visión general de sus fundamentos estructurales y energéticos, y cómo éstos se conectan en el entramado de circuitos bioquímicos que resultan en la homeostasis característica de los seres vivos. Durante los últimos 40 años, el alosterismo ha sido usualmente interpretado a través de dos modelos clásicos: el modelo concertado<sup>1</sup> y el secuencial<sup>2</sup>. En ambos se parte de la necesidad de que la proteína tenga una arquitectura multimérica (estructura cuaternaria), con subunidades o monómeros equivalentes estructural y funcionalmente. El esquema concertado trata al acoplamiento conformacional entre los distintos monómeros como un fenómeno absoluto: las subunidades de la proteína alostérica están conectadas de tal manera que un cambio conformacional en una subunidad se confiere necesaria e inmediatamente a todas las otras, de modo que todos los monómeros se encuentran siempre en la misma conformación. En ausencia de cualquier ligando (efector o sustrato), el equilibrio favorece a uno de los dos estados conformacionales, llamados tenso (T) o relajado (R). Dicho equilibrio se ve desplazado a través de la asociación del efector alostérico en un sitio distinto al sitio activo. En contraste, de acuerdo al modelo secuencial, las subunidades no necesariamente tienen que estar en el mismo estado. La unión del efector a cada uno de los monómeros induce un cambio conformacional (ajuste inducido, “*induced fit*”). El efecto de una subunidad sobre las otras es acumulativo (o secuencial), con modulaciones sucesivas de la afinidad por el sustrato en cada monómero. Estos modelos permiten explicar desviaciones de las clásicas curvas hiperbólicas que describen la actividad enzimática o la interacción con un ligando cuando no hay alosterismo.

Probablemente los dos conceptos que más han evolucionado desde la postulación de estos modelos clásicos son la estricta necesidad de estructura cuaternaria en la proteína regulada, así como la idea de que los cambios conformacionales son disparados o inducidos por la unión del efector. Es claro actualmente que las proteínas monoméricas pueden ser reguladas alostéricamente<sup>3-5</sup>, y parecería ser que la clave reside en su plasticidad (como característica opuesta a la rigidez) o flexibilidad conformacional. Muchos son los ejemplos, incluyendo en particular los asociados al descubrimiento y diseño de drogas que actúan como efectores alostéricos de proteínas blanco: es suficiente con que la unión del efector module a distancia la actividad del sitio funcional<sup>6,7</sup> aun en casos donde esto no se correlaciona con mecanismos de cooperatividad intermolecular en multímeros.

En cuanto a la inducción de ajustes conformacionales disparados por la unión del efector, uno de los conceptos recientes más poderosos, es el de ajuste ‘seleccionado’ (*selected fit*), más general que el de

ajuste inducido, de acuerdo al cual los modelos clásicos de alosterismo pasan a ser casos particulares. En este sentido las aproximaciones experimentales (cristalografía, RMN, microscopía electrónica) han contribuido evidencias fundamentales apoyando esta noción, sobre todo por la gran cantidad de estructuras ahora disponibles. Se ha constatado que en verdad las macromoléculas muestrean en solución las distintas variantes conformacionales a las que tienen acceso termodinámico<sup>8-11</sup>: así, las conformaciones definidas como ajustadas por unión de un ligando, se observan aun con la proteína libre. El ligando (sea este sustrato, ligando específico o efector alostérico) juega así el rol de seleccionar el conformero capaz de unirlo ya presente en solución, simplemente modificando el equilibrio y/o las constantes cinéticas de interconversión de las distintas especies conformacionales de la proteína regulada. Es en este escenario donde la plasticidad de las proteínas se distingue como factor clave para permitir la transmisión de la información a nivel molecular, aun en el seno de un mismo monómero. Los rearrreglos conformacionales incluyen frecuentemente modificaciones significativas en la disposición espacial de los residuos clave. Se comienzan a reportar ejemplos sin embargo, donde estos cambios pueden ser muy sutiles, y es la modulación de la flexibilidad de regiones específicas la que juega el rol de vehicular la información de un punto a otro de la molécula<sup>12,13</sup>.

Como modelo de estudio en este trabajo se decidió centrar la atención en el fenómeno biológico de la señalización celular, ya que es una función que, por definición, requiere de mecanismos de transmisión de información, y por ende una fuente diversa de proteínas donde el alosterismo jugaría un rol central. Las proteínas deben ser capaces de cambiar ante la presencia de la(s) señal(es) específica(s), y por ende translucirla(s) en términos de una cascada de señalización río abajo. Transducción queda así definido en sentido estricto como el conjunto de mecanismos moleculares que permiten sentir una señal extracelular para internalizarla conllevando a una respuesta celular específica. En sentido más amplio, y siguiendo el mismo tipo de mecanismo, la señal puede ser de hecho intracelular. Por lo tanto, esta es por definición un efector alostérico. En las vías de señalización, si bien hay una señal inicial, la cascada incluye una serie de señales derivadas, río abajo, que funcionan de efectores para las siguientes proteínas asociadas a la vía.

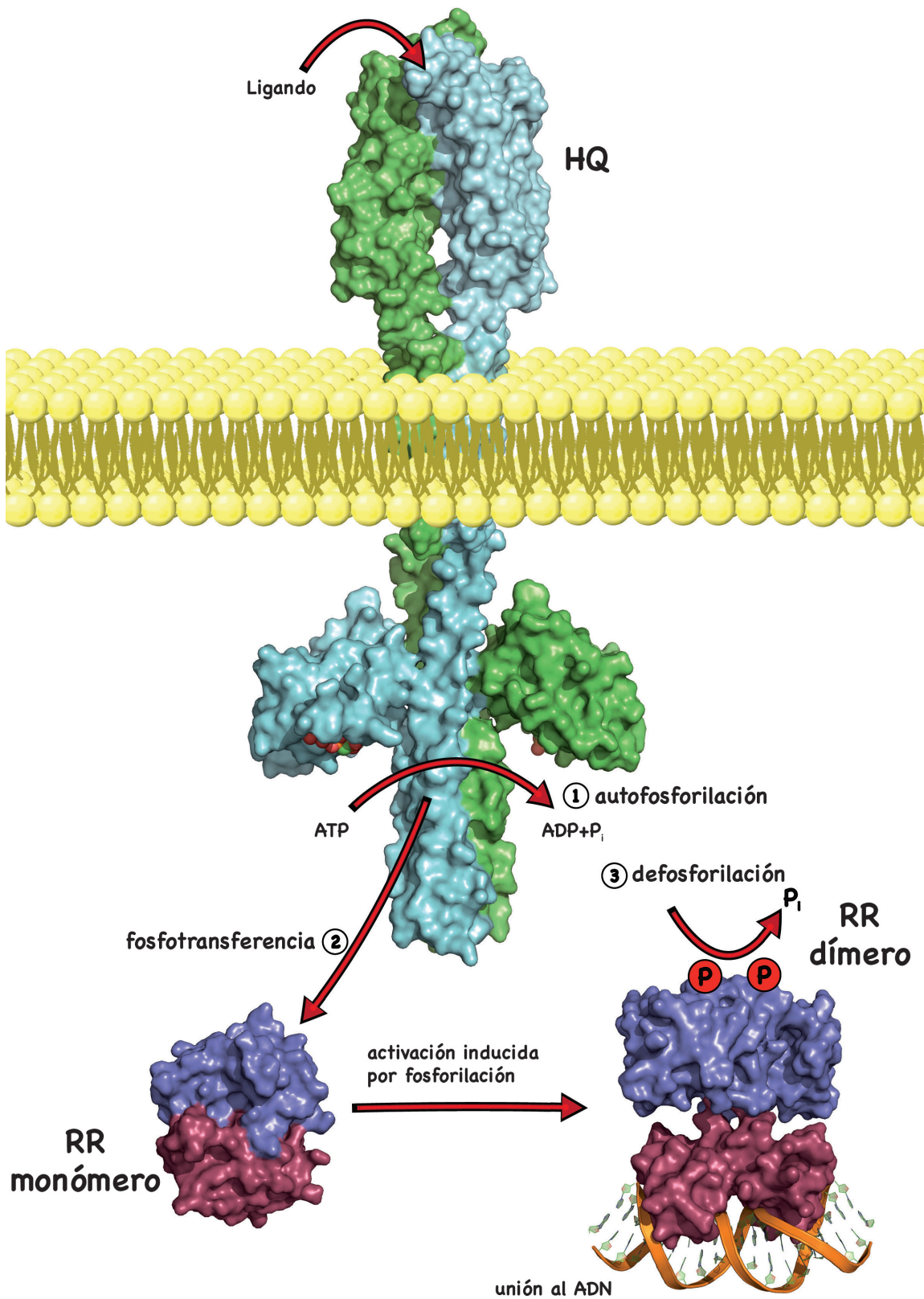
Las bacterias, como todo organismo vivo, necesitan detectar señales del entorno y generar respuestas adaptativas a los cambios ambientales para poder sobrevivir. Las células han desarrollado una serie de circuitos bioquímicos que permiten sentir, internalizar y transmitir las señales desde el exterior (transducción en sentido estricto) o desde el propio interior celular (incluyendo la acción de segundos mensajeros), induciendo cambios en la expresión de ciertos genes y/o modificando la actividad

de enzimas y otras proteínas específicas, como mecanismos centrales de la adaptación. La mayoría de los sistemas de detección y transducción de señales en bacterias se denominan “sistemas de un componente”<sup>14</sup>. Estos están constituidos por una proteína capaz de disparar una respuesta frente a un estímulo y el ejemplo clásico más estudiado es sin duda el represor Lac, capaz de regular la expresión génica en función de la presencia de lactosa<sup>15</sup>. Las bases estructurales de esta regulación fueron dilucidadas por Lewis y colaboradores resolviendo estructuras de esta proteína en distintos estados funcionales<sup>16,17</sup>. Así mismo son muy frecuentes sistemas más complejos, incluidos en la denominación general de “sistema de dos componentes” (SDC)<sup>18</sup>, sobre los que este trabajo de Tesis estará centrada. Más recientemente se han descubierto también sistemas de señalización basados en Ser/Thr/Tyr quinasas, durante muchos años clasificadas erróneamente como exclusivas de eucariotas.

Los mecanismos de transducción de las señales en estos distintos sistemas presentan diferencias importantes. Nuestro principal interés es dilucidar las modificaciones moleculares precisas que resultan en la regulación de las distintas funciones de las proteínas de SDCs, determinando en definitiva el flujo de información en estas vías de señalización. Nos hemos focalizado en los SDCs como modelo de estudio, ya que las proteínas que lo integran poseen distintas actividades (en particular distintas funciones catalíticas en función de la detección de la señal) y hasta la fecha la información detallada de la relación estructura:función sigue siendo escasa y necesaria.

### 3.1. Sistemas de dos componentes (SDC)

Los SDCs prototípicos (Figura 1) involucran la transferencia de grupos fosfato entre dos proteínas denominadas histidin-quinasa (HQ) y regulador de respuesta (RR). En algunas arqueas y eucariotas inferiores estas vías de señalización son poco frecuentes y en animales parecen estar ausentes. El 96% de los genomas bacterianos incluyen SDCs, mientras que sólo están presentes en el 50% de los genomas de arqueas<sup>19</sup>. En eucariotas el número de vías es mucho menor, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* presenta un único SDC que está involucrado en la osmoregulación (SLN1-YPD1-SSK1, SKN7), pero existen ejemplos interesantes en otros hongos (*Neurospora spp.*) e incluso en plantas superiores (*Arabidopsis thaliana*, entre muchas otras), donde los SDCs cumplen funciones biológicas centrales<sup>20</sup>. En bacterias, estas vías son capaces de detectar y responder a diversos estímulos físicos o químicos, como la presencia o ausencia de nutrientes o determinadas sustancias químicas, gradientes de moléculas (quimiotaxis), variaciones en la densidad celular (“*quorum sensing*”), concentración salina, temperatura, pH, luz, etc.<sup>21,22</sup> Varios SDCs han mostrado ser factores de virulencia en bacterias patógenas<sup>23-33</sup> o incluso esenciales para la supervivencia<sup>34-38</sup>. En los últimos años, el surgimiento

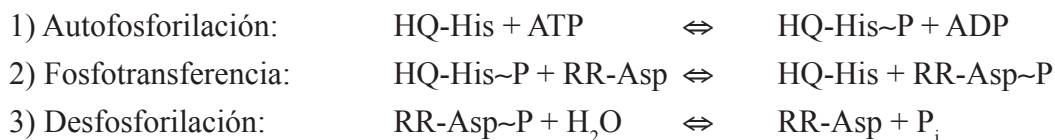


**Figura 1: Sistemas a dos componentes prototípico.** La HQ en presencia del estímulo adecuado, por ejemplo la unión de un ligando específico, es capaz de modular la reacción de autofosforilación de una histidina conservada en la región citoplasmática (1). Una vez fosforilada, la HQ transfiere el grupo fosfato desde la histidina a un aspártico del RR igualmente conservado (2). En la figura se representa la transición de una estructura cerrada y monomérica del RR a una forma dimerica capaz de unirse al ADN. Al desaparecer el estímulo detectado por la HQ, la vía se apaga por la defosforilación del RR (3). Esta reacción puede ocurrir por la hidrólisis espontánea del fosfoaspártato o catalizada por una enzima (una fosfatasa específica o un estado funcional diferente de la HQ).

de patógenos resistentes a antibióticos usados clínicamente ha generado un problema sanitario, con consecuencias económicas importantes. Este problema requiere de nuevos blancos para el desarrollo de tratamientos diferentes y los SDCs podrían representar un interesante grupo de proteínas para ser utilizados ya que no están presentes en los animales<sup>32</sup>.

Las HQs son proteínas capaces de catalizar la autofosforilación de un residuo de histidina altamente conservado, a expensas de ATP (esquema 1). Esta actividad está estrictamente regulada por la presencia de un estímulo específico o señal, lo que determina el comienzo de la transmisión río abajo. Dicha señal parece generalmente disparar (mediante regulación alostérica) la actividad autoquinasa de la HQ, aunque existen numerosos ejemplos donde el efecto es el opuesto: en el contexto de una actividad de autofosforilación constitutiva, la señal induce la inhibición de la misma, como ocurre con el etileno y el receptor ETR1 en plantas<sup>39</sup> o la señalización por quórum en bacterias Gram negativas por vía de la HQ LuxQ<sup>40</sup>, entre muchos otros casos. Por otro lado, los RRs son en general factores de transcripción, capaces de activar la expresión de ciertos genes cuando se encuentran en el estado fosforilado<sup>20,22</sup>. Esta modificación post-traducciona ocurre por transferencia del grupo fosfato de alta energía de la HQ a un aspartato conservado del RR (esquema 1). La reacción de transferencia es clave en la señalización y requiere que la interacción entre estas dos proteínas sea muy específica para que una respuesta adaptativa esté ligada a un determinado estímulo<sup>41</sup>. Las HQ son catalíticamente similares a las quinasas de serina, treonina o tirosina por transferir un grupo fosfato a partir del ATP; sin embargo existen importantes diferencias químicas ya que el producto final no es un enlace fosfoéster sino un fosforamidato, que presenta una energía libre de hidrólisis significativamente mayor<sup>20</sup>. También hay diferencias al considerar la fosforilación de un aspártico, un enlace anhídrido con vida media típicamente mucho menor en solución acuosa, que varía en el rango de segundos a horas<sup>42</sup>. Esta desfosforilación y su cinética dependiente de cada caso en particular, es relevante en relación a la inactivación de la vía (esquema 1)<sup>20</sup>. La hidrólisis del fosfoaspartato del RR puede ser espontánea o catalizada por la actividad fosfatasa de proteínas específicas. Muchas de las HQs constituyen proteínas multifuncionales, con capacidad de catalizar además la desfosforilación de su RR específico<sup>43,44</sup>. En estos casos de HQs con actividades quinasa/fosfatasa, la presencia o ausencia de la señal determina la relación entre ambas actividades y, por ende, los niveles de RR fosforilado<sup>44</sup>. En algunos SDCs más complejos pueden participar fosfatasas específicas<sup>45</sup>, como luego se discutirá en mayor profundidad.

Esquema de reacciones:



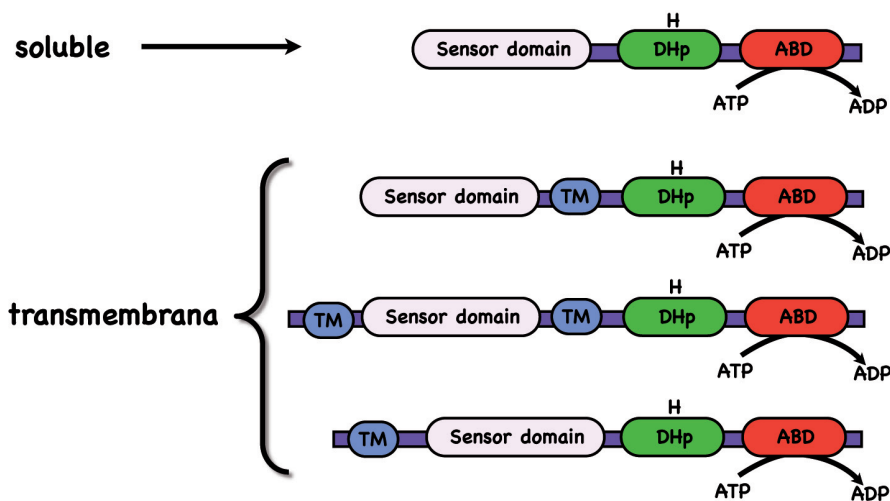
Es importante considerar también la capacidad de los RRs de “autofosforilarse” utilizando como dadores de fosfato, pequeñas moléculas fisiológicamente relevantes, tales como el acetyl-fosfato, lo que conecta el estado metabólico de las células con la transducción de señales <sup>46</sup>.

### 3.1.1. Clasificación de HQs y RRs

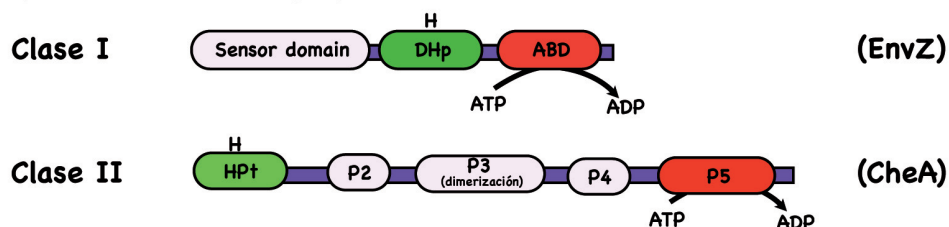
Las HQs y los RRs son proteínas modulares y la organización de los dominios funcionales puede ser muy diversa. En general, la región extracelular de las HQs presenta una secuencia muy variable, reflejando el amplio espectro de señales que pueden ser detectados por esos sistemas; por el contrario la región citoplásmática es mucho más conservada. Hasta la fecha se han identificado más de 45000 HQs diferentes y más de 62000 RRs, según la base de datos Pfam<sup>47</sup>.

En una descripción general (las variaciones serán mencionadas luego) las HQs son proteínas homodiméricas, con un dominio N-terminal sensor y una región citoplásmática catalítica, la cual incluye dos dominios: de dimerización y fosforilación (DHp, “Dimerization Histidine-phosphotranfer”) y otro de asociación a ATP (ABD, “ATP binding domain”)<sup>20</sup>. La superfamilia de HQs puede ser clasificada según diferentes criterios (figura 2) de acuerdo a: (1) si son proteínas de transmembrana o solubles, (2) la ubicación de la histidina fosforilable en el dominio DHp o en un dominio aparte denominado HPt (“*His-containing phosphotransfer domain*”), (3) la secuencia aminoacídica alrededor de la misma histidina, (4) la secuencia de los dominios de unión al ATP, (5) la organización topológica de los dominios. De acuerdo a la posición de la histidina fosforilable se distinguen dos grupos: de clase I, en las que la histidina fosforilable se ubica en el propio dominio de dimerización DHp; y, de clase II, en las que el sitio de fosforilación se localiza en un dominio HPt (aproximadamente 1137 miembros según la base de datos P2CS<sup>48</sup>). Las HQs de clase I son mucho más abundantes<sup>20</sup>, y pueden clasificarse de acuerdo a la secuencia aminoacídica del dominio DHp en 4 familias (figura 2): HISKA, HISKA\_3, HISKA\_2 y HWE\_HK<sup>47</sup>. Actualmente, la familia HISKA presenta 40899 miembros, mientras que la segunda más abundante, HISKA\_3, presenta 5319. Considerando las secuencias de los ABDs, las HQs se separan en 11 grupos, denominados HPK1 a 11<sup>49</sup>. Finalmente, la última clasificación involucra a la arquitectura de las proteínas en términos de presencia y topología de sus dominios consti-

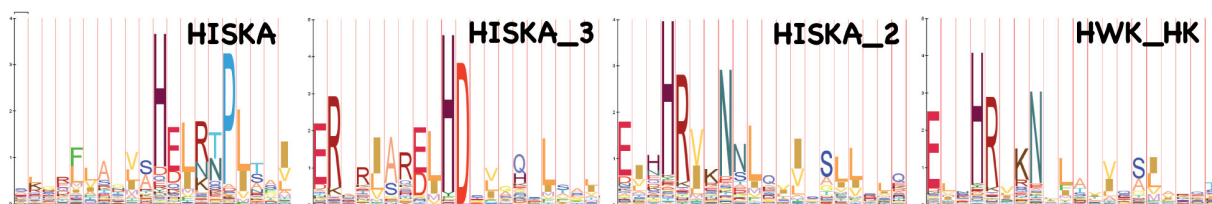
## 1) Proteínas transmembrana o solubles



## 2) Localización de la histidina fosforilable



## 3) Secuencia alrededor de la histidina fosforilable



## 4) Secuencia de los dominios ABD

## 5) Organización de dominios

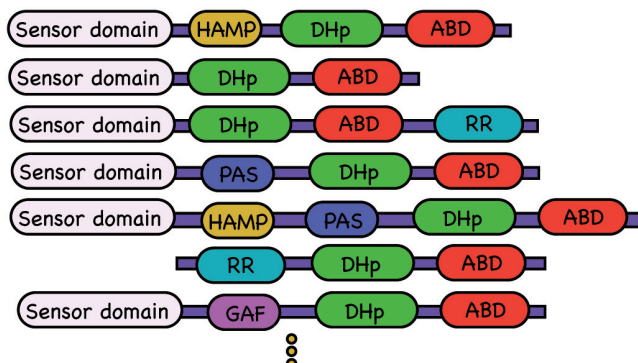


Figura 2: Clasificación de las HQs de acuerdo a los diferentes criterios detallados en el texto. Las figuras del panel (3) fueron obtenidas de la base de datos Pfam y representan los perfiles HMM de cada familia<sup>51</sup>. El panel (5) muestra sólo algunas de las más de 1900 arquitecturas diferentes de HQ, de acuerdo a la base de datos Pfam.

tutivos. Estos arreglos siguen patrones de organización muy variables, con implicancias en la transmisión de la señal. En la familia HSKA las dos arquitecturas más abundantes HAMP+DHp+ABD y DHp+ABD representan el 25 y 22 %, respectivamente. Estas también son las más abundantes para la familia HSKA\_3 con el 11 y 51 %, respectivamente. El dominio HAMP (su denominación viene de las siglas en inglés “*Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis proteins and Phosphatases*”, por su identificación en proteínas de esos grupos) actúa como conector y transmisor entre los dominios sensores extracelulares y los dominios catalíticos intracelulares, constituyendo un elemento muy frecuente en proteínas de señalización<sup>50</sup>.

Los RRs se caracterizan por presentar un dominio receptor (REC) hacia el extremo N-terminal y, generalmente, un dominio efector hacia el C-terminal. El REC es llamado así porque en el mismo reside el aspartato que recibe el grupo fosfato en la cascada de señalización. La gran mayoría de los RRs presentan dominios efectores de unión al ADN, actuando como factores de transcripción, mientras que un ~15% presenta únicamente el dominio REC, y actúan interaccionando con otras proteínas dependiendo del estado de fosforilación<sup>52</sup>. Una fracción no despreciable de RRs actúa aun de una forma diferente, ya que presentan uno o más dominios efectores con actividad enzimática, por ejemplo metiltransferasa, adenilato ciclasa, diguanilato ciclasa, fosfodiesterasa específica de GMPc, histidinquinasa, serin/treonin-quinasa, fosfatasa, entre las más importantes<sup>52</sup>. La secuenciación de nuevos genomas está revelando nuevas arquitecturas de RR<sup>52</sup>, reflejando la gran riqueza y complejidad en las vías de señalización. En eucariotas, la mayoría de los SDCs están compuestos por las llamadas HQs híbridas, que incluyen hacia el extremo C-terminal un dominio receptor (REC) que participan de la transferencia de fosfatos en las vías correspondientes<sup>19</sup>.

### 3.1.2. Organización de vías de transducción de señales

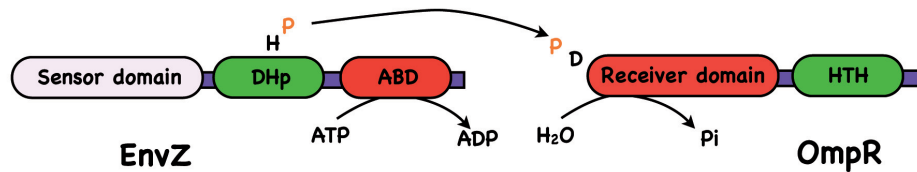
Uno de los ejemplos más estudiados de SDC, EnvZ/OmpR, ilustra la organización más simple en estas vías de señalización, esquema que se repite en muchas otras vías. El par EnvZ/OmpR ha sido extensamente estudiada y es clave en la capacidad de osmoregulación en *Escherichia coli*<sup>53-66</sup>. Cuando la bacteria se expone a un medio con alta osmolaridad predomina la actividad autoquinasa/fosfotransferasa de EnvZ sobre su actividad de fosfatasa. La transferencia del fosfato a OmpR activa y reprime la expresión de varios genes, entre los que se encuentran *ompC* y *ompF* (que codifican para porinas de la membrana externa) y que permiten la internalización de pequeñas moléculas, menores a 650Da<sup>53</sup>. Por el contrario en medios de baja osmolaridad la relación de actividades de EnvZ se invierte, disminuyendo drásticamente los niveles de OmpR fosforilado.

Los SDCs pueden organizarse en vías de mayor complejidad. Es frecuente encontrar ejemplos de vías con más de dos componentes, típicamente incluyendo proteínas intermedias entre la HQ sensora y el RR efector, que funcionan sólo transfiriendo el grupo fosfato (en inglés “*phosphorelay*”) en cascadas más largas (figura 3). Los dominios y mecanismos de transferencia de la información se encuentran sin embargo muy conservados<sup>22</sup> utilizando siempre residuos de histidina o aspártico para la transmisión de los grupos de fosfato, lo que explica su inclusión dentro de los SDCs. Un ejemplo clásico de este tipo de sistemas de *phosphorelay* es el involucrado en la regulación de la esporulación en *Bacillus subtilis*. En esta vía 5 HQs (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE) son capaces de transferir grupos fosfatos al aspártico de Spo0F, y este a su vez se lo transfiere a un residuo de histidina de Spo0B, para finalmente modificar a Spo0A, un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes involucrados en la esporulación<sup>67</sup>. Tanto Spo0F como Spo0B son proteínas de *phosphorelay* que sólo catalizan la transferencia específica de los grupos fosfato, e incapaces de utilizar ATP como sustrato. Spo0B presenta una similitud estructural importante con HQs<sup>68</sup> y Spo0F es una proteína pequeña con un único dominio REC<sup>69</sup>. Además, en esta vía participan dos tipos de fosfatasas Spo0E, que desfosforila a fosfo-Spo0A, y Rap que actúa sobre Spo0F<sup>45</sup>. Un caso de SDC complejo que ha sido estudiado con gran detalle, es sin embargo poco frecuente: la vía de control de la quimiotaxis en *Escherichia coli*. La HQ de clase I (CheA) es en este caso capaz de modificar distintos RRs (CheY y CheB), lo cual constituye un ejemplo de señal divergente, opuesto al sistema Spo0. CheY es una proteína con un único dominio REC que, al fosforilarse, se une a la base del flagelo alterando la rotación del mismo. Esta vía de señalización es de las más complejas hasta ahora estudiadas, por el número de proteínas que participan y mecanismos regulatorios involucrados, permitiendo adquirir memoria, adaptación y un rango dinámico de respuesta muy grande<sup>70</sup>.

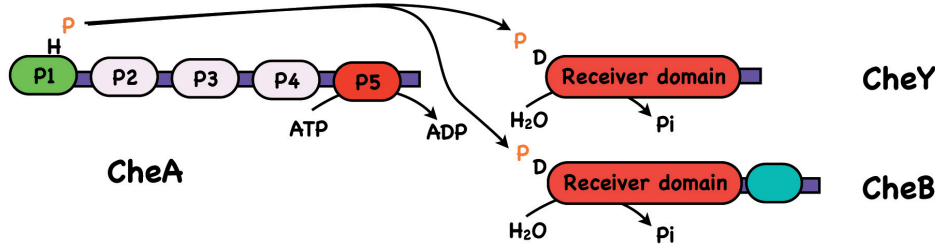
Hasta la fecha no se sabe exactamente por qué algunos sistemas presentan un solo paso de fosfo-transferencia mientras que otros son más complejos. Se ha propuesto que la presencia de varios pasos admite puntos de control adicionales, pero también podrían afectar la cinética de activación en función del tiempo o filtrar el ruido en ausencia del estímulo<sup>71</sup>. La complejidad de los sistemas puede aumentar si consideramos la presencia de mecanismos de retroalimentación positiva o negativa, ya que los propios RRs pueden activar o reprimir la expresión de genes que codifican para proteínas del SDC o que alteran su funcionalidad<sup>72-74</sup>.

En las bacterias pueden coexistir decenas de SDCs diferentes, por ejemplo *E. coli* presenta 30 HQs y 32 RRs, mientras que *Synechocystis* posee alrededor de 80 vías diferentes<sup>20</sup>. La interferencia (en

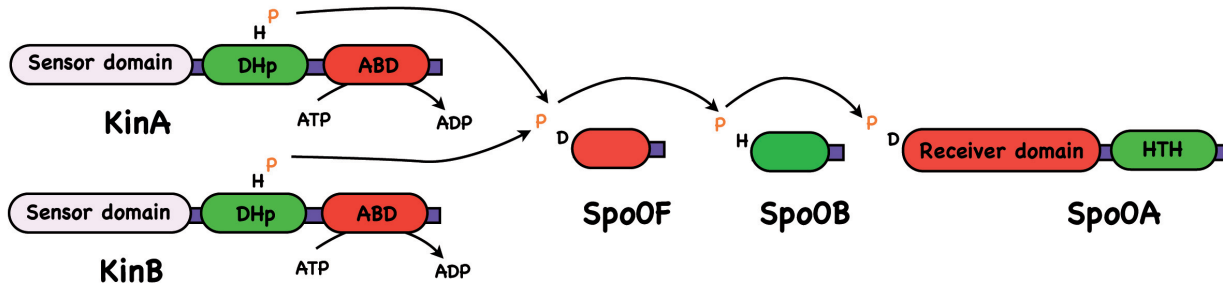
### Osmoregulación en *Escherichia coli*



### Quimiotaxis en *Escherichia coli*



### Esporulación en *Bacillus subtilis*



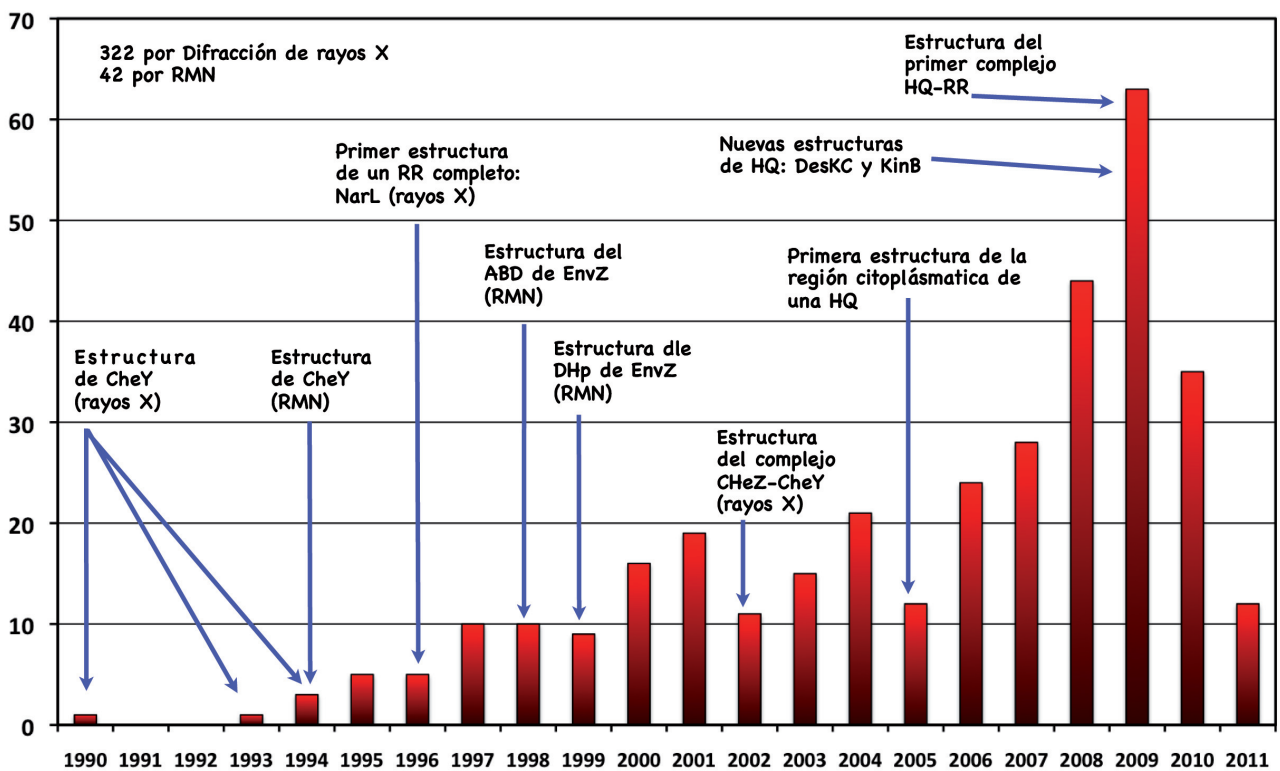
**Figura 3: Ejemplos de diferentes modos de organización de vías.** SDC prototípico (osmoregulación de *E. coli*), divergente (quimiotaxis de *E. coli*) o convergente (esporulación en *B. subtilis*). Con flechas se describen las transferencias de fosfatos entre diferentes elementos de las vías, que pueden ser intra o intermoleculares.

inglés “*cross-talk*”) entre vías es infrecuente, asegurando la circulación apropiada de la información, donde estímulos específicos disparan respuestas determinadas. Bajo ciertas condiciones particulares se ha demostrado interferencia<sup>75</sup>, pudiendo representar incluso otro nivel de complejidad con proteínas específicas capaces de modificar la señal en otra vía<sup>76,77</sup>. ¿Qué determina que no exista interferencia? Los principales mecanismos que aseguran la fidelidad de la transmisión de la información están dados por la especificidad en la interacción HQ-RR<sup>78,79</sup> y la presencia de fosfatasas específicas o de las propias HQs, que en general también pueden catalizar esta reacción en ausencia del estímulo<sup>75</sup>.

### 3.2. Estudios estructurales en SDC

Muchos grupos de investigación han realizado grandes esfuerzos para acumular información estructural sobre los SDC. En 1989 se resolvió la primer estructura de una proteína involucrada en estas vías de señalización mediante difracción de rayos X. Esta proteína, CheY, es un RR con un único dominio

REC que participa en la vía de quimiotaxis de *Salmonella typhimurium*<sup>80</sup>. Unos años más tarde se reportó la estructura de CheY de *Escherichia coli* pero mediante RMN<sup>81,82</sup>. En 1998 el grupo de Inouye publicó la primer estructura de un dominio ABD por RMN<sup>63</sup> y en 1999 el DHp de la misma proteína<sup>64</sup>. En la figura 4 se puede observar cómo ha crecido el número de estructuras de proteínas vinculadas a SDCs hasta la fecha. Actualmente disponemos de información tridimensional para representantes de cada tipo de dominio conservados en HQs y RRs<sup>18</sup>. A pesar de todos estos esfuerzos, la información disponible es aún fragmentaria. En particular no disponemos todavía de modelos estructurales de HQs completas, sino sólo de dominios o regiones funcionales. En lo que hace a los RRs, si bien se han resuelto algunas estructuras completas, la mayoría corresponden a subdominios aislados.



**Figura 4: Evolución temporal del números de estructuras de proteínas de SDCs depositadas en la PDB.** La mayoría de las estructuras fueron obtenidas mediante difracción de rayos X. La información fue obtenida a partir de la PDB utilizando como palabras clave de búsqueda “histidine kinase” y “two-component system”. También se agregaron las estructuras pertenecientes a la superfamilia “CheY-like” de la PDB, filtrando las estructuras duplicadas.

### 3.2.1. Histidin-quinasas

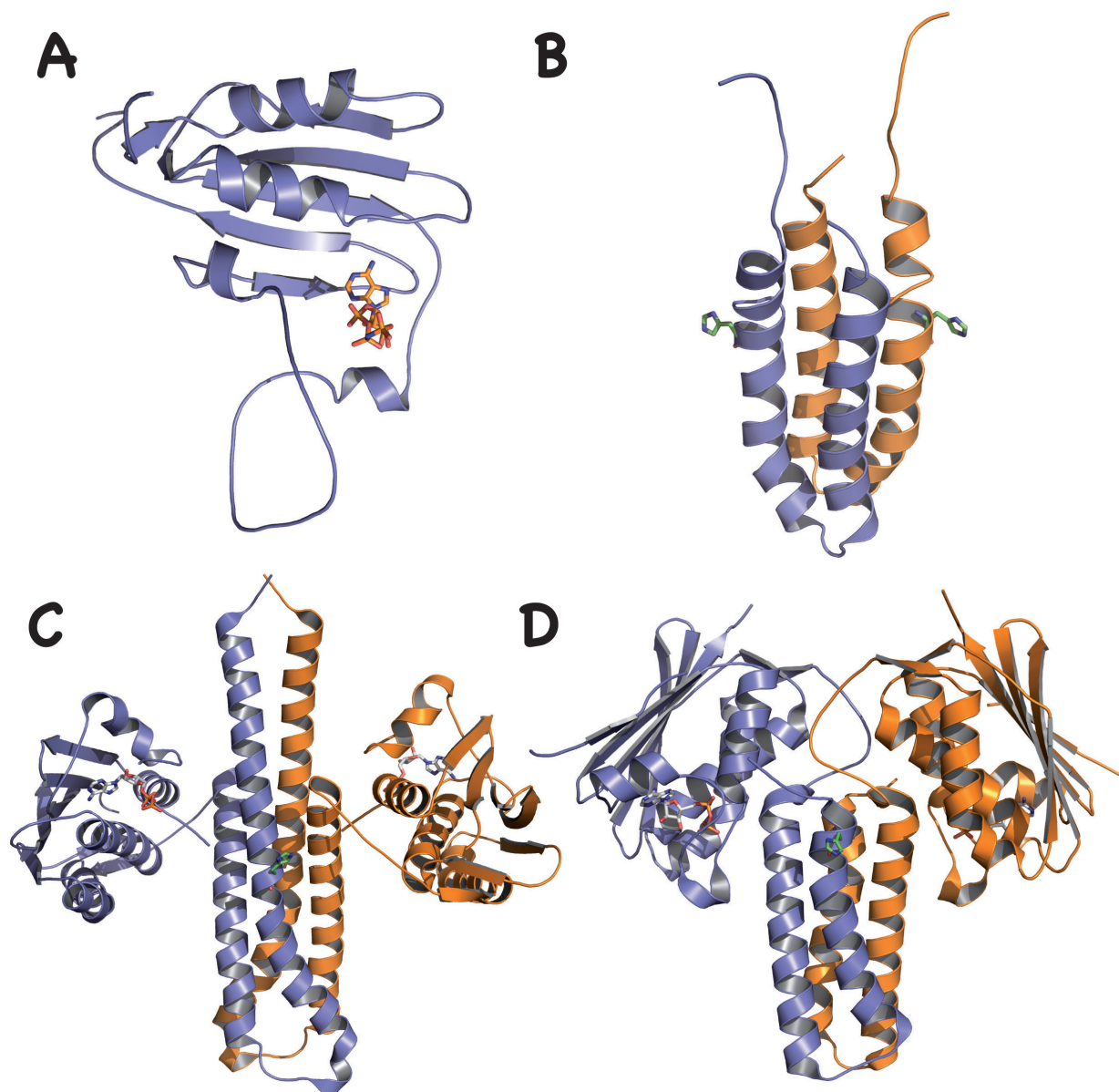
A continuación se realizará una breve revisión sobre la información estructural de las HQ, considerando por separado a la región citoplasmática y catalíticamente activa, la parte sensora de la proteína y, finalmente, los datos estructurales sobre las actividades autoquinasa, fosfatasa y fosfotransferasa

### 3.2.1.1 Estructura de la región citoplasmática de las quinasas de histidina

El análisis de las estructuras de dominios pertenecientes a EnvZ brindaron las primeras imágenes sobre estas enzimas<sup>63,64</sup> (figura 5). El dominio DHp está conformado por un haz de cuatro hélices  $\alpha$  empaquetadas entre sí por residuos hidrofóbicos. Este tipo de interacciones se denominan *coiled-coil*<sup>83</sup> ya que implican el empaquetamiento y superenrollamiento de hélices  $\alpha$  gracias a la presencia de residuos hidrofóbicos en posiciones específicas de la secuencia. Es un patrón de una secuencia repetitiva de 7 aminoácidos o héptadas, de acuerdo a la nomenclatura aceptada **(abcdefg)n**, con **n** igual al número variable de héptadas en cada *coiled-coil* particular<sup>84</sup>. Las posiciones hidrofóbicas especiales 1 y 4, son entonces generalmente identificadas como **a** y **d**. Hasta la fecha se han reportado estructuras formadas por 2, 3, 4, 5 y 7 hélices  $\alpha$ . El estado de oligomerización depende de las secuencias aminoácidas de las héptadas, siendo importantes las posiciones **e** y **g**<sup>84</sup>. Por otro lado, la estructura del ABD presenta una gran similitud estructural a los dominios catalíticos de ATPasas lentas de la superfamilia GHL<sup>64</sup>, cuyos miembros incluyen a la girasa GyrB, la chaperona Hsp90 y la proteína MutL.

En general, las HQs presentan 5 regiones conservadas que incluyen los motivos conservados de secuencia H (donde se ubica la histidina fosforilable), y N, G1, F y G2 que se ubican en el ABD<sup>18</sup>. El plegamiento de las HQs es muy diferente a lo que se observa en quinasas de Ser/Thr/Tyr. El ABD presenta un plegamiento sándwich  $\alpha/\beta$ , que consiste en 5 hebras  $\beta$  y tres hélices  $\alpha$  (figura 5A). El sitio de unión al ATP se construye mediante residuos conservados de los motivos N, G1, F y G2<sup>18</sup>. Posteriormente fueron resueltas varias estructuras de dominios ABD provenientes de otras HQs, revelando una conservación estructural muy importante, mientras que las diferencias más grandes residen en algunos bucles importantes<sup>63,85-88</sup>. Por ejemplo, entre los motivos F y G2 se forma un bucle flexible, denominado tapa del ATP ("*ATP lid*"), que en general adopta conformaciones más ordenadas cuando el nucleótido se une<sup>87</sup>. En el 2005 fue resuelta la primera estructura de la región citoplasmática entera de la HQ HK853 de *Thermotoga maritima*, incluyendo los dominios DHp y ABD<sup>89</sup> (figura 5C). Esta estructura, surge como resultado de una aproximación de genómica estructural, en virtud de lo cual no se dispone de información acerca de la señal detectada; sin embargo, contribuyó con información muy relevante. Resuelta a 1.9 Å de resolución en complejo con AMPPNP (análogo no hidrolizable del ATP), esta estructura muestra algunos aspectos a destacar (figura 5C): (1) los dominios DHp y ABD se encuentran interaccionados extensamente, con una superficie de 1250 Å<sup>2</sup>, en la que participan varios residuos hidrofóbicos conservados; (2) existe una distancia de aproximadamente 25 Å entre el fosfato  $\beta$  del ATP y la histidina fosforilable, indicando la necesidad de importantes cambios conformacionales durante el ciclo catalítico de estas enzimas; y (3) el dominio DHp, al igual que en EnvZ,

esta formado por un *coiled-coil* de 4 hélices  $\alpha$  entre las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de cada monómero, pero hacia el extremo N-terminal las  $\alpha 1$  se encuentran formando una interacción tipo *coiled-coil* de dos hélices  $\alpha$ , que como se verá más adelante juega un papel importante en la señalización. La superficie de homodimerización involucra  $2100 \text{ \AA}^2$ , de los cuales  $600 \text{ \AA}^2$  provienen del *coiled-coil* N-terminal. Generalmente se acepta que este tipo de estructuras *coiled-coil* son rígidas, aunque actualmente existen numerosas evidencias de que pueden ser flexibles<sup>90</sup>, asociado al hecho de que el patrón de héptadas frecuentemente no es ideal (canónico). La histidina fosforilable se encuentra completamente expuesta al solvente y dada la presencia de un sulfato presente en las cercanías, los autores proponen que la



**Figura 5: Estructuras de dominios o regiones funcionales de HQs.** A) Estructura del dominio de unión al ATP de la HQ EnvZ resuelta por RMN<sup>63</sup>. En barras (“sticks”) se representa la molécula de AMP-PNP. B) Estructura por RMN del dominio DHp de EnvZ, en barra se muestra la ubicación de las histidinas fosforilables. C y D) Estructuras cristalográficas de HK853<sup>89</sup> y KinB<sup>91</sup>, respectivamente. En azul y naranja se representan las dos cadenas de ambos homodímeros, mientras que en barras se muestran las moléculas de nucleótido y las histidinas fosforilables.

conformación de la proteína podría representar el estado fosfotransferasa en el ciclo catalítico de la enzima. Marina y colaboradores evaluaron funcionalmente la relevancia de la interacción DHP-ABD, observando que mutantes que rompen esta asociación presentan un aumento de la actividad de autofosforilación, mientras que la estabilización de la misma mediante entrecruzamiento (*cross-linking*) específico, introduciendo cisteínas en posiciones específicas, induce una pérdida de actividad<sup>89</sup>. Estos resultados funcionales y estructurales sugerían que los rearrreglos conformacionales son clave para poder catalizar la autofosforilación, aunque no dilucidaban aún los detalles de dichos rearrreglos. Más recientemente, durante la realización de esta tesis, se reportó la estructura 3D del complejo entre la HQ KinB de la vía de esporulación de *Geobacillus stearothermophilus* y una pequeña proteína inhibidora Sda, en presencia de ADP y Mg<sup>2+</sup>. La estructura de KinB revela una alta similitud estructural a HK853 al comparar cada uno de los dominios, pero la disposición de los ABD es diferente<sup>91</sup>. A pesar de estas diferencias, también se observa una asociación DHP-ABD importante y la distancia entre el ADP y la histidina fosforilable también es considerable, apuntando a que estos arreglos espaciales son conservados en las HQs.

Actualmente se carece de información estructural de otras familias de HQs, menos abundantes pero funcionalmente relevantes, como HSKA\_3, HSKA\_2 y HWE\_HK, así como de 5 de las 11 familias de los dominios ABD. La homología de HK853 y KinB con EnvZ y otras HQs estudiadas en detalle, sugieren mecanismos funcionales similares. Sin embargo, es muy importante señalar que las regiones catalíticas completas correspondientes a las dos proteínas cristalizadas hasta el momento, pertenecen a organismos hipertermófilos<sup>89,91</sup>. Parece ser relevante en este contexto obtener estructuras de HQs de organismos mesófilos, determinadas a partir de cristales obtenidos a temperaturas fisiológicas. Es probable que las mismas presenten mayor flexibilidad, explicando hasta cierto punto las dificultades para obtener estructuras de proteínas completas por cristalografía, pero revelando potencialmente información clave acerca de los mecanismos de transmisión y regulación alostérica, que podrían estar ligados a la plasticidad de la proteína.

Los grupos de Falke y Parkinson, han liderado la búsqueda de evidencias estructurales de estas proteínas flexibles mediante otras aproximaciones experimentales. Sustituyendo por cisteínas en posiciones específicas y evaluando la cinética de formación de disulfuros, se ha procurado obtener información estructural y dinámica de estas proteínas<sup>92-101</sup>. Estos trabajos se han realizado principalmente sobre la HQ atípica CheA de clase I y los quimiorreceptores<sup>85,102,103</sup>. Los resultados obtenidos han permitido sugerir movimientos importantes, interacciones y orientaciones específicas entre dominios de

CheA<sup>101</sup>, así como también proponer mecanismos de transducción de la señal<sup>104</sup>. Este mismo tipo de ensayos de entrecruzamiento (“*cross-linking*”) específico fue realizado para EnvZ por el grupo de Inouye con el objetivo de determinar cómo se asocian los dominios ABD y DHp para catalizar la reacción de autofosforilación<sup>55</sup>.

### 3.2.1.2 Estructura de dominios sensores de HQs

En general, las HQs presentan hacia el extremo N-terminal un dominio sensor, que en su mayoría son extracelulares o periplasmáticos. Existen también muchos ejemplos de dominios sensores citoplasmáticos o incluso inmersos de la membrana celular, así como también otras que carecen de estos dominios, en cuyo caso la detección de la señal es realizada por otra proteína acoplada. En los últimos años se han reportado varias estructuras correspondientes a estos dominios sensores separados del resto de la HQ<sup>40,105-114</sup>. Hasta la fecha no se dispone de ninguna estructura correspondiente a la región transmembranaria de estas enzimas. Las primeras estructuras resueltas fueron las regiones sensoras de DcuS<sup>110</sup> y CitA<sup>111</sup>, posteriormente fueron reportadas muchas otras, entre las que son de particular interés las estructuras de PhoQ<sup>105,113,114</sup>, LuxQP<sup>40,112</sup> y NarX<sup>106</sup>, ya que han permitido proponer mecanismos de cómo detectan la señal y la transducen al interior de la célula. El SDC PhoQ/PhoP se activa a baja concentración de cationes divalentes, pH ácido<sup>115</sup> o en respuesta a péptidos anti-microbianos<sup>23</sup>. Choi y colaboradores demostraron que en *Salmonella enterica* esta vía de señalización es capaz de sensar distintos estímulos induciendo respuestas diferentes<sup>115</sup>. PhoQ presenta un dominio sensor extracelular denominado PDC (PhoQ-DcuS-CitA, debido a que fueron las primeras estructuras resueltas y comparten el mismo plegamiento), que consiste en una hoja  $\beta$  antiparalela formada por 5 hebras, rodeada a ambos lados por hélices  $\alpha$ <sup>116</sup>. Otro caso interesante es el que involucra al receptor LuxPQ, compuesto por una proteína periplásmica LuxP y la HQ LuxQ. Este SDC está involucrado en la comunicación entre bacterias, permitiendo detectar los niveles de densidad celular, o detección de quórum, ya que reconoce pequeñas moléculas generadas por las mismas células (por ejemplo AI-2 o “Autoinducer-2”). Neiditch y colaboradores resolvieron la estructura del complejo entre LuxP y la región periplasmática de LuxQ en presencia y ausencia de ligandos<sup>40,112</sup>, observando cambios conformacionales muy relevantes que podrían ser claves en la internalización de la señal. El dominio sensor de LuxQ presenta un plegamiento similar a PhoQ, pero con una inserción de un segundo dominio PDC entre las dos primeras hélices  $\alpha$ <sup>112</sup>, algo bastante frecuente<sup>116</sup>. Por otro lado, NarX es una HQ de la familia de las HisKA\_3 que participa del SDC NarX-NarL, involucrado en el control de la respiración anaeróbica en presencia de nitrato o nitrito<sup>117</sup>. NarX de *E. coli* ha sido extensamente estudiada desde el punto de vista genético y bioquímico, y recientemente la estructura del dominio sensor peri-

plásmico fue resuelta en presencia y ausencia de nitrato<sup>106</sup>. Este dominio adopta una estructura con un haz de 4 hélices  $\alpha$ , similar a los quimiorreceptores Tar y Tsr<sup>106</sup>.

En relación a las HQs con dominios sensores en la región transmembrana, si bien no se disponen de estructuras es posible inferir aspectos estructurales y mecánicos considerando el complejo transductor rodopsina II de fototaxis (HtrII-SrII) de *Natronomonas pharaonis*<sup>118,119</sup>. Este complejo es miembro de un SDC y al igual que los quimiorreceptores, forma un complejo con la HQ CheA hacia el interior celular<sup>118</sup>. En función de la presencia del estímulo es capaz de modular la activación de CheA y, por ende, la vía de señalización. El transductor HtrII dimeriza en la región transmembranas formando una haz de 4 hélices  $\alpha$ , así como también establece un complejo con SRII, el receptor capaz de detectar la luz<sup>118</sup>.

Finalmente, existen HQs citoplasmáticas, asociadas extrínsecamente a la membrana como forma de anclaje o solubles. La mayoría de los dominios sensores de estas proteínas adoptan una estructura tipo PAS (por “*Per-Arnt-Sim* ó *Period circadian protein - Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein - Single-Minded protein*”, tres proteínas de señalización donde tempranamente se encontró este dominio sensor), que si bien también consiste en 5 hebras  $\beta$  antiparalelas rodeada por hélices  $\alpha$ , la topología difiere de los PDC. Otros dominios sensores que pueden estar presentes en HQs citosólicas son GAF o PHY, existiendo por lo menos una estructura representativa para cada dominio<sup>116</sup>. FixL, capaz de detectar oxígeno por la presencia de un grupo hemo<sup>120</sup>, y el sensor de luz LovK, capaz de detectar la luz azul<sup>121</sup>, son ejemplos de HQ citoplasmáticas bien estudiadas con dominios sensores de tipo PAS. En general, la mayoría de los dominios involucrados en detectar las señales se comportan como monómeros en solución, pero es bastante aceptado que las HQs son homodímeros y que la asociación entre estos dominios podría jugar un papel importante en la detección y transducción de la señal<sup>116</sup>.

### 3.2.1.3 Relación estructura:función en las HQs

#### 3.2.1.3.1 Autofosforilación

Mediante ensayos bioquímicos el grupo de Inouye demostró que en EnvZ la autofosforilación ocurre en el homodímero por un mecanismo en *trans*: el dominio catalítico de un monómero fosforila a la histidina del DHp del otro monómero, exclusivamente dentro del mismo dímero<sup>54,122</sup>. Este mecanismo fue confirmado luego en otras HQs como NtrB<sup>123</sup>, CheA<sup>124</sup> y AgrC<sup>125</sup>. Sin embargo, dadas las

estructuras tridimensionales de las regiones catalíticas citoplasmáticas enteras de distintas HQs<sup>89,91</sup>, no parecen existir restricciones estructurales para que el mecanismo fuera en *cis*. Recientemente este mecanismo alternativo fue de hecho demostrado para otras HQs, como HK853 y PhoR<sup>126</sup>, o bien ArcB<sup>127</sup>. El comportamiento mutuamente excluyente en relación al tipo de autofosforilación podría reflejar interacciones y configuraciones específicas entre las superficies de ambos dominios. Ensayos de autofosforilación empleando los dominios aislados DHp y ABD de EnvZ, demostraron la potencialidad de fosforilar la histidina, indicando una asociación específica entre estos dominios<sup>128</sup>. Otro aspecto interesante a resaltar es la observación de autofosforilación asimétrica en algunas HQs (como NtrB), en las que sólo una de las dos histidinas fosforilables presentes en el dímero es modificada<sup>129</sup>, sugiriendo cooperatividad negativa inducida por la primer fosforilación.

### 3.2.1.3.2 *Actividad fosfatasa*

La regulación funcional de muchas de las HQs implica cambios en la relación de las actividades autoquinasa/fosfatasa<sup>130</sup>. El flujo de información en los SDC puede ser controlada variando la autofosforilación de la HQ, la desfosforilación del RR fosforilado, catalizado por la HQ o regulando la fosfotransferencia entre ambas proteínas. Hasta la fecha no se han encontrado evidencias de que esta última represente un mecanismo utilizado en la naturaleza, sin embargo, sí existen ejemplos claros para las otras dos actividades. EnvZ regula la autofosforilación en función de la presencia del estímulo, mientras que CpxA regula la desfosforilación de CpxR-P<sup>130</sup>. En el caso de EnvZ se demostró que el centro reaccional de fosfatasa reside en su dominio DHp, aunque es más eficiente en presencia del dominio ABD. Este efecto es incluso más notorio en presencia de ADP, ATP o algún derivado no hidrolizable del ATP<sup>65,66</sup>. Estos resultados sugieren que estas pequeñas moléculas se unen al ABD y favorecen una conformación del DHp donde la actividad fosfatasa es mayor. La histidina fosforilable no parece ser esencial para catalizar la desfosforilación del RR<sup>131-134</sup>, sugiriendo no estar ocurriendo por un mecanismo inverso a la fosfotransferencia. La acción de fosfatasas específicas como CheZ, no depende de una histidina en la misma posición, es la presencia de residuos de Gln o His en una posición cercana, lo que parece jugar un rol clave para posicionar una molécula de agua y permitir el ataque nucleofílico al fosfato<sup>130,135</sup>. En línea con esto, recientemente se han identificado algunos residuos que parecerían ser clave en la actividad fosfatasa de las HQs, incluyendo en algunos casos una Gln en el DHp<sup>135</sup>, u otros residuos también en el ABD<sup>56,57,65</sup>. Varios trabajos han sugerido que la actividad fosfatasa de EnvZ no es relevante *in vivo* para apagar la vía, sino más bien para evitar la interferencia con otros SDC<sup>130,136</sup>, sugiriendo una función vital para la correcta transmisión de la señal.

Previamente fue mencionado que algunos SDC tienen además fosfatasa específicas. Hasta la fecha se conocen 4 familias de estas proteínas: CheZ, CheC/CheX/FliY, Spo0E y Rap<sup>45</sup>. Algunas de estas proteínas han sido bien caracterizadas tanto bioquímica como estructuralmente<sup>137-140</sup>. Por ejemplo, CheZ participa de la vía que regula la quimiotaxis en *E.coli*, desfosforilando a CheY. La estructura del complejo CheZ-CheY de *E.coli* fue resuelta en presencia de Mg<sup>+2</sup> y [BeF<sub>3</sub>]<sup>-</sup> a 2.9Å de resolución<sup>139</sup>. CheZ es un homodímero que forma una haz de 4 hélices  $\alpha$  similar a los DHP de las HQs. La interacción de CheY a este dominio de dimerización es análogo a lo observado en el complejo Spo0B-Spo0F<sup>139</sup>. Por otro lado, CheZ presenta un segundo sitio de interacción mediante una hélice  $\alpha$ , que aparentemente tendría un papel importante en determinar la selectividad hacia CheY en estado fosforilado. El mecanismo de desfosforilación involucrarían a la Gln<sub>147</sub> de CheZ, que se inserta en el sitio activo de CheY, participando de la coordinación del Mg<sup>+2</sup> e interaccionando con el [BeF<sub>3</sub>]<sup>-</sup>. El mutante CheZ Q147A, si bien es capaz de formar un complejo con CheY, presenta una actividad fosfatasa despreciable<sup>139</sup>. Ngoc Huynh y colaboradores han sugerido que las HQs presentan en una posición equivalente del DHP un residuo de Gln, Thr o Asn, indicando que el mecanismo de defosforilación podría estar conservado<sup>135</sup>. Muy recientemente se resolvió la estructura del complejo entre la fosfatasa CheX de *Borrelia burgdorferi* en complejo con su sustrato CheY3 a 1.96Å de resolución<sup>137</sup>. En este caso, si bien CheX se comporta como un dímero en solución, al formar el complejo actúa como monómero. En comparación con el complejo CheZ-CheY, el modo de interacción es completamente diferente, sin embargo el mecanismo parecería ser el mismo. Los residuos conservados Glu<sub>96</sub> y Asn<sub>99</sub> son clave en la interacción con el Mg<sup>+2</sup> y el [BeF<sub>3</sub>]<sup>-</sup>. La Asn<sub>99</sub>, junto con la Thr<sub>81</sub>, estarían encargados de alinear una molécula de agua, la cual es posible observar en la estructura a una distancia de 3.4 Å del Be<sup>137</sup>. Finalmente, Parashar y colaboradores reportaron este año la estructura del complejo entre RapH y Spo0F<sup>140</sup>, observando que si bien los mecanismos de defosforilación parecen ser conservados entre las distintas fosfatasas, la interacción entre las proteínas presenta algunas diferencias importantes.

### 3.2.1.3.3 *Actividad fosfotransferasa*

Hasta el momento los detalles estructurales de esta reacción, dado que no se han resuelto estructuras del complejo entre una HQ fosforilada y su RR, provienen del análisis de complejos relacionados y ensayos funcionales. La especificidad de la fosfotransferencia es clave para la correcta transmisión de la señal, y existen regiones específicas que la determinan. Una de las metodologías que han aportado valiosa información acerca de las superficies de interacción es el análisis de covarianza de la conservación entre posiciones de cada una de las proteínas<sup>78,79,141-143</sup>, denominada de información mutua (IM). Por IM se busca identificar residuos importantes en la interacción entre proteínas que no presen-

tan una gran conservación, definiendo las regiones variables que confieren especificidad en los complejos. Los resultados obtenidos por los distintos grupos sugieren una superficie de interacción que involucra a residuos ubicados hacia el C-terminal de la histidina fosforilable. Alrededor de esta histidina hay una serie de posiciones muy conservadas, probablemente reflejando su participación en las reacciones de transferencia de fosfatos o en las interacciones entre las proteínas, pero no definiendo la especificidad<sup>79</sup>. La información de covarianza ha sido utilizada por el grupo de Laub para demostrar que las vías de señalización pueden ser re-cableadas, modificando las especificidades entre las HQ y RR, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>78,79</sup>. Así, con sólo 3 mutaciones específicas en el DHp de EnvZ es posible modificar la especificidad hacia RstA<sup>79</sup>. El mismo grupo extendió este trabajo modificando la especificidad de las vías buscando posiciones que actúen como elementos positivos o negativos en la interacción, o sea contactos que promueven la interacción con el RR natural y otros que evitan la asociación con proteínas de otras vías, respectivamente<sup>78</sup>. Por otro lado, Bell y colaboradores reportaron la estructura entre el dominio HPt (P1) de CheA<sub>3</sub> y CheY<sub>6</sub> de *Rhodobacter sphaeroides*<sup>144</sup>. Esta estructura aportó información suficiente como para re-cablear las vías de señalización de quimiotaxis de esta bacteria. Como se verá más adelante al analizar las estructuras 3D de complejos, existen otras superficies adicionales poco conservadas que podrían participar también en la determinación de la especificidad.

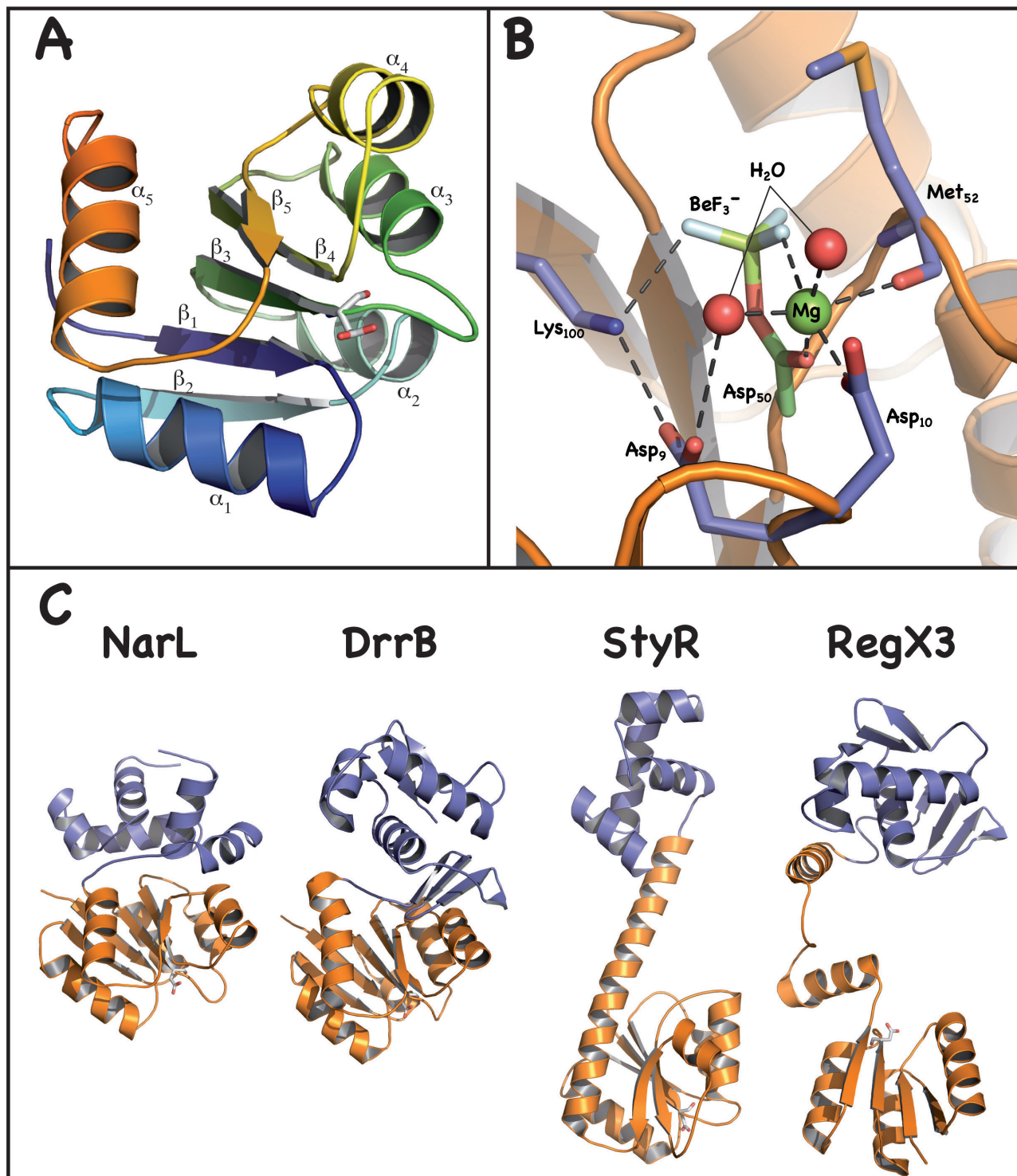
### 3.2.2. Reguladores de respuesta

Los RRs presentan generalmente un dominio REC en su extremo N-terminal y hacia el C-terminal se han descrito más de 60 dominios funcionales diferentes<sup>145</sup>. La mayor parte de los RRs presentan dominios C-terminales de unión al ADN. Dado que existen algunas diferencias importantes entre estos dominios se han clasificado en subfamilias de acuerdo a su similitud: las 3 subfamilias más numerosas son FixJ/NarL, OmpR/PhoB, NtrC/DctD.

La principal función del REC es actuar como un interruptor dependiente de la fosforilación, controlando la funcionalidad del dominio C-terminal adjunto o del propio REC cuando el RR es monodominio. Los dominios REC presentan una topología  $(\beta\alpha)_5$ , alternando una hebra  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  en la secuencia primaria. A nivel tridimensional se forma así una hoja  $\beta$  de 5 hebras rodeada de 2 hélices  $\alpha$  de un lado y 3 del otro (figuras 6A). Si bien la gran mayoría presenta este plegamiento, existen algunas variaciones, como por ejemplo DosR de *Mycobacterium tuberculosis* con una topología  $(\beta\alpha)_4$ <sup>146</sup>.

El dominio REC acomoda 4 residuos muy conservados en la cercanía del Asp fosforilable. Un residuo

de Lys forma un puente salino con el grupo fosfato y una treonina o serina interacciona mediante un puente de H con un átomo de O del mismo grupo. Mientras que 3 aspárticos, incluido el fosforilable, están involucrados en la coordinación del ión metálico divalente, en general magnesio, uno de ellos



**Figura 6:** A) Estructura del dominio REC de CheY (PDB 3CHY). La estructura presenta un gradiente de color del azul al rojo (N-terminal a C-terminal, respectivamente) con el objetivo de aclarar la topología. B) Primer plano del sitio de fosforilación del Asp<sub>50</sub> de DrrB (PDB 3NNS) en complejo con Mg<sup>2+</sup> y [BeF<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, mostrando la esfera de coordinación del catión. Las moléculas de agua están C) Estructuras de RRs en las conformaciones inactivas (NarL y DrrB) y activas (StyR y RegX3). En naranja se representan los dominios REC, mientras que en azul se muestran los dominios HTH. En barras se indican los Asp fosforilables. La comparación entre ambos pares, permite observar el cambio en la orientación relativa entre los dominios, producto de la fosforilación del Asp.

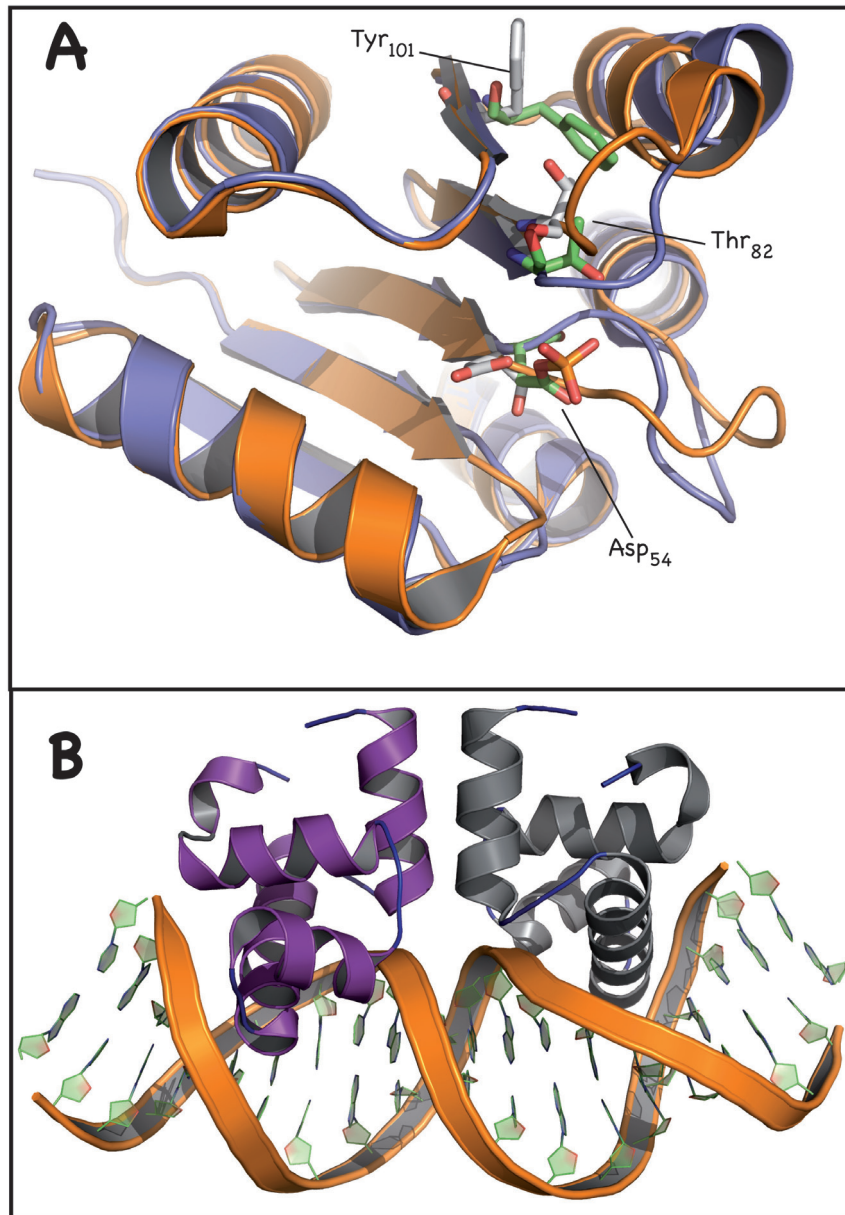
actuando a través de una molécula de agua (figura 6B). La interacción con un catión divalente es esencial para que ocurra cualquiera de las reacciones de modificación: fosfotransferencia (a partir de la fosfo-histidina río arriba), fosforilación (con pequeñas moléculas dadoras de fosfato, tales como el acetil-fosfato) y desfosforilación<sup>145</sup>. El  $Mg^{+2}$  es coordinado por 6 átomos, 2 posiciones están ocupadas por los Asp conservados, mientras que las demás están ocupadas por un carbonilo de la cadena principal, el fosfato y 2 moléculas de agua. La afinidad de interacción del metal no ha sido estudiada en detalle. En CheY se determinó una  $K_D$  de 0.5-1 mM, y dado que la concentración de  $Mg^{+2}$  libre en el citoplasma de *E. coli* es del mismo orden, probablemente no todas las moléculas de RR están activas *in vivo*<sup>145</sup>. Por otro lado, esta afinidad podría aumentar debido a interacciones adicionales que se generan al formarse el fosfo-aspartato, aunque hasta la fecha esto no ha sido estudiado. También es importante destacar que se disponen de pocas estructuras completas de RRs con más de un dominio, y en su mayoría se encuentran en el estado inactivo (figura 6): NarL<sup>147,148</sup> de *E. coli*, DrrB<sup>149</sup> y DrrD<sup>150</sup> de *T. maritima*, DosR<sup>146</sup>, PrrA<sup>151</sup> y MtrA<sup>152</sup> de *M. tuberculosis*. Más recientemente, se resolvieron estructuras en estados aparentemente activados: RegX3<sup>153</sup> de *M. tuberculosis* y StyR<sup>154</sup> de *Pseudomonas fluorescens*, reflejando algunos aspectos estructurales interesantes de la regulación por fosforilación.

¿Cuál es el mecanismo alostérico que permite a los RRs modificar su función dependiendo de su estado de fosforilación? A pesar del intenso trabajo que se ha realizado para entender este proceso, el mecanismo no es del todo claro. Actualmente se han resuelto más de 200 estructuras del dominio REC, tanto en el estado nativo como en el activado (por fosforilación en muy pocos casos, en su mayoría utilizando  $[BeF_3]^-$ ). El  $[BeF_3]^-$  se une no covalentemente al Asp del RR y, en general, induce la activación de la proteína, funcionando como un mimético del grupo fosfato<sup>155</sup>. De los análisis estructurales se ha podido sugerir algunas alteraciones comunes, que serían clave en la activación de la proteína<sup>156</sup>. El fosfato participa de la coordinación del catión e interacciona con una Thr/Ser y una Lys conservadas. El cambio más importante ocurre en el bucle entre la hebra  $\beta_4$  y la hélice  $\alpha_4$ , donde se encuentra esta misma Thr/Ser, provocando la estabilización de un rotámero de una Phe/Tyr presente en la hebra  $\beta_5$  (figura 7A). La mayoría de los RRs estudiados han mostrado que los cambios conformacionales más importantes entre el estado inactivo y activo ocurren en la cara  $\alpha_4\beta_5\alpha_5$  y esto es utilizado como salida de la señal, por ejemplo modulando la homodimerización de los RRs<sup>156</sup>. Esta dimerización sería clave ya que aproximadamente el 50% de los RRs presenta un único dominio de unión al ADN y reconocen operadores con dos o más elementos repetidos en tándem o invertidos<sup>52</sup>. Las estructuras de los dominios REC en el estado activo han mostrado que la forma más abundante de dimerización regulada por fosforilación sería utilizando la cara  $\alpha_4\beta_5\alpha_5$ . Pero también se han observado otros ti-

pos de asociación, que involucran a las regiones  $\beta 5\alpha 5$ ,  $\alpha 4\beta 5$  o  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  pero de forma antiparalela. Recientemente, el grupo de Ann Stock reportó que PhoB es capaz de adoptar dos dímeros diferentes dependiendo si es cristalizada en presencia de  $[\text{BeF}_3]^-$  y  $\text{Mg}^{+2}$  o ausencia de aditivos:  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  y  $\alpha 1\alpha 5$ , respectivamente<sup>157</sup>. La dimerización a través de la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  parece ser esencial para actuar como factor de transcripción. Por el contrario, la región  $\alpha 1\alpha 5$  participa de una dimerización en el estado desfosforilado, y aunque su función es aún desconocida, los autores proponen que podría tener un papel de auto-inhibición<sup>157</sup>. La primer estructura de un RR entero con más de un dominio fue la correspondiente a NarL, que participa del SDC NarX-NarL, extensamente estudiado<sup>147,148</sup>. Esta proteína presenta un dominio REC característico y hacia el extremo C-terminal un dominio HTH de unión al ADN (figura 6C). La estructura de la proteína en el estado nativo revela una conformación cerrada, donde ambos dominios se asocian a través de una extensa superficie, formada principalmente por varios enlaces de H, algunos puentes salinos y una serie de interacciones hidrofóbicas. Esta característica parecería ser común a la mayoría de los RR, ya que es compartida, en mayor o menor medida, por DrrB<sup>149</sup>, DrrD<sup>150</sup>, PrrA<sup>151</sup> y MtrA<sup>152</sup>. Por otro lado, el grupo de Dahlquist, mediante RMN realizó un análisis de la interacción entre el dominio REC y el HTH de NarL en el estado nativo y fosforilado<sup>158</sup>. En este trabajo se demuestra que la interacción entre ambos dominios es dependiente de la fosforilación y cuando la proteína es activada se produce la liberación del dominio HTH, permitiendo la interacción con el ADN<sup>158</sup>. Estos resultados fueron luego apoyados por las estructuras del HTH de NarL en complejo con oligonucleótidos del promotor de *nirB*<sup>159</sup> (figura 7B) y *narG*<sup>160</sup>, ya que la superficie de unión al ADN está ocluida en la estructura inactiva por la interacción con el REC<sup>147,148</sup>. Este mecanismo autoinhibitorio parecería ser compartido por muchos RRs e impondría una barrera energética a la activación de estas proteínas<sup>161</sup>. Por el contrario, en las estructuras resueltas de RegX3 y StyR es posible observar que ambos dominios están ligados únicamente por la cadena principal y los dominios REC presentarían características del estado activado. ¿Qué tan generales son estos mecanismos alostéricos propuestos? Los rearrreglos estructurales del dominio REC disparados por la fosforilación, parecerían ser similares en la mayoría de los RRs, aunque provocando distintos efectos de salida (*'output'*), en particular no siempre induce un cambio en la oligomerización. CheY es un buen ejemplo: presenta sólo un dominio REC y la fosforilación provoca cambios conformacionales en la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  que no conducen a su dimerización si no que permiten modular su interacción con FliM (río abajo)<sup>162</sup>. Otro caso bastante estudiado es el RR NtrC, que activa la transcripción en función de cambios ambientales. El mecanismo alostérico de activación de esta proteína ha sido muy estudiada mediante diversas metodologías<sup>5,163-166</sup>. Esta proteína esta compuesta por un REC N-terminal, un dominio central con actividad ATPasa y uno de unión al ADN C-terminal. En los trabajos reportados

por el grupo de Kern, se demuestra que la fosforilación actúa estabilizando una pequeña población pre-existente de proteínas en el estado activo, más que desestabilizando el estado inactivo<sup>166</sup>.

La desfosforilación de los RRs involucra el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el fosfato. Esta reacción es clave para terminar la señal de la vía y puede ocurrir en forma espontánea o catalizada por una fosfatasa específica. Es interesante resaltar que la vida media de los RRs fosforilados puede ser de unos pocos segundos a algunas horas, y aparentemente estaría relacionado no sólo



**Figura 7:** A) Comparación entre estado inactivo (naranja y barras en blanco) y activo (azul y barras en verde) del dominio REC de FixJ. Los residuos Asp<sub>54</sub>, Thr<sub>82</sub> y Phe<sub>101</sub>, que presentan cambios conformacionales importantes, están identificados con barras. C) Estructura del dominio HTH de NarL en complejo con el promotor *nirB*<sup>159</sup>. En violeta y gris se identifican los dos dominios de cada monómero, que median la interacción con el ADN.

con la adaptación a ambientes extremos como en los RR de organismos termófilos, sino también con los procesos biológicos que estén controlando<sup>145</sup>. Dos trabajos recientes han mostrado que algunas posiciones clave en las cercanías del Asp fosforilable son importantes para definir la vida media del fosfato<sup>42,167</sup>. Las actividad fosfatasa de las HQ o de fosfatasas específicas aparentemente funcionarían estimulando la actividad intrínseca de los RR<sup>137,139</sup>.

### 3.2.3. Proteínas de “phosphorelays”

Las proteínas de *phosphorelays* son intermediarios en las vías de señalización y permiten incorporar puntos adicionales de regulación. Como se comentó previamente, Spo0B y Spo0F son sólo mediadores de la transferencia de fosfatos hacia el RR Spo0A en la vía de regulación de la esporulación de *B. subtilis*. La estructura de ambas proteínas fueron resueltas por cristalografía de proteínas<sup>68,69,168</sup>, mientras que Spo0F fue además estudiada por RMN<sup>164,169</sup>. Posteriormente el grupo de Varughese resolvió el complejo Spo0B-Spo0F mediante difracción de rayos X en ausencia<sup>170</sup> y presencia de  $[\text{BeF}_3]^-$ <sup>171</sup>. Spo0F es una proteína compuesta por un único dominio REC, mientras que Spo0B es un homodímero con una homología estructural importante con las HQ. El dominio de dimerización forma un haz de 4 hélices  $\alpha$ , donde se ubica la histidina fosforilable, y un dominio C-terminal reminiscente de un ABD. Sin embargo, Spo0B de *B. subtilis* no es capaz de unir ATP ni autofosforilarse y su función es transferir los fosfatos desde Spo0F a Spo0A. Este complejo ha representado un modelo estructural de interacción entre HQ y RR durante varios años<sup>79,142</sup>.

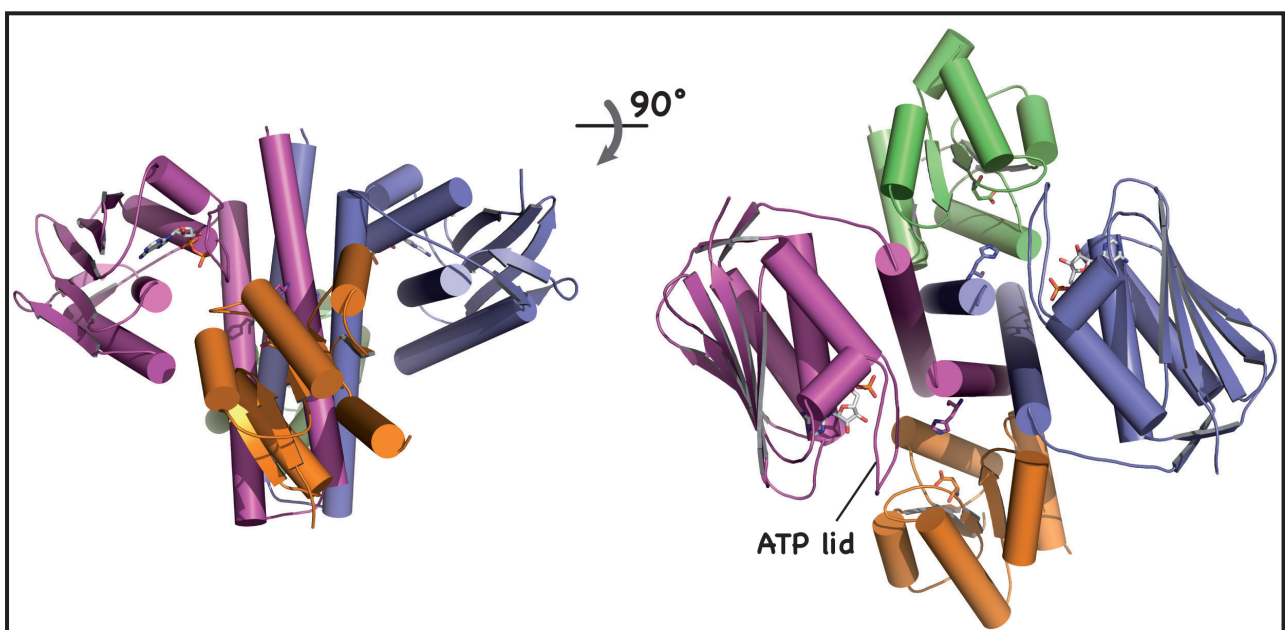
### 3.2.4. Complejos HQ-RR

Uno de los eventos cruciales en la señalización de un SDC es cuando se forma el complejo entre la HQ y el RR. La especificidad de interacción es crítica para asegurar una respuesta específica a un estímulo determinado. Los primeros resultados que aportaron información estructural acerca de esta interacción derivaron de la estructura del complejo Spo0B-Spo0F de *B. subtilis* que se acaba de mencionar<sup>170,171</sup>. Posteriormente, el grupo de Ann West resolvió la estructura de otro complejo de proteínas de fosfotransferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, YPD1-SLN1-R1<sup>172,173</sup>, que participa de la osmoregulación. SLN1 es una HQ híbrida y YPD1 presenta un dominio HPt. Este complejo se resolvió en dos formas cristalinas diferentes, y en presencia o ausencia de  $[\text{BeF}_3]^-$  y  $\text{Mg}^{+2}$ <sup>172,173</sup>. El complejo Spo0B-Spo0F es simétrico, formado por un homodímero de Spo0B unido a dos moléculas de Spo0F<sup>170</sup>. Por el contrario, en el caso de YPD1-SLN1-R1, YPD1 es un monómero que presenta en su estructura un haz de 4 hélices  $\alpha$  y se asocia a una molécula de SLN1-R1<sup>172</sup>. Es interesante recordar

que tanto Spo0B como YPD1 son capaces de interactuar y participar en la transferencia de fosfatos con dos proteínas diferentes. En el caso de Spo0B, recibe los fosfatos de Spo0F río arriba de la vía de señalización, para luego transferirlo a su vez a Spo0A<sup>67</sup>. La identidad de secuencia entre ambas proteínas es de solo 27%, mientras que considerando únicamente los residuos involucrados en la interacción es de 55%; sin embargo, la mayoría de los contactos más importantes están preservados<sup>170</sup>. La superficie de interacción está conformada por dos regiones, una más central hidrofóbica muy conservada en los RR, y una segunda región variable que probablemente sea determinante para definir la especificidad de esta asociación<sup>170</sup>. La comparación entre ambos complejos refleja que el modo de interacción es equivalente y la distancia entre el Nε de la histidina de YPD1 y Oδ del Asp de SLN1 es de 4.8Å, similar a lo observado para el complejo Spo0B-Spo0F.

Más recientemente, fueron resueltos por cristalografía de proteínas dos complejos entre las regiones citoplasmáticas de una HQ y su RR: HK853-RR468<sup>126,174</sup> y ThkA-TrrA<sup>175</sup>, ambos de *T. maritima*. Las superficies de interacción de estas estructuras concuerdan con los análisis de IM llevados a cabo por varios grupos de investigación<sup>78,79,141-143</sup>. El complejo HK853<sub>CP</sub>-RR468 es la única estructura resuelta a alta resolución (2.8Å) de la región citoplasmática de una HQ y su RR<sup>126</sup>. La unidad asimétrica del cristal está formada por un dímero de HK853<sub>CP</sub> unido a dos moléculas de RR468, formando un complejo con una simetría de orden 2 (figura 8). RR468 está interactuando no covalentemente con un sulfato en la posición que ocuparía el fosfato, y esta proteína estaría en la conformación activa, fosforilada<sup>126</sup>. La superficie de interacción más grande, de aproximadamente 885 Å<sup>2</sup>, involucra a la región inferior del DHp, hacia el C-terminal de la histidina fosforilable. Esta superficie involucra a la hélice α1 y el bucle entre la hebra β5 y la hélice α5 del RR<sup>126</sup>, datos que concuerdan perfectamente con los predichos mediante IM (análisis de covarianza). Sin embargo, también es posible observar dos regiones más pequeñas de contacto, donde participan el dominio ABD y el *bucle* que conecta los dominios DHp-ABD, aumentando la superficie total de contacto a aproximadamente 1170Å<sup>2</sup>. Los autores proponen que este complejo corresponde al estado funcional de desfosforilación del RR. Ensayos para validar experimentalmente esta estructura sugieren que esta superficie participaría tanto en la reacción de fosfotransferencia como de defosforilación<sup>126</sup>. Por otro lado, existen algunas diferencias entre las estructuras de HK853<sub>CP</sub> en complejo<sup>126</sup> y aislada<sup>89</sup>, principalmente en la estructuración de un *coiled-coil* en el extremo N-terminal y cambios en la orientación de los dominios ABD. En las dos estructuras el ABD está formando una superficie de interacción bastante importante con el DHp, pero la disposición del mismo es diferente. Estos resultados pueden reflejar variaciones conformacionales que corresponden a distintos estados funcionales de la proteína, como luego se discutirá.

Más recientemente, Yamada y colaboradores resolvieron la estructura a baja resolución (3.8Å) del complejo ThkA-TrrA<sup>175</sup>. En esta estructura, la organización general es similar a la resuelta por Casino y colaboradores, pero hay algunas diferencias interesantes. Por ejemplo, la HQ presenta además de los dominios DHp y ABD, un dominio PAS hacia el N-terminal, bastante común dentro de la familia HSKA de HQ. A pesar de la baja resolución, se puede visualizar el dominio PAS interaccionando con el ABD, y la superficie de contacto con el RR esta formada por los 3 dominios de la HQ presentes en la estructura<sup>175</sup>. Estos resultados, en combinación con lo anteriormente mencionado, sugieren que estas interacciones ocurre a través de una superficie de contacto compartida por la mayoría de los complejos HQ-RR, que se forma por contacto entre el DHp y el RR, mientras que el resto de las interacciones son muy diferentes y probablemente contribuyan a conferir la especificidad.

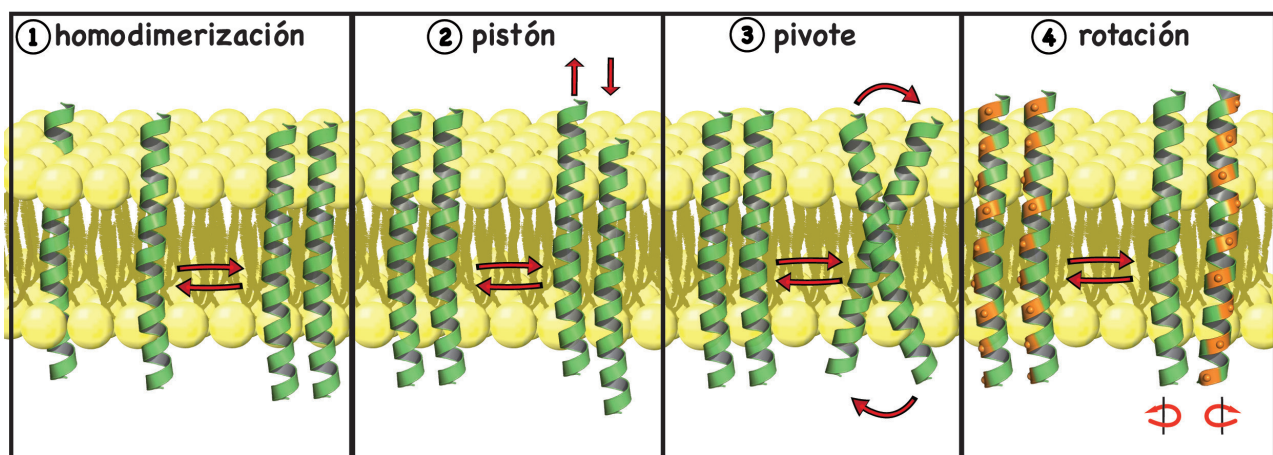


**Figura 8: Estructura del complejo entre HK853-RR468<sup>126</sup>.** En magenta y azul se representan las dos cadenas del homodímero de HK853, mientras que en naranja y verde se muestra las moléculas de RR468. Las hélices  $\alpha$  están representadas como cilindros y en barras se señalan residuos fosforilables y las moléculas de ADNP (análogo del ADP). En la imagen se puede observar que la interacción del RR468 con HK853 involucra a dos superficies en el dominio DHp y una en el ABD (principalmente el *ATP lid*). Además es posible visualizar una extensa asociación entre el DHp y ABD en la HK853.

### 3.3. Mecanismos de transducción de señales en SDC

Los mecanismos moleculares que permiten a las proteínas detectar señales del entorno y transducirlas hacia el interior celular son de enorme interés dadas su relevancia biológica y su evidente utilidad en potenciales estrategias de intervención. La mayoría de las señales son internalizadas mediante la acción de proteínas de membrana, que presentan una o más hélices  $\alpha$  transmembrana<sup>176,177</sup>. Los mecanismos de transducción no son aún bien conocidos al nivel molecular y atómico, y sólo en unos

pocos casos se han podido determinar con precisión. Teniendo en cuenta que las hélices  $\alpha$  transmembrana son elementos centrales de las proteínas transductoras de señales, es posible imaginar distintos movimientos que expliquen el modo de transducir el estímulo extracelular (figura 9): cambios en la oligomerización (implicando un movimiento traslacional), arreglos de tipo pistón en las hélices (traslación vertical relativa entre las hélices), de pivote (rotación de acuerdo a un eje paralelo al plano de la membrana) o de rotación (de acuerdo a un eje perpendicular al plano de la membrana)<sup>176</sup>. Por ejemplo, la mayoría de los receptores de tipo tirosin-quinasa, como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), que presentan un solo segmento transmembrana, la interacción del ligando no provoca una transmisión directa hacia el citoplasma por cambios conformacionales, sino que involucra cambios en la oligomerización de la proteína<sup>177</sup>. Otros receptores, como los GPCRs (receptores acoplados a proteína G, como el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico y la rodopsina) han sido estudiados estructuralmente en distintos estados funcionales. En el caso del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico la unión del ligando en la región extracelular, provoca cambios sutiles en el sitio de unión, pero conduciendo a alteraciones conformacionales importantes en la región intracelular de las hélices  $\alpha$  transmembrana, transduciendo la señal<sup>178</sup>. Estas hélices transmembrana sufren movimientos de entre 2 y 11 Å, en combinación con pequeñas rotaciones en sentido horario.



**Figura 9: Movimientos propuestos para la internalización de las señales al interior celular.**

En SDC muchos grupos han dedicado un enorme esfuerzo para estudiar el o los mecanismos, sin embargo hasta la fecha es un punto de gran controversia. Se han construido varias quimeras funcionales de HQs sensoras, intercambiando exitosamente partes de unas y otras<sup>179-189</sup>, lo que sugiere que el mecanismo de transducción es compartido, al menos entre muchas HQs. Aún más, el mecanismo podría ser compartido incluso con los receptores de quimiotaxis, dadas las grandes similitudes estructurales. Resta de cualquier modo demostrar esta potencial universalidad mecánica, ya que todas las

quimeras reportadas presentan un dominio HAMP transmisor. ¿Este mecanismo será compartido en proteínas con otros dominios transmisores, como PAS, o incluso careciendo de uno? Hasta donde fue posible indagar, la única quimera diferente fue generada por Kwon y colaboradores, entre la región sensora y transmembrana de Tar y la porción citoplasmática de ArcB<sup>190</sup>. ArcB es una HQ híbrida, que altera su estado funcional de acuerdo a las condiciones redox de la célula y presenta hacia el interior celular un dominio PAS, el DHP de la familia HISKA, un HATPase\_c, un REC y un HtP, careciendo de dominio HAMP. Las quimeras retienen la capacidad de regular la actividad dependiendo de las condiciones de crecimiento (aeróbica/anaeróbica), sin embargo, los autores plantean que el uso de aspartato como ligando de los dominios Tar no funciona como inductor<sup>190</sup>.

El mecanismo de transducción por movimientos de tipo pistón fue propuesto en 1996 por Chervitz y Falke<sup>93</sup>. Estos autores se basaron en la comparación de las estructuras del dominio periplasmático de receptor Tar, en presencia y ausencia del ligando. El desplazamiento de la  $\alpha$ -hélice C-terminal sería de 1.6 Å y habría una inclinación de 5°<sup>93</sup>. Este movimiento fue también evaluado por Ottemann y colaboradores utilizando EPR, ya que incorporando cisteínas en posiciones específicas del receptor, permitió a los autores sugerir movimientos del mismo tipo de aproximadamente 1 Å<sup>191</sup>. Más recientemente se resolvieron 2 estructuras de dominios sensores periplasmáticos de las HQ, NarX<sup>106</sup> y TorS<sup>107</sup>. En el caso de NarX la estructura se resolvió en presencia y ausencia de nitrato, siendo posible observar un desplazamiento de 1 Å de la  $\alpha$ -hélice C-terminal hacia la membrana. Mientras que en el caso de TorS fueron resueltas las estructuras de dos proteínas de diferentes organismos. La comparación entre ellas permitió a los autores sugerir el mismo mecanismo pistón, ya que una de ellas representaría la forma activada<sup>107</sup>. Otra evidencia interesante del mecanismo de transmisión surge del trabajo realizada por Sevvana y colaboradores con el dominio sensor de CitA<sup>192</sup>, una HQ que altera su actividad en presencia o ausencia de citrato. En este caso, el movimiento sería en el sentido contrario al observado para NarX. Todos estos resultados estructurales son consistentes con estudios bioquímicos con mutantes que alteran la polaridad de residuos de la región transmembrana del receptor Tar<sup>193</sup>.

Un sistema bien caracterizado estructuralmente, previamente descrita, es el de fototaxis en *Natronomonas pharaonis*, donde fueron resueltas las estructuras del receptor sensor de rodopsina II en complejo con una proteína transductora en distintos estados funcionales<sup>118,119</sup>. El mecanismo propuesto supone una rotación de 15° en sentido horario e inclinación de la hélices  $\alpha$  que comunica con el interior celular, así como también un desplazamiento de 0.9 Å en el plano de la membrana<sup>119</sup>. El mecanismo de rotación de hélices  $\alpha$  también ha sido propuesto por otros autores en base a ensayos de ingeniería

de proteínas para diversas HQ<sup>185,187,190,194-196</sup>. Recientemente, Hulko y colaboradores resolvieron por primera vez la estructura de un dominio HAMP por RMN, un homodímero que adopta una estructura de 4 hélices  $\alpha$  empaquetadas<sup>197</sup>. La secuencia de estos dominios presenta una periodicidad de héptadas que predeciría la formación de una estructura tipo *coiled-coil*; sin embargo, los residuos hidrofóbicos se empaquetan de forma atípica, denominada *knobs-into-knobs*, a diferencia del empaquetamiento clásico *knobs-into-holes* propuesta inicialmente por Crick<sup>83</sup>. Hulko y colaboradores han propuesto que las dos formas de empaquetar los residuos hidrofóbicos son isoenergéticas, y la transición entre las mismas es posible mediante una rotación de 26° de las 4  $\alpha$ -hélices<sup>197</sup>. En el HAMP la energía de interconversión entre los dos estados sería baja gracias a la periodicidad de la secuencia que favorecería a la forma típica de interacción, mientras que la presencia de un residuo de Ala clave sería importante para el empaquetamiento *knobs-to-knobs*<sup>197,198</sup>. Este mecanismo también fue sugerido por otros autores al observar en los receptores Tar que es posible bloquear estados de señalización mediante *cross-linking* específico de los segmentos transmembrana<sup>195</sup>. Además, las estructuras del dominio periplasmático del receptor LuxPQ observaron que la unión del ligando (AI-2) induce un cambio conformacional y que afecta la asociación entre los 2 dominios del homodímero<sup>40,112</sup>. Esta transición provocaría una rotación de las hélices  $\alpha$  transmembrana, permitiendo que la señal se transmita hacia el interior celular. Recientemente, Goldberg et al. sugirieron que hay interacciones polares en los segmentos transmembranas de PhoQ que cumplirían un papel clave en la transmisión de la señal<sup>199</sup>, algo que parecería estar conservado en las HQ.

Actualmente, es aceptado que las proteínas alostéricas son capaces de adoptar distintas conformaciones en equilibrio, lo que equivale a sugerir la presencia de más de un mínimo en su paisaje energético (“energy landscape”), y estos pueden ser poblados diferencialmente de acuerdo a la presencia/ausencia de los estímulos correspondientes<sup>200</sup>. Estos conceptos implican la importancia de la plasticidad en las proteínas. ¿Qué mecanismos alostéricos están involucrados en modular las actividades de las HQs? Si bien cómo se transmite la señal desde el espacio periplasmático hacia el interior celular está todavía en discusión, los cambios conformacionales que modulan las actividades de las HQ también podrían aportar evidencias al respecto. Andrea Cochran en 1996 observó que es posible expresar receptores Tar solubles (región citoplasmática) capaces de activar a la HQ CheA, mediante la fusión hacia el N-terminal de la secuencia aminoacídica proveniente de GCN4. GCN4 es una proteína de tipo *leucine zipper* muy caracterizada, que forma un *coiled-coil* paralelo de 2  $\alpha$ -hélices. Posteriormente, Singh y colaboradores mediante el desarrollo de un nuevo algoritmo (LEARNCOIL) para detectar estructuras de tipo *coiled-coil* en las secuencias primarias, reveló que la mayoría de las HQ

presentan estos motivos, justo antes y parcialmente solapado con el dominio DHp<sup>201</sup>. Es importante señalar que estas secuencias generalmente no son identificadas por otros programas que permiten realizar búsquedas de *coiled-coil* canónicos, probablemente reflejando que la periodicidad en estas secuencias se alejan del ideal. Posteriormente, Anantharaman observó que estos motivos estructurales se encuentran presentes en muchas proteínas señalizadoras, observándose en proximidad a otros dominios, como PAS, HAMP, GAF, etc<sup>202</sup>. En los últimos años, varios trabajos han surgido que revelan la importancia de estas estructuras en la regulación funcional de las HQ<sup>185,187,196,202,203</sup>. Tao y colaboradores fueron los primeros en analizar funcionalmente la región *coiled-coil* que precede al DHp de SLN1, tanto por mutaciones puntuales o motivos que estabilizan esta región<sup>196</sup>. El grupo de Moffat recientemente reportó un estudio utilizando quimeras entre el dominio LOV de YtvA y la HQ FixL<sup>185</sup>. En este trabajo se propone que la señal se transmite desde el dominio LOV, mediante rotaciones de entre 40-60° de las  $\alpha$ -hélices, que permitiría modular la formación de la estructura *coiled-coil*, y por ende, generar cambios conformacionales a la altura de la histidina fosforilable<sup>185</sup>. Por otro lado, NarX presenta hacia el interior celular un dominio HAMP, un DHp de la familia HSKA\_3 y el ABD (HATPase\_c) y es de interés porque pertenece a otra familia. El análisis de la secuencia utilizando el algoritmo LEARNCOIL permite identificar dos regiones *coiled-coil*, una a continuación del dominio HAMP y otra justo antes del DHp. Stewart y colaboradores realizaron un interesante análisis del primer motivo e identificando un *stutter* en la periodicidad del mismo. La presencia de *stutters* o *stammers* (delecciones de 3 ó 4 residuos en la héptada, respectivamente) en los *coiled-coil*, provocan discontinuidades asociadas a variaciones en el superenrollamiento entre las  $\alpha$ -hélices<sup>204</sup>. El *stutter* presente en NarX es clave para la transmisión de la señal desde el dominio HAMP hacia la histidina fosforilable<sup>203</sup>. Evidencias estructurales de estos motivos *coiled-coil* previo al dominio DHp fueron obtenidas por Alberto Marina y colaboradores en la estructura de HK853<sup>89</sup>. Este motivo adiciona 600 Å<sup>2</sup> de superficie de dimerización en la proteína, y dado que presenta algunos residuos hidrofílicos en posiciones clave **a** y **d** de las héptadas<sup>89</sup>, es posible romper durante el ciclo catalítico de la enzima.

Entender los mecanismos moleculares que permiten a la bacteria comunicarse con su entorno es clave para poder generar no sólo nuevos antibióticos, sino diseñar nuevas bacterias modificadas que permitan diversos usos comerciales e industriales<sup>205</sup>. Existen algunos ejemplos recientes, donde se ha buscado generar circuitos lógicos de señalización en bacterias modificadas<sup>206-211</sup>, demostrando resultados iniciales de una disciplina incipiente llamada Biología Sintética. Un ejemplo ilustrativo de los beneficios de modificar células con fines industriales podría ser para la producción de compuestos farmacéuticos<sup>212,213</sup>. Los SDC representan interesantes mecanismos de señalización debido a la naturaleza

modular de sus proteínas y componentes, la gran diversidad de estímulos que pueden ser detectados y las respuestas que pueden generarse. Además, como fue mencionado, existen varios ejemplos de ingeniería de SDC con el objetivo de cambiar la señal de entrada generando quimeras<sup>179-189</sup>, así como también el re-cableado entre las vías<sup>78,79</sup>.

### 3.4. Sistema DesK-DesR: un termómetro molecular

Los organismos poiquilotermos, como las bacterias y las plantas, son muy sensibles a las variaciones repentinas en la temperatura del entorno<sup>214</sup>. Cuando la misma desciende, varios cambios vitales ocurren en las células, siendo los más importantes la disminución en la fluidez de las membranas y la estabilización de ciertas estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, provocando una mayor ineficiencia en los procesos de transcripción y traducción<sup>214</sup>. En la naturaleza varios termómetros biológicos han sido identificados, desde ARN<sup>215</sup>, proteínas capaces de detectar la fluidez de la membrana<sup>216</sup> y hasta complejos canales de membrana<sup>217</sup>. *Escherichia coli* modula la expresión de la proteína CspA frente al choque frío, que actúa como una chaperona de ARN, desestabilizando estructuras secundarias. El ARN mensajero que codifica para esta proteína funciona como un termosensor modulando su propia traducción<sup>215</sup>. Este mecanismo representa una forma muy rápida de generar una respuesta frente a este estrés. Por otro lado, la fluidez de la membrana es central para el correcto funcionamiento de muchos procesos biológicos. Existen reportes donde se han documentado variaciones en la composición fosfolipídica disparadas por cambios en la temperatura ambiente<sup>218</sup>. Los ácidos grasos insaturados (UFAs, *cis-unsaturated fatty acids*) presentan una temperatura de transición mucho más baja, por lo que cambios en los niveles relativos de ácidos grasos insaturados/saturados tiene una influencia determinante en la fluidez de la misma. Por ejemplo, en *Escherichia coli* la composición de fosfolípidos varía en función de la temperatura, ya que al disminuir se produce un incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados<sup>219</sup>. Existe dos mecanismos principales en los seres vivos para catalizar la síntesis de UFAs, la mayoría son vías de desaturación dependientes de oxígeno, pero también existe una vía anaeróbica. En *E.coli* la vía es anaeróbica y depende de la acción de la enzima FabF, que participa en la vía biosintética de los ácidos grasos<sup>216</sup>. Por el contrario, *Bacillus subtilis* responde de diferentes maneras dependiendo si se encuentra en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. En la primer situación aumenta la síntesis de lípidos ramificados, mientras que en condiciones aeróbicas responde gracias a la acción de una desaturasa específica<sup>220</sup>. Ambos mecanismos tienen como objetivo disminuir la temperatura de transición de fase de la membrana, permitiendo mantener su fluidez a temperaturas menores<sup>221</sup>. En *B. subtilis*, la expresión de la  $\Delta 5$ -desaturasa se regula en función de la temperatura por un sistema a dos componentes. Los niveles de expresión de esta enzima determinan

la relación entre ácidos grasos saturados e insaturados<sup>131,222,223</sup>, ya que introduce dobles enlaces en *cis* en la posición  $\Delta 5$  de los fosfolípidos de membrana<sup>216</sup>. Este SDC presenta una organización prototípica, con una HQ de membrana denominada DesK y su RR DesR, que funcionan como un termómetro molecular<sup>222</sup> (figura 10).

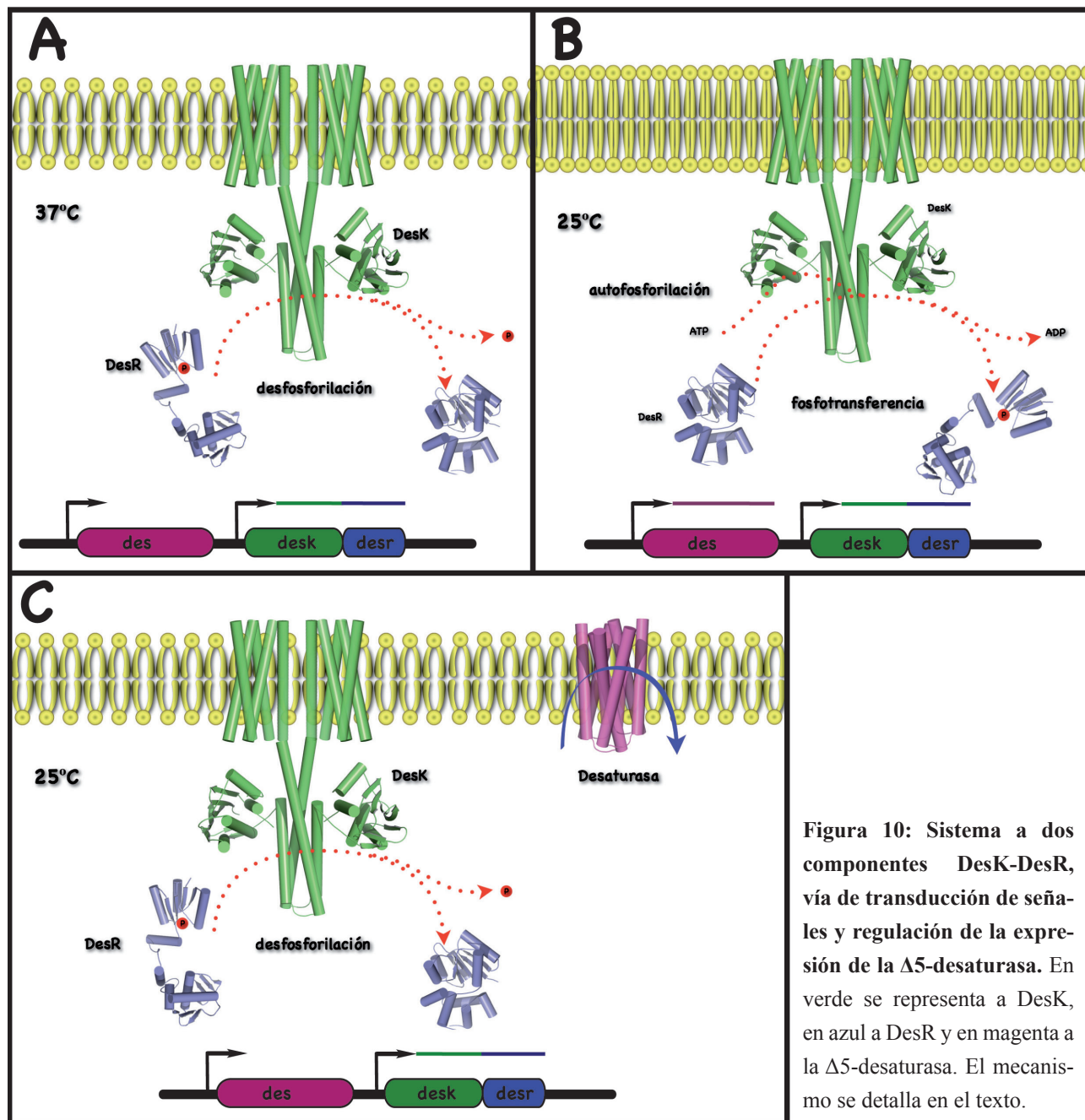


Figura 10: Sistema a dos componentes DesK-DesR, vía de transducción de señales y regulación de la expresión de la  $\Delta 5$ -desaturasa. En verde se representa a DesK, en azul a DesR y en magenta a la  $\Delta 5$ -desaturasa. El mecanismo se detalla en el texto.

DesK es una proteína integral de membrana que presenta 5 sectores transmembrana hacia el N-terminal<sup>224</sup> e incluye a la región sensorial<sup>131</sup>. Hacia la región citoplasmática C-terminal, presenta un dominio DHP de la familia HSKA\_3, que incluye a la His<sub>188</sub> fosforilable, y un dominio ABD (HATPase\_c). Por otro lado, DesR es un RR con un dominio REC N-terminal y un dominio HTH de unión al ADN de la familia LuxR. Al disminuir la temperatura, un choque frío, DesK ve activada

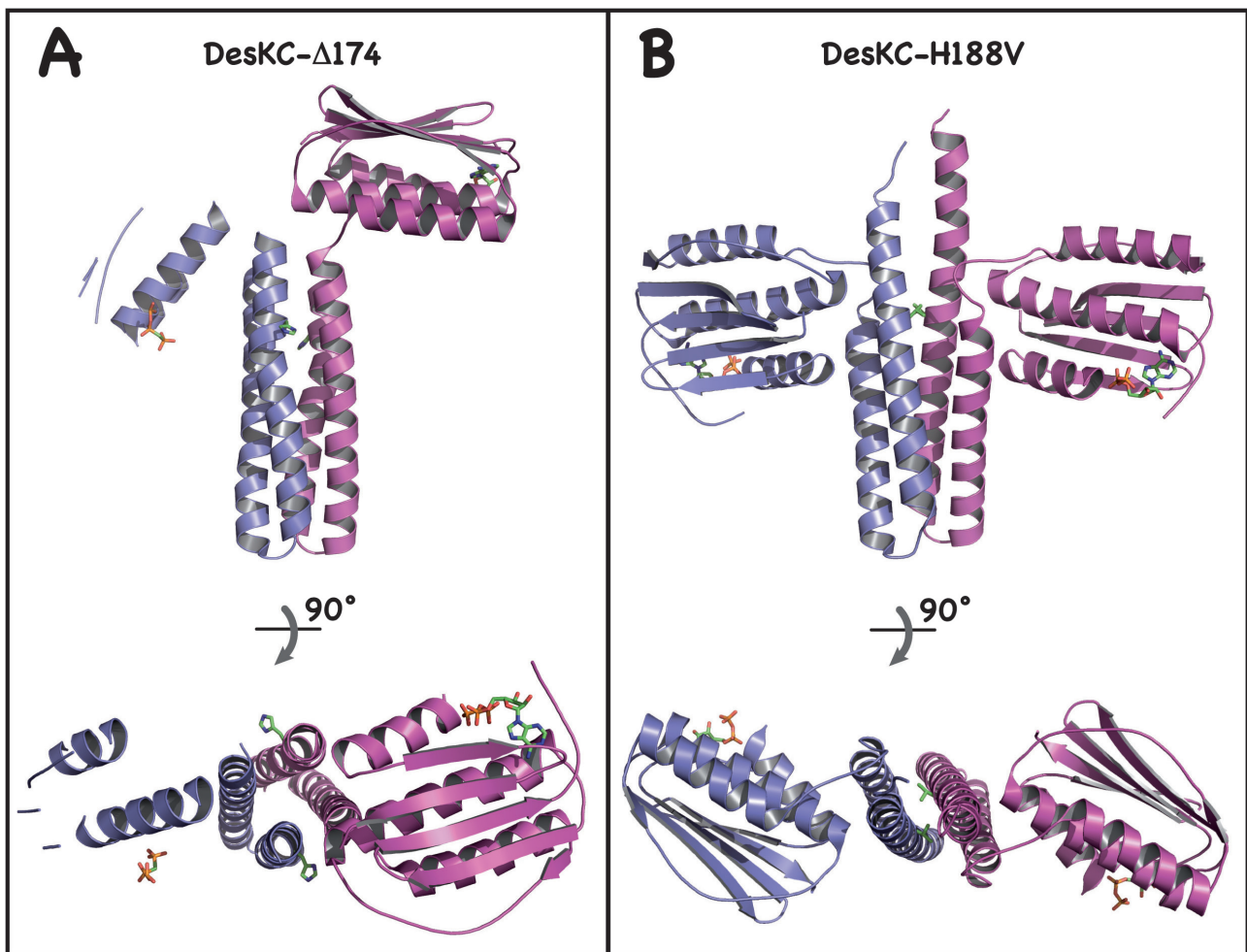
su función autoquinasa, induciendo la autofosforilación de la His<sub>188</sub>. La forma fosforilada de DesK cataliza de inmediato la transferencia del grupo fosfato al Asp<sub>54</sub> de DesR. La activación inducida por fosforilación en el RR provoca cambios conformacionales que desembocan en la formación de tetrámeros, y concomitantemente su unión al ADN<sup>225</sup>. La interacción específica de DesR-P con su operador en el promotor del gen *des*<sup>225</sup>, induce la expresión de la  $\Delta 5$ -desaturasa<sup>222</sup>, que es una proteína integral de membrana capaz de desaturar *in situ* los ácidos grasos de los fosfolípidos en una reacción que depende de O<sub>2</sub><sup>216</sup>. La expresión de esta desaturasa es máxima cuando disminuye la temperatura repentinamente<sup>226,227</sup> o también cuando se limita la síntesis de ácidos grasos ramificados<sup>223</sup>, lo que sugería en un principio que el estímulo detectado es la fluidez de la misma. A su vez los ácidos grasos insaturados generados por la  $\Delta 5$ -desaturasa terminan inhibiendo la actividad autoquinasa de DesK, conduciendo al apagado de la vía<sup>222</sup>. La región citoplasmática de DesK (DesKC) presenta una actividad autoquinasa constitutiva indicando que la pérdida del dominio transmembrana es esencial en la regulación<sup>131</sup>. Es importante resaltar que esta proteína mantiene la capacidad de catalizar las otras dos actividades presentes en DesK: transferencia del fosfato a DesR y defosforilación de DesR-P<sup>131</sup>. Por otro lado, la mutante puntual His<sub>188</sub>Val en DesKC, retiene la actividad fosfatasa *in vitro* e *in vivo*<sup>131</sup>. La His<sub>188</sub> es así esencial para la actividad de autofosforilación, pero no para la defosforilación de DesR-P<sup>131</sup>. ¿Cómo detecta DesK los cambios en la fluidez de la membrana plasmática? Muy recientemente se reportó la generación de un sensor mínimo de DesK usando construcciones de delección. Entre los distintos mutantes acortados, el más corto y funcional en términos de regulación consiste en uno conteniendo sólo un segmento de transmembrana, constituido por la fusión de la mitad N-terminal del primer segmento de transmembrana salvaje con la mitad C-terminal del último. El resultado es una proteína que atraviesa la membrana una única vez, pero que mostró capacidad de regular la actividad de la vía en forma comparable con DesK salvaje<sup>224</sup>. El análisis de la secuencia del sensor mínimo, así como ensayos funcionales sobre mutantes de esta proteína, demuestran que la señal percibida por DesK es el espesor de la membrana. Las bicapas lipídicas sufren transformaciones por cambios en la temperatura ambiente, principalmente aumentando su espesor al sufrir un enfriamiento<sup>228</sup>. El mismo efecto de activación del sensor mínimo DesK con la temperatura se puede observar al aumentar el tamaño de las cadenas de acilo de los fosfolípidos<sup>224</sup>. Estos cambios en el espesor podrían modificar el ángulo de inclinación de las hélices  $\alpha$  transmembrana y constituir el principal mecanismo molecular de activación de la proteína<sup>229</sup>. La inclinación de los segmentos transmembrana podría estar directamente ligada a un efecto hidrofóbico<sup>229,230</sup>, ya que el primer segmento transmembrana de DesK, hacia la cara extracelular, presenta 3 residuos hidrofílicos (Gln<sub>9</sub>, Lys<sub>10</sub> y Asn<sub>12</sub>), que cuando son sustituidos por residuos hidrofóbicos anulan la sensibilidad de DesK a la temperatura<sup>224</sup>. El aumento del espesor

de la membrana llevaría a estos residuos a quedar inmersos en la región hidrofóbica y la inclinación de la hélice  $\alpha$  permitiría orientar a las cadenas laterales de estos residuos hidrofílicos hacia el medio acuoso<sup>229</sup>. Otro mecanismo posible para evitar el costo energético de enterrar residuos hidrofílicos en el interior apolar de la bicapa lipídica es la asociación con otros residuos polares de una hélice  $\alpha$  vecina<sup>229</sup>.

La actividad de fosfotransferasa de DesK-P, que implica la transferencia del fosfato a DesR, es de crucial importancia para determinar la fidelidad con que se transmite la información. Es interesante resaltar que DesR sufre una transición alostérica, todavía no conocida con detalle molecular, ya que es incapaz de unirse al ADN del promotor de *des* (Pdes) si no está fosforilado<sup>225</sup>. Por ensayos de cambios en la movilidad por gel, es posible observar que DesR forma dos tipos de complejos con el promotor Pdes, sugiriendo dos sitios de unión<sup>225</sup>, proponiendo que DesR desfosforilado es un homodímero en solución y a altas concentraciones podría tetramerizar. Ensayos de protección con DNAsa I tienden a confirmar que Pdes presenta 2 sitios de unión: RA, el primero en ser ocupado por DesR, está caracterizado por una secuencia palindrómica, mientras que el segundo sitio RB no lo es y sólo comparte con RA un motivo de 6 pares de bases<sup>225</sup>. RB parecería ocuparse únicamente a altas concentraciones de DesR-P. Los ensayos funcionales revelan que ambas regiones son importantes para la activación de la transcripción mediada por DesR, estabilizando la interacción de la ARN polimerasa al ADN<sup>225</sup>.

Al inicio de esta tesis, en nuestro laboratorio se determinaron las estructuras cristalográficas de DesKC en complejo con AMP-PCP (DesKC- $\Delta$ 174 a 3.2 Å de resolución) y del mutante DesKC-H188V en dos grupos de espacio diferentes, en complejo con ADP (V188a a 2.1 Å de resolución) y AMP-PCP (V188b a 2.5 Å de resolución)<sup>231</sup>(ver tabla II, página 49, donde se resumen las abreviaturas de todas las estructuras de DesKC y mutantes referidas en esta Tesis). Una de las propiedades más relevantes que surgen del análisis es que DesKC es muy flexible, presentando una conformación en la que los dominios ABD se ven disociados del DHp central, mientras que DesKC-H188V adopta una estructura mucho más rígida, con una importante asociación entre los dos dominios (figura 11). También se observa en DesKC-H188V una extensión del DHp hacia el extremo N-terminal, en la forma de un *coiled-coil* paralelo de dos hélices  $\alpha$ . En la medida en que se avanzó en la determinación de otras estructuras adicionales de DesKC (en este trabajo de Tesis) confirmando estas dos conformaciones, así como una tercera, fue posible proponer una hipótesis en la cual estas diferencias conformacionales tienen implicaciones funcionales muy importantes, que serán discutidas en profundidad a lo largo de este trabajo. En relación a las otras estructuras de regiones catalíticas completas de HQs que han sido

reportadas <sup>89,91</sup>, DesKC-H188V es la que presenta claramente mayor similitud estructural, aunque la orientación relativa entre los dos dominios es diferente. La distancia entre el residuo Val<sub>188</sub>, que se encuentra hacia el interior hidrofóbico del dominio DHP y el AMP-PCP (o ADP) asociado al dominio ABD, es de más de 30 Å, por lo que para que ocurra la autofosforilación en el seno de cada dímero, es necesario que ocurran cambios conformacionales importantes. Por el contrario, la His<sub>188</sub> en la estructura de DesKC se encuentra expuesta al solvente, y la flexibilidad de la proteína no impone ninguna restricción estructural para que los dominios ABD se aproximen libremente al sitio de fosforilación.



**Figura 11: Estructura de DesKC-Δ174 (A) y DesKC-H188V (B).** En la figura se observa el homodímero de cada proteína (en azul y magenta se representa cada una de las cadenas). La conformación de ambas proteínas es diferente. Uno de los dos dominios ABD de DesKC-Δ174 se encuentra desordenado y su densidad electrónica es débil, por lo que su trazado fue incompleto.

Este trabajo de Tesis se centró en el estudio estructural de la región citoplasmática de DesK (DesKC) en distintos estados funcionales, del regulador de respuesta DesR y del complejo entre ambas proteínas. Se resolvieron una serie de estructuras de DesKC en distintos estados funcionales, atrapados mediante mutagénesis dirigida o fosforilación, se estudió su actividad de autofosforilación y la conformación del estado de transición capaz de catalizar dicha reacción, se determinó la estructura del dominio receptor de DesR y se analizó desde un punto de vista biofísico y estructural la interacción de DesK con DesR. La integración de toda la información generada permite proponer un mecanismo de transducción de señales desde el dominio sensor hacia la región citoplasmática, permitiendo entender cómo la proteína es capaz de regular distintas actividades catalíticas en función de una señal que es detectada a nanómetros de distancia, regulando el flujo de información en la vía. Los resultados experimentales contribuyen con un mecanismo molecular de alosterismo, y la interpretación es más simple si se apoya en la hipótesis del ajuste seleccionado: DesK preexiste en los distintos estados conformacionales (estructuras 3D determinadas experimentalmente), que están muestreados de acuerdo al valor de las constantes de equilibrio, y el espesor de la membrana (asociada a la disminución de temperatura) desplaza este equilibrio, modificando en suma las concentraciones relativas de los distintos conformeros con actividades catalíticas de salida diferentes. Ensayos funcionales recientes, y también actualmente en curso, contribuyen con datos experimentales que apoyan esta hipótesis mecanística, que deberá ser evaluada en cuanto a su universalidad en otros sistemas reguladores de dos componentes.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Descubrir los mecanismos moleculares precisos por los que las proteínas son capaces de transmitir señales, regulando alostéricamente sus funciones bioquímicas y/o celulares. La hipótesis central de trabajo es que existe un acoplamiento por rearrreglos estructurales precisos entre la detección de la señal y la transmisión de información en la proteína sensora, que en este trabajo se buscó describir con detalle atómico. Estos cambios conformacionales en el contexto de cascadas de señalización podrán contribuir a entender los determinantes estructurales de las interacciones proteína:proteína con ligandos relevantes de la vía, evitando interferencias entre vías que pudieran desviar el curso fisiológico de la transmisión, conduciendo a respuestas patológicas.

El modelo de trabajo se centra en una vía de transducción de señales de *Bacillus subtilis* que permite a estas bacterias percibir cambios en la temperatura ambiente (termómetro molecular), y responder regulando la fluidez de la membrana en función a la exposición al frío. El interés por este modelo radica en que la HQ responsable de esta señalización (DesK), es capaz de catalizar distintas reacciones enzimáticas de acuerdo a la presencia o ausencia del estímulo, determinando el flujo de información en la vía.

En otro nivel, este proyecto procuró como objetivo personal adquirir una formación en biología estructural, con énfasis en cristalografía de rayos X, y el uso complementario de técnicas provenientes de la biología molecular, bioquímica, biofísica de macromoléculas y bioinformática.

## 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 5.4.1. Resolver estructuras 3D de DesK en distintos estados funcionales.

DesK es una HQ capaz de catalizar tres actividades diferentes y la modulación funcional de la enzima ocurre por cambios en el dominio sensor a una gran distancia. ¿Cómo ocurren los rearrreglos estructurales que permiten esta regulación alostérica? Para abordar este objetivo se buscó profundizar los estudios estructurales de DesKC, estabilizando estados funcionales mediante mutagénesis dirigida, presencia de ligandos específicos o por modificaciones post-traduccionales.

### 5.4.2. Caracterizar el mecanismo de autofosforilación de DesK

La autofosforilación es la reacción que compromete a la activación de la vía, y los determinantes estructurales que permiten regularla no han sido estudiados con detalle. Además, hasta el momento es pobre la información disponible para HQs de la familia HSKA\_3, por lo que la información ob-

tenida podría contribuir a discriminar eventuales diferencias mecanísticas entre familias. Dado que la conformación de autofosforilación es un estado transitorio y por ende esencialmente difícil de atrapar, fue necesario abordar este objetivo mediante aproximaciones bioinformáticas y posterior validación experimental de las hipótesis.

#### **5.4.3. Resolver la estructura tridimensional de DesR**

La información estructural de los RRs es abundante, sin embargo el análisis detallado de las transiciones alostéricas que sufren estas proteínas al fosforilarse no permite aún proponer un mecanismo general del alosterismo, aun sabiendo que la fosforilación dispara un cambio funcional evidente. La determinación de las estructuras 3D de DesR así como de variantes truncadas del mismo, permitirá comprender los cambios conformacionales asociados a la fosforilación, y a su capacidad de formar complejos con DesK y el ADN.

#### **5.4.4. Realizar una caracterización biofísica del complejo DesK-DesR en solución**

En función de la hipótesis central del trabajo, según la cual DesK transita por distintos estados estructurales (objetivos A y B), surge la posibilidad de que forme distintos tipos de complejo con su RR específico DesR. Probar esta hipótesis y eventualmente dilucidar las diferencias y los determinantes de especificidad, permitirán aportar información hasta ahora no obtenida para ningún SDC. Para esto se realizarán ensayos por cromatografía de exclusión molecular y experimentos de calorimetría por titulación isotérmica (ITC).

#### **5.4.5. Realizar estudios estructurales del complejo DesK-DesR**

Los determinantes de especificidad podrían ser sutiles, o incluso significativamente diferentes, en las distintas familias de proteínas. Es claro que se necesita más información experimental sobre esta interacción HQ-RR, clave en la cascada de señalización. Para llevar a cabo este objetivo se buscará combinar información de cristalografía de proteínas con métodos bioinformáticos y funcionales, contribuyendo con nuevas imágenes en el curso de esta vía de señalización. Los datos así obtenidos podrían aportar información valiosa para proponer racionalmente el re-cableado de SDCs.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Construcción de plásmidos de expresión y mutagénesis dirigida

En la tabla I se muestran los distintos primers utilizados y los mutantes generados durante este trabajo. El Dr. Diego de Mendoza nos brindó los plásmidos de expresión pQE30-DesR, pQE32-DesKC y pQE32-DesKC-H188V, derivados de los vectores pQE30a y pQE32a de QIAGEN, pET15b-DesKC y pET15b-DesKC-H188V, derivados de pET15b de Novagen, y pETGEX-GST-DesR. Los distintos vectores de DesKC codifican para la región citoplasmática soluble de DesK, que incluye desde el residuo Arg<sub>154</sub> hasta la Lys<sub>371</sub><sup>131</sup>. Estos vectores fueron modificados para generar las distintas proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo. Gran parte de este trabajo fue posible gracias a la asistencia técnica de Natalia Ruétalo. Los plásmidos, en general, fueron purificados mediante el protocolo por lisis alcalina<sup>232</sup>. La mutagénesis dirigida fue realizada mediante una reacción de amplificación por extensión de primers con la enzima de alta fidelidad Phusion (Biolabs), utilizando primers mutagénicos complementarios a la región a modificar. Estas reacciones de amplificación se realizaron en 50 µL, adicionando 5 ng de plásmido purificado, solución 1X de PCR, 200 µM de cada dNTPs, 20 pM de cada primer y 2.5 unidades de polimerasa Phusion. Los protocolos de reacción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante de la polimerasa de alta fidelidad. Una vez terminada la reacción, los productos fueron purificados a partir de las bandas cortadas de geles de electroforesis en agarosa (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare), el ADN del plásmido parental fue digerido utilizando la enzima *Dpn I* (*New England Biolabs*) durante 2 hrs a 37° y luego la enzima inactivada a 80° por 20 minutos. A continuación los productos de la digestión fueron nuevamente purificados de igual forma para resuspender finalmente el ADN en agua. El ADN recuperado se utilizó para transformar bacterias competentes de *E. coli* TOP10 F' (preparadas de acuerdo a Sambrook y colaboradores<sup>232</sup>) por electroporación (ECM 830, BTX Electroporation System). Luego fueron sembradas en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente e incubadas a 37° durante toda la noche. A continuación se seleccionaron algunas colonias para crecer cultivos de LB en presencia del antibiótico (en general, ampicilina a 100 µg/mL), y los plásmidos purificados por el método de lisis alcalina fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo. Por otro lado, se generaron varias construcciones de DesR para incorporar la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus) entre la etiqueta de histidinas y la secuencia codificante de la proteína. Para esto se diseñaron una serie de primers que además de añadir la secuencia específica para la proteasa agregaron sitios de digestión específicos para las enzimas *BamH I* y *Sal I* (tabla I). A partir del plásmido pQE30-DesR, se amplificó por PCR de alta fidelidad y luego estos fueron digeri-

dos específicamente con las enzimas *BamH I* y *Sal I*. Por otro lado, el plásmido pQE80L (QIAGEN) fue digerido con las enzimas *BamH I* y *Xho I*. Los productos de la digestión fueron purificados por gel de agarosa (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare). La cuantificación de ADN se realizó con un instrumento Nanodrop 1000 (*Thermo Scientific*), determinando la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Las reacciones de ligación se realizaron utilizando la ligasa T4 (*New England Biolabs*) a 4 °C durante toda la noche: en 20  $\mu$ L de reacción se agregó 50 ng de vector y 3 veces más en concentración molar del fragmento codificante para DesR. Los productos de las ligaciones fueron purificados, resuspendidos en agua y electroporados en bacterias TOP10F'. Las colonias transformadas fueron analizadas por minipreps y digestión, para determinar la incorporación del fragmento en el vector pQE80L, y luego secuenciadas para comprobar la ausencia de mutaciones. En algunos casos (DesKC-G192C+G334C, DesKC-Q193C+G334C y DesKC-S196C+G334C) se realizó mutagénesis dirigida en dos sitios alejados utilizando el kit de QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Las construcciones de DesKC CoilP1, CoilP2, CoilP3, CoilP4 y CoilK y las formas truncadas de DesR-K120 y DesR-N136 fueron generadas por PCR alta fidelidad, utilizando primers fosforilados y purificados por SDS-PAGE. Las reacciones de PCR consistieron en amplificar todo el plásmido generando inserciones mediante el diseño de los primers. El número de ciclos de la reacción de amplificación fue menor a 25 y los productos de la reacción ligados con la ligasa T4. Las colonias seleccionadas fueron analizadas por secuenciación completa.

Tabla I: Lista de plásmidos utilizados o construidos.

Nombre	Vector	Primer Fw (5' → 3')	Primer Rev (5' → 3')
DesKC-wt	pQE32	Proporcionados por el grupo del Dr. Diego de Mendoza	
DesKC-H188V	pQE32	Proporcionados por el grupo del Dr. Diego de Mendoza	
DesKC-H188E	pQE32	GAATTGCCCGCGATCTCGAG GATACGCTTGGGCAAAA	TTTTGCCCAAGCGTATCCTCG AGATCGCGGGCAATTC
DesKC-L191C	pQE32	CCGCGATCTCCATGATACGT GTGGGCAAAAAGCTTTCTCTT	AAGAGAAAGCTTTTGCCAC ACGTATCATGGAGATCGCGG
DesKC-A184C	pQE32	AAATTAGAAGAACGTCAGC GAATTTGCCCGCGATCTCCAT GA	TCATGGAGATCGCGGCAAAAT TCGCTGACGTTCTTCTAATTT
DesKC-E342A	pQE32	CTTACTCGGGATGAGAGCAC GGCTTGAGTTTGCAA	TTGCAAACCTCAAGCCGTGCT CTCATCCCGAGTAAG
DesKC-E342K	pQE32	GATGAGAAAACGGCTTGAGT TTGC	CCGAGTAAGCCATGTCCTTT TG
DesKC-R343A	pQE32	GATGAGAGAAGCGCTTGAG- TTTGC	CCGAGTAAGCCATGTCCTTT TG
DesKC-R342E	pQE32	GATGAGAGAAGAGCTTGAG- TTTGC	CCGAGTAAGCCATGTCCTTT TG
DesKC-H188V+L191C	pQE32	CCGCGATCTCCATGATACGT GTGGGCAAAAAGCTTTCTCTT	AAGAGAAAGCTTTTGCCAC ACGTATCATGGAGATCGCGG

DesKC-H188V+A184C	pQE32	GTAAAGTTAGAAGAACGTCA ACGAATTGCGCGATCTCC ATG	CATGGAGATCGCGCAAATT CGTTGACGTTCTTCTAACTTT AC
DesKC-G192C+G334C	pQE32	GCGATCTCCATGATACGCTT TGCCAAAAGCTTTCTCTTAT TGG	GACATTTGTGACAGCTTCCT TTAAGGACATGCTCAAAATG
DesKC-G192C+G334C +C286S+C303S	pQE32	GTCAAACACAGCCAGGCTAA AACTTCCCAGATTGACATTC	GACATTTGTGACAGCTTCCT TTAAGGACATGCTCAAAATG
DesKC-Q193C+G334C	pQE32	TGCAAGCTTTCTCTTATTGGT TTAAAAAGCGAC	CCCAAGCGTATCATGGAGAT CGC
DesKC-S196C+G334C	pQE32	CAGAAGCTTTGTCTTATTGG TTTAAAAAGCGAC	CCCAAGCGTATCATGGAGAT GATCGC
DesKC-H188V+W311G +K312S	pQE32	GAGTTGACATTCAGCAGCTC GGGAGCGAAGTTGTGATTAC AGTGTC	GACTGTGAATCACAACCTTC GCTCCCGAGCTGCTGAATGT CAACTC
DesKC-CoilP1	pQE80L	AACTGCGTGAGGATGTGAAT GAACTGCGTGCAGAACTGGT AAAATTAGAAG	CTTCAAGCTGTTTCGCGCAGC TTGCGCACGCCCTGAAAATA CAGGTTTTCC
DesKC-CoilP2	pQE80L	CGAGGATCCGGTTCAGTTGA GAGCCTGGAGAGC	TTGCGCAGGCTCTCAACGCC CTGAAAATACAGGTTTTCC
DesKC-CoilP3	pQE80L	CGAGGATCCGGTTCAGTTGA GAGCCTGGAGAGC	TTGCGCAGGCTCTCAACGCC CTGAAAATACAGGTTTTCC
DesKC-CoilP-W311G+K312S	pQE80L	GAGTTGACATTCAGCAGCTC GGGAGCGAAGTTGTGATTAC AGTGTC	GACTGTGAATCACAACCTTC GCTCCCGAGCTGCTGAATGT CAACTC
DesKC-CoilP-F346A	pQE80L	GATGAGAGAACGGCTTGAG GCTGCAAACGGAAGC	CCGAGTAAGCCATGTCCTTT TG
His-DesR	pQE30	Proporcionados por el grupo del Dr. Diego de Mendoza	
DesR-His	pET15b	ATTCCATGGT TAGTATATTT ATTGCAG	ACGTCGACCTTAAACCAGCC TTTTCTTTTGACCG
TEV-DesR	pQE80L	Proporcionados por el grupo del Dr. Diego de Mendoza	
TEV-S-DesR	pQE80L	CGCGGATCCATGATTAGTA- TATTTATTGCAG	TCCTGGTCGACGCCAAGATC CTTTTTTATTTAAACC
TEV-GS-DesR	pQE80L	CGCGGATCCGGTTCAATGAT TAGTATATTTATTGCAG	TCCTGGTCGACGCCAAGATC CTTTTTTATTTAAACC
TEV-(GS) <sub>2</sub> -DesR	pQE80L	CGCGGATCCGGTTCAGGATC AATGATTAGTATATTTATTG CAG	TCCTGGTCGACGCCAAGATC CTTTTTTATTTAAACC
TEV-GS-N136	pQE80L	TAAAAAAGGATCTTGCGG- TCGACCTGC	AGCTTCGCTGTATAAGTCCT CCATCAG
TEV-GS-K120	pQE80L	TAAAAAAGGATCTTGCGG- TCGACCTGC	TCCGTTTCATGACGCTACGGA TGG
TEV-GS-N136	pACYC		
DesKC-CoilP2+N136	pACYC	CCATGGGCAGCAGCCATCAC CATCATCACCACGGATCAGG ATCGGAAAACC	TCGACTTAAGCATTATGCGG CCGCAAGCTTCGACTTATTTT GAATTATTAGG
DesKC-CoilP3+N136	pACYC	CCATGGGCAGCAGCCATCAC CATCATCACCACGGATCAGG ATCGGAAAACC	TCGACTTAAGCATTATGCGG CCGCAAGCTTCGACTTATTTT GAATTATTAGG
DesKC-CoilP4+N136	pACYC	GTTAACAGCCTGCGCGCGGA GGTGGAACTGACTTGAAGCGA AGCTCGAGGATC	TTTGCTCTCCAGGCTCTCAAC TGAAC
DesKC-CoilP5+N136	pACYC	GTTGAGAGCCTGCGCAAGGA GGTG	TTTGCTCTCCAGGCTCTCAAC TTTGCTCTCCAGGCTCTCAAC TGAAC
pTH24 (TEV)	pTH24		

## 6.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para la expresión de proteínas recombinantes, los plásmidos generados se transformaron en la cepa de *E. coli* TOP10F' y se cultivaron 10ml a 37°C en medio LB durante toda la noche (ON), en presencia del antibiótico correspondiente. Estos cultivos ON se usaron como inóculo sobre 1 a 3 litros de medio 2xYT en matraces de 5 litros, en presencia de antibióticos y 2 mM MgSO<sub>4</sub>. El cultivo se creció a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0.8 – 1, agregando en ese momento 0.5 mM IPTG para disparar la inducción (para las construcciones de DesKC y sus mutantes derivados; para DesR y derivados se usó 1mM IPTG). La inducción se realizó a 30°C durante 4 hrs con agitación a 240 rpm y luego las bacterias fueron cosechadas por centrifugación, lavadas con agua y congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

La lisis bacteriana se realizó en general mediante el procedimiento que se describirá a continuación. El pellet de bacterias se resuspendió en una solución de lisis (50mM Tris.HCl pH8, 0.5 M NaCl), con un cóctel de inhibidores de proteasa sin EDTA (Roche), 0.1% Triton-X100 y 1 mg/mL de lisozima. La lisis se realizó mediante incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, para luego proceder al sonicado (5 pulsos de 30s a potencia máxima, DIGITAL Sonifier® Model S-250D, Branson) y centrifugado a 4 °C durante 45 minutos a 25000g. La fracción soluble fue filtrada (filtros 0.45 µm, Amicon). Previo a la siembra en columnas HisTrap (de 1 ó 5 ml de volumen de cama, dependiendo del volumen del extracto, GE Healthcare) se adicionó imidazol (40 mM concentración final). La purificación por IMAC (*Iminodiacetic acid Metal Affinity Chromatography*) se realizó en un equipo de cromatografía líquida preparativa AKTA® UPC (GE Healthcare). Después de sembrar el extracto a la columna, esta fue lavada con 20 volúmenes de columna, hasta una A<sub>280</sub> estable, con solución A (50mM Tris.HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 10 % glicerol, 40 mM imidazol). La elución de las proteínas fue realizada mediante un gradiente de concentración de imidazol (40 mM a 500 mM) en 20 volúmenes de columna. La proteína purificada fue dializada durante toda la noche a temperatura ambiente en un solución compuesta por 50 mM Tris.HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 10 % glicerol, 0.5 mM DTT y proteasa TEV (en una relación de masas 1:40 proteasa:proteína recombinante). El plásmido para la expresión y purificación de la proteasa TEV fue aportado por van den Berg y colaboradores, y el protocolo de purificación se realizó según las condiciones reportadas<sup>233</sup>. A continuación de la diálisis, la proteína fue filtrada (0.22 µm) y sembrada en una nueva columna HisTrap (GE Health Care) para sustraer las proteínas recombinantes no proteolisadas y la proteasa TEV (que posee una etiqueta de histidinas). La proteína no retenida fue concentrada por ultrafiltración en dispositivos para centrífugas (Vivaspin corte 10kDa, Sartorius) y luego sembrada en una columna de exclusión por tamaño S75 16/60 o 26/60

(GE Healthcare) de acuerdo a la cantidad de proteína disponible, previamente equilibradas en 20 mM Tris.HCl pH8, 0.3 M NaCl y 0.5 mM DTT. Las fracciones seleccionadas con la proteína recombinante fueron concentradas hasta aproximadamente 10 mg/ml por ultrafiltración, se prepararon alícuotas de pequeño volumen y luego se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo realizando espectros de absorbancia (*Cary UV-visible spectrophotometer*). Dado que la  $A_{280}$  en condiciones nativas o desnaturizantes (6M cloruro de guanidinio) no presentó diferencias se utilizó el  $\epsilon_{280}$  teórico para calcular la concentración de proteínas. La pureza de las proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE con tinción por Coomassie, así como también por espectrometría de masas (Maldi-TOF, Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IPMontevideo).

### 6.3. Cromatografía analítica de exclusión por tamaño

El análisis de cada proteína y distintos complejos fue realizado por cromatografía de exclusión molecular analítica utilizando la columna S75 10/300 (GE Healthcare). Las proteínas purificadas fueron diluidas hasta la concentración definida por el experimento, incubadas con 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 5 mM ADP, ATP o AMP-PNP, durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  previo a la inyección de las muestras. La columna de gel filtración fue pre-equilibrada con 50 mM Hepes pH7.5, 0.3 M NaCl y 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , y las cromatografías realizadas a un flujo de 0.5 mL/min. La calibración de la columna fue realizada con una mezcla de proteínas globulares comerciales (kit MWGF70, Sigma). El análisis de los datos se realizó con el programa Origin v.8 (Originlab).

### 6.4. Cristalización de proteínas

La búsqueda de condiciones para la cristalización de las proteínas se efectuó mediante los métodos de difusión de vapor al equilibrio en gota colgante o sentada, de acuerdo a si se realizaron en forma manual o robótica, respectivamente. El trabajo de cristalogénesis para algunas de las proteínas contó con la asistencia técnica de Nicole Larrieux (Unidad de Cristalografía de Proteínas, IPMontevideo). Las cristalizaciones en gota colgante se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos tipo Linbro (VDX, Hampton Research). En la parte inferior del pocillo se colocó 0.5-1 ml de la condición de cristalización (preparada manualmente o comercial) y, en general, la mezcla de 2  $\mu\text{L}$  de esta condición y 2  $\mu\text{L}$  de la proteína se ubicó sobre vidrios siliconados. El pocillo fue aislado utilizando grasa y se dejó equilibrar por varios días a  $20^{\circ}\text{C}$ . Los primeros rastreos de condiciones se realizaron en forma manual utilizando matrices dispersas de condiciones conocidas (192 soluciones comerciales diferentes de QIAGEN y Hampton Research). Luego se comenzó a realizar procedimientos robóticos, permi-

tiendo la miniaturización del proceso, disminuyendo la cantidad de muestra y de reactivos utilizados. En general se rastrearon entre 384 y 576 condiciones comerciales diferentes (QIAGEN y Hampton Research) por el método de gota sentada. El robot de cristalización Honeybee963® (Digilab) nos permitió utilizar placas de 96 pocillos tipo Greiner, de forma de agregar 90  $\mu$ L de las soluciones comerciales en el pocillo y las gotas fueron preparadas con 0.3  $\mu$ l de proteína y 0.3  $\mu$ l del reservorio. Las placas fueron selladas e incubadas a 20 °C (en alguna ocasión se ensayó a 6 °C) durante varios días. Una vez identificadas condiciones con posibles cristales de proteína, se procedió al escalado y optimización. Estos ensayos se realizaron manualmente por el método de gota colgante en las placas tipo Linbro como ya describimos. Las condiciones a probar fueron preparadas manualmente. Los distintos mutantes de DesKC (10mg/ml) fueron preparadas preincubando durante 15 minutos a 4 °C con 5 mM de ADP, ATP o AMP-PNP, en presencia de 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ó  $\text{MgCl}_2$ , dependiendo del experimento de cristalización. En la tabla III se muestran los ensayos de rastreo de condiciones realizados robóticamente, para las distintas proteínas y complejos que se intentaron cristalizar.

Las condiciones de cristalización finales para las distintas proteínas serán detalladas a continuación y en la figura 12 se muestra una foto representativa de cada cristal.

- El dominio ABD en complejo con ATP (DesKC-ABD), cristalizó luego de proteólisis fortuita, en los intentos de cristalización del complejo DesKC-H188V/DesR. Para esto se preparó el complejo con una estequiometría de 1:1 y una concentración final total de 10 mg/ml en 50 mM Tris.HCl pH8, 300 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ATP y 5 mM  $[\text{BeF}_3]^-$ . La composición de la solución de cristalización fue 20 % PEG 3350, 0.2 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Luego de varios días aparecían multicristales, y mediante microsembrado se logró obtener cristales únicos.
- DesKC-H188V (V188c) a 10 mg/mL en complejo con ATP fueron obtenidos en presencia de 5 mM ATP y la solución de cristalización fue 14 % PEG-8000, 0.5 M KCl y 10 % glicerol. Los cristales aparecieron a los pocos días como pequeñas placas.
- El mutante DesKC-WKV (40 mg/ml) en presencia de 5 mM ADP, fue cristalizado en 14 % PEG 8000, 0.1 M cacodilato de sodio pH 6.5, 0.2 M acetato de sodio, 12 % glicerol y 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ .
- El mutante DesKC-H188E (10 mg/mL) fue cristalizado en 3 condiciones diferentes, que denominaremos E188a, E188b y E188c. La condición de E188a consistió en 10 % PEG-3350, 0.1 M Tris, pH 7, 5 mM KCl, 50 mM  $\text{CaCl}_2$  y la proteína fue preincubada en 5 mM de ADP; la condición para E188b incluyó 14 % MPD, 0.1 M HEPES, pH 6, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y la proteína se cristalizó en presencia de 5 mM AMP-PCP y 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Los cristales de E188c aparecieron en gotas donde se buscaba cristalizar el complejo DesKC-H188E/DesR-N136. Para esto las dos proteínas fueron mezcladas con una estequiometría 2:1 a una concentración final total de 10 mg/ml, en presencia de AMP-PCP y  $\text{MgCl}_2$ . La condición de cristalización fue preparada con 8 % MPD, 0.1 M Bicina pH9.

- La forma fosforilada de DesKC (WT-P) fue cristalizada luego de previa incubación con 5 mM ATP y 10 mM MgCl<sub>2</sub> durante 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la fosforilación completa. Luego el ATP fue removido por desalado (columnas PD10, GE Healthcare). La proteína (10 mg/ml), fue suplementada con 5 mM AMP-PNP, y se cristalizó en una condición conteniendo 10 % PEG 3000, 0.1 M CHES pH 9.5 y 10 mM MgCl<sub>2</sub>.
- CoilP1 fue cristalizada en presencia de 5 mM AMP-PCP y 10 mM MgCl<sub>2</sub>, y la condición de cristalización presentó 5.6 % PEG 4000, 0.07 M acetato de sodio pH 4.5 y 5 % glicerol.
- Los cristales de DesR-N136 (100 mg/ml) fueron producidos en una solución de 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M Hepes pH 7.25 y 2 % glicerol. La nucleación controlada se realizó mediante microsembrado y los cristales aparecían a las 24 hrs.

La criopreservación de los cristales fue realizada por incubación de 60 segundos en la condición de cristalización suplementada con 25% de glicerol para la mayoría de los casos, a excepción de E188b y E188c, para los que utilizamos 22% y 24% de MPD, y V188 en complejo con ATP (la condición ya es crioprotectora). En el caso de los cristales de ABD, la solución de crioprotección incluyó además 5 M NaI, usado para obtener fases experimentales. Los cristales tratados con la solución de criopreservación fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido rápidamente y almacenados hasta la colección de los datos.

Tabla II: Proteínas cristalizadas y de estructura resuelta.

Nombre	Característica	PDB	Comentarios
<b>V188a</b>	DesKC-H188V en complejo con ADP + Ca <sup>+2</sup>	3EHH	Previo a este trabajo
<b>V188b</b>	DesKC-H188V en complejo con AMP-PCP + Mg <sup>+2</sup>	3EHJ	Previo a este trabajo
<b>DesKC-Δ174</b>	DesKC-Δ174 en complejo con AMP-PCP + Mg <sup>+2</sup>	3EHF	Al inicio de este trabajo
<b>DesKC-ABD</b>	Dominio de unión al ATP, fragmento generado por proteólisis residuos 243-367	3EHG	En este trabajo
<b>V188c</b>	DesKC H188V en complejo con ATP + Mg <sup>+2</sup>	---	En este trabajo
<b>DesKC-WKV</b>	DesKC-H188V+W311G+K312S con ADP + Ca <sup>+2</sup>	---	En este trabajo
<b>E188a</b>	DesKC H188E en complejo con AMPPCP + Mg <sup>+2</sup>	3GIF	En este trabajo
<b>E188b</b>	DesKC H188E en complejo con ADP + Ca <sup>+2</sup>	3GIE	En este trabajo
<b>E188c</b>	DesKC H188E en complejo con ADP + Ca <sup>+2</sup>	---	En este trabajo
<b>WT-P</b>	DesKC fosforilada con AMPPCP + Mg <sup>+2</sup>	3GIG	En este trabajo
<b>N136a</b>	Dominio REC N-terminal de DesR	---	En este trabajo
<b>N136b</b>	Dominio REC N-terminal de DesR	---	En este trabajo
<b>CoilP1</b>	DesKC con varias mutaciones en el extremo N-terminal	---	En este trabajo



Figura 12: Selección de fotos de cristales de proteínas optimizados durante este trabajo.

Tabla III: Lista de condiciones probadas en rastreos

Nombre de la proteína	Nº de condiciones	Cristales
DesKC-H188V + DesR	694	No (ABD)
DesR	3844	No
GST-DesR	384	No
DesKC-P	1056	Sí
DesKC-WKV	384	Sí
N136	960	Sí
DesKC CoilP1	1152	Sí
DesKC CoilP3	768	No
DesKC CoilP 3+ N136	912	No
DesKC H188E + N136	644	No (E188c)

## 6.5. Difracción de rayos X, resolución de estructuras y refinamiento

Los datos de difracción fueron en su mayoría colectados en la Unidad de Cristalografía de Proteínas (IPMontevideo) a excepción de E188b y E188c, que fueron medidos en la European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, líneas ID23-2 y ID14, respectivamente). Los datos se obtuvieron a partir de cristales únicos a 100°K (Cryostream Series 700, Oxford Cryosystems) en un generador de rayos X de ánodo de cobre rotatorio con microfuelle (70µm) Rigaku MicroMax007-HF® (Rigaku), con espejos multicapa Varimax-HF (Rigaku) para enfocar, monocromatizar y colimar los rayos X. El detector utilizado es una placa de imagen Mar345 (Mar Research) y los cristales fueron montados en un goniómetro con geometría de un único eje de oscilación. Las estrategias de colección de datos se diseñaron teniendo en cuenta los resultados de indexación con una o pocas imágenes, en función de tamaño de celda, grupo de espacio y mosaicidad aparentes, procurando asegurar completitud y redundancia. Los datos completos fueron indexados, integrados y escalados utilizando los programas Mosflm / Scala<sup>234</sup> o XDS<sup>235</sup> / Scala. El análisis de la función de auto-rotación fue realizado utilizando Molrep<sup>236</sup>. Las estructuras fueron resueltas, a excepción de DesKC-ABD, mediante reemplazo molecular utilizando los programas Amore<sup>237</sup> o Phaser<sup>238</sup>. En general, el reemplazo molecular funcionó únicamente al utilizar fragmentos separados correspondientes al dominio DHp y/o el ABD a alta resolución, como sondas de búsqueda. En el caso de la estructura del dominio de unión al ATP, las fases experimentales fueron obtenidas por difracción anómala a una única longitud de onda (SAD Single-wavelength Anomalous Diffraction), ya que los átomos de yodo generan una señal significativa de dispersión anómala cuando se emplean rayos X de longitud de onda de 1.5418 Å. La ubicación de los átomos de I se determinaron mediante métodos directos con el programa SHELXD<sup>239</sup> y la

subestructura inicial fue refinada (posición y ocupancia, factores de desplazamiento atómico iso/anisotrópicos, e identificación de sitios menores) utilizando el programa SHARP<sup>240</sup>. Mediante métodos de modificación de densidad (algoritmo de inversión de solvente “*solvent-flipping*” implementado en SOLOMON autoSHARP<sup>241</sup>) se logró resolver la ambigüedad de fases y los mapas resultantes fueron de excelente calidad, permitiendo la interpretación de los mismos en forma automática en más de un 95% del modelo utilizando el programa Arp/wArp<sup>242</sup>. Se introdujeron correcciones finales y modelado de algunos bucles con el programa Coot<sup>243</sup>, para realizar los últimos ciclos de refinamiento restringido en espacio recíproco con Refmac5<sup>244</sup>, incluyendo un modelo TLS<sup>245</sup>. La estructura de DesR\_N136 a 2.6 Å fue resuelta mediante reemplazo molecular utilizando las coordenadas de 3B2N, que presenta un 41 % de identidad de secuencia entre los residuos 1 y 121, utilizando el programa Phaser. El refinamiento se realizó utilizando el programa phenix.refine<sup>246</sup> dentro del paquete Phenix<sup>247</sup>.

## 6.6. Análisis estructurales

La comparación entre modelos se realizó mediante alineaciones estructurales utilizando los programas Superpose (CCP4)<sup>248</sup> y Escet<sup>249,250</sup>, y el servidor Dali<sup>251</sup>. Superpose usa un algoritmo que permite alinear considerando la estructura secundaria de las proteínas, mientras Escet calcula matrices de diferencias de distancias pesadas por el error estimado. Finalmente la búsqueda de modelos similares en la PDB se realizó mediante Dali, que también determina matrices de distancia entre los C $\alpha$  para asignar residuos equivalentes. Los cálculos de potenciales electrostáticos fueron realizados con APBS<sup>252</sup> y las figuras preparadas con PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>). Las comparaciones entre los dominios de unión al ATP de distintas estructuras se realizó con Escet, con el objetivo de determinar si la unión de distintos ligandos provoca cambios conformacionales estadísticamente significativos. Para esto se realizó la comparación de la estructura del ABD a alta resolución con los dominios en complejo con ADP presentes en la estructura de DesKC-H188V (3EHH, resuelta a 2.1 Å) usando un nivel de corte de 2.5 $\sigma$  ( $\sigma$  está directamente correlacionada con las incertidumbres estimadas de las medidas de distancias interatómicas de cada una de las estructuras). Escet permite determinar los grupos con mayor número de C $\alpha$  invariantes, o sea que no presentan variaciones significativas en las distancias entre los mismos. La superposición utilizando el grupo de C $\alpha$  más importante permitió así comparar las estructuras permitiendo identificar con mayor facilidad y fiabilidad las regiones variables. Para descartar cambios conformacionales inducidos por el entorno cristalino, este mismo procedimiento se realizó para las coordenadas del ABD en complejo con ADP de la estructura DesKC-H188E (3GIE, resuelta a 2.65Å), ya que presenta un empaquetamiento cristalino completamente diferente. El nivel de corte utilizado fue de 1.5 $\sigma$  ya que la incertidumbre en las coordenadas es en este caso mayor (me-

nor resolución ). El mismo procedimiento se realizó para determinar regiones invariantes y flexibles del dominio DHp en distintas estructuras de DesKC, mutantes puntuales y otros modelos.

## 6.7. Ensayo de actividad: cinética de autofosforilación

Las actividades de autofosforilación y ATPasa de DesK fueron evaluadas mediante un ensayo acoplado<sup>253</sup>. La producción de ADP fue determinada mediante el acoplamiento con la oxidación ADP-dependiente de NADH, en reacciones acopladas catalizadas por lactato deshidrogenasa (Sigma) y piruvato quinasa para regenerar lactato a partir de fosfoenolpiruvato. El sistema acoplado fue utilizado en exceso para evitar saturación, y la concentración de NADH en función del tiempo se determinó midiendo la absorbancia a 340nm en un espectrofotómetro Cary UB-Visible (Varian) a 24°C. Las mezclas de reacción estaban compuestas por 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 145 mM acetato de potasio, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM fosfoenolpiruvato, 240 mM NADH, 5 unidades de piruvato quinasa, 23 unidades de lactato deshidrogenasa, y diferentes concentraciones de ATP, en un volumen final de 200 µl. En ausencia de DesKC la oxidación de NADH fue estable y lineal por varios minutos. El ATP utilizado presentó una pequeña contaminación con ADP, por lo que fue necesario realizar una preincubación con el sistema acoplado para consumir el contaminante. Las reacciones fueron iniciadas agregando 22 µM DesKC o distintos mutantes puntuales. Las curvas de variación de la A<sub>340nm</sub> en función del tiempo, así como los datos cinéticos en función de la concentración de ATP se realizaron con el programa Origin v.8 (Originlab). Para DesKC las curvas de consumo de NADH mostraron tener un comportamiento bifásico, y fueron ajustadas un modelo exponencial más una función lineal:

$$[NADH]_t = A_1 e^{-k_1 t} + (A_2 + k_2 t)$$

siendo A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> las amplitudes de las fases exponencial y lineal, respectivamente; k<sub>2</sub> es la constante de la fase lineal (k<sub>2</sub> < 0), mientras que k<sub>1</sub> es un coeficiente dependiente de la concentración del sustrato para la fase exponencial. La v<sub>0</sub> de la fase exponencial fue calculada a partir de la ecuación:

$$v_0^{fase\ exp} = k_1 A_1 = \frac{k_{cat} [ATP]}{K_M + [ATP]} (f[E])$$

El parámetro f es el factor de estequiometría que relaciona la concentración de histidinas fosforilables con respecto a la concentración total de enzima [E]. Este procedimiento tiene la ventaja de utilizar un método integral de determinación de las velocidades iniciales con mayor precisión<sup>254</sup>.

Para evaluar si DesK es capaz de utilizar GTP como sustrato, y dado que el sistema acoplado es capaz de utilizar GDP, realizamos ensayos de actividad siguiendo el mismo protocolo previamente detallado, sustituyendo ATP por GTP. Al no observar actividad de autofosforilación GTP dependiente, evaluamos si es capaz de actuar como un inhibidor competitivo, de forma de también estudiar la capacidad de unión a DesK. Para esto se realizaron ensayos de actividad en presencia de 0.5 mM ATP y el agregado de hasta 5 mM GTP como competidor.

## 6.8. Análisis de conservación de secuencia

Las secuencias de todos los reguladores de respuesta que presentan un dominio REC hacia el N-terminal y un HTH hacia el C-terminal fueron obtenidos a partir de la base de datos Pfam. Las secuencias fueron filtradas para eliminar secuencias con >90% de identidad, empleando el programa CD-HIT<sup>255</sup>. A continuación se modificó el formato para poder realizar búsquedas por BLASTp y las 500 secuencias con mayor puntuación fueron utilizadas para realizar un alineamiento en forma iterativa con el programa Muscle v3.6<sup>256</sup>. Las proteínas que introducían gaps muy grandes o que carecían de regiones funcionalmente relevantes fueron eliminadas en forma manual, resultando en una base de datos de 494 secuencias. El análisis de la conservación en los dominios DHp y ABD de DesK fue realizado por Martin Graña y la descripción del procedimiento se describe en detalle en el artículo adjunto en el Anexo<sup>257</sup>.

## 6.9. Estudios *in silico* de simulación de interacciones proteína:proteína

Los ensayos de *docking* fueron realizados utilizando el programa HADDOCK 2.0<sup>258,259</sup> que permite incorporar restricciones experimentales a los cálculos. Para los ensayos de asociación entre dominios se utilizaron las coordenadas atómicas del dominio DHp de DesK (residuos 176-242) obtenida a partir de DesKCH188E (PDB 3GIE, a excepción del Glu<sub>188</sub> que fue sustituido por una histidina en el rotámero más frecuente) y el dominio de unión al ATP a alta resolución (PDB 3EHG). La molécula de ATP y el ión Mg<sup>+2</sup> fueron tratados especialmente como un único residuo, definiendo enlaces y ángulos para mantener la geometría de coordinación del catión. Previo a los ensayos de *docking*, se generó diversidad estructural *in silico* en el ATP lid (residuos 326-334) y el extremo N-terminal (residuos 243-246) del modelo del ABD, mediante protocolos de templado simulado (*simulated annealing*) y dinámica molecular, utilizando el programa CNS 1.2<sup>260</sup>. Sabemos que estas regiones pueden adoptar distintas conformaciones, dependiendo del estado funcional de la proteína o de la unión de ADP, ATP o análogos no hidrolizables del ATP, algo que también ha sido reportado para otras HQs<sup>87,89</sup>. Mediante

un protocolo de calentamiento simulado a 3000°K con posterior enfriamiento lento hasta 300°K en 60 pasos (3.5 fs), se generaron 20 modelos con diferentes conformaciones en estas regiones. Estos protocolos permiten muestrear el espacio de interacción considerando cambios conformacionales inducidos por la interacción. Haddock admite el uso de restricciones experimentales, denominados AIR (*Ambiguous Interaction Restraints*), y en nuestros ensayos incluimos aquéllos que necesariamente deben ocurrir para obtener la conformación en que DesK puede catalizar la autofosforilación: 1) Ne de la His<sub>188</sub> del DHp del monómero A con el P $\gamma$  del ATP en el ABD y 2) el C de la cadena principal de la Lys<sub>242</sub> del monómero B con el N de la Gly<sub>243</sub> del ABD, restituyendo de esta forma el enlace peptídico entre ambos dominios. Estos AIR permiten realizar la búsqueda considerando un mecanismo *trans* de autofosforilación, sin embargo, también realizamos pruebas considerando un potencial mecanismo en *cis*, modificando únicamente el primer AIR: Ne de la His<sub>188</sub> del DHp del monómero B con el P $\gamma$  del ATP en el ABD. Inicialmente se realizaron varias pruebas modificando el estado de protonación de la His<sub>188</sub>, rotámeros alternativos, variaciones en las distancias y peso relativo de los AIR y también hicimos pruebas utilizando Ne o Nd de la His<sub>188</sub>, para asegurar la sensibilidad del método así como su robustez. Dado que no observamos diferencias entre los dos átomos de N de la histidina, se seleccionó el Ne como átomo que reacciona con el P $\gamma$  en función de varios reportes que sugieren que este es el átomo más probablemente fosforilado<sup>261-263</sup>. El protocolo de *docking* consistió en la generación de 3000 estructuras en el paso de minimización de energía en cuerpo rígido. Las mejores 300 fueron refinadas mediante un paso de reemplado simulado semi-flexible y luego un segundo refinamiento con solvente explícito. Los demás parámetros por defecto del programa no fueron modificados, así como tampoco se cambiaron las funciones de evaluación de los modelos generados. Una vez definidos estos parámetros de corrida, se realizaron los ensayos por cuadruplicado para asegurarnos la reproducibilidad y la robustez de los resultados. Este mismo protocolo fue realizado para evaluar la asociación entre estos dominios pero utilizando los DHp correspondientes a los estados fosfatasa (PDB 3EHH) y fosfotransferasa (PDB 3GIG). Los cálculos de desviación cuadrática media (rmsd) fueron determinados utilizando un script en VMD<sup>264</sup>, que consistió en la superposición de los C $\alpha$  de cada DHp con los C $\alpha$  del dominio DHp de la estructura con mejor puntuación, para luego realizar los cálculos de rmsd para los dominios ABD con respecto a la mejor estructura. El análisis de los datos se hizo con Origin v.8 (Originlab) y las estructuras visualizadas con PyMOL.

El modelado de los complejos DesKC-H188V/N136 y DesKC-H188E/N136 también fueron realizados por *docking* con el programa Haddock. En estos casos se usaron protocolos muy similares, partiendo de las coordenadas 3EHH, 3GIE y el modelo de N136 (resultados no publicados, no depo-

sitada aún en PDB), utilizando los AIR entre Nε de la His<sub>188</sub> de DesKC y Oδ1 del Asp<sub>54</sub> de DesR. En el caso de DesKC-H188V, los AIR fueron utilizados considerando la distancia al Cα del residuo V<sub>188</sub>, mientras que para DesKC-H188E, el residuo de Glu<sub>188</sub> fue sustituido por una histidina en su rotámero más frecuente. Se hicieron varias pruebas iniciales de las distancias a emplear, entre 5 y 14 Å, considerando las distancias observadas en los complejos HK853-RR468, Spo0B-Spo0F y YPD1-SLN1. Por otro lado, también se generó diversidad estructural en DesR\_N136 utilizando el protocolo Relax de Rosetta. 3.1<sup>265</sup>. Se seleccionaron las 20 mejores estructuras con mejor puntuación y para luego realizar los ensayos de docking.

## 6.10. Entrecruzamiento químico de proteínas

Durante el transcurso de este trabajo se realizaron dos tipos de experimento de entrecruzamiento: (1) búsqueda de condiciones para estabilizar el complejo DesKC-DesR usando compuestos inductores de entrecruzamiento inespecífico y (2) entrecruzamiento específico mediante la oxidación de cisteínas introducidas por ingeniería genética en posiciones especiales. El entrecruzamiento del complejo se realizó empleando dos tipos de reactivos DTSSP y NHS-EDC (Thermo Sci.). DTSSP es un reactivo que presenta grupos sulfo-NHS en el extremo de una cadena de carbonada, con una distancia de 12 Å, capaz de formar enlaces amida con aminos primarios a pH entre 7 y 9. En cambio, si bien la química de sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) y EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride) es similar, permite formar un enlace amida entre una amina primaria y un carboxilato. En este caso no presenta una cadena de carbonos separando grupos funcionales, por lo que reacciona cuando una lisina se encuentra a una distancia muy corta de un carboxilato proveniente de un aspártico o glutámico. La optimización de las reacciones de entrecruzamiento se realizaron modificando varios parámetros, como por ejemplo la concentraciones de proteínas, concentración de inductor de entrecruzamiento, temperatura, pH, tiempo y otros aditivos.

Los ensayos de entrecruzamiento específico entre los dominios DHp y ABD de DesK se realizaron mediante la oxidación y formación de disulfuros entre cisteínas ubicadas por mutagénesis dirigida en posiciones especiales. Las proteínas utilizadas fueron DesKC, DesKC-G192C+G334C, DesKC-Q193C+G334C, DesKC-S196C+G334C y DesKC-G225C+A259C. Las reacciones se realizaron incubando las proteínas a una concentración de 10µM a temperatura ambiente, en contacto con el aire. También se ensayaron procedimientos más rápidos buscando tener mayores niveles de rendimiento de complejos covalentes, pero estos resultaron ser demasiado desestabilizantes para las proteínas. Por ejemplo se probaron concentraciones variables de peróxido de hidrógeno (entre 10-100 µM)

y tratamientos con fenantrolina de cobre ( $\text{Cu[II]-[fenantrolina]}_3$ ) o batocuproína de cobre ( $\text{Cu[II]-[disulfonato de batocuproína]}_2$ ). En todos los casos las reacciones de oxidación fueron frenadas mediante incubación con 10 mM N-etilmaleimida y 1mM EDTA. Las reacciones fueron analizadas por SDS-PAGE. Las reacciones de oxidación por oxígeno molecular fueron las más específicas y por ende seleccionadas para el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, IPMontevideo). Las digestiones tríplicas fueron analizadas con y sin tratamiento previo de reducción con DTT, para identificar los péptidos involucrados en la formación del disulfuro.

### 6.11. Calorimetría de titulación isotérmica

Las titulaciones para estudiar las propiedades termodinámicas de las interacciones fueron realizadas en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal Inc., Nothampton, MA). Estos ensayos se efectuaron en colaboración con Gonzalo Obal, de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Las proteínas evaluadas fueron transferidas a la solución de trabajo con una columna de desalado (PD MiniTrap G25, GE Healthcare), en 20 mM Tris.HCl pH 8, 0.3 M NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; a excepción de la titulación de CoilP3 y DesR-N136 donde se usó una solución con 0.5 M NaCl. Las titulaciones fueron realizadas en presencia de 0.5 mM AMPPNP, dado que la estabilidad de las proteínas probó ser mayor en presencia de este ligando. Las proteínas fueron cuantificadas por determinación de la  $A_{280}$  utilizando el  $\epsilon_{280}$  teórico y degaseadas durante 10 min antes de realizar el experimento. Se chequeó la integridad de las mismas por SDS-PAGE, posteriormente a cada experimento. Las titulaciones se realizaron a 15 °C, consistiendo de una inyección inicial (1  $\mu\text{L}$ ) seguida por 25–30 inyecciones de 10  $\mu\text{L}$  de proteína (denominada ligando) sobre la celda conteniendo la contraparte molecular. El calor de dilución del ligando se determinó inyectando la misma solución de proteína usada para la titulación, sobre la celda con la solución de trabajo sin proteína, utilizando la misma secuencia de inyecciones. Los mutantes de DesKC evaluados fueron colocados en la celda de reacción (1.4 mL) mientras que DesR-N136 fue ubicada en la jeringa (entre 250 y 300  $\mu\text{L}$ ). En total fueron evaluados 5 complejos diferentes: N136-V188, DesR-V188, N136-CoilP3, N136-E188 y N136-WKV. Los datos adquiridos se analizaron con el programa MicroCal Origin versión 7 (MicroCal Software Inc.) previa corrección manual de la línea de base y sustracción del calor correspondiente a la dilución del ligando. El calor evolucionado por inyección se ajustó a un modelo de unión secuencial de dos sitios mediante ajuste no lineal de mínimos cuadrados realizando múltiples iteraciones hasta converger a un valor mínimo de  $\chi^2$ . La estequiometría de unión (N), la constante de asociación (Ka), y el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) se obtuvieron a partir del ajuste de la curva. Los valores correspondientes al cambio en

energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), y el cambio de entropía se calcularon a partir de la relación

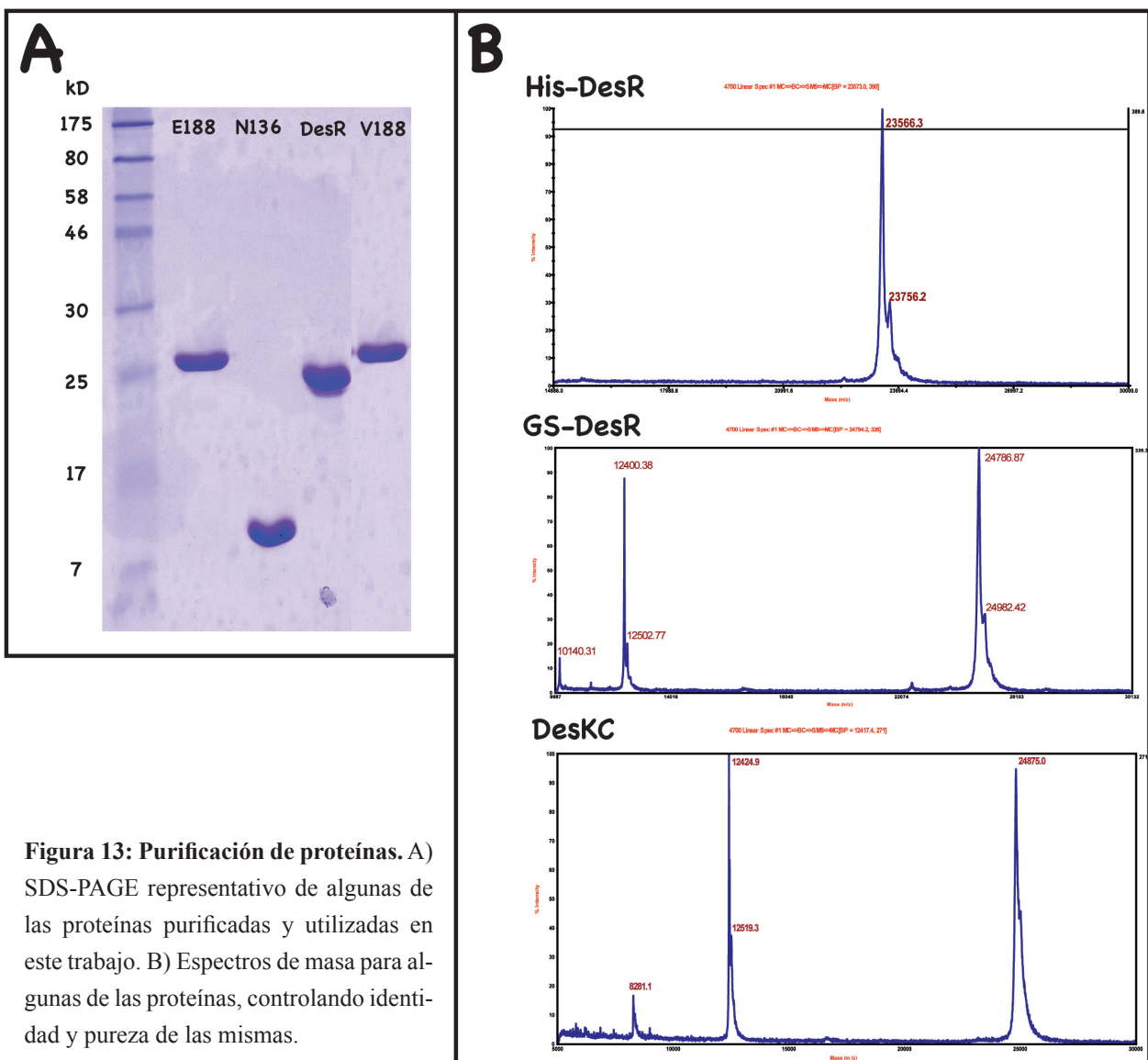
$$\Delta G = -RT \ln(Ka) = \Delta H - T\Delta S$$

donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Expresión y purificación de proteínas

La expresión y purificación de DesR, DesKC y mutantes puntuales fue realizado de acuerdo a protocolos reportados<sup>131,225</sup>, con algunas modificaciones que permitieron aumentar el rendimiento final. Por ejemplo, en las purificaciones de DesKC y los mutantes generados, para evitar la precipitación de una fracción importante de estas proteínas en la columna, fue necesario adicionar una concentración final de 10 % de glicerol a las soluciones de trabajo, aumentar el volumen de cama de la columna en relación a la cantidad de muestra sembrada y sembrar el extracto conteniendo una concentración final de imidazol de 100 mM. La pureza (>95%) e identidad de las proteínas fue evaluada mediante SDS-PAGE y espectrometría de masa (figura 13). El mutante DesKC-H188V ya disponible al inicio de este trabajo de Tesis<sup>131</sup>, se usó como modelo de la HQ incapaz de autofosforilarse, pero activo para desfosforilar DesR-P con igual eficiencia que la forma salvaje de DesKC. Se generó el mutante



**Figura 13: Purificación de proteínas.** A) SDS-PAGE representativo de algunas de las proteínas purificadas y utilizadas en este trabajo. B) Espectros de masa para algunas de las proteínas, controlando identidad y pureza de las mismas.

DesKC-H188E, en el que la sustitución de la His<sub>188</sub> por un glutámico mimetizara el estado fosforilado de DesKC. Las otras proteínas diseñadas a partir de los resultados obtenidos durante este trabajo (tabla I) fueron purificadas siguiendo esencialmente los mismos protocolos. En algunos casos las mutaciones produjeron un efecto desestabilizante sobre las proteínas, como por ejemplo en DesKC-L191C, DesKC-A184C o DesKC-CoilP2, provocando rendimientos más bajos.

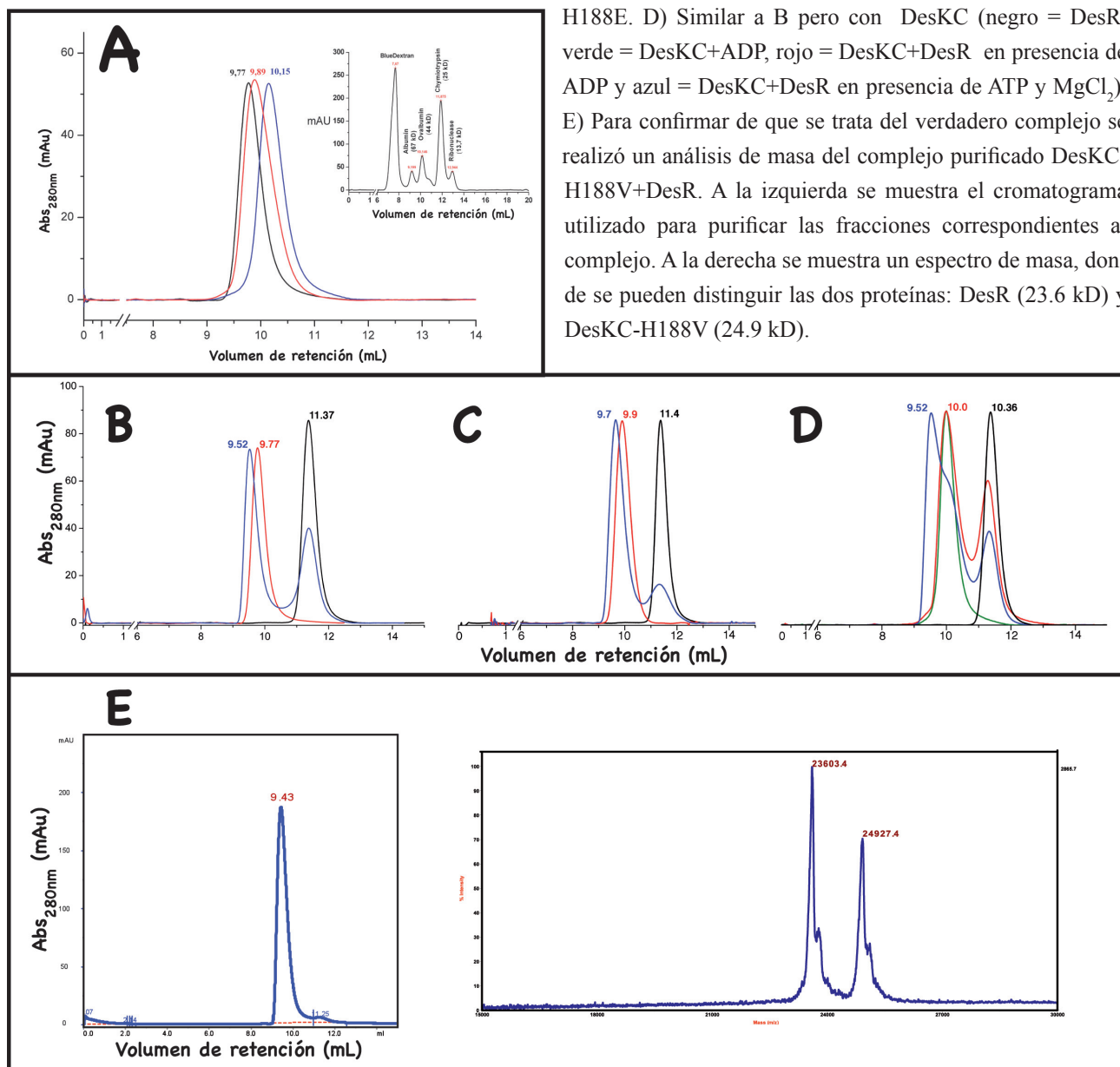
## 7.2. Análisis por cromatografía de exclusión molecular

El estudio comparativo por cromatografía analítica de exclusión molecular permitió observar diferencias reproducibles en los volúmenes de retención entre DesKC, DesKC-H188V y DesKC-H188E. Estas diferencias disminuyen con la autofosforilación de DesKC (figura 14). Para controlar el efecto específico debido a fosforilación, se verificó la ausencia de efecto detectable cuando las proteínas son preincubadas con ADP o AMP-PNP, en presencia de MgCl<sub>2</sub>. DesKC y los mutantes puntuales presentan un volumen de retención comparable a proteínas globulares de entre 45–53 kD, equivalente a un homodímero. Por el contrario, DesR presenta un volumen de retención semejante a una proteína globular de 27 kD (figura 14), algo inesperado en relación a reportes previos<sup>225</sup> que evocan un comportamiento como dímero en solución. DesKC y los mutantes puntuales sobre la His<sub>188</sub> mostraron tener un comportamiento diferencial en relación a su asociación con DesR. Los dos mutantes fueron capaces de formar un complejo con DesR dependiente de MgCl<sub>2</sub>, mientras que DesKC sólo fue capaz de formarlo si previamente es autofosforilada (figura 14). La formación del complejo fue confirmada por SDS-PAGE y espectrometría de masa de fracciones purificadas (figura 14E).

## 7.3. Estructuras del dominio ABD en complejo con ATP a alta resolución

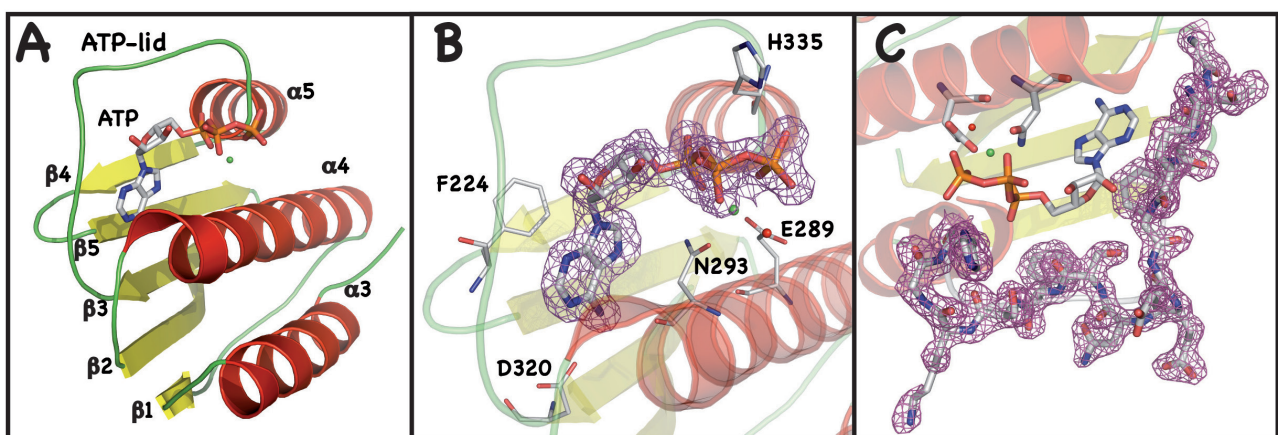
El primer objetivo cristalográfico de este proyecto se centró en reproducir los cristales de DesKC-H188V (obtenidos inicialmente en el la Unidad de Bioquímica Estructural, Inst Pasteur, Paris) en Montevideo, y en paralelo se lanzaron los rastreos de condiciones de cristalogénesis del complejo entre DesKC y DesR, como se describirá en detalle más adelante. En preparación a la cristalización del complejo, estudios por cromatografía de exclusión molecular condujeron a la búsqueda de condiciones con la construcción DesKC-H188V más DesR en presencia de ATP y MgCl<sub>2</sub>. Luego de ~15 días de incubación a 20°C, crecieron cristales muy birrefringentes que difractaban típicamente a alta resolución (>1.8Å). La celda del cristal resultó ser muy pequeña para albergar al complejo o incluso al dímero de DesKC-H188V. Inicialmente consideramos la hipótesis de la cristalización de DesR entera, aunque los intentos por resolver la estructura por reemplazo molecular utilizando como

**Figura 14: Cromatografía de exclusión molecular comparando distintos estados conformacionales de DesKC.** A) DesKC-H188V (línea negra) presenta un volumen de retención mayor a DesKC (preincubado con ADP, línea azul), pero esta diferencia disminuye al preincubar DesKC con ATP y  $MgCl_2$  (línea roja). En el recuadro interior se muestra una calibración de la columna S75 10/300 (GE Healthcare) usando una mezcla de proteínas globulares. Para mayor claridad, se aplicó un factor de corrección sobre la amplitud de los picos a los fines de comparar los volúmenes de retención con precisión B) Formación del complejo entre DesKC-H188V y DesR. Las curvas corresponden a DesKC-H188V+ADP (roja), DesR (negra) y DesKC-H188V+DesR 1:1 en presencia de ADP (azul). C) Similar a B pero con el mutante DesKC-H188E. D) Similar a B pero con DesKC (negro = DesR, verde = DesKC+ADP, rojo = DesKC+DesR en presencia de ADP y azul = DesKC+DesR en presencia de ATP y  $MgCl_2$ ). E) Para confirmar de que se trata del verdadero complejo se realizó un análisis de masa del complejo purificado DesKC-H188V+DesR. A la izquierda se muestra el cromatograma utilizado para purificar las fracciones correspondientes al complejo. A la derecha se muestra un espectro de masa, donde se pueden distinguir las dos proteínas: DesR (23.6 kD) y DesKC-H188V (24.9 kD).



sonda de búsqueda a NarL (1RNL) u otros RRs similares fueron infructuosos. Mediante el método de soaking rápido con yoduro de sodio<sup>266</sup> se obtuvieron fases experimentales por SAD (*Single wavelength Anomalous Diffraction*) colectando datos redundantes con el ánodo de Cu de nuestro laboratorio (tabla IV). Por métodos directos se determinaron fácilmente las posiciones de 5 yoduros (I), y luego de realizar el refinamiento en la posición, factores B y ocupancia, fue posible ubicar 7 átomos más. La ambigüedad de fases fue resuelta utilizando algoritmos de modificación de densidad. El mapa de densidad electrónica fue de excelente calidad, permitiendo identificar que la estructura

correspondía al dominio ABD de DesK, pudiendo construir más del 95% del modelo en forma automatizada, utilizando Arp/wArp<sup>242</sup>. Luego se realizaron correcciones locales del modelo en forma manual empleando Coot<sup>267</sup> y refinamiento restringido en Refmac<sup>244</sup>. Este resultado puso en evidencia la presencia de una actividad proteolítica en las condiciones de cristalización, que sin embargo no fue eliminada cambiando las soluciones utilizadas, pudiéndose reproducir el fenómeno siguiendo el protocolo, lo que sugiere que la presencia del RR facilita de algún modo el proceso. El modelo final del ABD comprende a todos los residuos entre las posiciones 243 y 367 de DesK en complejo con una molécula de ATP y un catión  $Mg^{+2}$  a una resolución final de 1.8 Å. Es un dominio globular, y como se observa en la figura 15A esta compuesto por una hoja  $\beta$  de 5 hebras ( $\beta 1$  a  $\beta 5$ ) asociado a 3 hélices  $\alpha$  ( $\alpha 3$ – $\alpha 5$ , considerando la numeración de  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del DHp). La presencia de ATP resultó ser fundamental para la obtención de cristales, ya que no se formaron al sustituirlo por AMP-PCP o ADP, quizás correspondiente a una actividad proteolítica ATP-dependiente. Con el objetivo de determinar si existen cambios conformacionales dependientes del nucleótido acomplejado, se realizaron varias pruebas de sustitución incubando los cristales en soluciones conteniendo ADP y  $CaCl_2$  (o  $MgCl_2$ ). Sin embargo, estas pruebas de competencia resultaron ineficientes, ya que al refinar la ocupancia del ATP/ADP, nunca fue posible obtener una proporción mayor al 50% de los sitios ocupados por ADP. Por otro lado, también es de interés obtener una estructura del ABD en ausencia de ligandos<sup>175,268</sup>. La incubación de los cristales en una solución de cristalización con 5mM EDTA, provocó sin embargo la disolución inmediata de los mismos, consistente con una función estructurante de la asociación del nucleótido, que ha sido descripto para otras HQs<sup>269</sup>.



**Figura 15: Estructura del dominio de unión al ATP en complejo con su sustrato natural.** A) Representación esquemática de la estructura del ABD. Las hélices  $\alpha$  están coloreadas en rojo, las hébras  $\beta$  en amarillo y los bucles en verde. B) Mapa de densidad electrónica  $2mF_{obs} - DF_{calc}$  del ATP (contorneado a  $1\sigma$ ), permitiendo observar claramente todo el nucleótido. En representación de barras se identifican residuos clave que interactúan con el ligando. C) Mapa de densidad electrónica  $2mF_{obs} - DF_{calc}$  ( $1\sigma$ ) del *ATP lid*. Nótese que la totalidad del bucle está claramente definida.

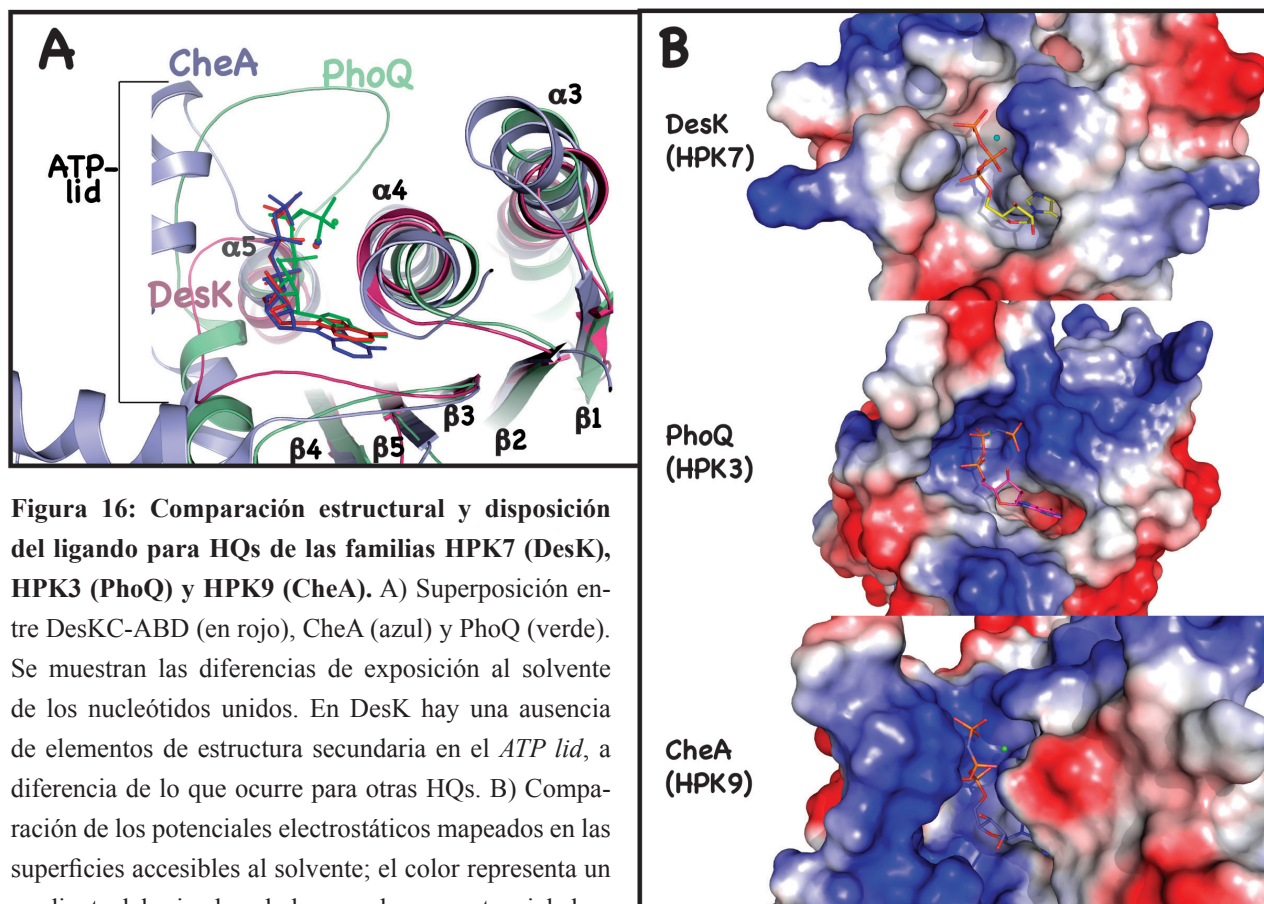
La actividad ATPasa intrínseca de la mayoría de las HQs probablemente sea la causa de la carencia de estructuras en complejo con su sustrato nucleotídico natural, incluso utilizando análogos como el AMP-PNP, se ha reportado la identificación de una forma hidrolizada del mismo unido en el sitio específico del ABD<sup>89</sup>. Hasta donde llega nuestro conocimiento la estructura DesKC-ABD representa así la primera a ser reportada en complejo con su sustrato natural y la densidad electrónica del ATP se define para toda la molécula (figura 15B), así como también para todo el *ATP lid* (figura 15C), algo que, como se desarrollará en secciones subsiguientes, no vemos en otras estructuras de DesK.

Tabla IV: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para la estructura DesKC-ABD en complejo con ATP y Mg<sup>+2</sup>

	<b>DesKC-ABD</b>
Grupo de espacio	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Longitud de onda (Å)	1.5418 Å
Resolución de los datos (Å)	22-1.73 (1.82-1.73)
Reflexiones medidas	81259
Multiplicidad	4.8 (4.6)
Completitud (%)	97 (84.5)
R <sub>meas</sub> (%)	9.7 (63.1)
<I/σ(I)>	15.8 (2.7)
a b c (Å)	40.38 49.07 81.4
FOM de reflexiones acéntricas antes de la modificación de densidad	0.322 (0.357 en la capa 2.68-2.56Å)
Poder de faseo anómalo	1.079 (1.095 en la capa 2.82-2.68Å)
Correlación de  E  <sup>2</sup> después de inversión de solvente (máx resolución usada)	0.83 (2.1 Å)
Resolución de refinamiento (Å)	20-1.8
R <sub>cris</sub> [N° refs]	0.162 [14616]
R <sub>free</sub> [N° refs]	0.211 [777]
rmsd (enlaces/ángulos)	0.018 Å / 1.8°
Átomos de proteína (excluyendo hidrógenos)	1004
Átomos de agua	185
Átomos de ligando	31 (ATP) / 12 (I <sup>-</sup> ) / 1 (Mg <sup>+2</sup> )
N° de residuos en regiones del gráfico de Ramachandran (permitido/no permitido)	114 / 2
PDB ID	3EHG

Una búsqueda en el servidor de Dali permitió confirmar que el plegamiento de este dominio es estructuralmente muy similar a proteínas de la superfamilia de ATPasas lentas GHL (tabla V), que incluyen otras HQ como CheA (1I59), TM0853 (2C2A), PhoQ (1ID0), KinB (3D36), PrrB (1YS3), NtrB (1R62), pero también el factor anti-F SpoIIAB (1TID y 1TIL) y diferentes quinasas de dehi-

drogenas mitocondriales (1GKZ y 2BU8). La comparación estructural del ABD de DesK (HPK7) con otras subfamilias de HQ, como KinB (HPK1), EnvZ (HPK2), PhoQ (HPK3), NtrB (HPK4) y CheA (HPK9) revela interesantes diferencias, ya que DesK presenta un dominio más pequeño con un bolsillo de unión a ATP menos profundo, con lo que el ATP se encuentra más expuesto al solvente (figura 16).



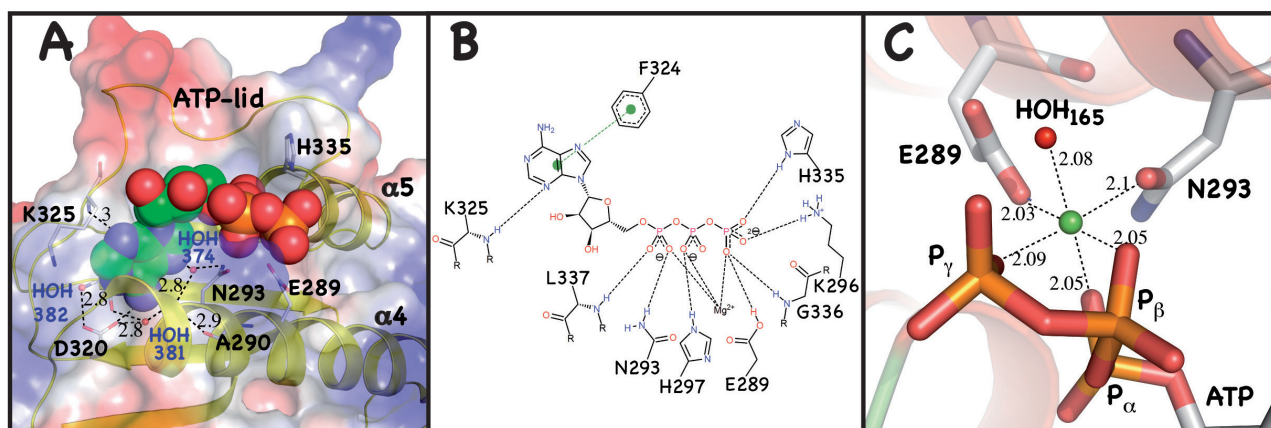
**Figura 16: Comparación estructural y disposición del ligando para HQs de las familias HPK7 (DesK), HPK3 (PhoQ) y HPK9 (CheA).** A) Superposición entre DesK-ABD (en rojo), CheA (azul) y PhoQ (verde). Se muestran las diferencias de exposición al solvente de los nucleótidos unidos. En DesK hay una ausencia de elementos de estructura secundaria en el *ATP lid*, a diferencia de lo que ocurre para otras HQs. B) Comparación de los potenciales electrostáticos mapeados en las superficies accesibles al solvente; el color representa un gradiente del rojo al azul, de acuerdo a un potencial electrostático de negativo a positivo. La familia HPK7 presenta un hendidura menos profunda, principalmente debido al menor tamaño de su *ATP lid*. Por otro lado, es posible notar que el parche básico alrededor de los fosfatos del ATP es menos pronunciado en DesK.

La unión del ATP involucra el enterramiento del anillo de adenina en un bolsillo, interactuando por apilamiento con la Phe<sub>324</sub>, mientras que el resto de la molécula queda expuesta al solvente (figura 17A). En la figura 17B se muestra un esquema de contactos entre la molécula de ATP y residuos clave que forman el bolsillo y posicionan correctamente al ligando. El Asp<sub>320</sub> se encuentra muy conservado en las HQs y forma un puente de hidrógeno con el amino N6 de la base de adenina y con el N de la cadena principal de la Gly<sub>322</sub>. Estas interacciones impedirían la unión de GTP, posibilidad eventual en función de reportes en otras HQs<sup>270</sup>. Además se forma una red de moléculas de aguas estructurales que estabilizan el complejo mediante enlaces de hidrógeno, actuando como puentes con distintos residuos de la proteína. Por ejemplo, las moléculas HOH<sub>373</sub>, HOH<sub>374</sub>, HOH<sub>381</sub> y HOH<sub>382</sub>, se ubican en

Tabla V: Resultados de Dali para la estructura del ABD de Desk

PDB	Z-score	RMSD	lali	nres	%id	Resolución (Å)	Descripción del PDB	Glu289	Asn293	Lys296	His297	His335
1i59	13.8	2.3	119	180	24	1.80	CHEMOTAXIS PROTEIN CHEA	His405	Asn409	Asp412? Arg408?	His413	Arg503?
2c2a	13.7	2.5	121	240	21	1.90	SENSOR HISTIDINE KINASE	Asn376	Asn380	Lys383	Tyr384	?
1ysr	13.7	2.6	119	137	18	1.78	SENSOR-TYPE HISTIDINE KINASE PRRB	Asn349	Asn353	Lys356	His357	Arg396?
1gkz	13.1	2.5	119	316	16	2.20	3-METHYL-2-OXOBUTANOATE DEHYDROGENASE	Glu285	Asn249	Arg252		?
1id0	12.9	2.6	118	146	18	1.60	PHOQ HISTIDINE KINASE	Asn385	Asn389	Lys392	Tyr393	Arg434
3d2r	12.8	2.6	119	362	16	2.03	PYRUVATE DEHYDROGENASE [LIPOAMIDE] KINASE	Glu254	Asn258	Arg261		?
2bu8	12.7	2.6	119	359	18	2.50	PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE ISOENZYM E 2	Glu243	Asn247	Arg250		?
3d36	12.4	2.4	119	221	16	2.03	SPORULATION KINASE B	Asn320	Asn324	Glu327	Ala328	?
1r62	12.3	2.5	111	136	14	1.60	NITROGEN REGULATION PROTEIN NR(II)	Asn244	Asn248	Gln251	Ala252	?
3cgz	11.5	2.9	112	143	17	1.90	VIRULENCE SENSOR HISTIDINE KINASE PHOQ	Asn386	Asn390	Lys393		His423?
1til	10.6	2.2	98	141	18	2.70	ANTI-SIGMA F FACTOR	Glu46	Asn50	Arg105?		Arg105?
2ftk	9.4	2.8	106	182	8	3.05	SPORULATION INITIATION PHOSPHOTRANSFERASE B	Lys716	Leu720	Gln723		?
1mx0	6.3	2.3	88	461	17	2.30	TYPE II DNA TOPOISOMERASE VI SUBUNIT B	Glu38	Asn42	Asp45		?

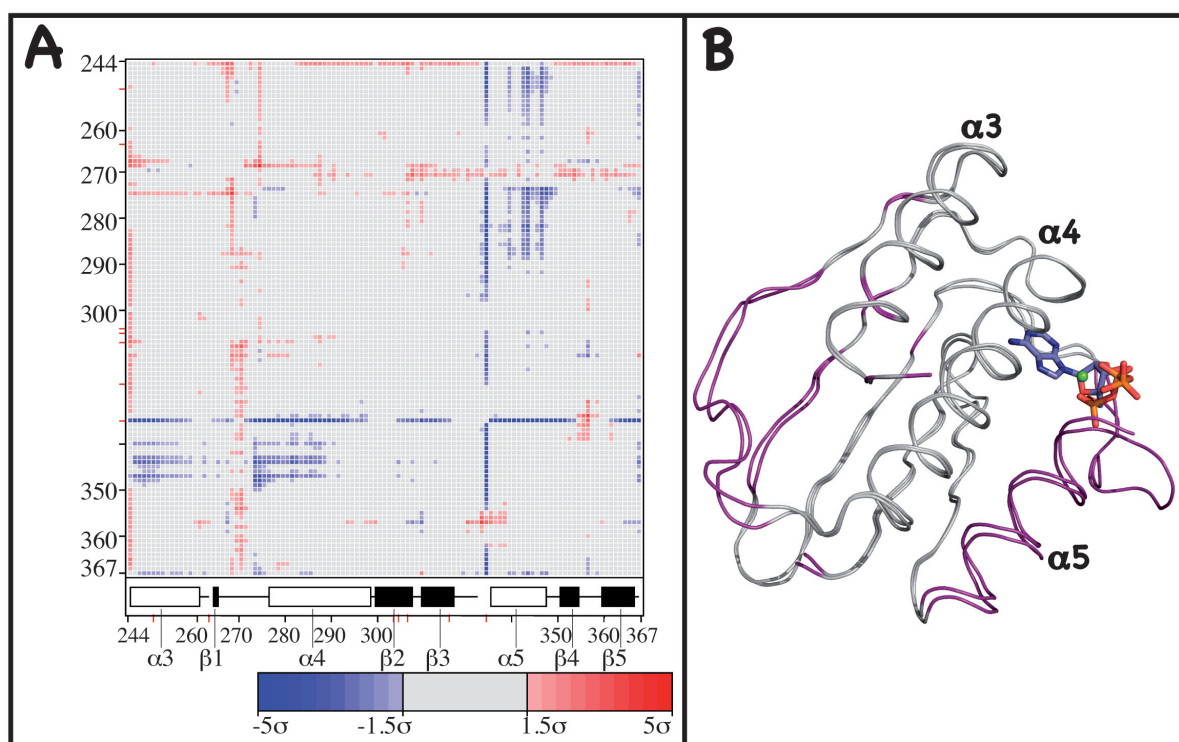
la parte más profunda del bolsillo, formando contactos con los residuos Asp<sub>320</sub>, Thr<sub>359</sub>, Gly<sub>322</sub>, Ala<sub>290</sub> y Asn<sub>293</sub> y la adenina del ATP. Por otro lado, el bucle entre los residuos 321 y 334, denominado “tapa del ATP” (en inglés “ATP lid”), a pesar de presentar un factor B promedio algo mayor que el resto de la proteína, muestra densidad electrónica clara que permitió su modelización sin ambigüedad. El ATP lid contribuye además con un puente de hidrógeno entre el N de la cadena principal de la Lys<sub>325</sub> y el N3 de la adenina. Otros residuos importantes en la interacción con el ATP son la Lys<sub>296</sub>, His<sub>297</sub>, Glu<sub>289</sub>, His<sub>335</sub> y la Gly<sub>336</sub>. El catión Mg<sup>2+</sup> se encuentra coordinado de forma octaédrica (figura 17C) con 3 oxígenos de los fosfatos del ATP (O1A, O2B y O3G), el OE2 del Glu<sub>289</sub>, el OD1 de Asn<sub>293</sub> y una molécula de agua (HOH<sub>165</sub>). Esta molécula de agua podría tener un papel catalítico, actuando como dador de protones al fosfato  $\gamma$  al ocurrir la transferencia del mismo. La secuencia de aminoácidos denominada motivo N, contiene a los residuos Glu<sub>289</sub> y Asn<sub>293</sub>, ambos involucrados en la coordinación del Mg<sup>2+</sup>, y que también forman puentes de hidrógeno con oxígenos de los fosfatos del ATP. El motivo G1 está conservado, incluyendo la secuencia consenso Asp<sub>320</sub>-Asp/Asn-Gly<sub>322</sub>, que participa de la interacción con el anillo de adenina. Por otro lado, el motivo G2, que no se encuentra muy conservado (Gly<sub>336</sub>-X-X-Gly<sub>339</sub>), se ubica justo a continuación del ATP lid y realiza contactos con los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  del ATP.



**Figura 17: Detalles estructurales de la interacción con el ATP.** A) Superficie accesible al solvente de DesK-ABD, la molécula de ATP se representa como esferas de van der Waals. Los residuos clave en la interacción están en barras y las moléculas de agua estructurales como pequeñas esferas rojas. La superficie esta coloreada de acuerdo al potencial electrostático (rojo = negativo y azul = positivo). Los números corresponden a distancias en Å. B) Esquema de las interacciones entre la proteína y la molécula de ATP. C) Primer plano del sitio de coordinación del Mg<sup>2+</sup>. La coordinación de este metal es octaédrica, estando las valencias ocupadas por los oxígenos de los tres fosfatos del ATP, de las cadenas laterales de los residuos Glu<sub>289</sub> y Asn<sub>293</sub> y de la molécula de agua HOH<sub>165</sub>.

Con el objeto de visualizar eventuales cambios conformacionales disparados por el nucleósido trifosfato (en comparación con el difosfato o con la proteína libre de nucleótido) se intentó obtener la estructura del ABD en complejo con ADP. Se observó que estos cristales sólo aparecen con ATP, por lo que se buscó intercambiar los nucleótidos sobre los cristales con ATP. El agregado de EDTA a estos

efectos (quelar el  $Mg^{2+}$  para liberar el ATP) resultó en la disolución inmediata de los cristales, por lo que se intentó sustituir el ATP por competición con ADP en exceso. Efectivamente se consigue un reemplazo parcial, pero la ocupancia del difosfato no fue nunca superior al 50%, imposibilitando el análisis inequívoco de las conformaciones alternativas. Como última variante para este análisis, se terminó comparando DesKC-ABD en complejo con ATP con los dominios ABD de DesKC-H188V asociado a ADP (V188a, depositada en la PDB bajo el código 3EHH que estaba disponible al comenzar este trabajo de Tesis), utilizando el programa Escet<sup>249,250</sup>. Este programa permite tener en cuenta los errores estimados en las coordenadas de los dos modelos en comparación, y determinar así cambios estructurales estadísticamente significativos entre ambos calculando diferencias ponderadas en las matrices de distancias. La comparación con un umbral de  $2.5\sigma$  ( $\sigma$  es la incertidumbre estimada de la distancia entre dos átomos) permite considerar a la mayoría del dominio ABD como estructuralmente rígido, a excepción del *ATP lid* (que en 3EHH no se pudo modelizar completo pues tiene regiones no visibles) y la hélice  $\alpha 5$  que se ubica a continuación de este bucle (figura 18). En el extremo de la hélice  $\alpha 5$  se ubican la Leu<sub>337</sub>, Gly<sub>336</sub> e His<sub>335</sub> que forman contactos con los fosfatos  $\alpha$  y  $\gamma$  del



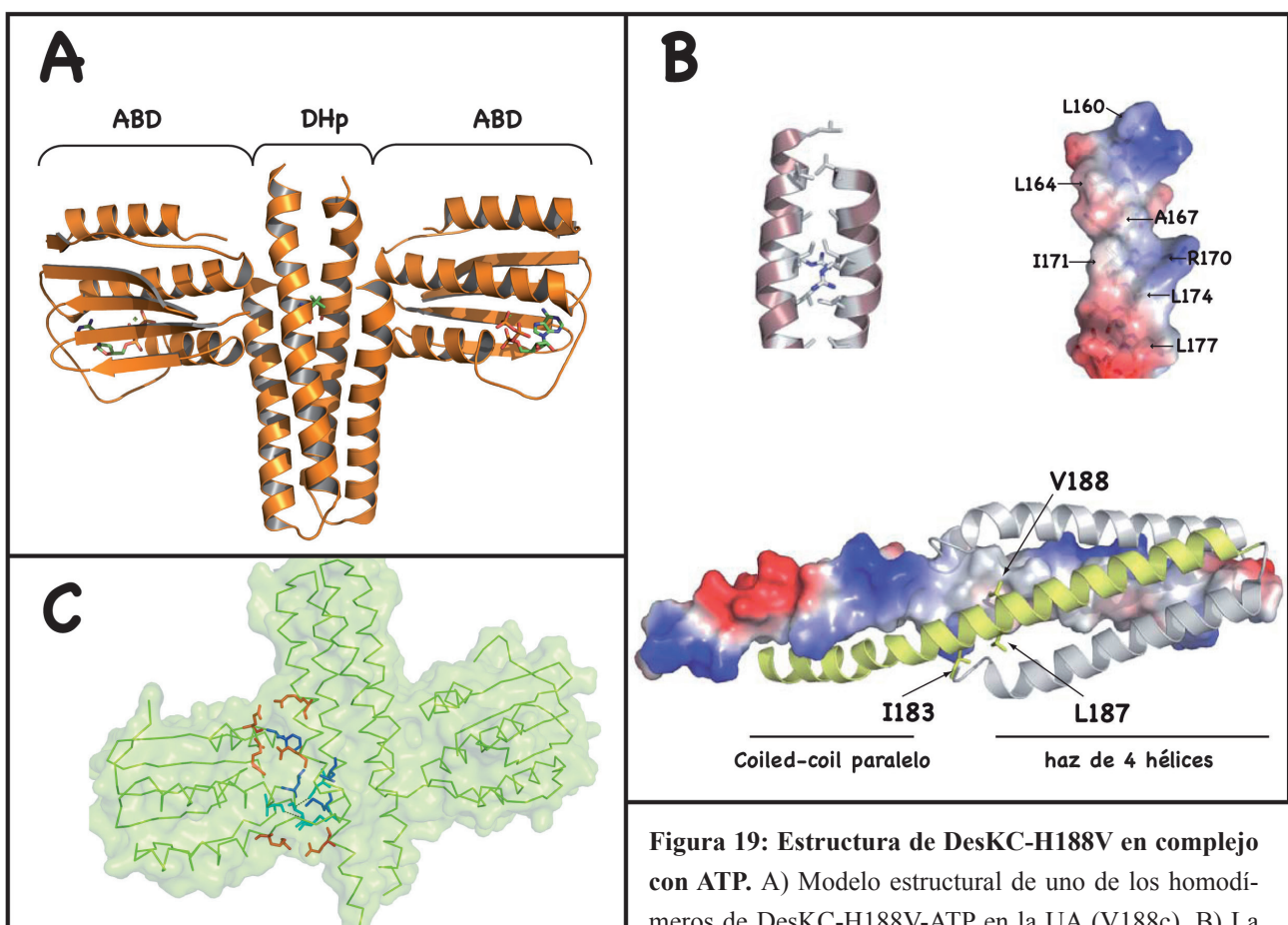
**Figura 18: Comparación estructural del dominio ABD en complejo con ATP o ADP realizado con Escet. A)** Matriz de diferencia de distancias, escalada por errores, resultante de la comparación entre 3EHG a 1.8 Å (con ATP) y 3EHH a 2.1 Å (con ADP). Los ejes corresponden a los residuos entre 243 y 367 y los cambios estructurales menores a  $2.5\sigma$  presentan un color gris, mientras que en rojo y azul se representan respectivamente, las expansiones y contracciones significativas. Además se muestran las regiones correspondientes a las hélices  $\alpha$  (cajas vacías) y hébras  $\beta$  (cajas negras) en el eje de las abscisas. B) Superposición de los dos modelos comparados en A utilizando los Ca de las regiones conformacionalmente invariantes a un nivel de  $2.5\sigma$  (gris). Las regiones que cambiaron significativamente están identificadas en violeta (incluyendo expansión y contracción).

ATP. Esta región fue la que presentó los cambios más importantes en las coordenadas atómicas y el mismo resultado se obtuvo al comparar con otra estructura de la región citoplasmática en complejo con ADP que fue resuelta posteriormente (E188a, PDB ID 3GIE). Como luego se describirá, 3GIE presenta diferencias en la asociación entre los dominios DHp-ABD así como en el empaquetamiento cristalino en relación a 3EHH, sugiriendo que los cambios estructurales evidenciados con Escet están disparados directamente por la unión a ATP.

#### 7.4. Estructuras de mutantes de DesKC en el estado fosfatasa

A continuación se buscó resolver la estructura de DesKC-H188V en complejo con ATP, con el objetivo determinar si en presencia del sustrato natural la conformación de V188a se ve afectada. Para reproducir los cristales previos las condiciones debieron ser levemente modificadas, particularmente sustituyendo el  $\text{CaCl}_2$  por  $\text{MgCl}_2$ , demostrando un rol importante del catión en el posicionamiento preciso del nucleótido. Así, los cristales de DesKC-H188V en complejo con ATP- $\text{Mg}^{2+}$  difractaron típicamente a 2.8 Å de resolución, y pertenecen al grupo de espacio  $P2_1$ . La estructura fue resuelta mediante reemplazo molecular utilizando como sondas de búsqueda a las coordenadas del dominio DHp de DesKC-V188 (3EHH) y el ABD a alta resolución (3EHG) por separado, con el programa Phaser<sup>238</sup>. La unidad asimétrica (UA) del cristal presenta un dímero y la comparación con las estructuras del mismo mutante 3EHH y 3EHF no revelaron grandes diferencias, a excepción de pequeños movimientos de los ABD en relación al DHp. Posteriormente, fue posible optimizar incluso una nueva condición de cristalización para DesKC-H188V en complejo con ATP, en ausencia de cationes divalentes. La inclusión de KCl resultó fundamental para la formación de estos cristales. Estos pequeños cristales crecieron en el grupo de espacio  $P2_1$ , y difractaron a 3.5 Å (V188c, tabla VI). La UA contiene dos dímeros, cuya conformación es similar a la de los dímeros previamente resueltos (figura 19). Todas las estructuras resueltas del mutante DesKC-H188V presentan así un dominio de dimerización central (DHp) conformado por un *coiled-coil* antiparalelo de cuatro hélices  $\alpha$ , que se disponen como un haz de hélices (*4 helix bundle*) característico de las HQS<sup>85,89</sup>. Cada monómero contribuye con dos hélices ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) y el haz se estabiliza por 8 capas de residuos hidrofóbicos dirigidos hacia el interior del mismo, residuos que conforman 4 héptadas de *coiled-coil*. El sitio de fosforilación, ocupado en estos mutantes por la Val<sub>188</sub>, se encuentra hacia el interior hidrofóbico del DHp (figura 19C), por lo que es pertinente preguntarse si en presencia de una histidina esta conformación podría ser accesible. La sustitución *in silico* de esta valina por una histidina, teniendo en cuenta rotámeros frecuentes de His, permite acomodar el nuevo residuo implicando sólo cambios menores de las cadenas laterales de residuos circundantes. La histidina quedaría sólo parcialmente expuesta al solvente, sugiriendo

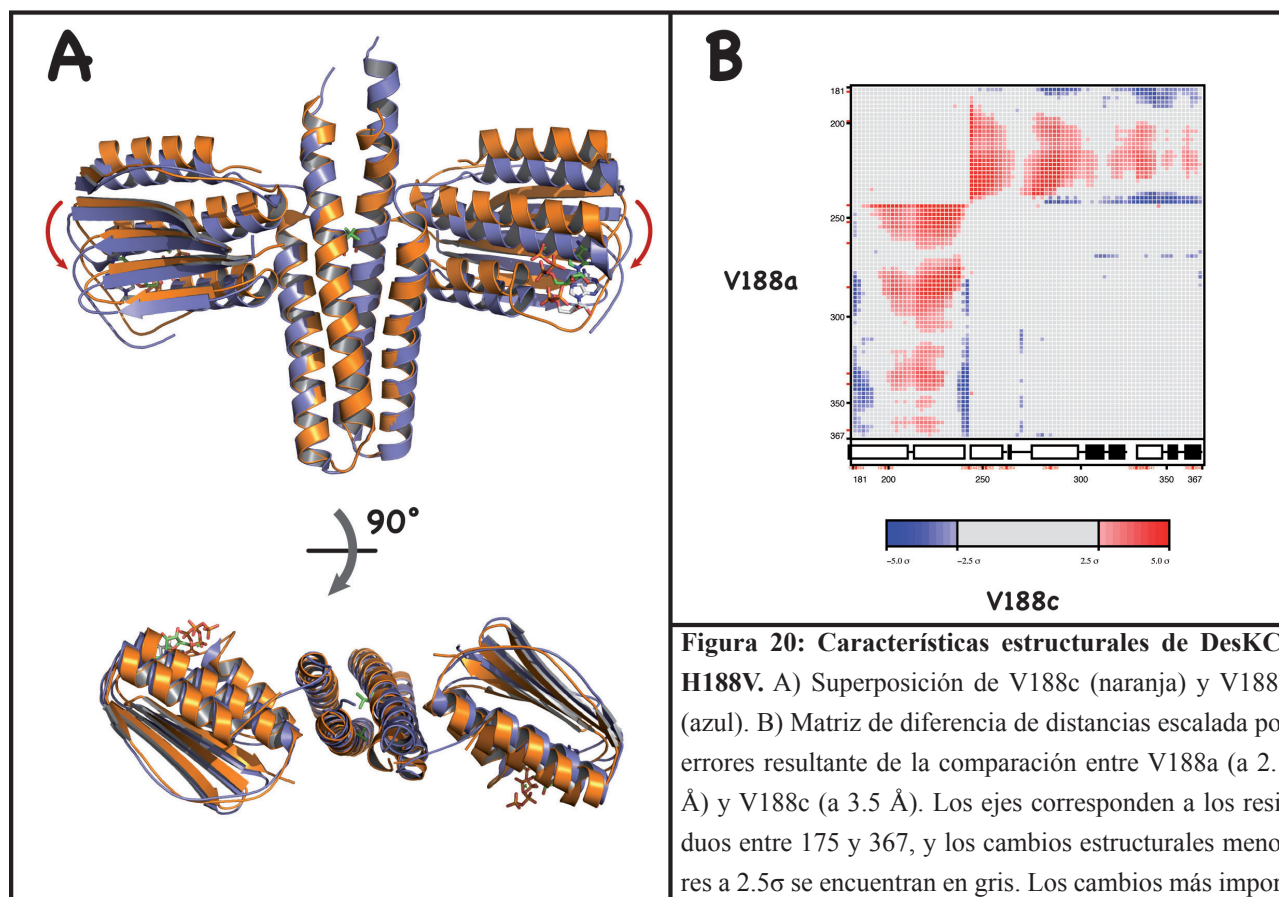
que esta conformación es posible, pero forzando un enterramiento parcial de una cadena lateral polar hacia el núcleo hidrofóbico central del *coiled-coil*. En esta estructura es posible observar una extensión del DHP en un *coiled-coil* N-terminal de las dos hélices  $\alpha$ 1, formado por 5 niveles de residuos hidrofóbicos, que representan 3 héptadas adicionales (figura 19B). Por otro lado, los dominios ABD se disponen a ambos lados del DHP interaccionando a través de una extensa superficie de 1100–1200 Å<sup>2</sup> (figura 19). Es importante resaltar que el empaquetamiento cristalino entre todas las estructuras resueltas de DesKC-H188V es muy similar, a pesar de las diferencias en las dimensiones de celda o grupo de espacio. La comparación entre las estructuras de DesKC-H188V usando Escet, no permiten identificar diferencias significativas entre los dominios ABD, a pesar de que algunos están asociados a distintos ligandos (aunque la resolución de los datos es en algunos casos muy baja, agregando figuras elevadas de incerteza en las coordenadas). Sin embargo, al comparar los homodímeros V188a y V188c (figura 20) es posible observar que existen diferencias significativas en la disposición de los ABD con respecto al DHP. El cambio más importante ocurre en una dirección particular y esto se ob-



**Figura 19: Estructura de DesKC-H188V en complejo con ATP.** A) Modelo estructural de uno de los homodímeros de DesKC-H188V-ATP en la UA (V188c). B) La región que conecta el dominio transmembrana sensora con el DHP adopta una estructura de tipo *coiled-coil* paralelo de dos hélices  $\alpha$ . En la imagen se puede observar cómo ciertos residuos hidrofóbicos se disponen hacia el interior, estabilizando el empaquetamiento de las hélices. C) Extensa superficie de asociación entre los dominios DHP y ABD en las estructuras de DesKC-H188V (se ilustra para el caso de V188a de mayor resolución). Los residuos clave que realizan contactos están señalados en barras y coloreados de acuerdo al tipo de interacción (rojo = electrostática, azul = hidrofóbica y verde = puente de hidrógeno).

de los dominios DHP y ABD en las estructuras de DesKC-H188V (se ilustra para el caso de V188a de mayor resolución). Los residuos clave que realizan contactos están señalados en barras y coloreados de acuerdo al tipo de interacción (rojo = electrostática, azul = hidrofóbica y verde = puente de hidrógeno).

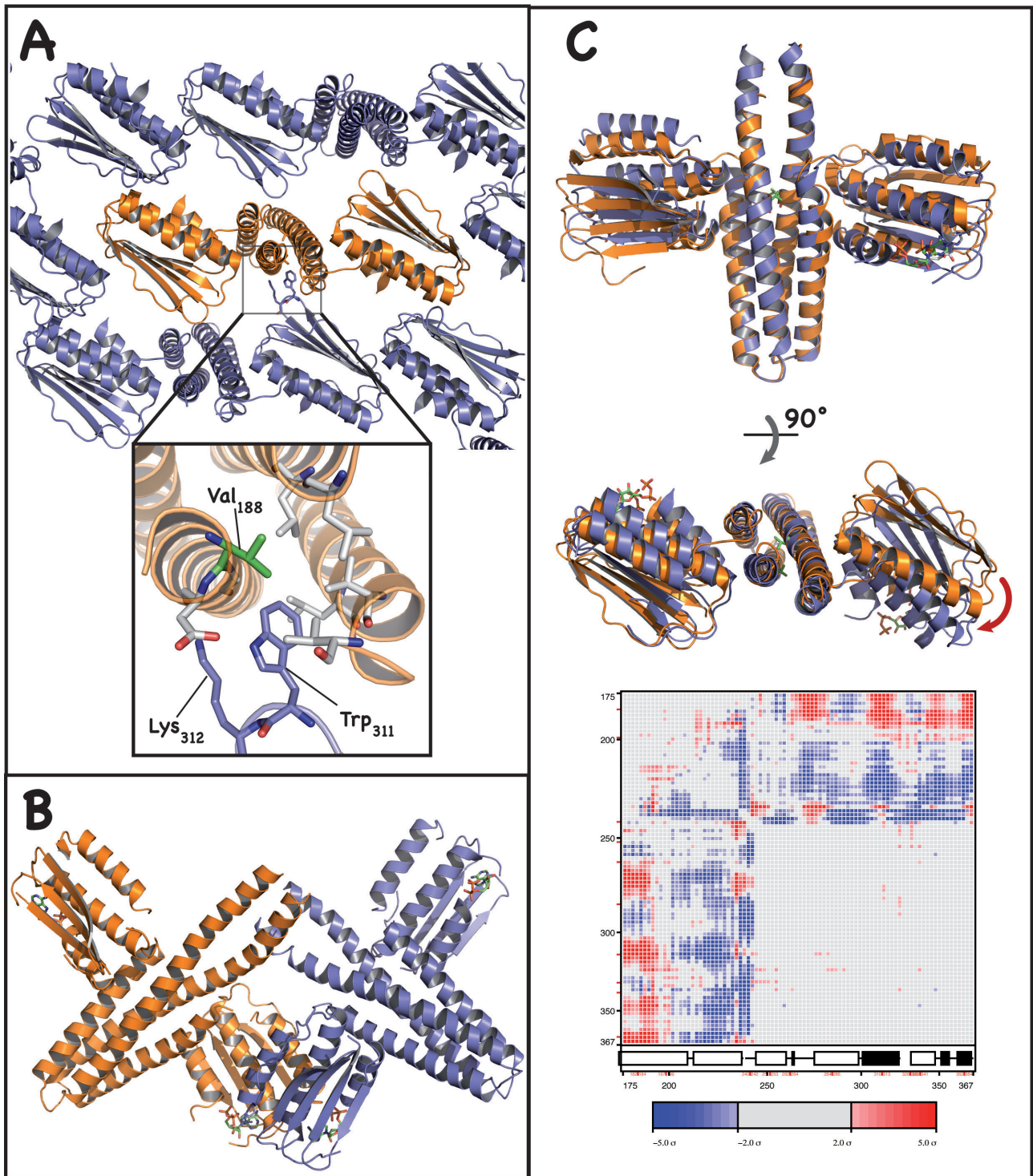
serva en los cuatro monómeros presentes en la UA de V188c. A pesar de estos cambios, los residuos involucrados en la asociación DHp-ABD se mantienen en todas las estructuras. En la figura 19C se muestran los residuos que participan de esta interacción, considerando para este análisis la estructura de DesKC-H188V en complejo con ADP (3EHH), que es la de mayor resolución. La interacción DHp-ABD está definida por contactos hidrofóbicos (Ile<sub>183</sub>, Leu<sub>187</sub> y Ile<sub>237</sub> en el DHp y Leu<sub>278</sub> y Phe<sub>346</sub> en el ABD), dos enlaces de H (Lys<sub>194</sub>-NZ:Phe<sub>346</sub>-O y Asp<sub>186</sub>-OD2:Leu<sub>278</sub>-N) y tres puentes salinos (Arg<sub>228</sub>:Glu<sub>342</sub>, Glu<sub>233</sub>:Arg<sub>343</sub> y Glu<sub>179</sub>:Arg<sub>245</sub>). La mayoría de estos contactos se conservan en V188c, aunque algunas cadenas laterales no presentan densidad electrónica bien definida (por ej la Arg<sub>343</sub>).



**Figura 20: Características estructurales de DesKC-H188V.** A) Superposición de V188c (naranja) y V188a (azul). B) Matriz de diferencia de distancias escalada por errores resultante de la comparación entre V188a (a 2.1 Å) y V188c (a 3.5 Å). Los ejes corresponden a los residuos entre 175 y 367, y los cambios estructurales menores a  $2.5\sigma$  se encuentran en gris. Los cambios más importantes involucran expansiones entre el DHp y el ABD.

En función de la gran similitud en el empaquetamiento cristalino de todas las estructuras de DesKC-H188V se decidió obtener evidencia directa a partir de formas cristalinas diferentes. Para ello se generó una nueva construcción sustituyendo los residuos Trp<sub>311</sub> y Lys<sub>312</sub> por una glicina y una serina, respectivamente. Estos residuos establecen importantes contactos cristalinos en las formas anteriores, directamente en la interacción con moléculas vecinas del cristal, y están ubicados en regiones que no parecen implicar cambios en la unión de ATP. En todas las estructuras previas de DesKC-H188V, el Trp<sub>311</sub> se dispone hacia el sitio donde se ubica la Val<sub>188</sub> de otra proteína, interaccionando hidrofó-

bicamente con un bolsillo formado por Val<sub>188</sub>, Leu<sub>191</sub>, Leu<sub>231</sub>, Val<sub>234</sub> y Val<sub>238</sub> (figura 21A). Este nuevo mutante, denominado DesKC-WKV, presentó una mayor solubilidad, ya que la proteína puede ser concentrada hasta más de 40 mg/mL, así como también es capaz de formar un complejo dependiente de MgCl<sub>2</sub> con DesR. Los intentos por formar cristales en las condiciones previamente encontradas para el mutante DesKC-H188V fueron infructuosos, y fue necesario realizar un nuevo rastreo robótico de 384 condiciones, encontrando que en alrededor del 50% de las mismas, crecieron cristales. Varias condiciones fueron seleccionados para optimización, aunque la difracción siempre resultó menor a 3.5 Å. Se colectaron datos completos para un cristal generado en presencia de ADP y CaCl<sub>2</sub>, perteneciente al grupo de espacio P2<sub>1</sub> (DesKC-WKV, tabla VI). La estructura fue resuelta por reemplazo molecular utilizando Phaser<sup>238</sup>, y empleando como sonda de búsqueda las coordenadas de los dominios DHp y ABD de la estructura V188a. El refinamiento de esta estructura fue realizada con el programa Phenix<sup>247</sup>, incorporando restricciones de distancias de puentes de hidrógeno en la cadena principal de elementos de estructura secundaria, así como restricciones adicionales por superposición estructural con modelos resueltos a mayor resolución usados como referencia<sup>271</sup>. El empaquetamiento cristalino es totalmente distinto a las estructuras previas de DesKC-H188V y, sin embargo, cada uno de los dos dímeros de DesKC-WKV presentes en la UA (figura 21B), tienen una conformación muy similar a V188a (rmsd de 1.4 Å, comparando los dímeros formados por las cadenas A y B) y V188b (rmsd de 1.5 Å). En esta estructura es posible observar la misma asociación entre los dominios DHp y ABD, así como también la extensión del DHp en un *coiled-coil* N-terminal de dos  $\alpha$ -hélices (figura 21C). El ligando ADP fue modelado en los cuatro sitios disponibles de la UA así como también los átomos de Ca<sup>+2</sup>. El extremo N-terminal fue modelado hasta el residuo 161, por lo que hay 7 aminoácidos para los cuales la densidad electrónica no es visible. El alineamiento estructural entre los dos dímeros de la unidad asimétrica revela un rmsd de 3 Å, diferencia que puede explicarse por pequeñas variaciones en la orientación de los ABD con respecto al DHp, ya que la superposición de los dominios por separado presenta un rmsd menor a 0.5 Å. Estas diferencias explican por qué muchas veces fue imposible resolver las estructuras por reemplazo molecular utilizando como sonda de búsqueda un dímero o incluso el monómero de DesKC-H188V. La comparación con V188a también revela cierta flexibilidad en la relación DHp-ABD, existiendo diferencia significativas en la posición de los ABD (figura 21C). Es importante resaltar que los factores de desplazamiento atómico (factor B) promedio para los dominios ABD son más altos (104 Å<sup>2</sup> y 168 Å<sup>2</sup>) que el del DHp (74 Å<sup>2</sup>); tampoco es posible visualizar la totalidad de los residuos de los ABD, existiendo algunos bucles y cadenas laterales sin densidad electrónica visible (residuos 265–272 y 351–358 de la cadena A y residuos 263–268 y 302–306 de la cadena D). En suma, se revela cierto grado de flexibilidad en la interfaz DHp-ABD



**Figura 21: Cambios en el empaquetamiento cristalino de DesKC-H188V.** A) Contactos cristalinos que involucran al Trp<sub>311</sub> y Lys<sub>312</sub> en las estructuras de DesKC-H188V (V188a). En barras verdes se muestra la Val<sub>188</sub>, mientras que en blanco se identifican los residuos que forman parte del bolsillo de interacción con estos dos residuos. B) Estructura de dos homodímeros en la UA de DesKC-WKV. C) Superposición de los dominios DHP entre DesKC-WKV (azul) y DesKC-H188V (naranja). Se visualizan las diferencias en la posición de los ABDs. Además se muestra la matriz de diferencia de distancias entre la cadena A de V188a y la cadena C de WKV, siendo posible observar que estos cambios son significativos.

en relación a lo que previamente se había observado en las estructuras de DesKC-H188V, probablemente ligado a diferencias de los empaquetamientos cristalinos. Sin embargo, la conservación de una misma conformación de cada dímero evidencia que la sustitución de la His<sub>188</sub> por una valina, induce efectivamente la adopción de una estructura rígida en solución, con los nucleótidos unidos en bolsillos alejados de la posición fosforilable, la cual se ve forzada a enterrarse al menos parcialmente hacia el núcleo hidrofóbico del DHp.

Tabla VI: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para las estructuras V188c y WKV.

	<b>V188c</b> (refinamiento parcial)	<b>WKV</b> (refinamiento parcial)
Grupo de espacio	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Longitud de onda (Å)	1.5418	1.5418
Resolución de los datos (Å)	19.8 – 3.5 (3.69-3.50)	29.6-3.5 (3.69-3.50)
Reflexiones medidas	59603	41916
Multiplicidad	2.7 (2.7)	2.6 (2.6)
Complejidad (%)	97.7 (99.1)	99.2 (99.4)
R <sub>meas</sub> (%)	11.5 (49.3)	10.8 (47.3)
<I/σ(I)>	5.9 (1.4)	6.4 (1.6)
a b c (Å)	34.3 121.5 136.3	114.76 44.41 123.619
β (°)	90.12	96.1
Resolución de refinamiento (Å)	19.8 – 3.5	28.9-3.5
R <sub>crist</sub> [N° refs]	0.274 [12801]	0.272 [15084]
R <sub>free</sub> [N° refs]	0.314 [992]	0.334 [935]
rmsd (enlaces/ángulos)	0.026 Å / 2.07°	0.032 Å / 2.27°
Átomos de proteína (excluyendo hidrógenos)	5865	5288
Átomos de ligandos	124 (ATP) / 4 (Mg <sup>+2</sup> )	108 (ADP) / 4 (Ca <sup>+2</sup> )
N° de residuos en regiones del gráfico de Ramachandran (permitido/no permitido)	708 / 4	709 / 16

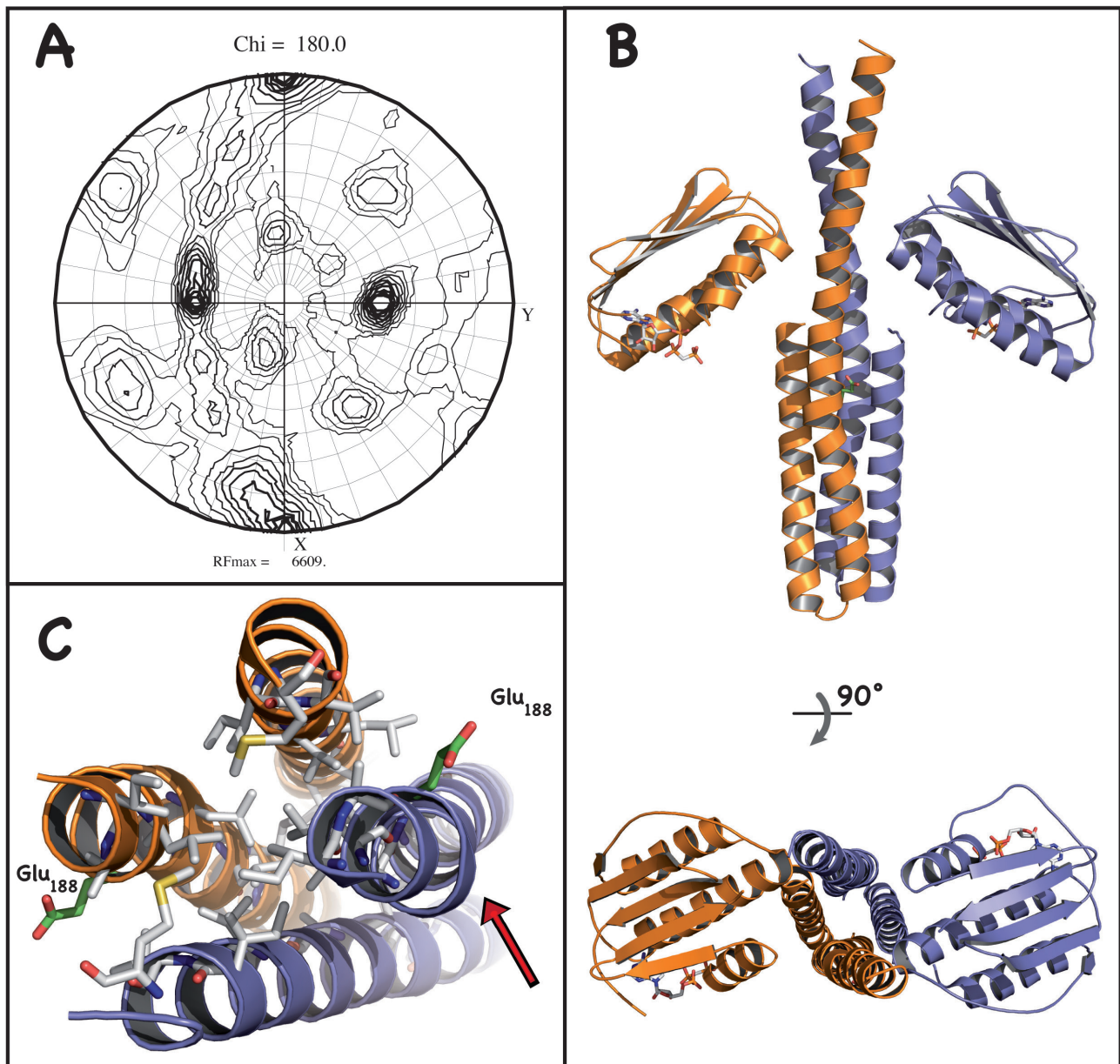
## 7.5. Estructuras de DesKC en el estado quinasa y fosfotransferasa

La siguiente etapa fue enfocada en comprender las bases estructurales del comportamiento observado por cromatografía de exclusión molecular al preincubar DesKC con ATP y MgCl<sub>2</sub>. Las proteínas empleadas con este fin, fueron DesKC-fosforilada, así como el mutante DesKC-H188E, que busca mimetizar el estado fosforilado evitando la inestabilidad de la fosfo-histidina a pH neutros y ácidos. La búsqueda de condiciones de cristalización se realizó en forma robótica para DesKC-H188E en complejo con AMP-PCP y MgCl<sub>2</sub>, DesKC-H188E en presencia de ADP y CaCl<sub>2</sub> y DesKC-fosforilada asociada a AMP-PCP y MgCl<sub>2</sub>. En total se colectaron datos de difracción para tres cristales de

DesKC-H188E (E188a, E188b y E188c) y uno de DesKC-fosforilada (DesKC-P). E188b fue resuelta en complejo con AMP-PCP y  $Mg^{+2}$  a 2.65 Å de resolución (tabla VII). El procesamiento de los datos sugirió, en una primera instancia, una forma cristalina ortorrómbica centrada en la cara ab ( $C222_1$ ), ya que en la sección  $\kappa=180^\circ$  de la función de auto-rotación (con los datos integrados en P1) aparecen tres picos de igual intensidad y perpendiculares entre sí (figura 22A). Luego se comprobó la presencia de un cristal con maclado (*twinning*) hemihédrico, una patología cristalina en la que el supuesto cristal único está en verdad constituido por varios (en este caso dos) cristales distintos (dominios o maclas) relacionados entre sí por leyes geométricas simples que interfieren con la simetría cristalográfica propia de cada dominio. El maclado fue detectado por desviaciones en las estadísticas de intensidades medidas, y resulta posible en este caso de que el ángulo  $\beta$  es fortuitamente igual a  $90^\circ$ . La estructura fue en definitiva resuelta utilizando como sondas de búsqueda el DHp de DesKC (residuos 180 a 241) y las coordenadas de DesKC-ABD, empleando los datos procesados en  $C222_1$  con el programa Amore<sup>237,272</sup>. A continuación, el modelo resultante fue refinado con los datos procesados en el grupo de espacio C2, considerando la ley de maclado que relaciona a ambos dominios del cristal ( $h\ k\ l = -h\ -k\ l$ ). En esta estructura también se observa el DHp central y los dos dominios ABD se encuentran completamente libres, visibles gracias a anclajes del empaquetamiento cristalino (figura 22B). La unión del ligando AMP-PCP a los ABD muestra las mismas interacciones polares y de tipo  $\pi$ - $\pi$  observados en la estructura DesKC-ABD. También es posible visualizar la densidad electrónica de toda la región que conecta el DHp a la porción transmembrana (desde el residuo 154), y que se dispone como una larga  $\alpha$ -hélice. La única región no modelada por falta de densidad electrónica es el ATP lid de la cadena A (residuos 326 a 336). La estructura presenta un eje de simetría de orden 2 no-cristalográfico que relaciona a ambos monómeros del dímero. Al igual que en DesKC (3EHF), la periodicidad en héptadas permite empaquetar los residuos Ile<sub>183</sub> (**d**, de acuerdo a la nomenclatura **abcdegf**) y Leu<sub>187</sub> (**a**) hacia el interior, generando una inserción en la posición 188 (**x** o posición *skip*), que se traduce en una deformación local de la hélice  $\alpha 1$  (figura 22C) de tipo “panza” (*bulge*). Estas deformaciones de las hélices  $\alpha$  (hélice 3.6<sub>13</sub>), frecuentemente resultan de su reestructuración en hélices  $\pi$  (hélice 4.4<sub>16</sub>) recientemente caracterizadas en forma sistemática<sup>273</sup> asociando su frecuente rol en actividades funcionales ligadas a la plasticidad.

Es importante resaltar que el empaquetamiento de las hélices  $\alpha$  del DHp se pierde hacia el N-terminal de la Ile<sub>183</sub> en E188b, a diferencia de lo observado en DesKC-H188V (donde se ven formando un *coiled-coil* extendido de dos hélices  $\alpha$  hacia el N-terminal). Los residuos hidrofóbicos de esta región están en cambio involucrados en E188b en contactos cristalinos con  $\alpha 1$  de moléculas vecinas. Ade-

más, la hélice  $\alpha 1$  presenta una pequeña curvatura (*kink*) a la altura del residuo 188, que es similar a lo observado en las estructuras de HK853<sup>89</sup> y KinB<sup>91</sup>. En el caso de HK853 y KinB (ambas pertenecientes a la familia HISKA), dicha curvatura parece estar ligada a la presencia de una prolina muy conservada 5 residuos después de la histidina fosforilable. La familia HISKA\_3 no presenta esta prolina, y en su lugar se encuentra una glutamina conservada. De cualquier modo, la distancia entre el O del Glu<sub>188</sub> y el N de la Gly<sub>192</sub> es de 3.6 Å, revelando la ausencia del puente de H que estabilizaría

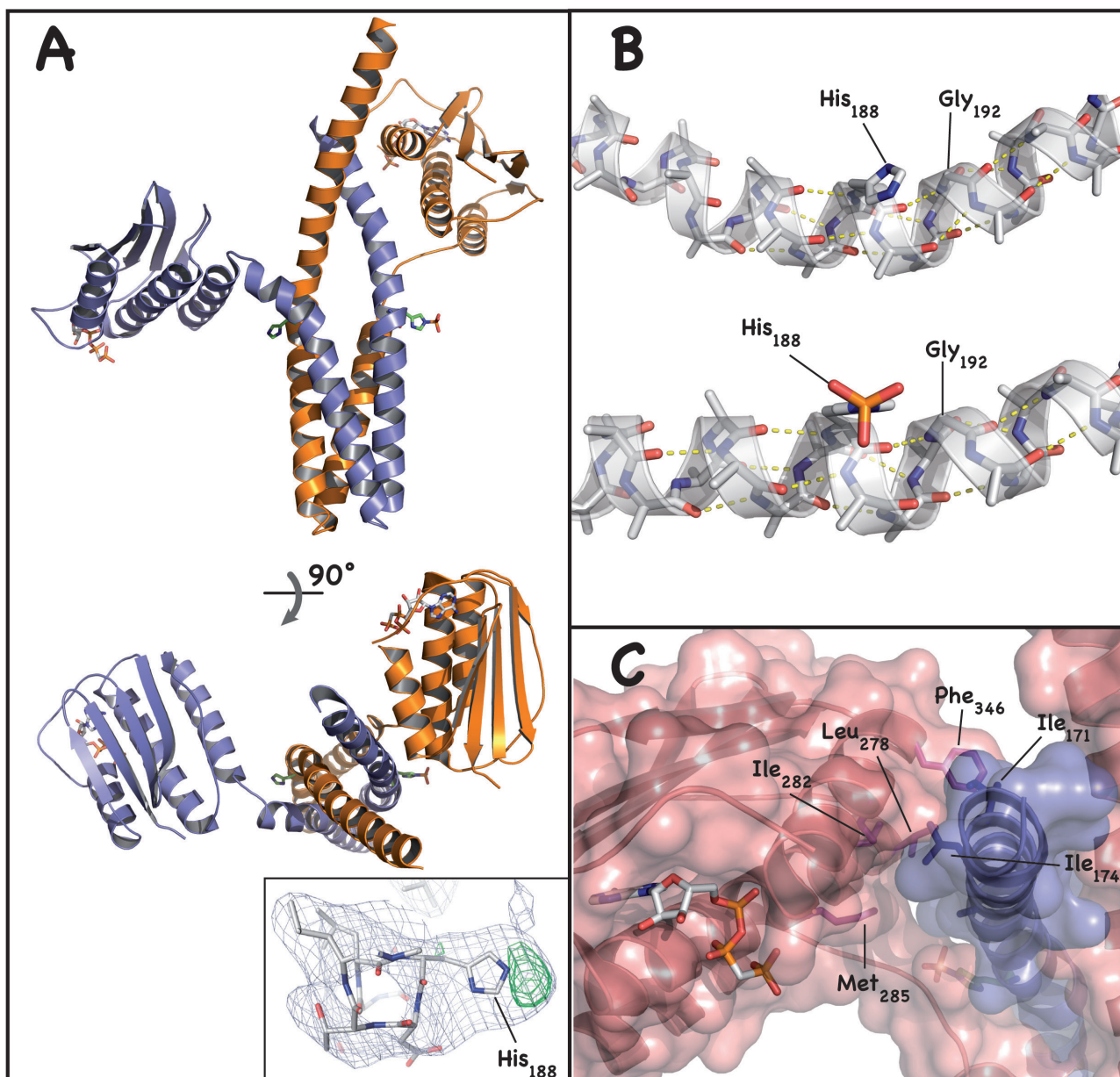


**Figura 22: Estructura DesKC-H188E (E188b).** A) Función de auto-rotación en P1 de E188b. Obsérvese que los dos picos contenidos en el plano YZ están a 90° entre sí, y perpendiculares al tercer eje de orden 2 (paralelo al eje X). B) Modelo del dímero E188b. C) Deformación de la hélice  $\alpha 1$  por la inserción de un residuo hidrofílico en la posición 188 (His<sub>188</sub> en DesKC- $\Delta$ 174, ó Glu<sub>188</sub> en este caso) en una héptada del *coiled-coil* del dominio DHp (señalado con una flecha roja). Esta alteración de la hélice permite preservar el núcleo hidrofóbico del dominio. En barras verdes se señalan los dos Glu<sub>188</sub> presentes en el homodímero, mientras que en blanco se ubican los residuos hidrofóbicos que permiten empaquetar las hélices  $\alpha$  del DHp.

la estructura secundaria, por lo que esta curvatura en el DHp parece ser una característica conservada entre HQs.

Para obtener la estructura de DesKC en el estado fosforilado fue necesario realizar la reacción de autofosforilación a pH 8.5. Luego de efectuar el rastreo de condiciones de cristalogénesis, se seleccionó para optimizar una que contenía CHES pH 9.5 como tampón, de forma de evitar la inestabilidad de la fosfohistidina. La estructura se resolvió en complejo con AMP-PCP y  $Mg^{+2}$  a 3.5 Å de resolución en el grupo de espacio P3<sub>1</sub>21. En la UA se dispone un único dímero completamente asimétrico, en el cual es posible observar cambios conformacionales importantes, incluyendo en particular la disposición de las hélices  $\alpha$ 1 hacia el N-terminal y la ubicación de los ABDs (figura 23A). La densidad electrónica permitió modelar desde los residuos 155 en la cadena A y 165 en la cadena B. No fue posible modelar 2 aminoácidos del *ATP lid* (residuos 333 y 334 de la cadena A). Inesperadamente, sólo se encontró una de las dos histidinas del dímero modificadas por fosforilación. A pesar de la baja resolución, es claramente visible un pico positivo en el mapa diferencia mFo-DFc adyacente a la His<sub>188</sub> de la cadena B (figura 23). Esta asimetría fue luego comprobada al caracterizar funcionalmente la actividad autoquinasa de DesKC, como se describirá más adelante. Una particularidad de esta estructura es la conformación que adoptan las hélices  $\alpha$ 1, ya que presentan una curvatura muy pronunciada y diferencial de 33-35° y 50-54° para una y otra en cada monómero. Esta curvatura se corresponde con la discontinuidad en la red de puentes de H que estabilizan la estructura secundaria (figura 23B). En las estructuras de DesKC <sub>$\Delta$ 174</sub> y E188b esta curvatura es de 12-19°, y la debilidad del puente de H entre la His<sub>188</sub> y la Gly<sub>192</sub> probablemente facilita los cambios observados. Las hélices  $\alpha$  se caracterizan por presentar puentes de H entre el O de un residuo y el NH de otro residuo a 4 posiciones más adelante (esto es, en sentido C-terminal). Por el contrario, las hélices  $3_{10}$  y  $\pi$ , forman puentes de H con residuos 3 y 5 posiciones más allá, respectivamente. En el caso de E188b y DesKC <sub>$\Delta$ 174</sub>, la interacción entre el O del residuo 188 y el N de la Gly<sub>192</sub> sería muy débil, mientras que la Leu<sub>187</sub> y la Gly<sub>192</sub> se encuentran formando un contacto, sugiriendo la presencia de una pequeña hélice  $\pi$  en esta región, como se mencionó más arriba. Probablemente estas características permitan reducir la barrera energética implicada en el aumento de la curvatura de estas hélices. Un elemento interesante, y que ocurre en la hélice con mayor curvatura, es que la distancia entre el O del Asp<sub>189</sub> y los NH de la Gln<sub>193</sub> o Lys<sub>194</sub> es demasiado grande. La ubicación del OG1 de la Thr<sub>190</sub> a distancia de enlace con el O del Asp<sub>186</sub>, podría estabilizar el aumento en la curvatura, algo que ha sido descrito previamente<sup>274</sup>. Por otro lado, el ABD de la cadena B se encuentra completamente libre, no presentando ningún contacto con el resto de la proteína, y es visible gracias a que está directamente involucrado en contactos cristalinos. El otro ABD

se dispone formando una nueva superficie de asociación con la hélice  $\alpha 1$ , de aproximadamente de 420-450  $\text{\AA}^2$  (figura 23C). Esta superficie de interacción esta formada principalmente por contactos hidrofóbicos entre el extremo N-terminal de  $\alpha 4$  (Leu<sub>278</sub>, Ile<sub>282</sub> y Met<sub>285</sub>) y la región C-terminal de las  $\alpha 5$  (Phe<sub>346</sub>) en el ABD y algunos residuos hidrofóbicos de la  $\alpha 1$  (Ala<sub>167</sub>, Ile<sub>171</sub>, Leu<sub>174</sub> y Leu<sub>177</sub>). Esta conformación asimétrica con un único sitio fosforilado podría tener implicancias sobre la autofosforilación así como en la fosfotransferencia a DesR.



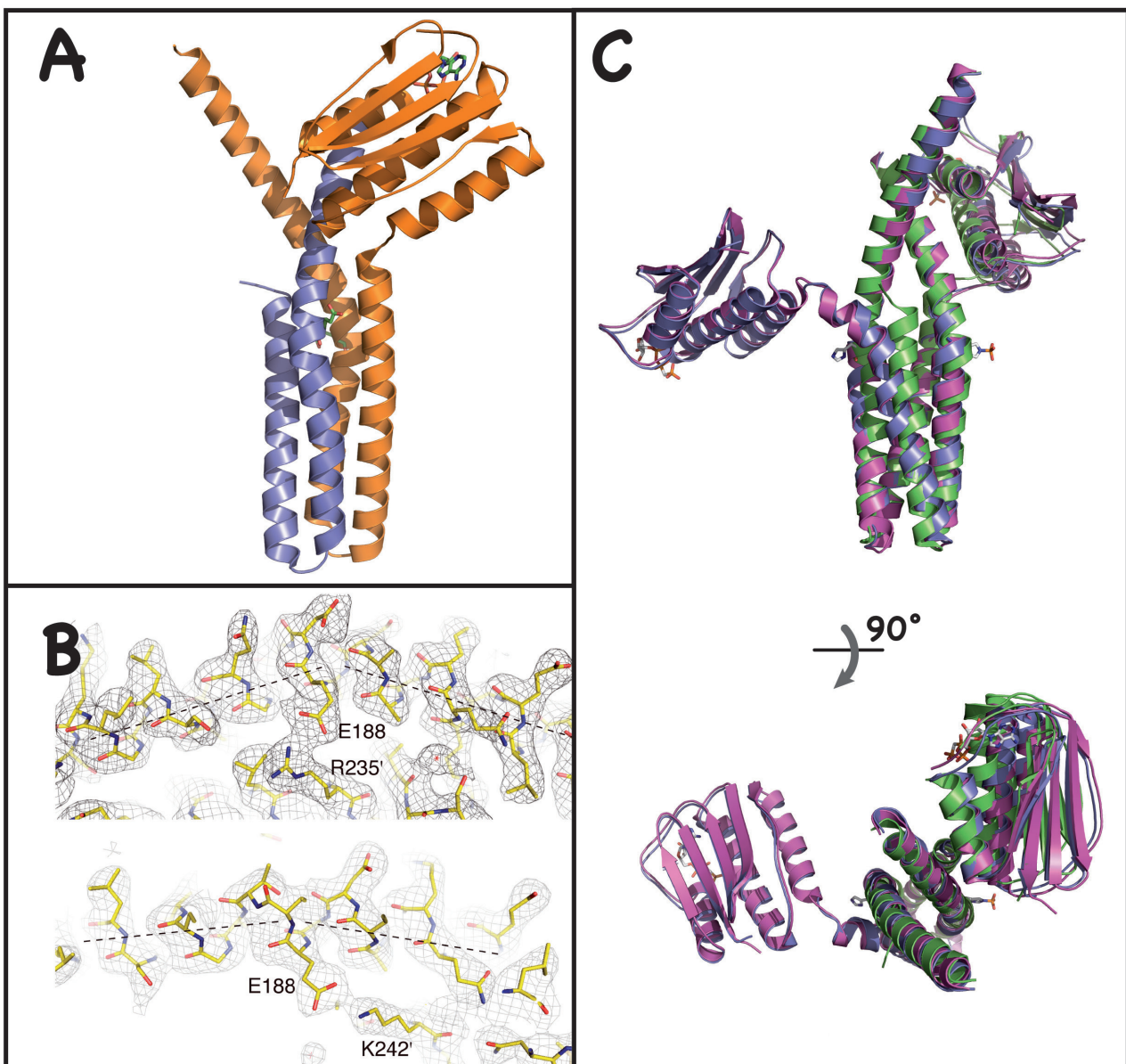
**Figura 23: Estructura de DesKC fosforilada.** A) Se puede observar que sólo una cadena (la B, en azul) muestra a la His<sub>188</sub> fosforilada. Las dos hélices  $\alpha 1$  se ven curvadas asimétricamente. En el recuadro se muestran los mapas de densidad  $2mF_{obs} - DF_{calc}$  (contorneado a  $1\sigma$ , en gris) y  $mF_{obs} - DF_{calc}$  ( $3\sigma$ , en verde), en la región aledaña a la His<sub>188</sub> de la cadena B (previo al refinamiento de un residuo de fosfohistidina que fue finalmente modelizado). B) Significativa curvatura de las hélices  $\alpha 1$ , probablemente favorecida por los cambios en la red de puentes de H alrededor de la His<sub>188</sub> y la presencia de una Gly en la posición 192. C) Superficie de interacción hidrofóbica entre la hélice  $\alpha 1$  de la cadena B y el ABD del otro monómero. En barras se señalan los residuos hidrofóbicos que forman parte de esta interfaz.

Otra estructura de DesKC-H188E (E188a) surgió de la optimización de pequeños cristales en complejo con ADP y  $\text{CaCl}_2$ . A pesar de los intentos, fue imposible obtener cristales del tamaño adecuado para realizar el experimento de difracción en el equipo disponible en el Instituto Pasteur de Montevideo. Los mismos fueron colectados en la línea ID23-2 del sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia), obteniendo un juego de datos completo a 2.7Å. La estructura fue resuelta por reemplazo molecular en el grupo de espacio  $P2_12_12$ , con un dímero por UA (figura 24A y tabla VII). En esta estructura es visible solo uno de los dos ABDs, sugiriendo que el otro se encuentra muy móvil y, por ende, desordenado en el cristal. Esta estructura adopta la misma conformación asimétrica a DesKC-P, y algunos aspectos interesantes son más claros dada su mayor resolución. El  $\text{Glu}_{188}$  establece puentes salinos con la  $\text{Arg}_{235}$  o la  $\text{Lys}_{242}$  (dependiendo del monómero analizado, figura 24B), siendo estos dos residuos básicos muy conservados en la familia HSKA\_3. La  $\text{Thr}_{190}$  forma un puente de H entre el OG1 y el O del  $\text{Asp}_{189}$ , reforzando un papel estabilizador del cambio de curvatura de la hélice  $\alpha 1$ .

Tabla VII: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para las estructuras E188a, E188b, E188c y WT-P.

	<b>E188a</b>	<b>E188b</b>	<b>E188c</b> (refinamiento parcial)	<b>WT-P</b>
Grupo de espacio	$P2_12_12$	C2 <i>twinning hemihédrico</i>	$P3_12_1$	$P3_12_1$
Longitud de onda (Å)	0.933	1.5418	0.9797	1.5418
Resolución de los datos (Å)	36.2-2.7 (2.85-2.7)	30-2.65 (2.75-2.65)	39.5-3.8 (3.9-3.8)	30-3.5 (3.6-3.5)
Reflexiones medidas	63081	34758	88931	41904
Multiplicidad	4.3 (4.4)	2.9 (2.8)	10.5 (10.9)	3.8 (3.9)
Complejidad (%)	99.9 (100)	97.6 (95.8)	99.9 (99.9)	99.2 (99.3)
$R_{\text{meas}}$ (%)	7.1 (56.5)	7.3 (71.5)	10.3 (50.2)	5.5 (37.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	15.1 (2.8)	12.4 (2.1)	5.6 (1.4)	19.7 (4.04)
a b c (Å)	91.6 93.5 59.4	99.9 94.1 44.6	94.2 94.2 158.1	94.6 94.6 162.4
$\beta$ (°)	—	90.0	—	—
Resolución de refinamiento (Å)	36 – 2.7	27 – 2.65	39.4 – 3.8	28.8 – 3.5
$R_{\text{crist}}$ [N° refs]	0.261 [13780]	0.194 [10660]	0.293 [7828]	0.287 [10094]
$R_{\text{free}}$ [N° refs]	0.313 [726]	0.243 [1097]	0.314 [583]	0.335 [896]
rmsd (enlaces/ángulos)	0.018 Å / 2.0 °	0.008 Å / 1.44°	0.027 Å / 2.03°	0.027 Å / 2.72 °
Átomos de proteína (excluyendo hidrógenos)	2176	3308	3258	2953
Átomos de agua	3	20	—	—
Átomos de ligandos	27 (ADP) / 1 ( $\text{Ca}^{+2}$ )	62 (AMP-PCP) / 2 ( $\text{Mg}^{+2}$ )	62 (AMP-PCP) / 2 ( $\text{Mg}^{+2}$ )	62 (AMP-PCP) / 2 ( $\text{Mg}^{+2}$ )
N° de residuos en regiones del gráfico de Ramachandran (permitido/no permitido)	273 / 5	388 / 15	389 / 2	395 / 16
PDB ID	3GIF	3GIE	—	3GIG

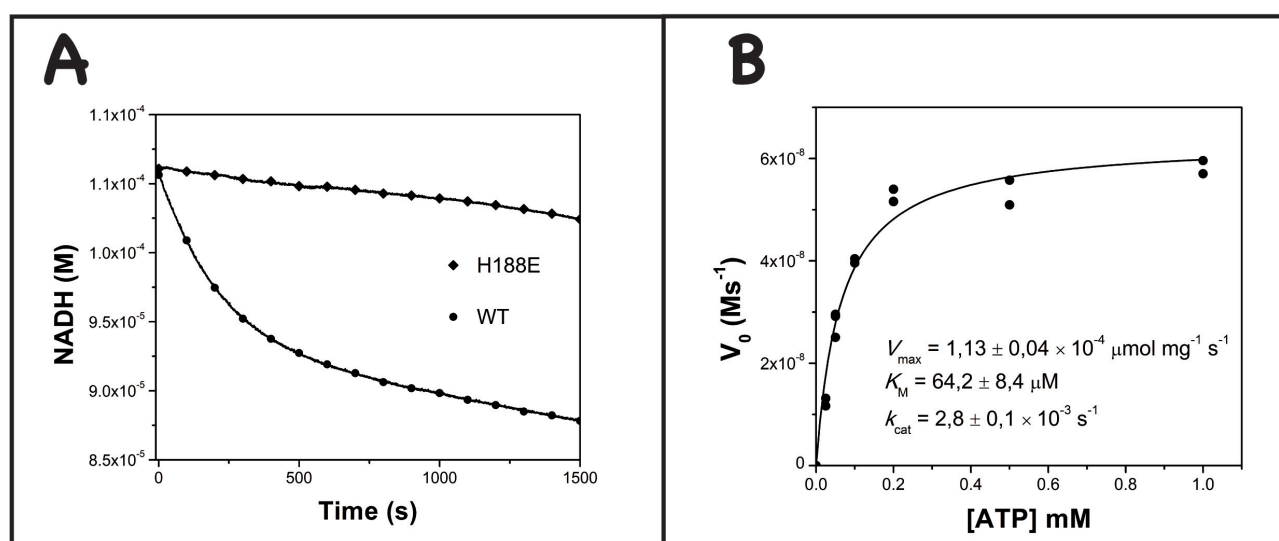
Durante los intentos por cristalizar el complejo entre DesKC-H188E y el dominio REC de DesR, se obtuvo un juego de datos a 3.8Å en la línea ID14 (ESRF, Grenoble). Este cristal pertenece al grupo de espacio P3<sub>1</sub>21 (tabla VII). La estructura fue resuelta utilizando las coordenadas de los dominios DHP y ABD de E188a, demostrando que DesR no estaba presente. DesKC-H188E adopta en este caso la misma conformación que DesKC-P y con el mismo empaquetamiento cristalino (figura 24C). En conjunto, estos resultados sugieren que DesKC-H188E es capaz de adoptar una conformación similar a la forma fosforilada, aunque, como veremos más adelante, se encuentra en un equilibrio dinámico entre distintos confórmeros.



**Figura 24: Estructura de DesKC-H188E (E188a).** A) Modelo estructural del dímero E188a. Se observa la misma organización asimétrica que en DesKC fosforilada, aunque el dominio ABD de la cadena A (azul) no es visible. B) Cada monómero muestra un puente salino entre el Glu<sub>188</sub> y un residuo básico muy conservado (Arg<sub>235</sub> o Lys<sub>242</sub>, dependiendo de la cadena considerada). C) Superposición estructural de E188a (verde), E188c (azul) y WT-P (magenta). En barras se representan las histidinas fosforilables y el AMP-PCP de WT-P.

## 7.6. Caracterización funcional de la autofosforilación de DesKC

La estructura de DesKC-P sugiere una autofosforilación asimétrica, con modificación de sólo una de las dos histidinas en el homodímero. Para confirmar esta observación en solución, se realizó la caracterización enzimática de DesKC acoplando enzimáticamente el consumo de ATP a la desaparición de NADH<sup>253</sup>. Estos ensayos funcionales revelaron que DesKC presenta una curva de consumo de ATP bifásica (figura 25A). La primera etapa corresponde a la autofosforilación de la His<sub>188</sub>, mientras que a continuación queda una actividad ATPasa remanente, similar a la observada con el mutante DesKC-H188E (figura 25A). El consumo de ATP en la primera etapa concuerda con datos reportados usando ATP radioactivo <sup>131</sup>, y los parámetros cinéticos que podemos ajustar son comparables con otras HQs (figura 25B y tabla VIII). El análisis de nuestros datos cinéticos son consistentes con una autofosforilación asimétrica, dado que la estequiometría de reacción implica el consumo de 0.5 equivalentes de ATP en relación a la cantidad de sitios fosforilables disponibles.



**Figura 25: Caracterización cinética de la autofosforilación de DesKC.** A) Cursos temporales del consumo de ATP para DesKC salvaje (WT, •) y el mutante puntual inactivo DesKC-H188E (H188E, ♦). DesKC-H188E muestra una actividad ATPasa basal (actividad intrínseca del ABD). Mientras que DesKC presenta un comportamiento bifásico, con una primera fase exponencial, seguida de una segunda lineal. B) Velocidades iniciales de la autofosforilación de DesKC en función de la concentración de ATP. Estos ensayos fueron realizados con DesKC a una concentración de 22 μM y la k<sub>cat</sub> fue calculada considerando la concentración total de monómero.

Tabla VIII: Comparación de los parámetros cinéticos para distintas HQ reportadas.

Enzima	Actividad de autofosforilación			Referencias
	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_M$ ATP ( $\mu M$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	
<b>DesKC</b>	$2.8 \times 10^{-3}$	64	44	Este trabajo
<b>CheA</b>	0.117	274	427	<sup>261</sup>
<b>CheA</b>	0.026	300	87	<sup>275</sup>
<b>NRII</b>	0.032	18	1805	<sup>276</sup>
<b>NarX</b>	$5 \times 10^{-5}$	2.4	21	<sup>277</sup>
<b>NarQ</b>	$2.2 \times 10^{-4}$	22.8	9.65	
<b>KinA</b>	$1.9 \times 10^{-3}$	74	25.7	<sup>278</sup>
<b>EnvZ</b>	$8.1 \times 10^{-5}$	218	0.37	<sup>279</sup>
<b>PhoQ</b>	–	20.1	–	<sup>86</sup>
<b>WalK(Spn) (VicK)</b>	$1.7 \times 10^{-3}$	37	46.0	<sup>280</sup>

Las interacciones observadas entre el dominio ABD y el ATP sugerían que DesK no sería capaz de utilizar GTP como sustrato. Dado que la piruvato quinasa del ensayo acoplado es capaz de utilizar indistintamente ADP o GDP, se decidió confirmar esta hipótesis evaluando las curvas de consumo de GTP. Estos ensayos no permitieron detectar disminuciones en los niveles del sustrato (límite de detección =  $-1.9 \times 10^{-10} Ms^{-1}$ ), observando un nivel estable durante varios minutos. También se confirmó que el GTP no actúa como un inhibidor competitivo del ATP, sugiriendo que la especificidad de unión al sustrato está dada por los numerosos contactos observados en la estructura 3D.

## 7.7. Alineamientos estructurales entre los distintos modelos

Todas las estructuras resueltas de DesKC pueden ser agrupadas en tres conjuntos (tabla IX) simplemente superponiendo los dominios DHP respectivos (mitad bajo la diagonal de la tabla IX) o los homodímeros completos (mitad sobre la diagonal), y calculando las desviaciones cuadráticas medias (rmsd). Por un lado, las estructuras E188b y DesKC- $\Delta$ 174 presentan un rmsd muy pequeño al comparar los DHP, aumentando si se incluye a los dominios ABD en los cálculos. Esto es comprensible ya que éstos últimos se encuentran completamente libres y posicionándose en distintas configuraciones espaciales de acuerdo a los contactos cristalinos. El segundo clúster de estructuras, conformado por E188a, E188c y DesKC-P, presentan la misma asimetría estructural, así como también se distinguen por la importante curvatura de las hélices  $\alpha$ 1. Finalmente, todas los modelos estructurales de DesKC-H188V forman un tercer grupo. Estos resultados estructurales, así como también los experimentos funcionales realizados por nuestro laboratorio y por el grupo del Dr. Diego de Mendoza, sugieren la presencia de 3 estados funcionales y estructurales. El primer grupo (DesKC- $\Delta$ 174 y E188b) fue

asignado como estado quinaso ya que incluye a DesKC- $\Delta$ 174, capaz de catalizar su autofosforilación. Estas estructuras se caracterizan por presentar los ABD completamente libres, permitiendo acercar el ATP a la histidina fosforilable. Las estructuras de DesKC-H188V y DesKC-WKV representarían el estado fosfatasa, ya que estas proteínas presentan una conformación más rígida y estable, capaz de formar un complejo con DesR (figura 14) y catalizar su desfosforilación<sup>131</sup>. Finalmente, el grupo integrado por DesKC-P representaría el estado fosfotransferasa, también capaz de formar un complejo con DesR y catalizar la transferencia del fosfato. En estas estructuras uno de los dos ABD se encuentra asociado a la hélice  $\alpha$ 1, reduciendo su movilidad, lo cual podría ser relevante a la hora de regular la interacción con el RR.

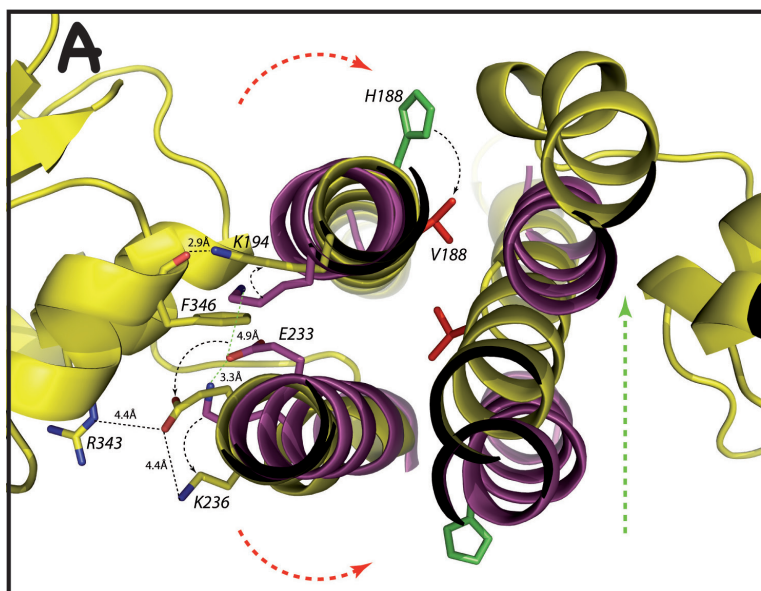
Tabla IX: Superposición estructural entre diferentes estructuras de la región citoplasmática de DesK. Se reportan los valores de rmsd (en Å) para las comparaciones entre los dominios DHP (entre los residuos 175-242, mitad inferior) o los homodímeros enteros (entre los residuos 175-368, mitad superior)

Estructuras	DesKC- $\Delta$ 174	E188b	E188a	E188c	DesKC-P	V188a	V188b	V188c	WKV
DesKC- $\Delta$ 174		3.711 (277)	5.799 (243)	12.685 (283)	12.655 (283)	14.243 (282)	14.418 (283)	14.118 (275)	13.601 (277)
E188b	0.615 (125)		8.812 (247)	15.733 (371)	15.801 (371)	15.799 (367)	15.910 (368)	15.841 (364)	14.891 (349)
E188a	1.467 (125)	1.985 (134)		1.790 (253)	2.219 (254)	16.866 (252)	16.964 (254)	16.677 (247)	16.681 (251)
E188c	2.142 (126)	2.444 (135)	2.082 (135)		0.942 (384)	18.605 (374)	18.932 (380)	18.747 (377)	18.236 (355)
DesKC-P	2.178 (126)	2.495 (135)	2.220 (135)	0.520 (136)		18.854 (374)	19.245 (374)	18.967 (377)	18.331 (353)
V188a	2.676 (126)	3.113 (135)	3.447 (135)	3.801 (136)	3.876 (136)		0.723 (374)	1.790 (365)	1.681 (353)
V188b	2.632 (126)	3.067 (135)	3.436 (135)	3.720 (136)	3.795 (136)	0.498 (136)		1.505 (373)	1.716 (353)
V188c	2.588 (118)	3.425 (128)	3.567 (128)	3.538 (128)	3.614 (128)	1.019 (128)	1.089 (128)		1.929 (348)
WKV	2.520 (125)	3.072 (134)	3.519 (135)	3.558 (135)	3.623 (135)	1.157 (135)	1.079 (135)	1.049 (128)	

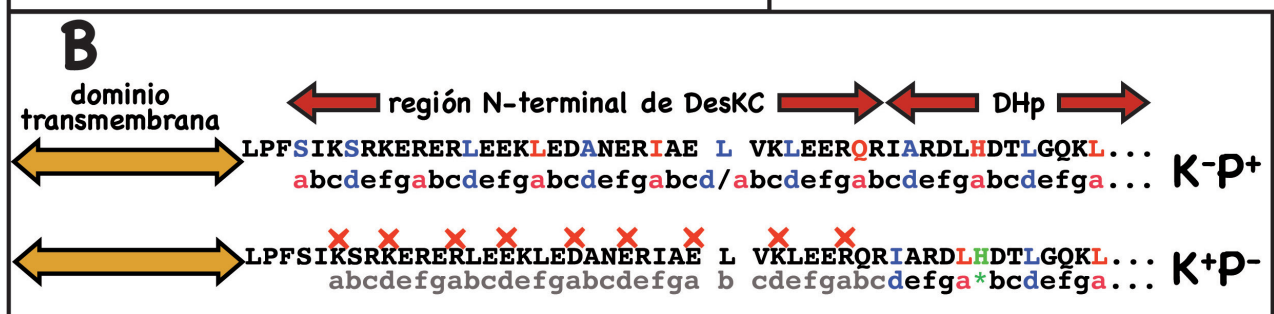
De la comparación entre los distintos estados es posible describir los rearrreglos estructurales que correlacionan con la transición funcional entre las diferentes actividades reguladas de DesK. La su-

perposición de DesKC- $\Delta$ 174 y DesKC-H188V (figura 26) sugiere que la transición fosfatasa–quinasa ocurre por movimientos de rotación de tipo engranajes entre las hélices  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, permitiendo exponer (quinasa) u ocultar (fosfatasa) la histidina fosforilable. Estos mismos movimientos, también están involucrados en esconder/exponer los residuos del DHp, directamente implicados en la extensa interacción DHp-ABD del estado fosfatasa. Un elemento central en esta transición hacia el estado fosfatasa, es la formación de una estructura tipo *coiled-coil* hacia el N-terminal. Esta región es la encargada de conectar el DHp a la región sensora de membrana, y por lo tanto, podría jugar un papel central en la transducción de la señal. La periodicidad en héptadas se encuentra conservada en la familia HSKA\_3, así como también en la familia HSKA, aunque con algunas diferencias importantes que serán luego discutidas con mayor detalle. En el caso de DesK, la formación/ruptura del *coiled-coil* de 2 hélices  $\alpha$  en el extremo N-terminal provoca un efecto directo sobre la posición 188, ya que esta pasa de constituir una inserción en la héptada (DesKC- $\Delta$ 174) a ocupar una posición clave **a** en

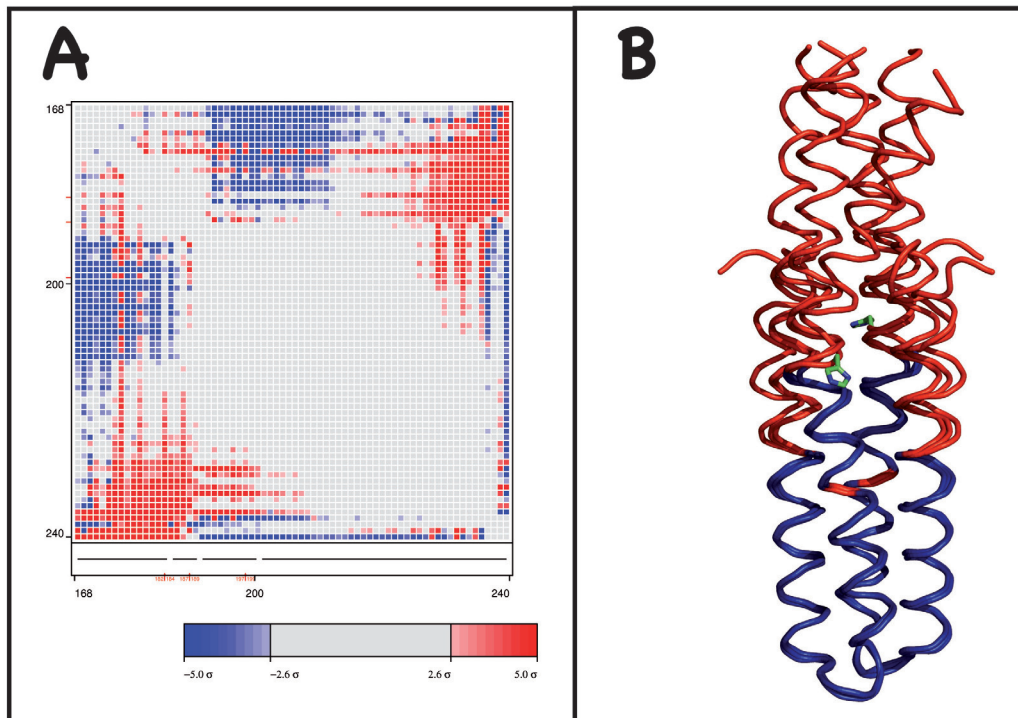
**Figura 26: Cambios conformacionales que definen la transición fosfatasa/quinasa.** A) Representación en cintas de los dímeros de V188a (amarillo) y de DesKC- $\Delta$ 174 (magenta) luego de superponer las hélices  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de uno de los monómeros. El rearrreglo de las hélices  $\alpha$  sigue un patrón de movimientos que combinan principalmente una rotación en ‘engranajes’ con una translación relativa entre los monómeros. Algunos residuos clave están marcados y se muestran en barras, así como también se muestran algunas distancias de enlaces importantes. Las flechas negras punteadas muestran los cambios de ubicación de residuos específicos, las flechas rojas subrayan la rotación de tipo engranaje y la flecha verde exhibe la translación en cizalla de una horquilla de hélices con respecto a la otra. B)



Análisis de la secuencia de aminoácidos y la periodicidad en héptadas de la región que conecta entre el dominio sensor transmembrana y el haz de 4 hélices. El análisis se realizó empleando el algoritmo LEARNCOIL sobre las estructuras V188a ( $K^+P^-$ , fosfatasa) y DesKC- $\Delta$ 174 ( $K^+P^-$ , quinasa). En la figura se muestra en colores las posiciones clave **a** (rojo) y **d** (azul) y en verde el residuo 188 cuando hay una inserción de una posición en la héptada. En el estado  $K^+P^-$  las cruces rojas indican cómo las posiciones **a** y **d** pasarían a ser ocupadas por residuos desfavorables (en general cargados) para enterrarse hacia el interior de un *coiled-coil*.



DesKC-H188V (figura 26B). Por esta razón, la sustitución de la His<sub>188</sub> por una valina favorece la ubicación hacia el interior hidrofóbico del DHp y estabiliza la conformación fosfatasa. Por otro lado, la comparación estructural de los distintos DHp utilizando el programa Escet, sugiere la presencia de una zona conformacionalmente rígida e invariable (residuos 190 a 227), mientras que las regiones que conectan el DHp a la región sensora (residuos 154 a 189) y a los ABD (residuos 228 a 243) presentan una gran flexibilidad (figura 27). Estas características reflejan la gran plasticidad estructural del dominio DHp.



**Figura 27: Comparación estructural entre distintos DHp utilizando el programa Escet.** A) Matriz de diferencia de distancias considerando las incertidumbres posicionales entre las estructuras de V188a, E188b y E188a, seleccionadas por presentar la mayor resolución en cada subgrupo conformacional. B) Superposición de los dominios DHp considerando la región invariable (residuos 190 – 197 y 199 – 227). En barras verdes se señala la ubicación de la histidina fosforilable, que queda incluida en una región variable.

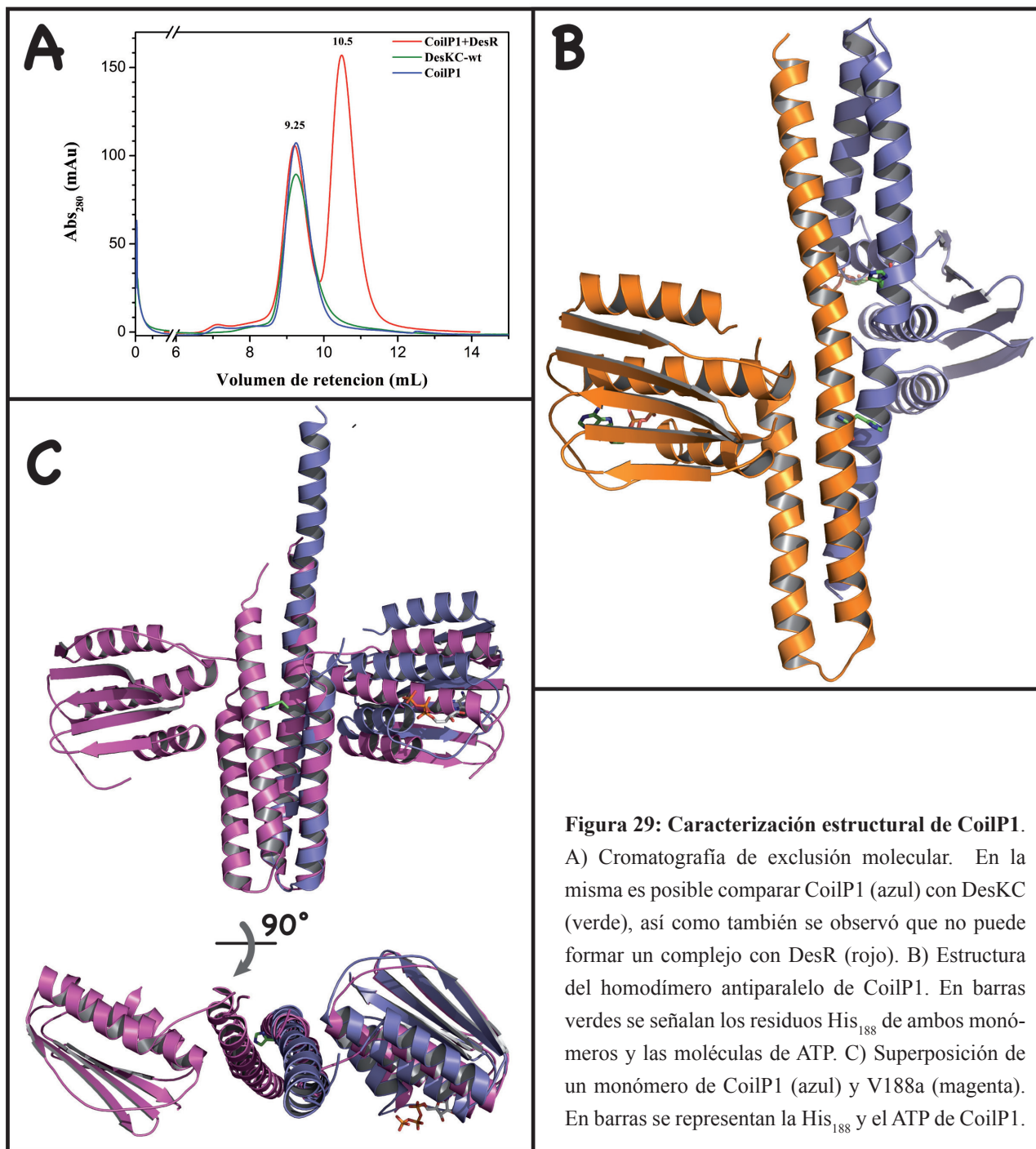
Con el objetivo de validar estos resultados cristalográficos, se intentó obtener información estructural mediante ensayos de entrecruzamiento específicos, colocando cisteínas en posiciones clave y analizando la formación de puentes de disulfuro. Para esto se construyeron 4 mutantes puntuales, DesKC-A184C, DesKC-H188V+A184C, DesKC-L191C y DesKC-H188V+L191C. Los residuos de Ala<sub>184</sub> y Leu<sub>191</sub> fueron seleccionados ya que presentan un cambio importante entre el estado quinasa y fosfatasa, ubicándose hacia el interior del DHp de DesKC-H188V. Los mutantes DesKC-H188V+A184C y DesKC-H188V+L191C permitieron detectar efectivamente la formación de los puentes de disulfuro como era previsto. En el caso de los mutantes en DesKC (con la His en posición 188), resultados pre-

liminares indicaron que los puentes disulfuro se forman (datos no publicados); sin embargo, las proteínas así modificadas resultaron ser inestables, sus perfiles cromatográficos de exclusión molecular revelaron una gran heterogeneidad estructural, no permitiendo llegar a datos concluyentes. Ensayos en curso procuran evitar la agregación mediante la co-expresión y co-purificación de estos mutantes con DesR, método que recientemente demostramos efectivo en diversos mutantes inestables de DesKC.

## 7.8. Relevancia del *coiled-coil* N-terminal en la transmisión de la señal

El mecanismo propuesto para regular la transición fosfataza–quinasa implica un enterramiento de la His<sub>188</sub> hacia el interior del DHp, lo cual impondría un costo energético por el ambiente hidrofóbico del mismo. Es posible especular que existan compensaciones energéticas tanto por la formación de nuevos contactos en el *coiled-coil* N-terminal como en la asociación DHp-ABD, permitiendo que ambos estados sean isoenergéticos. Para demostrar que la señal desde la región sensora de membrana en DesK define la formación o ruptura de esta extensión *coiled-coil* N-terminal se propuso estabilizar los estados fosfataza y quinasa (mediante ingeniería de proteínas) introduciendo mutaciones en el extremo N-terminal, alejados del sitio de fosforilación. De acuerdo a estas hipótesis, se debería poder mimetizar las conformaciones que adopta DesK en respuesta a los cambios en la temperatura, sin modificar el sitio clave de fosforilación. En la figura 28 se esquematizan los distintos mutantes generados. La asignación de las héptadas es un requisito indispensable para poder definir los residuos hidrofóbicos que formarán el núcleo del *coiled-coil* de dos hélices  $\alpha$ . Sin embargo dicha asignación no es una tarea trivial, fundamentalmente debido a que la periodicidad no es perfecta. Se construyó así un primer mutante ‘fosfataza’ mediante la introducción de un *coiled-coil* perfecto que permitiera ubicar a la His<sub>188</sub> en la posición **a** (CoilP1). Inesperadamente, este mutante no mostró un volumen de retención por cromatografía de exclusión molecular mayor a DesKC, ni tampoco fue capaz de formar un complejo con DesR (figura 29A). De cualquier modo logramos cristalizar CoilP1 y coleccionar datos completos de difracción. Luego de varios intentos iniciales infructuosos, finalmente obtuvimos una forma cristalina que permitió resolver la estructura por reemplazo molecular a 3.5 Å de resolución, en el grupo de espacio P2<sub>1</sub> con 1 dímero por UA. En este caso se ubicaron los 2 dominios ABD, mientras que no se tuvo éxito en posicionar el DHp, a pesar de utilizar distintos programas de reemplazo molecular y sondas de búsqueda (Amore, Phaser y Molrep). La solución al problema fue alcanzada utilizando la solución parcial de reemplazo molecular como sonda de búsqueda en un juego de datos a 3 Å de resolución (tabla X), posicionando 4 dominios ABD en la UA. Luego se realizó un refinamiento del modelo parcial utilizando el programa Buster-TNT. Los mapas de densidad electrónica resultantes





**Figura 29: Caracterización estructural de CoilP1.**

A) Cromatografía de exclusión molecular. En la misma es posible comparar CoilP1 (azul) con DesKC (verde), así como también se observó que no puede formar un complejo con DesR (rojo). B) Estructura del homodímero antiparalelo de CoilP1. En barras verdes se señalan los residuos His<sub>188</sub> de ambos monómeros y las moléculas de ATP. C) Superposición de un monómero de CoilP1 (azul) y V188a (magenta). En barras se representan la His<sub>188</sub> y el ATP de CoilP1.

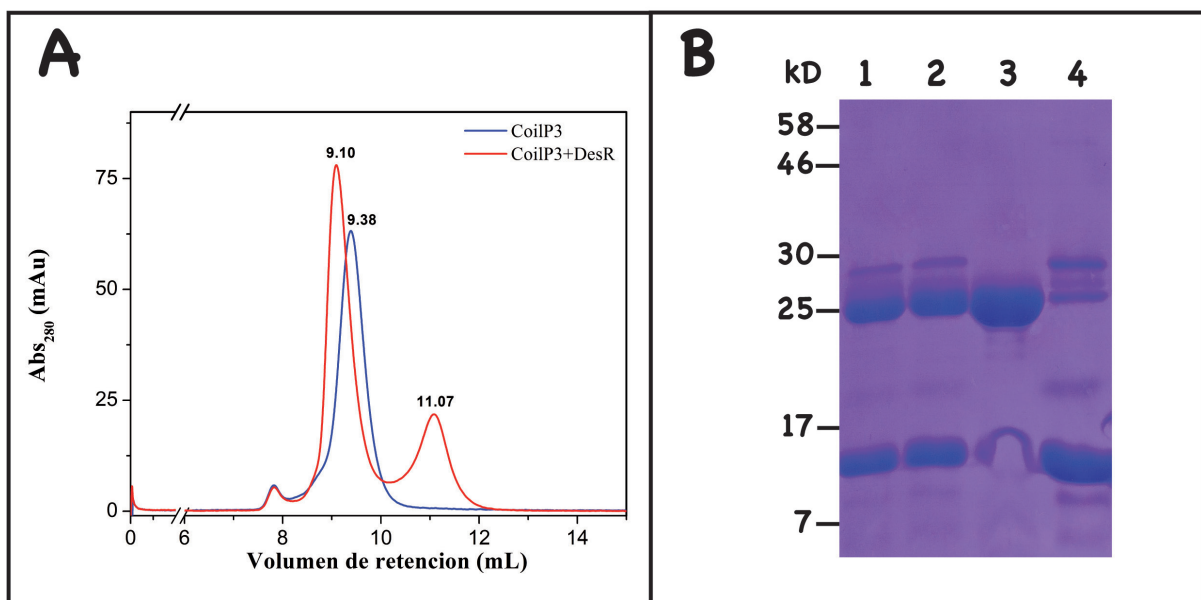
Un análisis más exhaustivo sobre la asignación de héptadas en la secuencia N-terminal de DesKC y las estructuras 3EHH y 3EHF, permitió identificar un *stutter* (corrimiento de la fase de secuencia en el patrón de una héptada de *coiled-coil* que puede interpretarse como una deleción de tres residuos) a la altura de la Leu<sub>174</sub> (figura 26). Este *stutter* provoca una deformación de la hélice  $\alpha 1$  generando una curvatura en la misma, permitiendo el correcto empaquetamiento de las dos hélices  $\alpha$  del *coiled-coil* hacia el N-terminal, lo que probablemente explique que su inadvertida eliminación haya resultado en

Tabla X: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para la estructura CoilP1.

	<b>CoilP1</b> (refinamiento parcial)
Grupo de espacio	P2 <sub>1</sub> <i>twinning hemihédrico</i>
Longitud de onda (Å)	1.5418
Resolución de los datos (Å)	29.3 - 3.0 (3.1 - 3.0)
Reflexiones medidas	101311
Multiplicidad	3.8 (3.7)
Complejitud (%)	99.9 (99.9)
R <sub>meas</sub> (%)	9.6 (45.7)
<I/σ(I)>	6.2 (1.7)
a b c (Å)	72.55 132.55 72.81
β (°)	102.4
Resolución de refinamiento (Å)	39.3 – 3.0
R <sub>crist</sub> [N° refs]	0.247 [25633]
R <sub>free</sub> [N° refs]	0.292 [1329]
Rmsd (enlaces/ángulos)	0.021 Å / 1.9 °
Átomos de proteína (excluyendo hidrógenos)	6047
Átomos de agua	—
Átomos de ligandos	124 (ATP) / 4 (Mg <sup>+2</sup> )
N° de residuos en regiones del gráfico de Ramachandran (permitido/no permitido)	789 / 21

la estructura aberrante de CoilP1. Se propuso entonces generar cuatro construcciones nuevas introduciendo las mutaciones estabilizantes a una mayor distancia de la posición de fosforilación en el DHp. Fueron denominadas CoilP2, CoilP3, CoilP4 y CoilP5 (figura 28). CoilP2 resultó completamente inestable, no observando proteína en la fracción soluble del extracto bacteriano. Por el contrario, CoilP3 se expresó en buena cantidad como proteína soluble, aunque constatándose cierta inestabilidad, ya que una proporción importante de la proteína formó agregados solubles de alto peso molecular. Sin embargo, la proteína purificada correspondiente al homodímero, fue utilizada demostrando ser capaz de formar un complejo específico con DesR (figura 30A). El volumen de retención de CoilP3 es de 9.4 mL, lo que corresponde a una proteína de mayor peso molecular (aproximadamente 62 kD), sugiriendo que la estabilización del *coiled-coil* N-terminal podría inducir cambios conformacionales similares a DesKC-H188V. Para resolver los problemas de rendimiento, se evaluó la co-expresión con una versión truncada de DesR (DesR-N136, que presenta únicamente el dominio REC), siendo posible obtener cantidades suficientes de proteína no agregada tanto de CoilP2 como CoilP3. Sin em-

bargo, los intentos por separar ambas proteínas por gel filtración resultaron infructuosos, observando una persistente contaminación con DesR-N136 a pesar de numerosos intentos de separación por distintos criterios. De cualquier manera se procedió con los intentos de cristalización (tanto en presencia de esta pequeña contaminación como adicionando suficiente DesR-N136 para generar un complejo 1:1), no obteniendo cristales en >1680 condiciones. Procurando evitar esta contaminación, se realizó la co-expresión de CoilP3 y DesR-N136 (careciendo esta última de sitio de corte para TEV) en el vector pACYC-Duet11. De esta manera, al realizar la segunda IMAC luego de la digestión con TEV, DesR-N136 debería quedar retenida. Al contrario de lo esperado, las primeras pruebas revelaron que ambas proteínas se mantuvieron inmovilizadas aun en condiciones muy extremas (2 M NaCl ó 1 M urea), y sólo fue posible separarlas al inyectar 6 M urea, indicando la fuerza de esta interacción (figura 30B). Por esta razón, a continuación se decidió realizar una optimización de las condiciones de purificación de CoilP3 sola, de forma de obtener cantidades suficientes de proteína soluble para estudios estructurales y funcionales. Se observó que la incubación de CoilP3 a temperatura ambiente provoca la progresiva formación de agregados solubles. El estudio de esta agregación mediante cromatografía de exclusión molecular (S75 10/150, GE Healthcare) permitió constatar que es posible evitarla por incubación con ATP o derivados (ADP o AMP-PCP). La adición de DesR, glicerol, NaCl >1 M y el trabajo a temperaturas <6 °C, también retardan la agregación. De esta forma, se obtuvieron cantidades



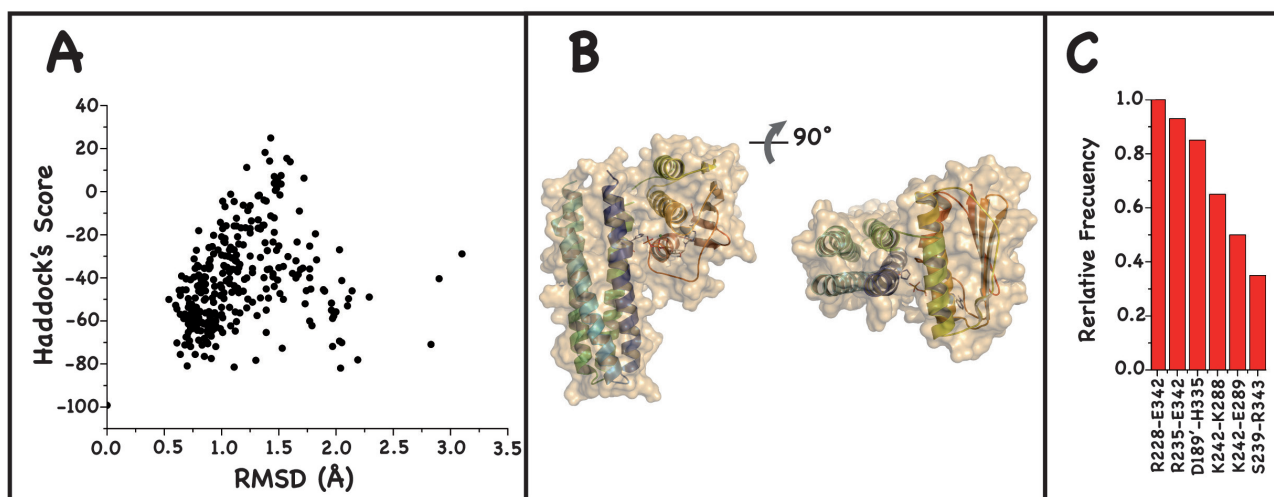
**Figura 30: Fortalecimiento del coiled-coil N-terminal.** A) Evaluación de la formación del complejo CoilP3–DesR-N136 por cromatografía de exclusión molecular. CoilP3 (en azul) presenta un volumen de retención similar a una proteína globular de 62 kD, mientras que el complejo CoilP3+DesR (rojo) sería equivalente a una proteína de 70.3 kD (un dímero de CoilP3 parecería estar asociado a un monómero de DesR). B) SDS-PAGE de la co-expresión CoilP3–DesR-N136. En el carril 1 se sembraron las proteínas purificadas luego de digerir con la proteasa TEV. En el carril 2 se corrieron las proteínas eluidas con 0.5 M imidazol, luego de un lavado extenso con soluciones conteniendo 2 M NaCl ó 1 M urea. En el carril 3 se inyectó en cambio 6 M urea observando el material despegado (principalmente CoilP3); finalmente en el carril 4, se muestra la elución con 0.5 M imidazol luego del tratamiento observado en la calle 3 (recién allí se eluye DesR-N136).

suficientes de CoilP3 estable como para realizar rastreos de condiciones de cristalización y ensayos de ITC, como se describirá más adelante. Los ensayos de cristalización hasta el momento no han sido positivos.

## 7.9. Autofosforilación en DesK: docking y entrecruzamiento específico

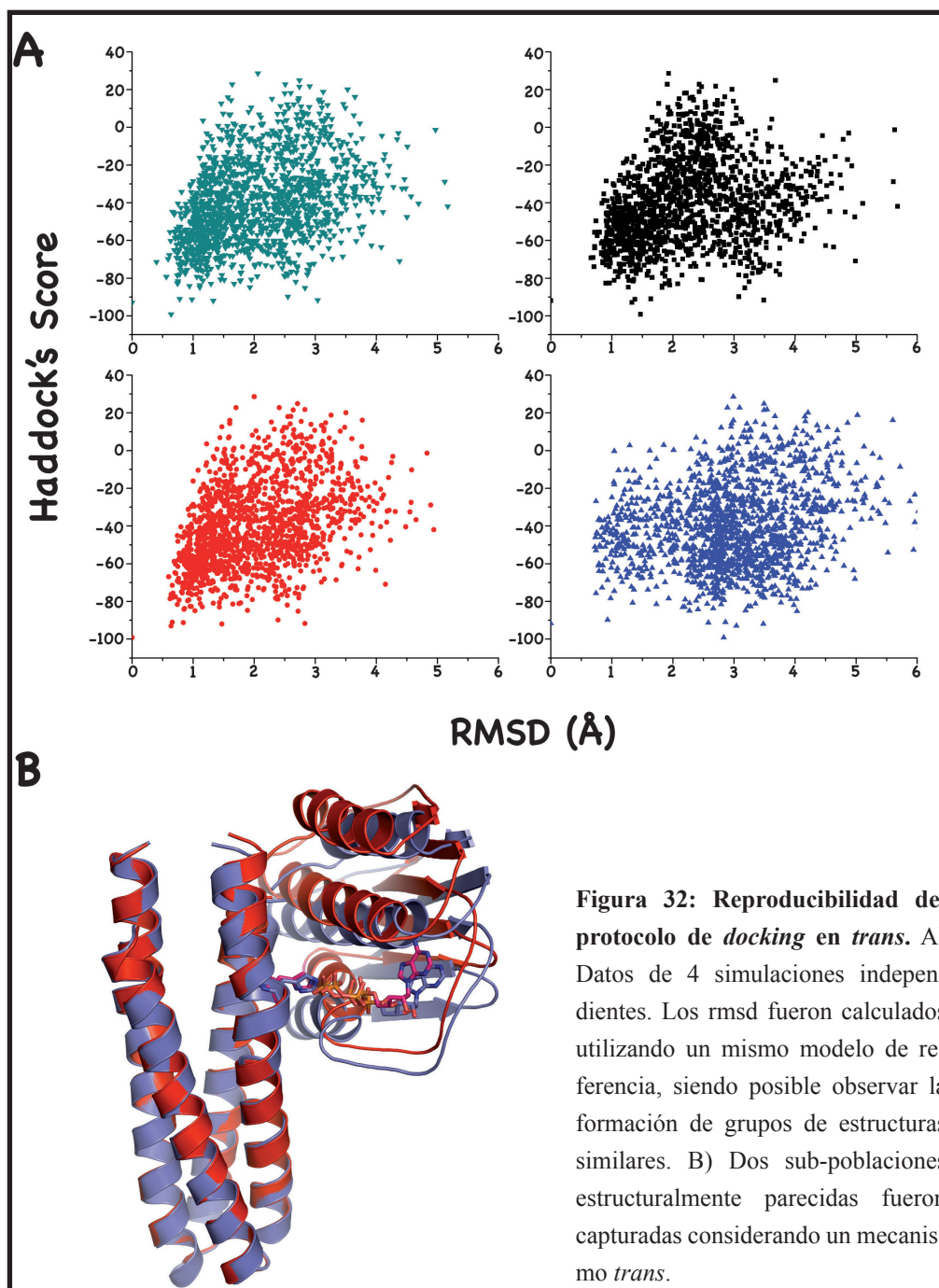
Los estudios estructurales presentados han permitido describir distintas conformaciones funcionales de DesK que podrían explicar cómo se regula el flujo de información en esta vía. En el estado quinasa los ABD se encuentran libres, lo que permite catalizar la reacción de autofosforilación. Capturar este estado fugaz por cristalografía puede resultar un desafío insalvable. Para abordar este problema se decidió realizar primero una aproximación bioinformática, aprovechando la disponibilidad de la estructura DesKC-ABD en complejo con su sustrato natural a alta resolución. Se realizaron ensayos de *docking* proteína-proteína entre los dominios DHp y ABD, buscando que la histidina fosforilable quedara a distancia de reacción del P $\gamma$  del ATP. El estado quinasa de DesK presenta dos sitios fosforilables simétricos, por lo que es posible asumir dos escenarios alternativos: mecanismo de autofosforilación en *trans* o en *cis* utilizando el programa Haddock<sup>258,259</sup>, que permite la incorporación de restricciones experimentales de distancia en los cálculos (denominados AIR, por *Ambiguous Interaction Restraints*). Se realizaron una cantidad de pruebas preliminares para definir el sistema de trabajo, incluyendo el estado de protonación de la His<sub>188</sub>, rotámeros de la misma, AIRs, etc. (como se detalla en la sección Materiales y Métodos). Estos ensayos de docking se realizaron utilizando las coordenadas de DesKC-ABD (3EHG) y el DHp de E188b (residuos 176-182 de 3GIE, sustituyendo el Glu<sub>188</sub> por una histidina en su rotámero más frecuente). También este programa admite realizar protocolos de *docking* semi-flexible, aumentando así el espacio conformacional de búsqueda<sup>281</sup>. Asimismo, dado que distintos grupos han propuesto que el *ATP lid* sería importante en la autofosforilación<sup>87,282</sup>, y teniendo en cuenta que en DesK tanto este bucle como el extremo N-terminal del ABD (residuos 243-246, que conecta con el dominio DHp) presentan importante flexibilidad, se decidió agregar diversidad estructural localizada en estas regiones utilizando el programa CNS 1.2<sup>260</sup>. Si bien se desconoce el mecanismo de autofosforilación de DesK, sea *cis* o *trans*, necesariamente se deben dar dos condiciones: 1) el N $\epsilon$  de la His<sub>188</sub> del DHp tiene que estar a distancia de reacción del P $\gamma$  del ATP de uno u otro ABD y, 2) el C de la cadena principal de la Lys<sub>242</sub> se encuentra a una corta distancia del N de la Gly<sub>243</sub> del ABD (restituyendo el enlace peptídico entre ambos dominios). Dado que no observamos diferencias entre la selección del N $\epsilon$  o N $\delta$  en el resultado final del docking, se decidió continuar el trabajo considerando al N $\epsilon$ , en función de la evidencia de que la fosforilación en esta posición es más estable<sup>263</sup> y en CheA, se confirmó que este es el sitio de modificación<sup>262</sup>. Dependiendo de la cadena

seleccionada es posible evaluar el mecanismo *trans* o *cis*. En las figuras 31 y 33, se muestran respectivamente los ensayos realizados para ambos mecanismos. El análisis en detalle de las 300 estructuras con mejor puntuación para el docking en *trans* revela un cluster mayoritario de modelos con un rmsd menor a 2.5 Å, que puede a su vez distinguirse en dos subpoblaciones muy parecidas, pero con una ligera diferencia en la orientación del ABD (figura 32). Por otro lado, al considerar la frecuencia de interacciones entre ambos dominios para los 10 modelos con mejor puntuación, algunas interacciones se encuentran claramente sobrerrepresentadas (figura 31C). Alguno de estos residuos se encuentran muy conservados, sugiriendo que podrían ser importantes para alinear ambos dominios durante la autofosforilación. Por ejemplo, Arg<sub>235</sub>-Glu<sub>342</sub> (presentan una conservación en la familia HSKA\_3 de 93 y 70 %, respectivamente), Arg<sub>228</sub>-Glu<sub>342</sub> (35 y 70 %), Asp<sub>189</sub>-His<sub>335</sub> (96 y 15 %), Lys<sub>242</sub>-Glu<sub>289</sub> (44 y 96 %), y Asp<sub>189</sub>-Lys<sub>296</sub> (99 y 52 %). Estos contactos surgieron en todos los modelos con mejor puntuación, así como también en ensayos independientes. El mejor modelo presenta una interacción entre el extremo C-terminal del ATP lid con la hélice  $\alpha$ 1 del DHp, por enlaces de H entre la His<sub>335</sub> y el Asp<sub>189</sub>, y entre la Gly<sub>199</sub> y la Lys<sub>333</sub>. Algunos contactos parecerían ser fuertes, ya que quedan enfrentados residuos de carga opuesta, formando puentes salinos con distancias cortas, como ser: Asp<sub>189</sub>-Lys<sub>296</sub>, Arg<sub>228</sub>-Glu<sub>342</sub>, Arg<sub>235</sub>-Glu<sub>342</sub> y Lys<sub>242</sub>-Glu<sub>289</sub>. Algunos de estos residuos se ubican en la hélice  $\alpha$ 5 del ABD, que previamente fue sugerida como relevante por presentar cambios conformacionales al unirse el sustrato ATP. Finalmente, la disposición de los dominios, así como también la configu-



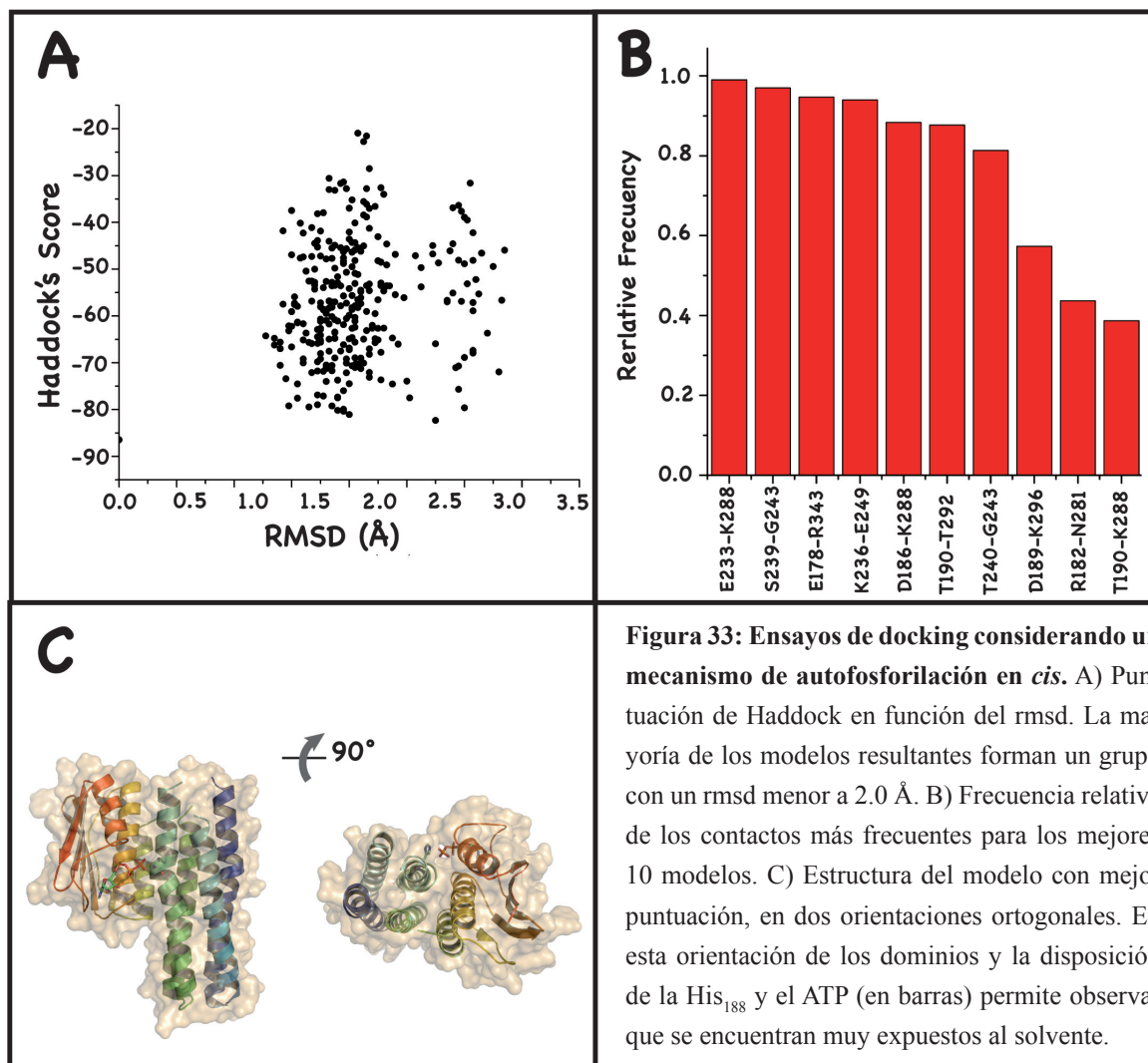
**Figura 31: Docking entre los dominios ABD y DHp de DesKC.** A) Puntuación de Haddock en función del rmsd (calculado con respecto al modelo de mejor puntuación). La mayoría de los modelos resultantes forman un grupo con un rmsd menor a 1.5 Å. B) Estructura del modelo con mejor puntuación para un mecanismo de autofosforilación en *trans*, en dos orientaciones ortogonales. La superficie accesible al solvente de ambos dominios se muestra parcialmente transparente para distinguir la orientación entre los dos dominios. Los residuos His<sub>188</sub> y el ATP están señalados en barras. C) Frecuencia relativa de contactos para los mejores 10 modelos. El histograma está limitado a una frecuencia de 30 %, permitiendo distinguir los pares de residuos mas representados (los residuos que presentan una comilla única (') pertenecen al otro monómero dentro del dímero).

ración del ATP lid, enfrenta a la Gly<sub>192</sub> con la Gly<sub>334</sub>. Estos residuos se encuentran muy conservados y dado su pequeño tamaño probablemente tengan como función permitir el empaquetamiento más cercano entre ambos dominios.

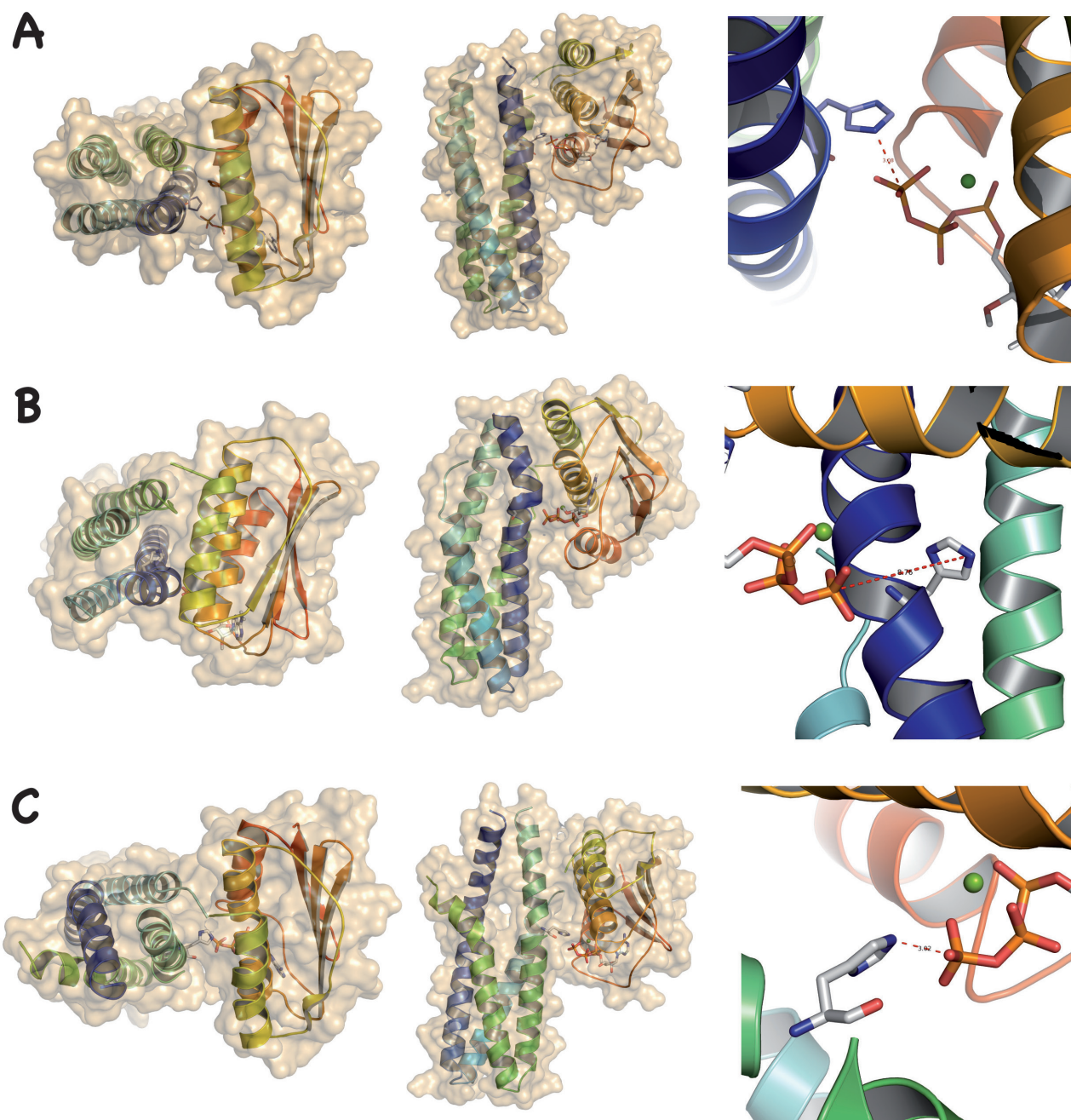


El mismo protocolo de docking fue realizado considerando un mecanismo de tipo *cis* (figura 33). Comparados con la hipótesis de mecanismo en *trans*, estos ensayos resultaron en modelos con energías menos favorables, así como una distancia mayor entre el punto de conexión entre los dos dominios (bisagra Lys<sub>242</sub>-Gly<sub>243</sub>) y la His<sub>188</sub>, lo que impone restricciones severas en los grados de libertad que permiten acomodar el ABD sobre el DHp. A diferencia de lo que ocurre para los modelos de

autofosforilación en *trans*, la disposición de los dominios en *cis* ubica a la His<sub>188</sub> y el P $\gamma$  del ATP muy expuestos al solvente, en ausencia de un ambiente proteico que pueda asistir en la catálisis, sugiriendo que este mecanismo es menos probable.



A continuación se evaluó si las simulaciones por *docking* usando los distintos estados conformacionales del DHp, podían aportar evidencias adicionales sobre la ausencia de actividad autoquinasa en los estados de tipo fosfatasa y fosfotransferasa. Usando el mismo protocolo de *docking* previamente descrito pero utilizando las coordenadas de los DHp de las estructuras de DesKC-H188V (3EHH) y DesKC-P (PDB 3GIG), los resultados sugieren que los cambios estructurales observados en el dominio DHp imponen efectivamente restricciones para la actividad de autofosforilación en estos estados (figura 34). En el caso del estado fosfotransferasa la superficie inaccesible al solvente por la asociación así como también la energía de interacción son significativamente menores (tabla XI). Aunque en el estado fosfatasa la superficie de contacto es mayor, la distancia entre el P $\gamma$  del ATP y la His<sub>188</sub>, debido a los movimientos rotacionales previamente descritos, es demasiado grande como para poder catalizar la fosforilación.



**Figura 34: Análisis de la asociación DHP-ABD para diferentes estados funcionales de DesK.** A la izquierda se muestran los modelos con mejor puntuación para cada uno de los estados conformacionales analizados (quinasa, fosfatasa y fosfotransferasa). Mientras que hacia la derecha se observa un acercamiento de la His<sub>188</sub> y el ATP, resaltando las distancias entre el Nε y Pγ. A) DHP en el estado quinasa (PDB ID 3GIE). La distancia entre ambos átomos es de 3 Å. B) Igual a A, pero empleando el DHP en el estado fosfatasa (PDB ID 3EHH). La Val<sub>188</sub> fue sustituida por una histidina en un rotámero frecuente. La distancia entre el Nε de la His<sub>188</sub> y el Pγ del ATP es de 8.8 Å, lo cual sería demasiado grande para ser compatible con la reacción de fosforilación. C) Estructura del modelo con mejor puntuación empleando el dominio DHP del estado fosfotransferasa (PDB ID 3GIG). La superficie escondida al solvente es considerablemente menor en comparación con el estado quinasa, así como también la energía asociada a esta interacción.

Finalmente, teniendo en cuenta que DesK-P presenta una estructura asimétrica con un único sitio fosforilado, es pertinente preguntarse por qué la proteína es incapaz de fosforilar a un segundo sitio fosforilable dentro del dímero. Los ensayos de docking entre el ABD y el DHP sugieren que en el estado fosfotransferasa, las superficies de interacción (850 Å<sup>2</sup>) serían significativamente menores que

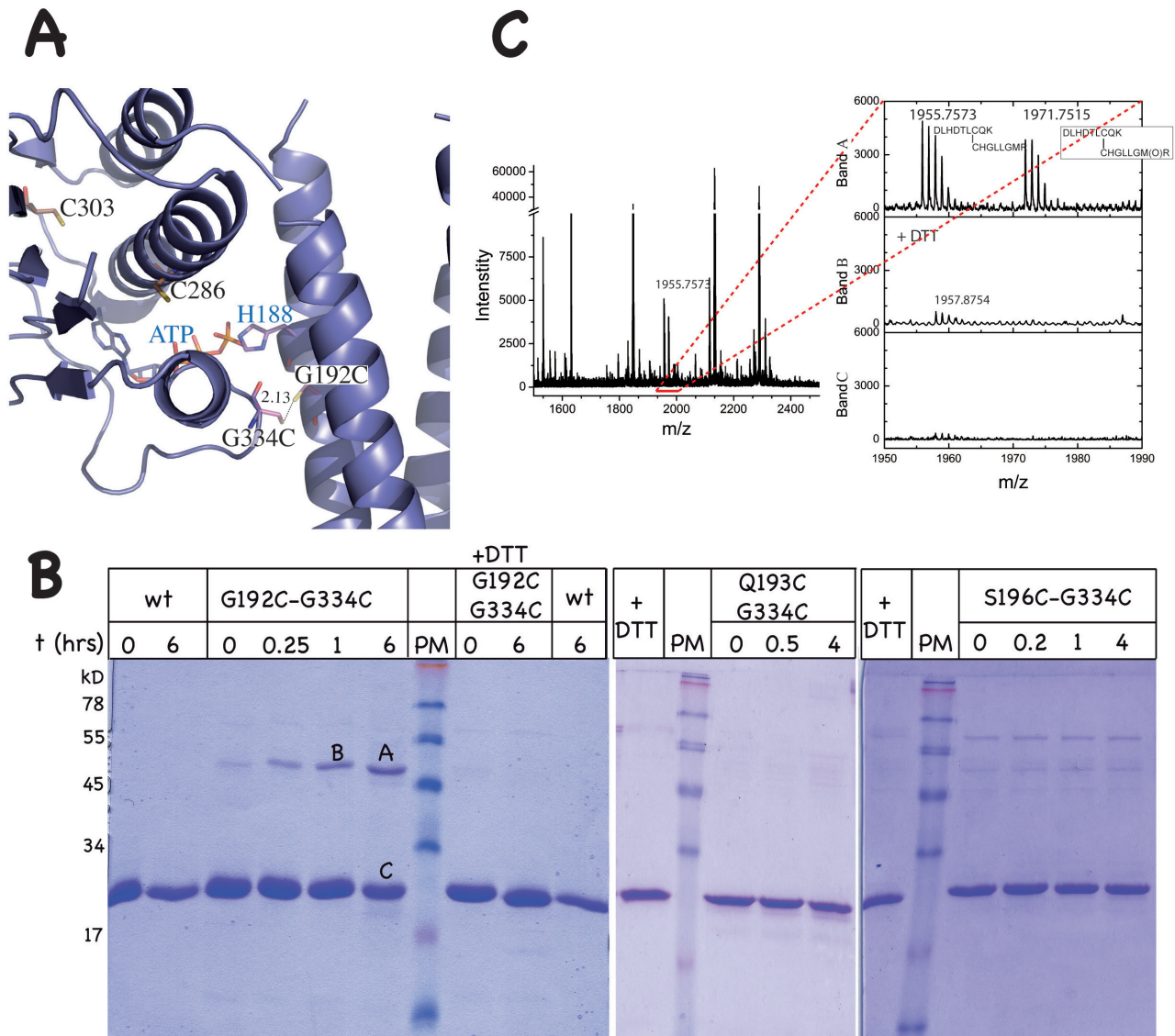
en el estado quinasa (1540 Å<sup>2</sup>), considerando a la His<sub>188</sub> del otro monómero. Esto sugiere que una vez adoptada la conformación de fosfotransferencia por fosforilación del primer sitio, a pesar de no existir impedimentos estéricos para acercar el ATP a la His<sub>188</sub> no fosforilada, la falta de suficiente superficie de interacción no permitiría al segundo ABD ubicarse correctamente como para catalizar la reacción.

Tabla XI: Detalles de la asociación DHp-ABD para los distintos estados funcionales de DesK

Estado funcional del DHp	Puntuación de Haddock	Superficie escondida al solvente (Å <sup>2</sup> )	Energía de Haddock (kJ/mol)	Distancia entre el Py del ATP y el Nε de la His <sub>188</sub> (Å <sup>2</sup> )
Quinasa	-99.2	1540	-620	3.08
Fosfotransferasa	-73.3	1271	-263	3.02
Fosfatasa	-135	1890	-761	8.7

En función de las simulaciones por *docking* se procedió luego a su verificación experimental. El procedimiento involucró el diseño de mutantes con cisteínas en posiciones específicas y se evaluó la eficiencia de formación de disulfuros. Si se considera a la interacción DHp-ABD como específica y genuina, colocando dos cisteínas en posiciones definidas se debería observar la formación de un puente covalente entre ambos dominios. Con este objetivo, se generó el doble mutante DesKC-G192C-G334C, ya que estos residuos quedarían enfrentados de acuerdo al modelo propuesto. La sustitución de ambas glicinas por cisteínas en el modelo de docking en *trans* (figura 35A) predice que ambos tioles quedarían a una distancia de reacción (menor a 2.5 Å) y debería formarse un dímero covalente, ya que ambos residuos pertenecen a distintos monómeros. En cambio, considerando el modelo de docking en *cis* esta distancia sería mayor a 11 Å, siendo improbable formar este entrecruzamiento. Esta proteína mutante fue purificada y oxidada en contacto con el aire, provocando la formación de un dímero covalente, claramente distinguible mediante separación por SDS-PAGE en condiciones no-reductoras. En la figura 35B se observa como la formación del dímero ocurre a expensas de la disminución en la cantidad de monómero. Incubaciones más largas resultaron en inestabilidad proteica, apareciendo especies de mayor peso molecular, por lo que no fue posible obtener toda la proteína en forma de dímero covalente. En un intento por acelerar el proceso de formación de disulfuros, también fueron ensayadas condiciones de oxidación más fuerte, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu(II)-(fenantrolina)<sub>4</sub>, o Cu(II)-(disulfonato de batocuproína)<sub>4</sub>). Sin embargo, estos tratamientos, incluso a tiempos de incubación cortos, provocaron la aparición de especies oligoméricas de alto peso molecular producto de la inestabilidad de la proteína o de la presencia de dos cisteínas endógenas en el ABD. Con el objeto de demostrar que el dímero covalente identificado es el producto del enlace covalente entre las dos cisteínas introducidas,

las bandas de los geles de SDS-PAGE fueron analizadas por espectrometría de masa MALDI-TOF (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo). La comparación entre las muestras tratadas en condiciones reductoras y no-reductoras permitieron identificar al puente de disulfuro predicho, confirmando la captura del intermediario de la reacción de autofosforilación en *trans* (figura 35C).



**Figura 35: Ensayos de entrecruzamiento específicos.** A) Modelo estructural de la conformación predicha de autofosforilación en *trans* incluyendo las sustituciones *in silico* de la Gly<sub>192</sub> y la Gly<sub>334</sub> por cisteínas (en barras). La distancia entre los tioles es de ~2.1 Å, compatible con la formación de un puente disulfuro en condiciones oxidantes. B) La reacción de entrecruzamiento por oxidación fue analizada por SDS-PAGE. La formación del puente disulfuro genera un enlace covalente entre monómeros, provocando la aparición de una banda de proteína de aproximadamente 50 kDa. Los carriles rotulados PM, corresponden a marcadores de peso molecular (cuyos valores en kDa se muestran a la izquierda del panel). Las bandas A, B y C fueron cortadas del gel para su análisis por espectrometría de masa. C) Espectros de masa de las digestiones tríplicas derivadas de las bandas A, B y C. Los picos correspondientes al péptido covalentemente unido por el enlace disulfuro se identifican sólo en las muestras derivadas de la banda A (la banda B confirma la desaparición de la especie por reducción). La Met<sub>340</sub> aparece en los estados reducido y oxidado (m/z 1955.7573 y 1971.7515, respectivamente).

Para evaluar la especificidad de las reacciones de entrecruzamiento, se generaron los mutantes DesKC-Q193C-G334C y DesKC-S196C-G334C. En el primer caso la primera cisteína se traslada en una posición en la hélice  $\alpha 1$ , o sea en una posición rotada  $\sim 100^\circ$  con respecto a DesKC-G192C-G334C. Mientras que la sustitución S196C coloca a la cisteína una vuelta de hélice más abajo (C-terminal) en la  $\alpha 1$ , lo que implica un desplazamiento de aproximadamente 5.4Å con respecto a la sustitución G192C. El mutante con la cisteína en la posición 193 no permitió detectar dímero covalente. En el caso de DesKC-S196C-G334C se observó una pequeña fracción de dímero, consistente con una misma orientación en el DHp que en la posición 192. Sin embargo, la baja eficiencia indica que la cisteína ubicada en la posición 192 se encuentra a una menor distancia (figura 35B). En conjunto, estos resultados indican que los dominios ABD y DHp se aproximan entre sí con una orientación específica, apoyando fuertemente el modelo obtenido por *docking*. Ensayos funcionales comparando DesKC con proteínas mutantes puntuales en la  $\alpha 5$  (DesKC-E342A y DesKC-R343A), sugieren que esta región cumpliría una función importante en el estado de autofosforilación, aunque hasta el momento no comprendemos las diferencias observadas en las curvas de consumo de ATP.

En lo que hace al análisis de elementos estructurales importantes, la presencia de regiones conservadas puede proporcionar evidencias de preservación funcional. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de HQs de la familia HSKA\_3, que fue luego mapeado en la superficie de DesK-ABD (figura 36A). Este trabajo fue realizado en colaboración con Martín Graña (Unidad de Bioinformática, IPMontevideo). Como es esperable, los residuos directamente involucrados en la unión al ATP y en la coordinación del  $Mg^{+2}$ , se encuentran muy conservados. Sorprendentemente, un segundo parche conservado se ubica alejado del sitio de unión al ATP, que comprende a los residuos Gly<sub>336</sub> a Leu<sub>344</sub> en la hélice  $\alpha 5$  (figura 36B). Esta misma región fue identificada previamente como una de las zonas que sufre los rearrreglos más importantes al sustituir el ADP por ATP. Algunos de estos residuos también participan directamente en la asociación DHp-ABD en el estado fosfatasa (Arg<sub>228</sub> y el Glu<sub>342</sub> o Glu<sub>233</sub> y la Arg<sub>343</sub>, figura 19C). Además, el modelo estructural de autofosforilación también propone que esta hélice  $\alpha 5$  es importante en otra forma de interacción DHp-ABD. Por otro lado, el mapeo de conservación sobre la estructura del DHp permite visualizar un parche muy conservado alrededor de la histidina fosforilable (figura 36C), como era de prever.

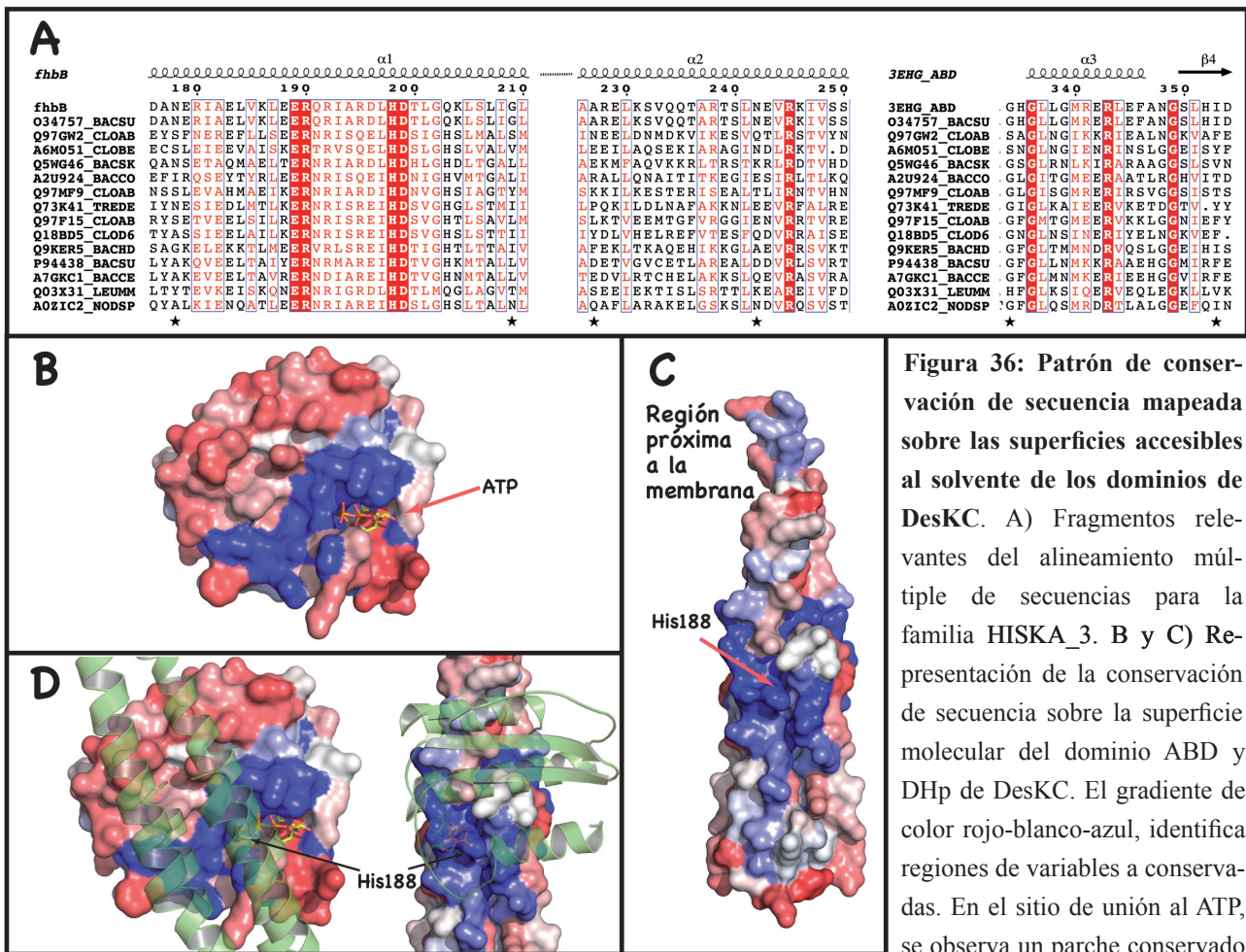
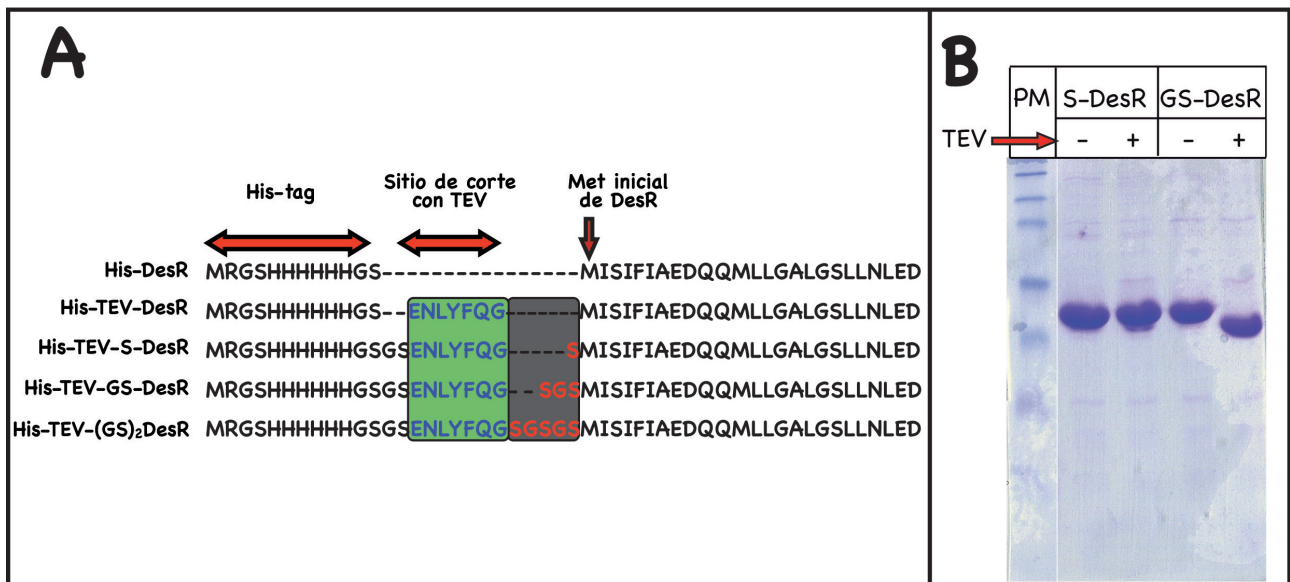


Figura 36: Patrón de conservación de secuencia mapeada sobre las superficies accesibles al solvente de los dominios de DesKC. A) Fragmentos relevantes del alineamiento múltiple de secuencias para la familia HISKA\_3. B y C) Representación de la conservación de secuencia sobre la superficie molecular del dominio ABD y DHp de DesKC. El gradiente de color rojo-blanco-azul, identifica regiones de variables a conservadas. En el sitio de unión al ATP, se observa un parche conservado

en el ABD que se continúa con otra región más alejada, sobre la hélice  $\alpha 5$ . En el DHp también se puede observar una región conservada alrededor de la histidina fosforilable. D) Ambas regiones se enfrentarían al adoptar la conformación de autofosforilación en *trans* predicho por *docking*.

## 7.10. Estructura del dominio receptor de DesR

Durante el transcurso de esta tesis, se realizaron grandes esfuerzos por cristalizar DesR. Sin embargo, a pesar de ensayar más de 4600 condiciones diferentes, donde fueron modificados muy diversos parámetros (concentración de proteína, temperatura, presencia de aditivos, etc), no fue posible obtener cristales adecuados para su análisis por difracción. También fueron realizados rastreos de condiciones para proteína de fusión GST-DesR o DesR modificada químicamente mediante un tratamiento de metilación reductiva de lisinas, que para algunos casos recalcitrantes ha demostrado ser útil<sup>283</sup>. Hasta ese momento, la construcción utilizada presentaba una etiqueta histidinas N-terminal, con lo que se decidió generar tres nuevas construcciones (figura 37A). Todas resultaron ser solubles, y de buen rendimiento. S-DesR resultó ser resistente a la digestión con TEV, sugiriendo que la distancia entre el sitio de corte y el comienzo de DesR impone restricciones estéricas para la interacción con la proteasa (figura 37B). En función de estos resultados se decidió continuar el trabajo con GS-DesR, que permite eliminar la etiqueta de histidina dejando hacia el N-terminal el motivo fusionado más corto (GlySerGly).

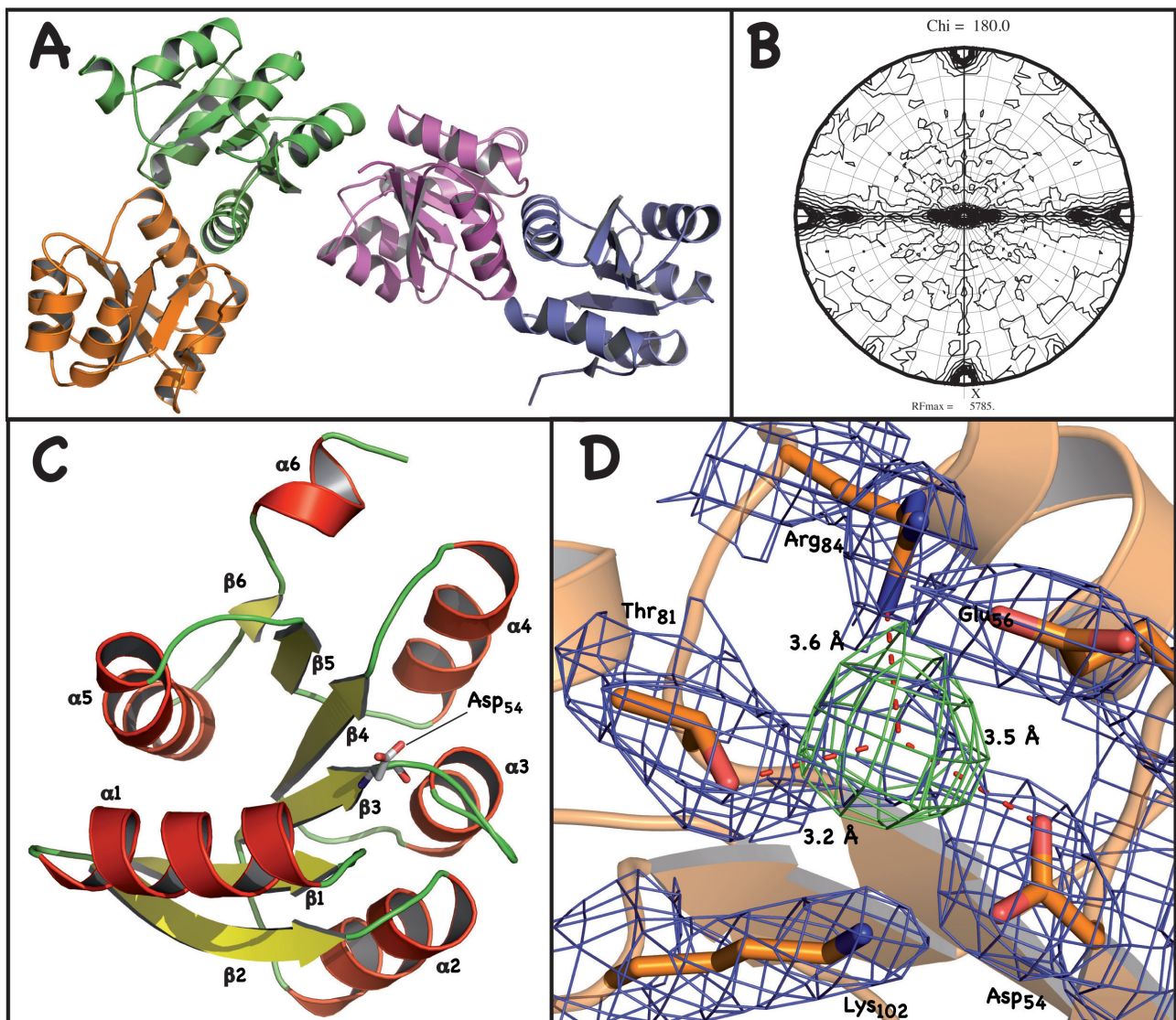


**Figura 37: Construcciones de DesR para lograr eliminar la etiqueta de histidinas empleando la proteasa TEV.** A) Alineamiento de secuencias de las diferentes construcciones generadas. El recuadro verde resalta la secuencia específica de corte por TEV, mientras que en gris se destacan los residuos adicionales entre este sitio de corte y la primer metionina de DesR. B) SDS-PAGE de dos de las proteínas estudiadas antes y después de incubación con TEV.

Los ensayos de cristalización de GS-DesR fueron más alentadores, produciendo cristales de proteína, aunque el orden cristalino resultó muy pobre. Se buscaron nuevas condiciones de cristalización mediante rastreo robótico, utilizando semillas de estos mismos cristales<sup>284</sup>, así como el agregado de aditivos, con el objetivo de mejorar el orden y el tamaño, pero hasta el momento no ha sido posible obtener mejoras sustanciales. Ya que los fallidos intentos por cristalizar el complejo DesKC-DesR podrían explicarse en parte a los problemas de cristalizabilidad del RR, se diseñaron dos nuevas construcciones que permitieran expresar en forma soluble el dominio REC de DesR: DesR-K120 y DesR-N136 (excluyendo o no una putativa  $\alpha$ -hélice conectora entre el dominio REC y el HTH, en el nombre se identifican los últimos residuos correspondientes al extremo C-terminal de cada proteína). DesR-K120 resultó insoluble acumulándose en cuerpos de inclusión. Por el contrario DesR-N136 se expresó en forma soluble, con buen rendimiento. Esta proteína presenta el mismo extremo N-terminal que GS-DesR, con la etiqueta de histidinas y el sitio de corte para TEV. Por lo tanto, continuamos nuestro trabajo con esta nueva variante.

DesR-N136 es una proteína muy soluble y fue concentrada hasta  $\sim 245$  mg/ml ( $\sim 16$  mM). Los rastreos de cristalización revelaron varias condiciones con formas cristalinas y la optimización de una de ellas permitió obtener pequeños cristales en forma de barra (figura 12). La concentración de la proteína fue reducida hasta niveles donde no crecieran espontáneamente los cristales, para luego controlar el número por sembrado, lo que permitió prepararlos de tamaño suficiente para montar en el equipo

de difracción. Estos cristales fueron empleados para obtener un juego de datos completo a 2.6 Å de resolución (N136a, tabla XII). La estructura fue resuelta por reemplazo molecular utilizando las coordenadas de 3B2N, un RR de la familia LuxR de *Staphylococcus aureus*, seleccionada por ser la que presentó mayor homología de secuencia en la base de datos PDB. La unidad asimétrica del cristal esta formada por 4 moléculas (figura 38A), y es posible modelizar prácticamente la totalidad de la proteína desde el extremo N-terminal hasta el Asp<sub>130</sub> o la Tyr<sub>131</sub> dependiendo de la cadena. En las cadenas B y D no es posible modelar los residuos 83-84 y 83-86, respectivamente, ya que se encuentran desordenados. Las cuatro proteínas se disponen en dos homodímeros muy similares entre sí, con



**Figura 38: Estructura del dominio receptor de DesR (N136a).** A) Modelo estructural de cuatro moléculas en la UA de N136a, con colores diferentes para cada cadena. B) Función de autorotación de N136a en el grupo de espacio P2<sub>1</sub>. C) Representación esquemática de la estructura del dominio REC de DesR. Las hélices  $\alpha$  están coloreadas en rojo, las hébras  $\beta$  en amarillo y los bucles en verde. El residuo fosforilable Asp<sub>54</sub> se representa en barras. D) Mapas de densidad electrónica  $2mF_{obs} - DF_{calc}$  ( $1\sigma$ , en azul) y  $mF_{obs} - DF_{calc}$  ( $3\sigma$ , en verde) en la región cercana al sitio de fosforilación (Asp<sub>54</sub>). En la figura se observa la presencia de un pico positivo en el mapa de Fourier diferencia, a corta distancia del Asp<sub>54</sub> y la Thr<sub>81</sub>.

un rmsd de 0.46 Å. La función de autorotación con los datos procesados en el grupo de espacio  $P2_1$  revela 3 picos correspondientes a ejes de simetría no cristalográficos de orden 2 (figura 38B). El más importante es muy significativo, con una altura de 82 % del eje único cristalográfico, y perpendicular al mismo (con lo que se genera automáticamente un tercer eje ortogonal). Esta díada relaciona a los dos dímeros de la UA entre sí, muy sutiles diferencias son las responsables de romper la simetría ortorrómbica. Los otros dos picos menores (~35%), relacionan a los monómeros de cada homodímero siguiendo un patrón de simetría 2 helicoidal, lo cual genera el esperable patrón de reflexiones impares sistemáticamente débiles en el eje 001.

Tabla XII: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para las estructuras N136a y N136b.

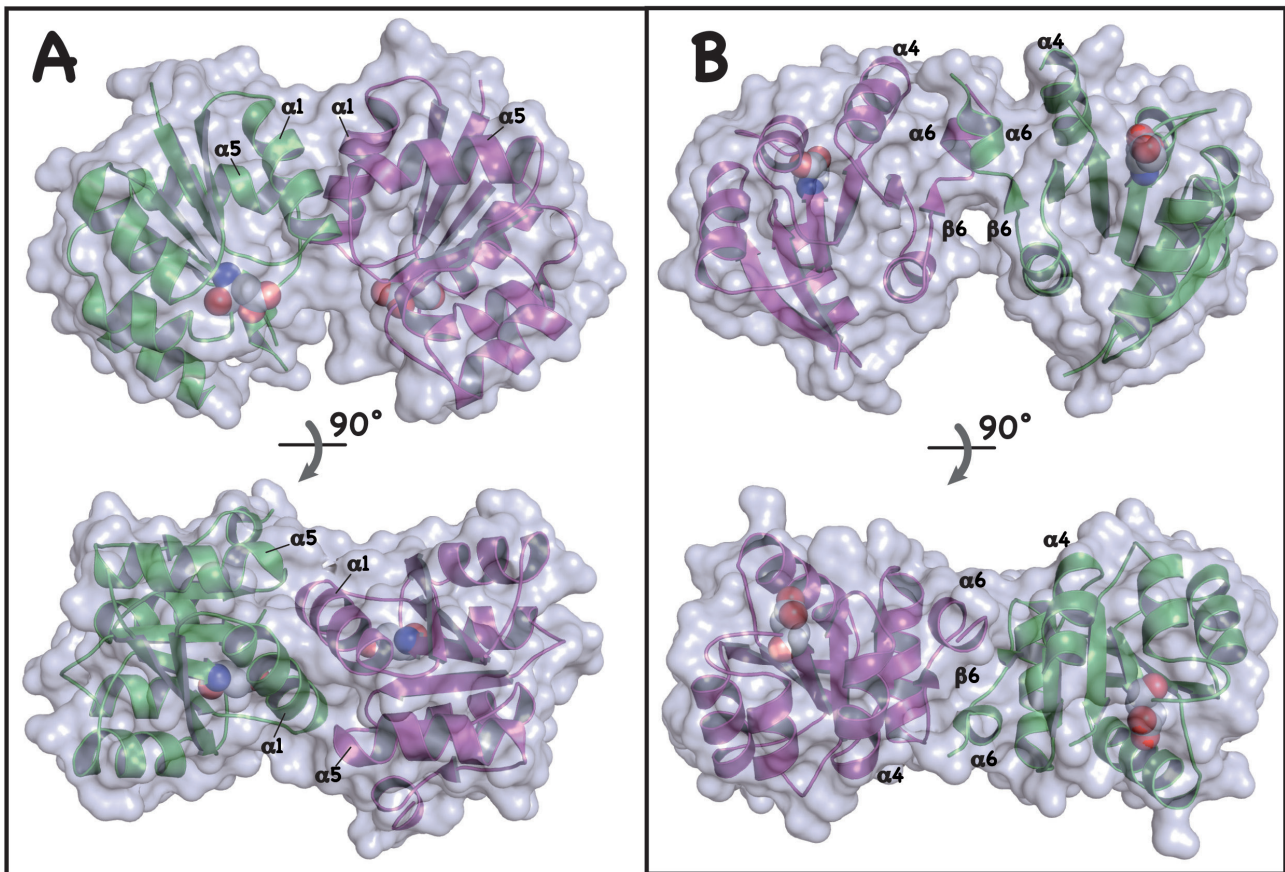
	<b>N136a</b>	<b>N136b</b>
Grupo de espacio	$P2_1$	C2
Longitud de onda (Å)	1.5418	1.5418
Resolución de los datos (Å)	38.7-2.65 (2.79-2.65)	36-2.9 (3.06-2.90)
Reflexiones medidas	69196	29791
Multiplicidad	3.6 (3.6)	3.7 (3.6)
Complejidad (%)	99.9 (99.9)	99.5 (98.8)
$R_{meas}$ (%)	9.7 (44.9)	11.7 (48.6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	6.8 (1.7)	5.6 (1.5)
a b c (Å)	43.27 63.73 121.38	131.97 64.00 44.26
$\beta$ (°)	97.8	101.9
Resolución de refinamiento (Å)	28.2 – 2.65	33 – 2.9
$R_{cris}$ [N° refs]	0.216 [18235]	0.238 [7512]
$R_{free}$ [N° refs]	0.253 [989]	0.305 [556]
rmsd (enlaces/ángulos)	0.017 Å / 1.5 °	0.016 Å / 1.73°
Átomos de proteína (excluyendo hidrógenos)	3852	1891
Átomos de agua	129	—
Átomos de ligandos	15 ( $PO_4^{-2}$ ) / 4 ( $K^+$ )	4 ( $PO_4^{-2}$ )
N° de residuos en regiones del gráfico de Ramachandran (permitido/no permitido)	499 / 10	249 / 5

DesR-N136, al igual que la mayoría de los dominios REC resueltos hasta el momento, presenta en su plegamiento una hoja  $\beta$  paralela con 5 hebras, rodeada hacia un lado por 3  $\alpha$ -hélices,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , y hacia el otro por las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_5$ . El extremo C-terminal (residuos a partir de la Lys<sub>120</sub>) se pliega de manera que extiende la hoja  $\beta$  por una hebra corta adicional ( $\beta_6$ ) ausente en la mayoría del dominio REC de otros RRs. Hacia el final, se visualiza una la hélice  $\alpha_6$  que conecta con el dominio HTH au-

sente en esta construcción (figura 38C). Además de la proteína, fueron modelados 3  $\text{PO}_4^{2-}$ , 4  $\text{K}^+$  y una molécula de glicerol. La región inmediatamente adyacente al  $\text{Asp}_{54}$ , presenta un pico significativo en los mapas de Fourier (ver mapa mFo-DFc contorneado a  $3\sigma$  en la figura 38D). Este modelo está en las etapas finales de refinamiento, y sin embargo la interpretación de dicho pico de densidad electrónica no es satisfactoria. Distintas hipótesis fueron utilizadas para intentar su modelización, desde ya testeando en primera instancia la presencia de un grupo fosfato. Los resultados no han sido hasta ahora convincentes, aun incluyendo el ligando con baja ocupancia o conformaciones alternativas. También se ha considerado la posibilidad de que corresponda a un átomo de potasio (dada la presencia de 1 M fosfato de potasio en el licor madre), sin mejor definición.

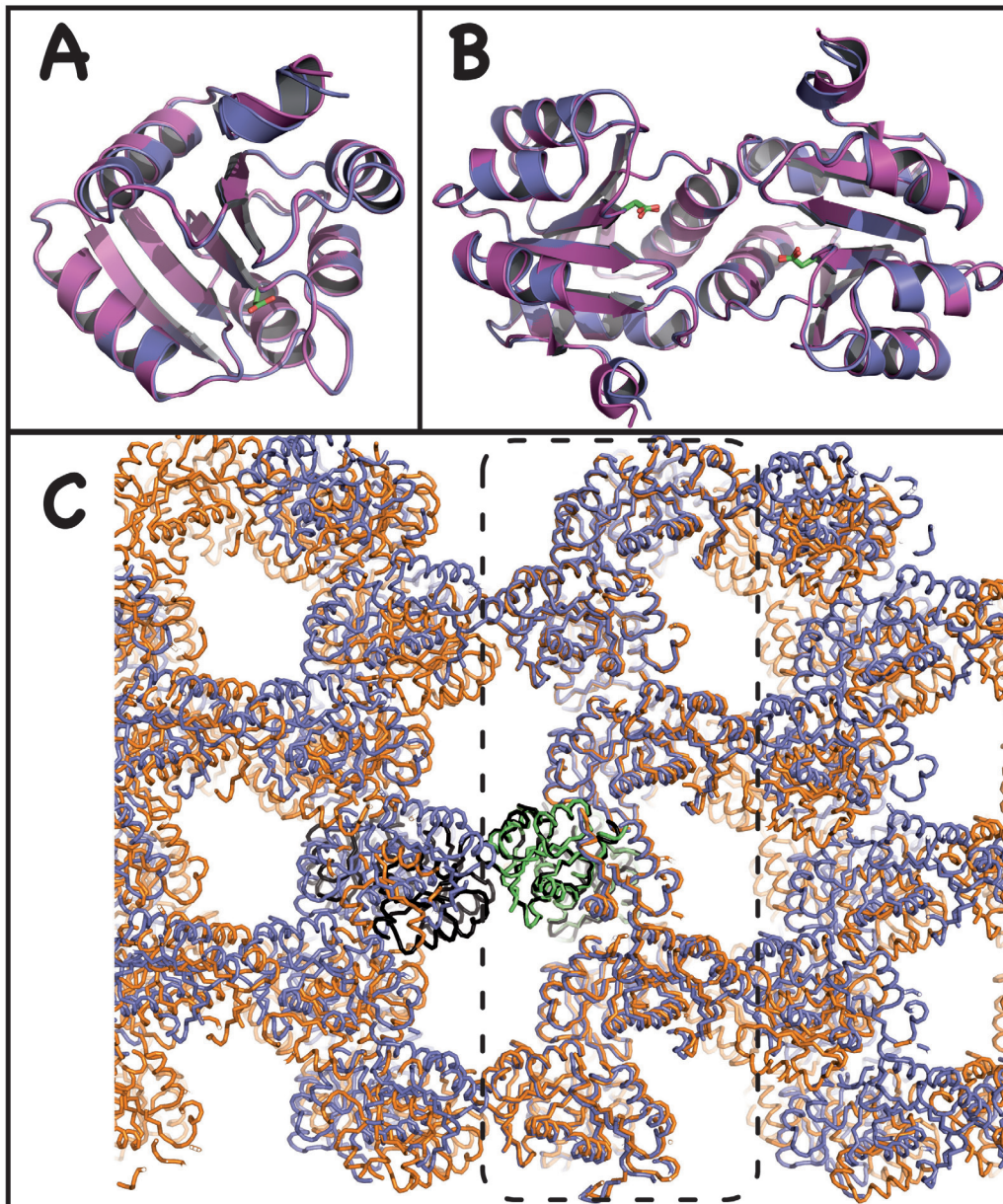
### 7.11. Análisis estructural de las superficies de asociación del dominio receptor de DesR: relevancia en su estructura cuaternaria

La disposición de las moléculas en la UA sugiere fuertemente la cristalización de homodímeros biológicamente relevantes. A fin de obtener datos cuantitativos en este sentido, se realizaron cálculos de superficies de contacto utilizando el servidor PISA<sup>285</sup>. La asociación entre las cadenas A y B, y entre C y D, parece efectivamente relevante (figura 39A), ya que presentan áreas de 800-820  $\text{\AA}^2$ , con 6 a 7 puentes de H (dependiendo de cada caso) y varios contactos hidrofóbicos involucrando los residuos  $\text{Met}_{12}$ ,  $\text{Leu}_{13}$ ,  $\text{Ala}_{16}$ ,  $\text{Leu}_{17}$ ,  $\text{Leu}_{20}$ ,  $\text{Leu}_{23}$ ,  $\text{Leu}_{100}$ ,  $\text{Leu}_{101}$ ,  $\text{Pro}_{105}$  y  $\text{Leu}_{109}$ . En esta superficie de interacción participan las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$ , algo que no ha sido descrito frecuentemente, aunque sí reportado en las estructuras de PhoB (1B00) o en los RRs NarL (1RNL) de *E. coli* y de *M. tuberculosis* (3EUL). En DesR, esta asociación ubica a los sitios de fosforilación de cada monómero enfrentados, disminuyendo la accesibilidad al  $\text{Asp}_{54}$ . El mismo análisis utilizando el servidor PISA para las estructuras de PhoB (1B00) y NarL (1A04) revela superficies de asociación menores, de 580 y 390  $\text{\AA}^2$ , respectivamente. Finalmente, el extremo C-terminal (entre los residuos  $\text{Lys}_{120}$  –  $\text{Tyr}_{131}$ ) de la cadena A se ve interaccionando con el equivalente de la cadena B' de una molécula vecina relacionada por simetría (lo mismo se cumple entre A' y B, entre C y D', así como entre C' y D). Esta área de contacto tiene una extensión 490  $\text{\AA}^2$ , involucrando a las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  y a la hebra  $\beta 6$  (figura 39B). Estabilizada por 4 interacciones iónicas ( $\text{Arg}_{121}:\text{Glu}_{126}$ ,  $\text{Arg}_{121}:\text{Glu}_{129}$ ,  $\text{Glu}_{126}:\text{Arg}_{121}$  y  $\text{Glu}_{129}:\text{Arg}_{121}$ ), 1 puente de hidrógeno ( $\text{Tyr}_{121}\text{-OH}:\text{Glu}_{129}\text{-OE2}$ ) y varios contactos hidrofóbicos entre los residuos Phe88, Ile92, Tyr123, Pro125 y Met128 de ambas cadenas. Los potenciales electrostáticos de las superficies asociadas, resultan ser a su vez bien complementarias. En suma, es pertinente plantear la posible relevancia funcional de esta asociación, como forma de tetramerización de DesR, y especialmente por implicar regiones involucradas en mecanismos alostéricos propuestos de regulación de RRs por fosforilación.



**Figura 39: Posibles superficies de oligomerización en DesR.** A) Superficie de asociación  $\alpha 1\alpha 5$  entre las cadenas A y B. En esta interfaz participan principalmente la hélice  $\alpha 1$  y el extremo N-terminal de la  $\alpha 5$ . En esferas se señalan los Asp<sub>54</sub> y la superficie accesible al solvente está representada en forma semi-transparente. B) Superficie de interacción que involucra los extremos C-terminales de moléculas vecinas en el empaquetamiento cristalino. Las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  y la hebra  $\beta 6$  son las principales regiones que median esta asociación.

Recientemente, se logró obtener un juego de datos de un cristal distinto de DesR-N136 (monoclínico centrado), a 2.9 Å de resolución (N136b, tabla XII). La estructura fue resuelta mediante reemplazo molecular utilizando el homodímero formado por las cadenas A y B de N136a. La comparación entre N136a y N136b utilizando el programa Escet, no permitió identificar diferencias significativas entre estas estructuras (figura 40). El aspecto más interesante a destacar es que el empaquetamiento cristalino de ambas estructuras es distinto (figura 40C). Esto aporta una evidencia experimental fuerte sobre la relevancia de este homodímero como estructura cuaternaria fisiológica, ya que el mismo es igual en ambas estructuras. Otra superficie compartida entre ambas estructuras, es la interacción entre los extremos C-terminales, aportando también en este caso un elemento de apoyo fuerte a una arquitectura de tetramerización. Es cierto que esta superficie tiene menor extensión, pero resulta sugestivo que haya sido observada en otro RR muy similar a DesR (PDB 3CZ5). Estos cristales de N136b crecen únicamente en presencia de  $[\text{BeF}_3]^-$ , un mimético de la fosforilación, mientras que si además se agrega  $\text{MgCl}_2$ , la cristalización se inhibe, revelando su influencia en la conformación de DesR y/o su empaquetamiento cristalino.

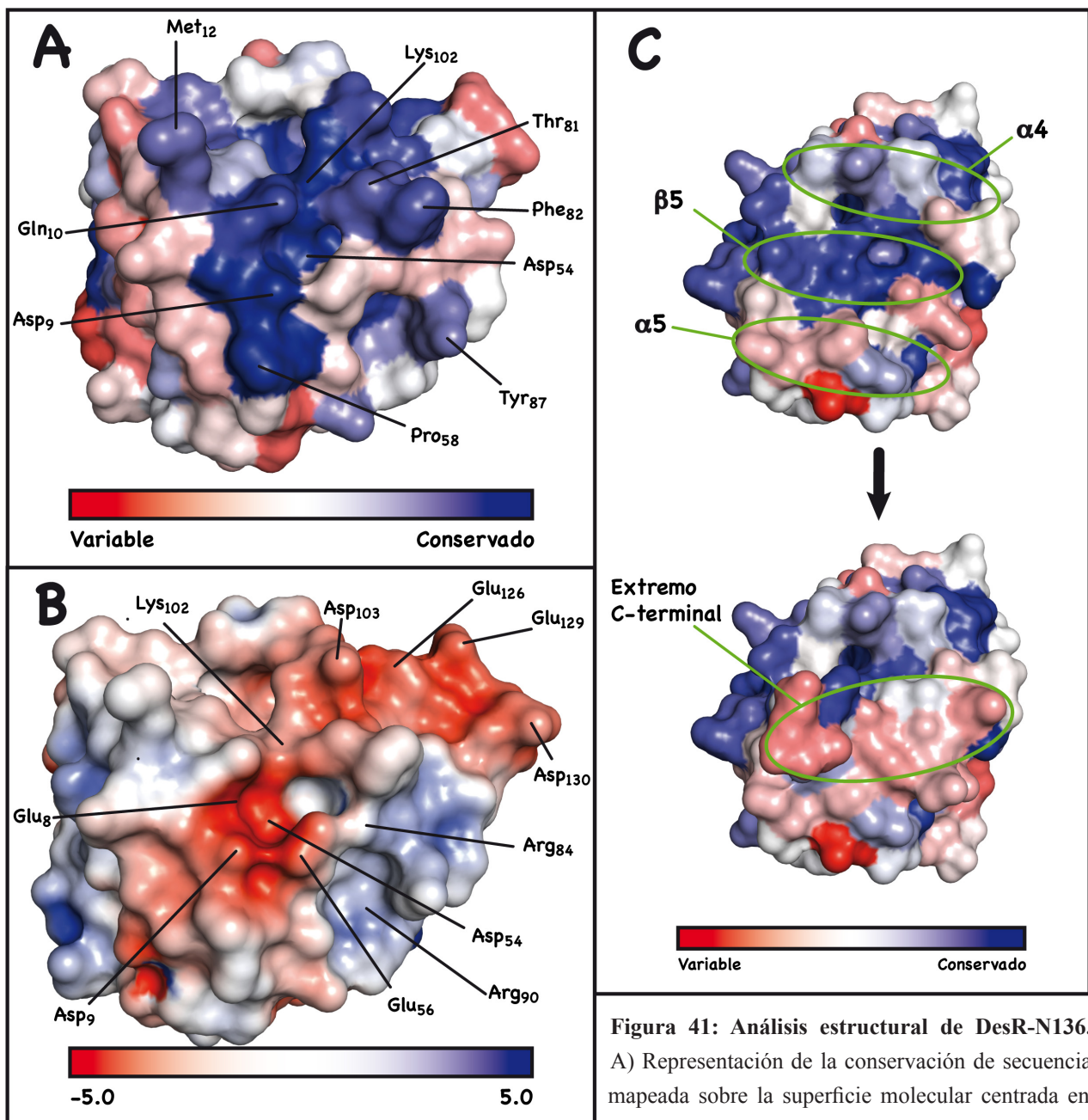


**Figura 40: Comparación estructural entre N136a y N136b.** A y B) La superposición de los monómeros (A) o dímeros (B) de N136a (azul) y N136b (magenta) revela que no existen diferencias significativas entre estas estructuras. En barras verdes se señala el aspártico fosforilable. C) Los empaquetamientos cristalinos de N136a y N136b son diferentes. Superponiendo uno de los dos dímeros de N136a (todo el cristal coloreado en naranja, una UA resaltada en negro) con el dímero N136b (cristal en azul, una UA en verde), se logra un correcto alineamiento espacial sólo válido en una región limitada (recuadro punteado). Rápidamente fuera de esta región el empaquetamiento diferencial lleva a perder la superposición.

## 7.12. Conservación de secuencia y posible estado funcional de DesR-N136

Para buscar regiones conservadas que pudieran ser relevantes en la transición alostérica que sufren estas proteínas al ser fosforiladas, se decidió comparar las secuencias de RRs que poseen la misma arquitectura de dominios que DesR, obtenidas a partir de la base de datos Pfam<sup>47</sup>. El primer conjunto

de secuencias (~7600), fue procesado de forma de eliminar secuencias con más de 90% de identidad utilizando el programa CD-HIT<sup>255</sup> y luego se seleccionaron las 500 secuencias con mayor similitud a DesR usando Blast. Finalmente, mediante un procesamiento manual se eliminaron las secuencias que introducen *gaps* muy grandes o que carecen de secuencias funcionalmente relevantes. Las 494 secuencias finales fueron alineadas de forma iterativa con el programa Muscle v3.6<sup>256</sup>. El mapeo del alineamiento sobre la estructura de DesR permite observar un parche muy conservado alrededor del Asp<sub>54</sub>, que involucra a los residuos Glu<sub>8</sub>, Asp<sub>9</sub>, Gln<sub>10</sub>, Met<sub>57</sub>, Pro<sub>58</sub>, Thr<sub>80</sub>, Thr<sub>81</sub>, Phe<sub>82</sub>, Lys<sub>102</sub> y Asp<sub>103</sub> (figura 41A). Tanto la Lys<sub>102</sub> como la Thr<sub>80</sub> han sido involucradas en el mecanismo alostérico de activación de la proteína dependiente de la fosforilación. En DesR-N136 la Lys<sub>102</sub> se ubica en dirección del Asp fosforilable, a 2.7 Å formando un puente salino fuerte en las 4 moléculas de la UA. Por otro lado, la Thr<sub>81</sub> dispone su cadena lateral hacia el Asp fosforilable, mientras que la Thr<sub>80</sub> se ubica en la dirección opuesta, formando puentes de H con el NH1 de la Arg<sub>84</sub> y el O de la Phe<sub>82</sub>. Los residuos Asp<sub>54</sub>, Glu<sub>8</sub>, Asp<sub>9</sub> y Glu<sub>56</sub> forman un parche cargado negativamente que estaría parcialmente neutralizado por la Arg<sub>84</sub> y la Lys<sub>102</sub> (figura 41B). En la cadena A y C la Arg<sub>84</sub> se dispone hacia el interior interactuando con la Thr<sub>81</sub> y a 3.2 Å del Glu<sub>56</sub>. Por el contrario, en las cadenas B y D los residuos 83 y 84 se encuentra desordenados, no siendo visible la densidad electrónica de esta región, así como tampoco la cadena lateral del Glu<sub>56</sub>. Algunos de los residuos directamente involucrados en la superficie de homodimerización presentan una conservación interesante, por ejemplo en la posición 12 la presencia de un residuo hidrofóbico está altamente conservado (98 % considerando los aminoácidos M, L, V, I y F). Esto mismo ocurre para la Leu<sub>13</sub> (98 %), Ala<sub>16</sub> (93.8 % tomando en cuenta únicamente a Gly y Ala), Leu<sub>17</sub> (98.6 %), Leu<sub>20</sub> (96.6 %) Leu<sub>23</sub> (68.8 % considerando también a una Ala), Leu<sub>100</sub> (98.2 %), Leu<sub>101</sub> (92.8 %) y Leu<sub>109</sub> (100 %). También participan en esta superficie de interacción mediante contactos de van der Waals, la Gln<sub>10</sub> y la Pro<sub>105</sub>, que presenta una conservación de 60,2 (84,4 % entre Gln e His) y 42 %, respectivamente. En PhoB esta superficie de dimerización es un poco más pequeña, pero conserva la naturaleza hidrofóbica de los contactos. Por otro lado, la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  implicada en la dimerización disparada por fosforilación en varios RRs, también exhibe alto nivel de conservación en DesR (figura 41C). La misma involucra a los residuos Tyr<sub>99</sub> (99.8 % entre Y y F), Leu<sub>100</sub>, Leu<sub>101</sub>, Ala<sub>112</sub> (72 %), Val<sub>116</sub> (96.8 % entre A, V, I y L) y Glu<sub>108</sub> (62 % considerando D y E), y en DesR esta superficie está escondida por el extremo C-terminal de esta construcción, que incluye la hebra  $\beta 6$  del dominio REC y la  $\alpha 6$  conectora con el HTH (figura 41C panel inferior y figura 38C). En cuanto a la superficie de interacción que involucra al extremo C-terminal la naturaleza hidrofóbica de los residuos Phe<sub>88</sub>, Ile<sub>92</sub>, Tyr<sub>123</sub>, Pro<sub>125</sub> y Met<sub>128</sub>, se encuentra altamente conservada.



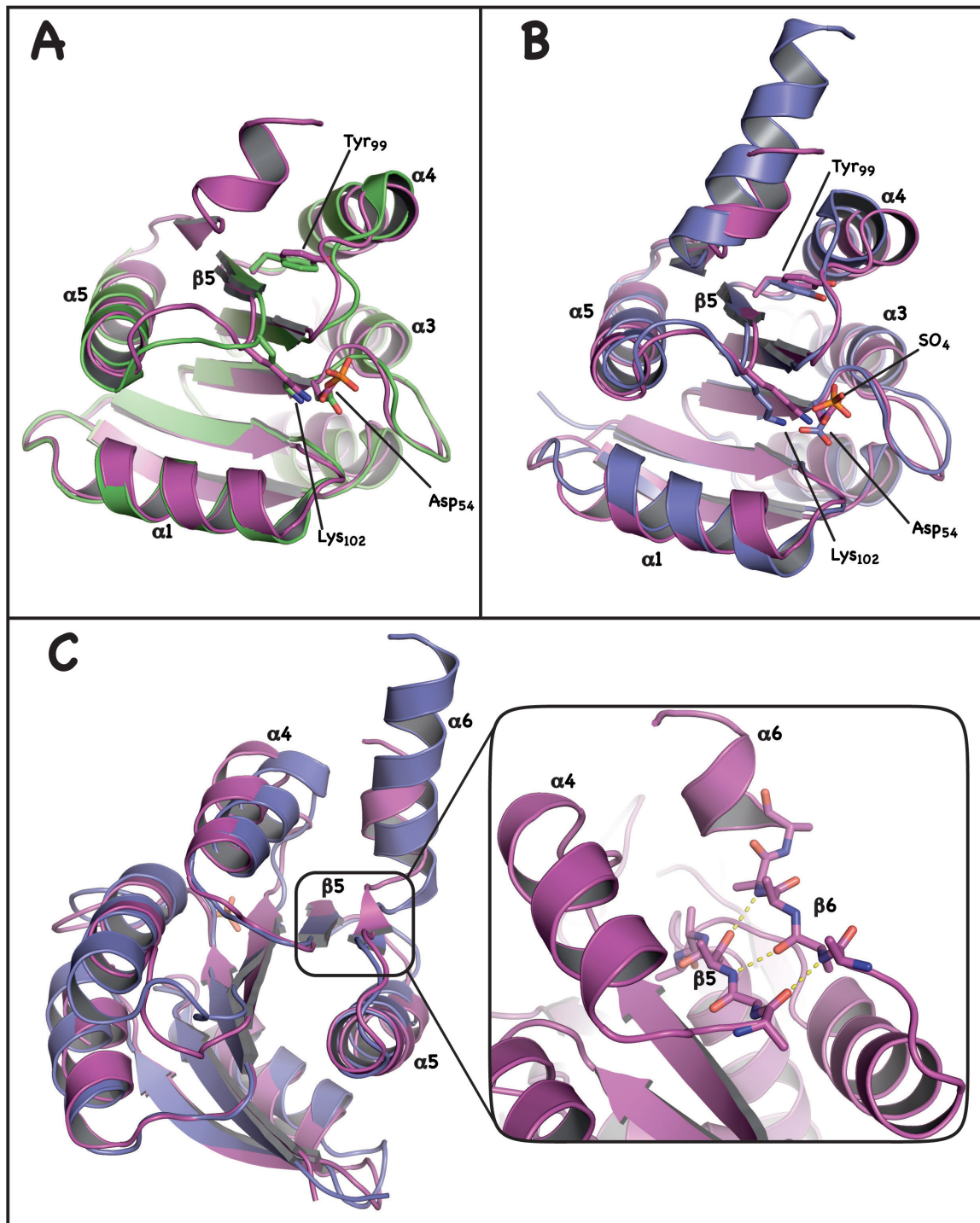
**Figura 41: Análisis estructural de DesR-N136.**

A) Representación de la conservación de secuencia mapeada sobre la superficie molecular centrada en el sitio de fosforilación. El alineamiento múltiple fue

realizado sobre un grupo de RRs con una arquitectura similar a DesR. El gradiente de color rojo-blanco-azul, identifica regiones variables a conservadas. B) La superficie accesible al solvente está coloreada de acuerdo al potencial electrostático (rojo = negativo y azul = positivo), centrado sobre el sitio de fosforilación. Se observa que existe una concentración de cargas negativas alrededor del Asp<sub>54</sub>, y ésta coincide con el parche conservado identificado en A. C) Panel superior: se identifica la alta conservación de la zona  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  (principalmente la hebra  $\beta 5$ ), implicada en el mecanismo de activación de otros RRs. El extremo C-terminal del dominio REC (eliminado en el panel superior para permitir la visualización), ocluye gran parte de esta región como se muestra en el panel inferior.

La búsqueda de estructuras similares a DesR utilizando DALI<sup>251</sup> identificó una serie de modelos (tabla XIII). Las estructuras con mejor puntuación incluyen a un RR de la familia LuxR de *Aurantimonas sp. SI85-9A1* (3CZ5) y a un ortólogo de NarL de *M. tuberculosis* (3EUL). También aparece con una puntuación alta (*Z score* de 20.7) la estructura fosforilada de Spo0A de *Bacillus stearothermophilus*. En la figura 42 se muestran las superposiciones de DesR-N136 (magenta) con Spo0A fosforilado

(verde, figura 42A) y 3CZ5 (azul, figura 42B). Una de las características más sobresalientes de la estructura de DesR-N136 es la disposición del extremo C-terminal (entre los residuos 120 y 131), ya que extiende la hoja  $\beta$  central con una hebra adicional (figura 42C) como ya fue mencionado. Hasta donde fue posible indagar, la única estructura que presenta la misma disposición en esta región es 3CZ5. El plegamiento del dominio REC es similar al de otros RRs. La disposición de los residuos



**Figura 42: Comparación estructural con otros RRs.** La superposición de DesR-N136 (magenta) con Spo0A fosforilado (A, verde, PDB ID 1QMP) y el RR 3CZ5 (B, azul, PDB ID 3CZ5). En barras se señalan residuos clave en la activación por fosforilación. A diferencia del resto de los RRs analizados, 3CZ5 y DesR-N136 comparten la inusual orientación del extremo C-terminal (B y C). Nótese cómo esta conformación extiende la hoja  $\beta$  central con un hebra suplementaria, quedando la hélice  $\alpha6$  conectora orientada hacia el solvente (C).

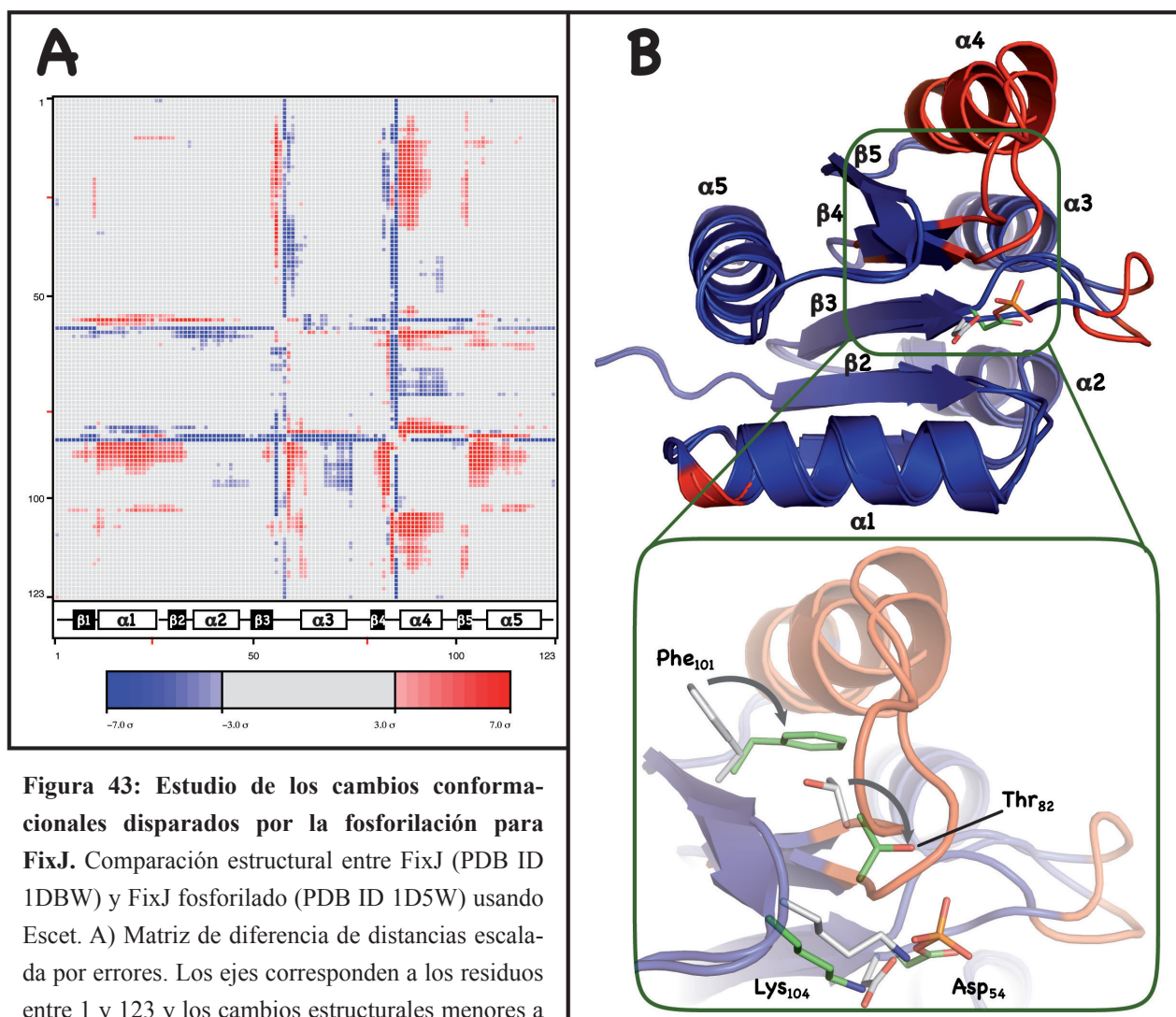
clave en la activación por fosforilación (Asp<sub>54</sub>, Lys<sub>102</sub> y Tyr<sub>99</sub>, de acuerdo a la numeración de DesR) sugieren que DesR-N136 fue cristalizada en una conformación activa, por comparación con la estructura fosforilada de Spo0A (figura 42). Apoyando esta hipótesis, este grupo de aminoácidos claves adoptan la misma orientación en 3CZ5, que si bien no ha sido publicada (estado funcional incierto), sugestivamente presenta un grupo sulfato a corta distancia del aspártico fosforilable.

Tabla XIII: Resultados de Dali para la estructura de DesR-N136.

PDB	Z-score	RMSD	lali	nres	%id	Resolución (Å)	Descripción del PDB
<b>3cz5</b>	22.3	1.4	130	141	27	2.70	RR, LuxR family, from <i>Aurantimonas sp. SI85-9A1</i>
<b>3eul</b>	21.4	1.1	120	123	25	1.90	putative RR NarL from <i>M. tuberculosis</i>
<b>3b2n</b>	21.1	1.1	118	120	43	2.00	RR, LuxR family, from <i>S. aureus</i>
<b>1qmp</b>	20.7	1.1	117	121	30	2.00	Phosphorylated Spo0a
<b>2a9o</b>	19.9	1.3	116	117	22	1.65	RR from <i>S.pneumoniae</i> in complex with [BeF <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>
<b>1ys6</b>	19.7	2.1	123	227	22	1.77	PrrA from <i>M. tuberculosis</i>
<b>2ftk</b>	18.5	1.5	116	119	24	3.05	beryllofluoride Spo0F in complex with Spo0B
<b>2pl1</b>	18.4	1.7	117	121	19	1.90	Beryllifluoride activated REC domain of <i>E.coli</i> PhoP
<b>1d5w</b>	17.8	1.7	117	122	18	2.30	Phosphorylated transcriptional regulatory protein FixJ
<b>2pkx</b>	17.7	1.9	117	120	19	2.54	<i>E.coli</i> response regulator PhoP receiver domain
<b>1dbw</b>	16.6	1.8	117	125	19	1.60	Transcriptional regulatory protein FixJ
<b>1rnl</b>	16.4	2.1	120	200	27	2.40	Nitrate/Nitrite RR protein NarL

En base a la estructura del dominio REC de DesR es válido preguntarse: ¿qué estado alostérico representa?, y ¿qué relevancia funcional tienen las superficies de oligomerización surgidas de los modelos 3D? Estas preguntas no son simples de responder empleando la información disponible, ya que en particular, los cambios conformacionales disparados por la fosforilación que han sido reportados son pequeños y existen pocas estructuras de proteínas enteras o de dominios REC capturados en ambos estados. Varios autores han sugerido que la fosforilación induce cambios conformacionales sutiles, que involucran al bucle entre la hebra  $\beta_4$  y la hélice  $\alpha_4$ . Allí se encuentra una Thr conservada (99.8 % incluyendo Thr y Ser) que forma un puente de H con el fosfato, promoviendo la activación de la proteína<sup>286</sup>. El espacio que produce el movimiento de esta Thr, permite a su vez el rearrreglo de una Phe o Tyr muy conservada, que se dispone entre la hebra  $\beta_5$  y la hélice  $\alpha_4$ . En definitiva el cambio alostérico más importante es el movimiento de la cadena lateral de esta Tyr/Phe desde una posición expuesta al solvente hacia una interna, transmitiendo la señal a esta región de la proteína<sup>156</sup>. Para intentar responder estas preguntas se decidió buscar patrones comunes en distintos RRs realizando la comparación entre estructuras inactivas y activas, utilizando el programa Escet, para cuatro proteínas diferentes cristalizadas en ambos estados (FixJ, DrrB, DrrD y PhoB). En todos los casos se observó

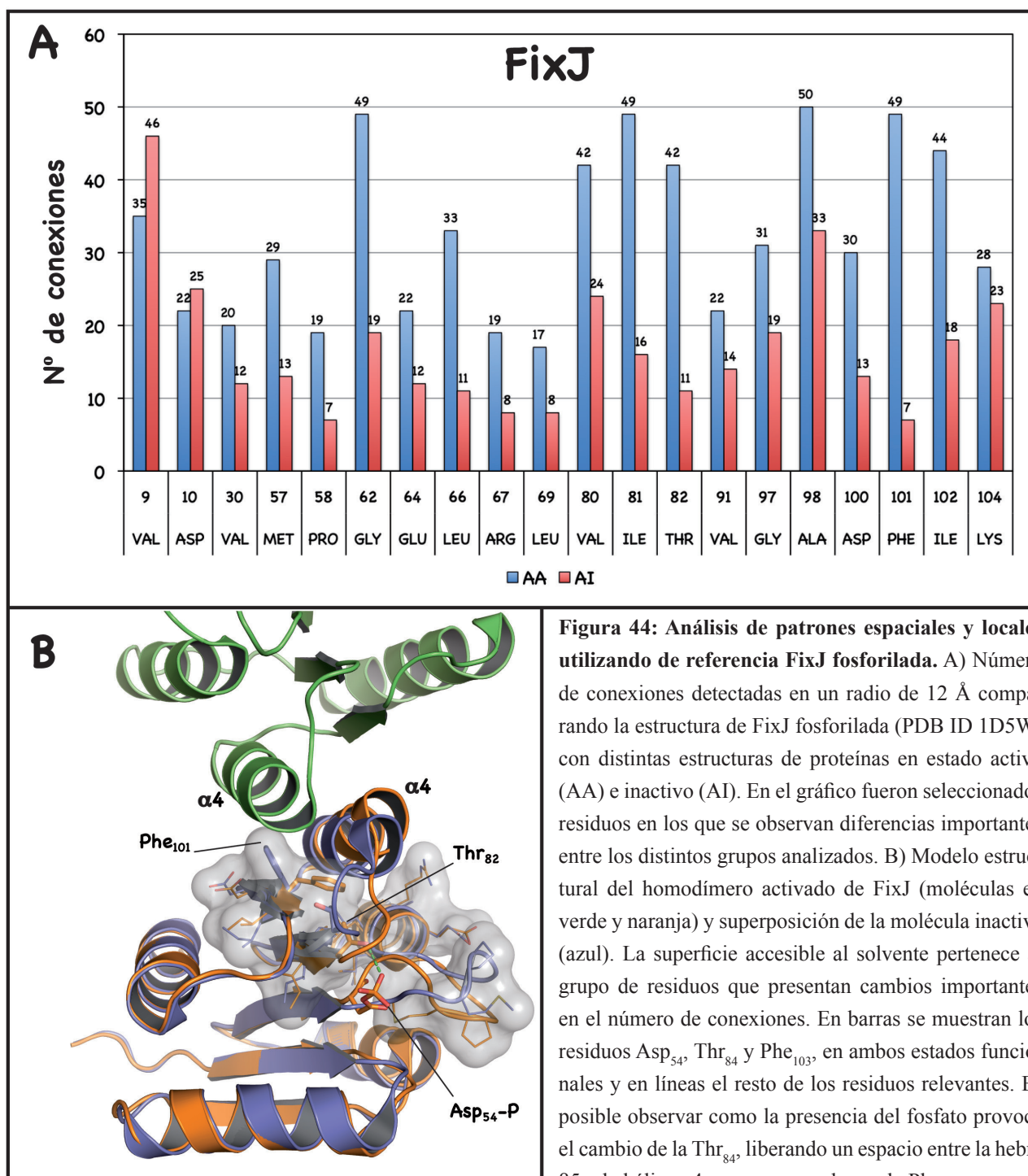
que la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$  es la más afectada por la fosforilación, siendo la hélice  $\alpha 4$  la que presenta los cambios más importantes (figura 43), con cambios mayores a  $5\sigma$ .



**Figura 43: Estudio de los cambios conformacionales disparados por la fosforilación para FixJ.** Comparación estructural entre FixJ (PDB ID 1DBW) y FixJ fosforilado (PDB ID 1D5W) usando Escet. A) Matriz de diferencia de distancias escalada por errores. Los ejes corresponden a los residuos entre 1 y 123 y los cambios estructurales menores a  $3\sigma$  se representan en gris. En rojo y azul se señalan las expansiones y contracciones significativas, respectivamente. Observar las diferencias más importantes, que se ubican en la hélice  $\alpha 4$  y en los bucles  $\beta 3\alpha 3$  y  $\beta 4\alpha 4$ . B) Superposición de los dos modelos comparados en A utilizando los  $C\alpha$  de las regiones conformacionalmente invariantes (azul). Las regiones con cambios significativos se identifican en rojo (incluyendo expansión y contracción). En barras se representan el Asp<sub>54</sub> fosforilable. En el recuadro se muestra un primer plano de la región con más alteraciones, señalando los residuos involucrados en la activación por fosforilación mediante barras (Asp<sub>54</sub>, Thr<sub>82</sub>, Phe<sub>101</sub> y Lys<sub>104</sub>). El único residuo que se ubica en una región significativamente variable es la Thr<sub>82</sub>. Las flechas señalan los movimientos de algunos residuos.

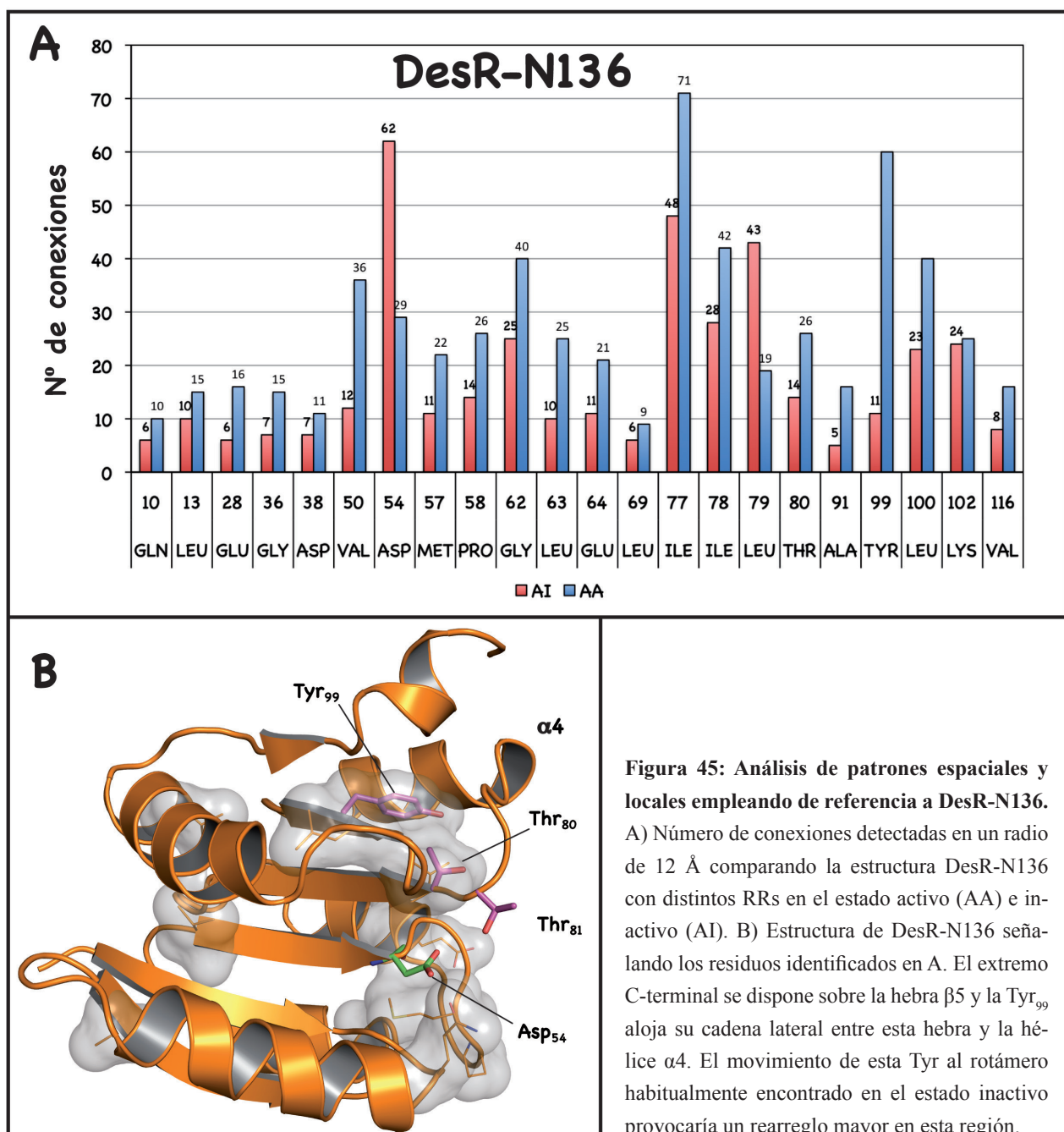
El análisis mediante Escet permite realizar comparaciones para distintas estructuras de la misma proteína o mutantes, considerando únicamente los  $C\alpha$ , por lo que no revela cambios alostéricos que impliquen movimientos en las cadenas laterales. En este sentido se incorporó el análisis por un método de grafos (LSPA - *Local Spatial Pattern Alignment*), independiente de secuencia y de superposición que previamente fue empleado con éxito para Ser/Thr quinasas<sup>287</sup>. Para esto se utilizó el programa Sirius (desarrollado en el *San Diego Supercomputer Center*) que permite realizar comparaciones de

patrones locales en el espacio, en función del número de conexiones de cada residuo con sus vecinos en una esfera de 12 Å de radio. Para validar esta aproximación realizamos un primer análisis con las estructuras de FixJ-P y Spo0A-P como modelos de reguladores activados. En la figura 44 es posible observar así como varía la puntuación de una selección de residuos comparando alternativamente FixJ-P (1D5W) con dos grupos de estructuras: activas (llamadas AA en la figura; PDBs 1ZES, 1QMP, 2PL1, 1FQW, 1K68 y 1ZY2) e inactivas (AI; PDBs 1B00, RNL, 2PLX, 3CHY, 1YS6 y 2GWR). Los residuos que presentan mayor diferencia de puntuación apuntan hacia posiciones clave en la activación por fosforilación, y pertenecen a la hélice  $\alpha 3$  (Gly<sub>62</sub>, Glu<sub>64</sub>, Leu<sub>66</sub>, Arg<sub>67</sub> y Leu<sub>69</sub>), hebras



$\beta 5$  (Asp<sub>100</sub>, Phe<sub>101</sub> y Ile<sub>102</sub>) y  $\beta 4$  (Val<sub>80</sub> y Ile<sub>81</sub>) y bucles  $\beta 3\alpha 3$  (Met<sub>57</sub> y Pro<sub>58</sub>) y  $\beta 4\alpha 4$  (Thr<sub>82</sub>). Estos residuos se agrupan en el espacio en dos clusters alrededor de la hélice  $\alpha 4$  (figura 44B). Considerando las estructuras de FixJ en ambos estados y su superficie de dimerización, el uso de LSPA apoya que el movimiento de la Phe<sub>101</sub> producto de la relocalización de la Thr<sub>82</sub> es un evento determinante del cambio en el estado oligomérico. La ubicación de la Phe101 en la configuración inactiva impone una restricción estérica para la homodimerización (figura 44B).

Teniendo en cuenta que por LSPA se confirma la identidad de residuos importantes en el mecanismo alostérico descritos previamente en FixJ-P y Spo0A-P, se siguió el mismo procedimiento empleando a DesR-N136 como referencia (AA: 1D5W, 1ZES, 1QMP, 2PL1, 1FQW, 1K68 y 1ZY2, y AI: 1DBW,



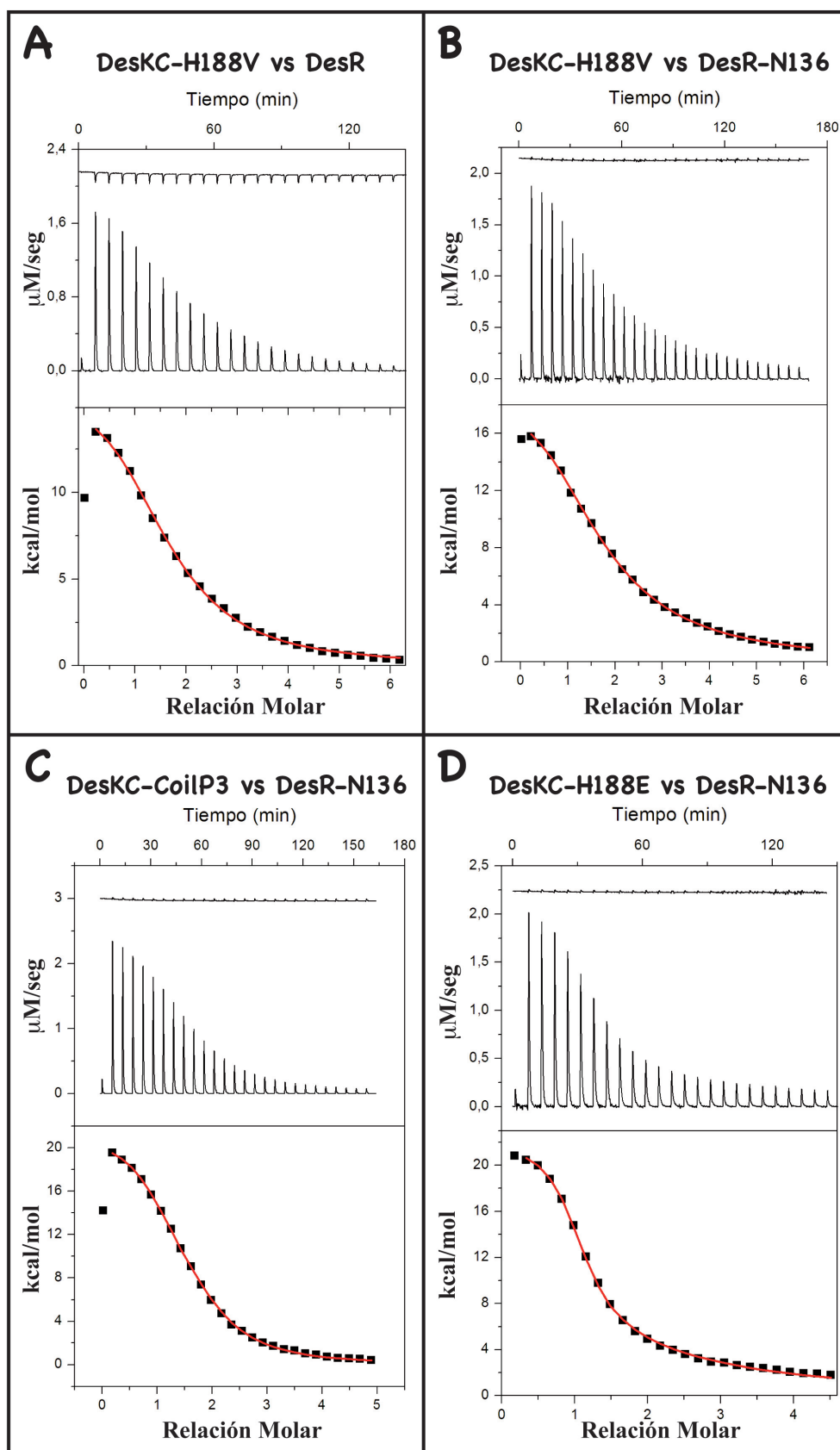
**Figura 45: Análisis de patrones espaciales y locales empleando de referencia a DesR-N136.** A) Número de conexiones detectadas en un radio de 12 Å comparando la estructura DesR-N136 con distintos RRs en el estado activo (AA) e inactivo (AI). B) Estructura de DesR-N136 señalando los residuos identificados en A. El extremo C-terminal se dispone sobre la hebra  $\beta 5$  y la Tyr<sub>99</sub> aloja su cadena lateral entre esta hebra y la hélice  $\alpha 4$ . El movimiento de esta Tyr al rotámero habitualmente encontrado en el estado inactivo provocaría un rearrreglo mayor en esta región.

1B00, 1RNL, 2PLX, 3CHY, 1YS6 y 2GWR). Así, fue posible observar algunos elementos interesantes y compartidos con FixJ-P (figura 45). De acuerdo a este análisis, los residuos Met<sub>57</sub>, Pro<sub>58</sub>, Gly<sub>62</sub>, Glu<sub>64</sub>, Ile<sub>77</sub>, Ile<sub>78</sub>, Thr<sub>80</sub>, Tyr<sub>99</sub> y Leu<sub>100</sub> en DesR-N136, presentan características del estado activado.

### 7.13. Caracterización biofísica del complejo DesK-DesR

Las evidencias experimentales apoyan un modelo funcional de DesK con tres estados estructurales diferentes. En la figura 14 se muestra que esta proteína es capaz de interactuar con su RR específico DesR en los estado fosfatasa y fosfotransferasa. ¿Cómo es esta interacción entre ambos componentes? ¿Cuáles son los determinantes de especificidad? Con el objetivo de caracterizar esta interacción se decidió realizar ensayos mediante calorimetría por titulación isotérmica (ITC). En la figura 46 se observa el resultado de la titulación de DesKC-H188V con DesR (figura 46A), o bien con DesR-N136 (figura 46B). Las curvas de titulación fueron realizadas a 288 °K y revelan en ambos casos una reacción fuertemente endotérmica. La estequiometría de ambas asociaciones es 1:1, esto es, un dímero de DesKC-H188V forma un complejo con dos moléculas de DesR. La comparación entre estas dos titulaciones sugiere que la presencia del dominio HTH no afecta de manera significativa a la asociación, por lo que el dominio REC parecería ser el principal contribuyente. Esta estequiometría de interacción es similar a la observada para otros complejos como ThkA-TrrA<sup>175,288</sup>, Spo0B-So0F<sup>170,171</sup> o HK853-RR468<sup>126,174</sup>. El modelo que mejor ajustó a los datos implica la unión secuencial sobre dos sitios, con constantes de asociación al equilibrio Ka<sub>1</sub> y Ka<sub>2</sub> del orden micromolar, comparables a las determinadas para complejos similares, como CheA-CheY<sup>289</sup>, EnvZ-OmpR<sup>290,291</sup> y PhoQ-PhoP<sup>292</sup>. A notar es la diferencia de casi un orden de magnitud entre las dos constantes de asociación, revelando un efecto de cooperatividad (Tabla XIV). La reacción está dirigida principalmente por el componente entrópico, incluso con una contribución entálpica desfavorable.

Más arriba se describió el efecto del fortalecimiento de la extensión *coiled-coil* hacia el N-terminal de DesKC (construcción CoilP3, procurando estabilizar el estado ‘fosfatasa’ sin sustituir la His<sub>188</sub> salvaje), induciendo a la proteína a poder formar un complejo con DesR de forma constitutiva. La titulación por ITC de CoilP3 con DesR-N136 permitió obtener los parámetros biofísicos de esta interacción (tabla XIV), confirmando nuevamente una estequiometría 1:1 (un dímero de CoilP3 forma un complejo con dos moléculas de DesR-N136) (figura 46). La constante de disociación para el sitio de mayor afinidad es de 0.45 μM, lo cual representa la mayor afinidad obtenida hasta el momento comparando todos los mutantes de DesK. De todas formas es importante resaltar que a diferencia del resto de las titulaciones realizadas en este trabajo, el experimento se realizó en presencia de 0.5M



**Figura 46: Ensayos de calorimetría por titulación isotérmica para distintos mutantes de DesKC.** A) Titulación de DesKC-H188V con DesR. El panel superior muestra el flujo de calor durante la titulación, tanto en el ensayo control (curva superior) como en la titulación entre ambas proteínas (curva inferior). En el panel inferior se muestra la integración de la cantidad de calor producto de las inyecciones, normalizadas a la concentración de ligando y macromolécula (relación molar). B) Titulación de DesKC-H188V con DesR-N136. C) Titulación de DesKC-CoilP3 con DesR-N136. D) Titulación de DesKC-H188E con DesR-N136.

NaCl, ya que se sabe que esta proteína es estabilizada a mayor fuerza iónica. Actualmente se están llevando a cabo experimentos a 0.3M NaCl así como también a diferentes temperaturas, de forma de validar las diferencias observadas. De cualquier modo la titulación de CoilP3 permite corroborar una asimetría importante entre los dos sitios de interacción (~10.7 veces), algo mayor a la observada con DesKC-H188V. Estos resultados sugieren que los cambios conformacionales impuestos por las mutaciones en el *coiled-coil* N-terminal estabilizan una conformación capaz de formar un complejo con alta afinidad, así como también podrían reflejar que los cambios conformacionales del DHp producto de la sustitución de la His<sub>188</sub> por una valina no mimetizan exactamente el estado fosfatasa, inducido fisiológicamente por los cambios en la fluidez de la membrana.

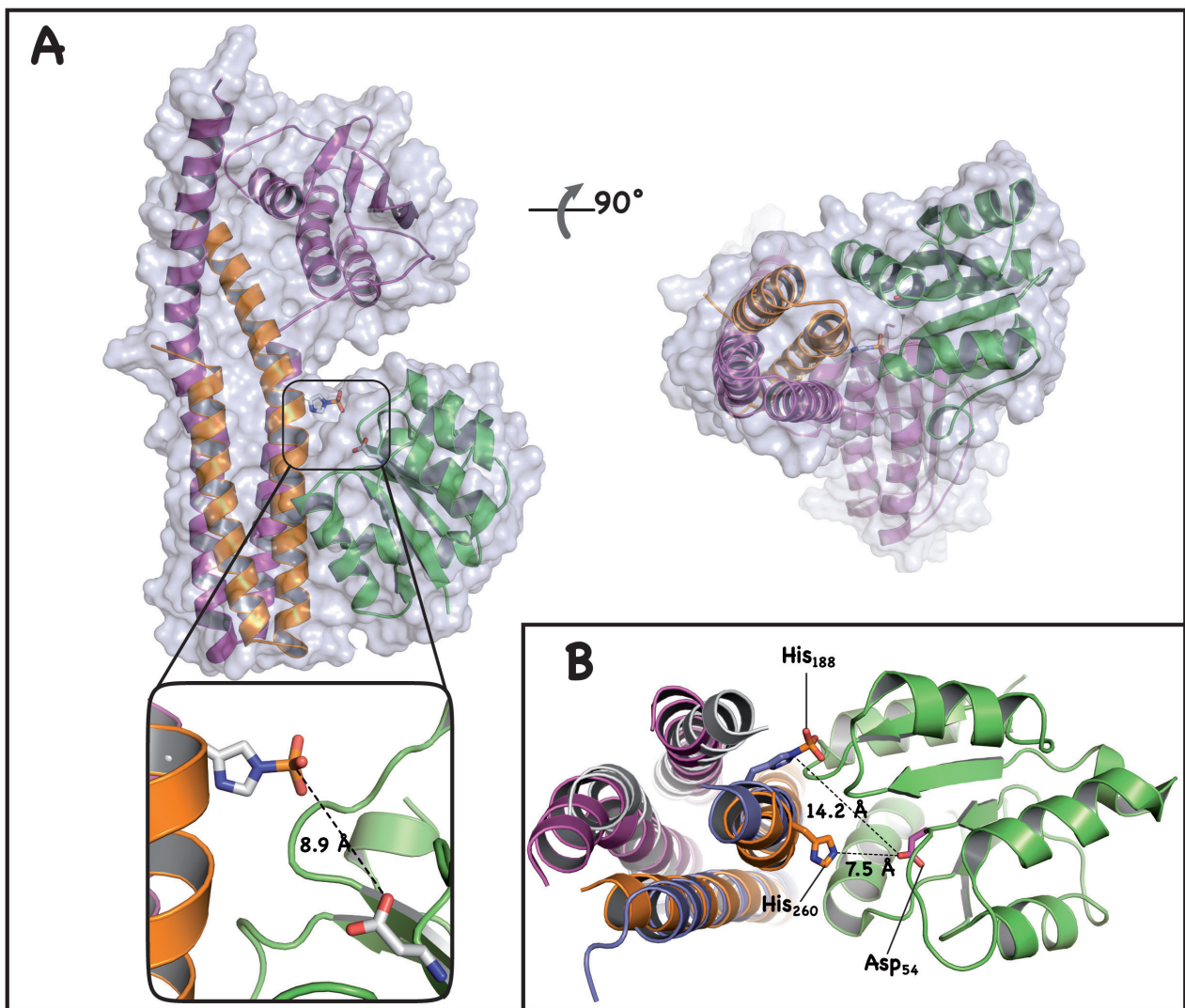
Tabla XIV: Propiedades termodinámicas de la interacción DesK-DesR

	<i>ligando</i>	<i>N</i>	<i>Ka (x10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>)</i>	$\Delta G$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
<b>V188</b>	<b>DesR</b>	1	7.7x10 <sup>5</sup> (±1.2x10 <sup>5</sup> )	-7.8x10 <sup>3</sup>	15.4x10 <sup>3</sup> (±343)	23.2x10 <sup>3</sup>
		1	9.5x10 <sup>4</sup> (±0.47x10 <sup>3</sup> )	-6.5x10 <sup>3</sup>	14.0x10 <sup>3</sup> (±468)	20.5x10 <sup>3</sup>
<b>V188</b>	<b>N136</b>	1	4.9x10 <sup>5</sup> (±0.47x10 <sup>5</sup> )	-7.5x10 <sup>3</sup>	18.9x10 <sup>3</sup> (±343)	26.4x10 <sup>3</sup>
		1	5.7x10 <sup>4</sup> (±0.16x10 <sup>4</sup> )	-6.2x10 <sup>3</sup>	22.0x10 <sup>3</sup> (±506)	28.2x10 <sup>3</sup>
<b>E188</b>	<b>N136</b>	1	1.7x10 <sup>6</sup> (±0.16 x10 <sup>6</sup> )	-8.2x10 <sup>3</sup>	22.1x10 <sup>3</sup> (±242)	30.2x10 <sup>3</sup>
		1	3.0x10 <sup>4</sup> (±0.21x10 <sup>4</sup> )	-5.9x10 <sup>3</sup>	21.2x10 <sup>3</sup> (±640)	27.1x10 <sup>3</sup>
<b>WKV</b>	<b>N136</b>	1	1.1x10 <sup>5</sup> (±9.8 x10 <sup>3</sup> )	-6.7x10 <sup>3</sup>	21.3x10 <sup>3</sup> (±493)	28x10 <sup>3</sup>
		1	2.4x10 <sup>4</sup> (±9.6x10 <sup>3</sup> )	-5.7x10 <sup>3</sup>	16.2x10 <sup>3</sup> (±714)	21.9x10 <sup>3</sup>
<b>CoilP3</b>	<b>N136</b>	1	2.2x10 <sup>6</sup> (±1.5 x10 <sup>5</sup> )	-8.4x10 <sup>3</sup>	2.04x10 <sup>4</sup> (±117)	2.9x10 <sup>4</sup>
		1	2.1x10 <sup>5</sup> (±6.2 x10 <sup>3</sup> )	-7.0x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>4</sup> (±157)	2.0x10 <sup>4</sup>

Siguiendo esta línea de razonamiento, la estructura de DesKC fosforilada muestra una consistente asimetría en el dímero, que parece correlacionar con las diferencias de afinidad entre los dos posibles sitios de unión al RR. Para profundizar aún más en la caracterización de variaciones asociadas a la transición entre estados funcionales, realizamos también estudios biofísicos de DesK en el estado fosfotransferasa. Dado que no es posible *a priori* emplear DesKC en el estado fosforilado (de otro modo durante el experimento ocurriría la fosfotransferencia) para interaccionar con DesR, se decidió trabajar con el mutante puntual DesKC-H188E, capaz de adoptar la misma conformación. Notemos nuevamente que de hecho esta proteína se encuentra en un equilibrio conformacional entre el estado quinasa (E188b) y fosfotransferasa (E188a y E188c). La curva de titulación también muestra ser endotérmica y dirigida entrópicamente. El modelo que mejor se ajustó a los datos presenta dos sitios secuenciales pero con marcadas diferencias en las constantes de asociación (tabla XIV y figura 46), lo cual apoya la fuerte asimetría estructural en DesK fosforilada.

Los estudios de covarianza<sup>78,79,141-143</sup> así como las estructuras de complejos HQ-RR resueltos hasta el momento sugieren que la especificidad HQ-RR está dada principalmente por una región del DHp de la HQ. Comenzamos usando la estructura del complejo HK854-RR468 (con la que globalmente ThkA-TrrA y Spo0B-Spo0F comparten la forma de interacción), como referencia para comprender los experimentos de ITC del sistema DesK-DesR. Luego del posicionamiento de DesKC-H188E y DesR-N136 en la misma orientación que el complejo HK853-RR468 (3DGE) fue necesario realizar algunos ciclos de minimización con el programa Rosetta3.1 para evitar choques entre cadenas (figura 47A). Este complejo putativo presenta una región central dominada por contactos hidrofóbicos, donde se destacan los residuos Leu<sub>197</sub>, Leu<sub>200</sub>, Leu<sub>204</sub> y Leu<sub>208</sub> de la cadena  $\alpha$ 1 de DesK con los residuos Met<sub>12</sub>, Leu<sub>13</sub>, Ala<sub>16</sub>, Leu<sub>17</sub>, Leu<sub>20</sub> y Leu<sub>23</sub> de DesR. También es posible predecir algunos puentes salinos como la Arg<sub>235</sub> y la Lys<sub>207</sub> en DesK con el Asp<sub>103</sub> y el Glu<sub>24</sub> en DesR, respectivamente. El análisis del potencial electrostático de ambas proteínas sugiere una distribución complementaria en las respectivas superficies. Además, la mayor parte de los residuos involucrados se encuentran muy conservados (no estarían directamente implicados en determinación de especificidad). Sin embargo, la distancia entre la His<sub>188</sub> (sustituida *in silico* a partir de las coordenadas del Glu<sub>188</sub> usando un rotámero frecuente y orientado hacia el Asp<sub>54</sub> de DesR) de DesK y el Asp<sub>54</sub> de DesR resulta ser de  $\sim 9$  Å de acuerdo a este modelo simulado, significativamente superior a los 7.5 Å que se observan en el complejo HK853-RR468. Esto puede de hecho explicarse de modo muy sencillo, teniendo en cuenta las diferencias que presentan las familias HSKA e HSKA\_3 en la ubicación de la histidina fosforilable. En HSKA, la histidina se ubica en la posición **f** del *coiled-coil* que forma el DHp y, por ende, completamente expuesta al solvente. En el caso de DesK y la familia HSKA\_3, la histidina se ubica en una posición **a** del *coiled-coil* en el estado fosfatasa, mientras que en los estados quinasa y fosfotransferasa este residuo se sitúa en forma más expuesta producto de una inserción en la héptada (posición **x**), como previamente se describió (Fig 19). La superposición de DesKC en el estado fosfotransferasa y HK853, claramente muestra las diferencias en la orientación de las histidinas, que equivale a una posición en la hélice  $\alpha$  (figura 47B). Esta diferencia sería aún mayor si se considerara el movimiento que sufre esta región de DesK al pasar al estado fosfatasa. Esto claramente impone ciertas restricciones estructurales, ya que sería necesario disminuir a la mitad la distancia entre estos residuos para que sea posible la fosfotransferencia, de acuerdo a la estructura de Spo0B-Spo0F en complejo con [BeF<sub>3</sub>]<sup>-171</sup>.

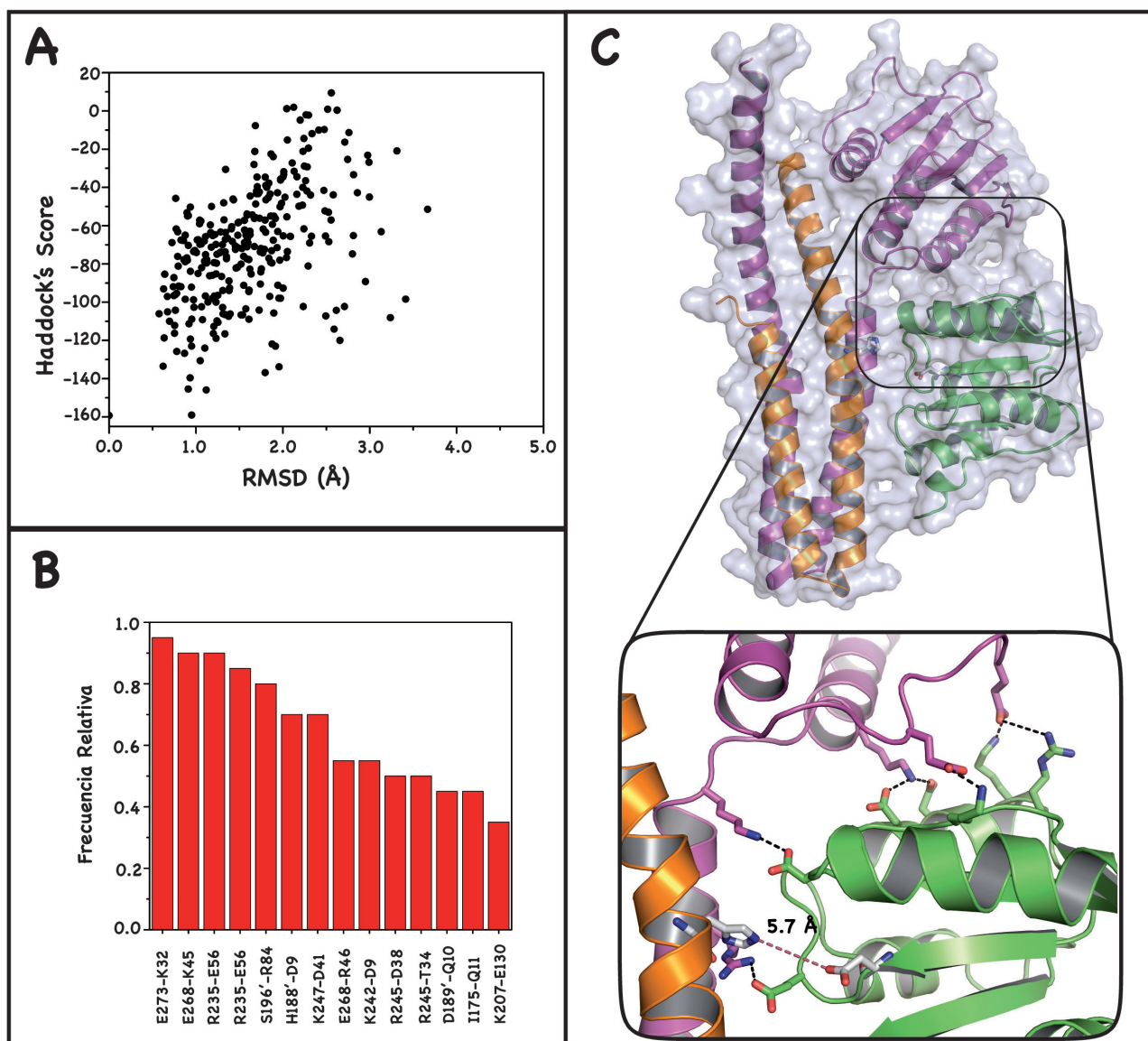
Estas diferencias entre DesK y HK853, motivaron a extender el trabajo de modelización para explorar eventuales hipótesis alternativas, que apuntaran quizás a diferencias en el modo de asociación de acuerdo a la clase de DHp de la HQ en estudio. En este sentido, realizamos ensayos de *docking*



**Figura 47: Complejo DesK-DesR similar a HK853-RR468.** Posicionamiento de DesKC-H188E (E188a) y DesR-N136 (N136a) maximizando la superposición sobre el complejo experimental HK853-RR468. Luego se realizó un protocolo de minimización con Rosetta3.1 para evitar choques entre cadenas. A) Modelo del complejo DesKC en estado fosfotransferasa (magenta y naranja, el Glu<sub>188</sub> fue sustituido por la fosfohistidina en un rotámero habitual orientado hacia el aspártico fosforilable de DesR) y DesR-N136 (verde). En barras se representan la His<sub>188</sub> fosforilada de DesK y el Asp<sub>54</sub> de DesR. En el recuadro se muestra la distancia entre el fosfato de la fosfohistidina y el Asp<sub>54</sub>, demasiado grande como para permitir la fosfotransferencia. B) Superposición simple entre DesKC-P (azul y magenta) y el complejo HK853 (blanco y naranja)-RR468 (verde), resaltando la diferencia en la posición de las histidinas fosforilables en las familias HSKA (HK853) e HSKA<sub>3</sub> (DesK).

semiflexible entre DesKC y DesR utilizando el programa Haddock2.0. Para esto fueron empleadas las coordenadas de N136a y DesKC-H188E (3GIF, los dos Glu<sub>188</sub> fueron sustituidos por histidinas en el rotámero más frecuente), las dos estructuras representativas resueltas a mayor resolución. Se realizaron corridas control iniciales, en presencia o ausencia de la His fosforilada y variando los AIR utilizados, sin encontrar grandes diferencias. Finalmente, se decidió emplear como límite máximo de AIR 12 Å de distancia entre el Nε de la His<sub>188</sub> del DHP y el OD1 del Asp<sub>54</sub> de DesR, de forma de alcanzar conformacionalmente la interacción observada entre HK853 y RR468<sup>126</sup>. En la figura 48 se puede observar como este procedimiento genera un cluster de modelos con un rmsd <3 Å en relación

a la estructura con mejor puntuación (DesKC-P\_N136). Inesperadamente, el modelo de DesKC-P\_N136 así generado muestra una interacción entre las dos proteínas que difiere significativamente a la observada para el complejo de *T. maritima*<sup>126</sup>. La superficie de asociación de DesK (~2100 Å<sup>2</sup>) involucraría no solo el DHp, sino también la hélice  $\alpha_3$ , la hebra  $\beta_1$ , el bucle  $\alpha_3$ - $\beta_1$  y el extremo N-terminal de la  $\alpha_4$  del dominio ABD. Esta superficie predicha involucra pocas interacciones hidrofóbicas, entre la Leu<sub>197</sub> y la Leu<sub>200</sub> de DesK y la Phe<sub>82</sub> de DesR. El análisis de las 20 estructuras con mejor puntuación en cuanto a la frecuencia de contactos permite sugerir una serie de interacciones que podrían jugar un papel determinante en esta asociación (figura 48C): Glu<sub>273</sub>-Lys<sub>32</sub>, Glu<sub>268</sub>-Lys<sub>45</sub>, Lys<sub>247</sub>-Asp<sub>38</sub>,

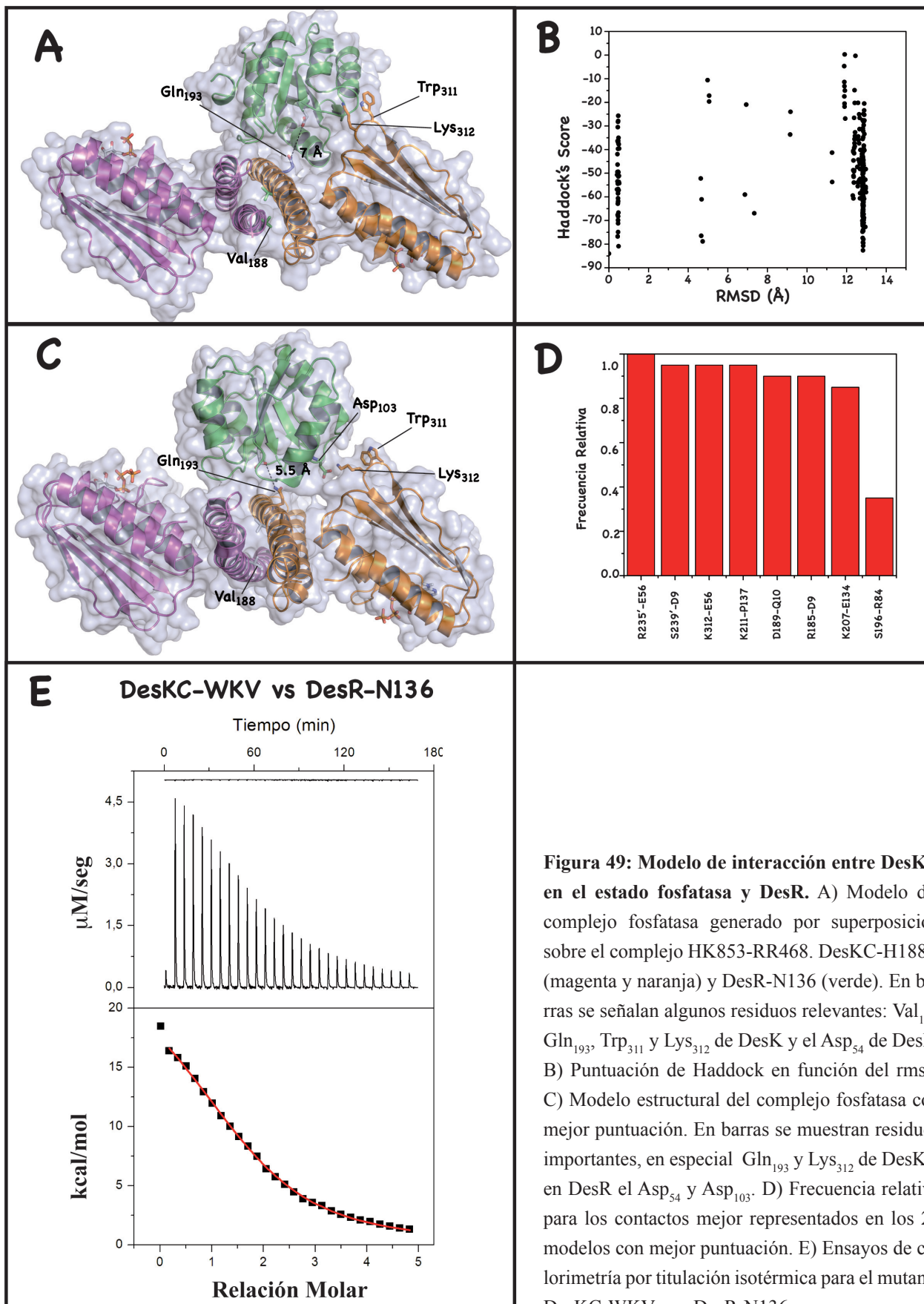


**Figura 48: Docking entre DesKC (en estado fosfotransferasa) y DesR.** A) Puntuación de Haddock en función del rmsd. La mayoría de los modelos resultantes forman un grupo con un rmsd <3 Å. B) Frecuencia relativa para los contactos más representados en la población de los 20 modelos con mejor puntuación. El histograma está limitado a frecuencias >30% (los residuos que presentan una comilla única (') pertenecen al otro monómero dentro del dímero de DesK). C) Estructura del modelo con mejor puntuación. La superficie accesible al solvente de ambas proteínas se muestra semi-transparente. Los residuos His<sub>188</sub> (DesK) y Asp<sub>54</sub> (DesR) están señalados en barras. En el recuadro se muestra un primer plano de los contactos más frecuentes identificados en B, señalados en barras. La distancia entre el Ne de la His<sub>188</sub> y OD1 del Asp<sub>54</sub> es de 5.7 Å.

Arg<sub>235</sub>-Glu<sub>56</sub>, Ser<sub>196</sub>-Arg<sub>84</sub>, His<sub>188</sub>-Asp<sub>9</sub> y Lys<sub>247</sub>-Asp<sub>41</sub>. En general estos residuos no se encuentran muy conservados, posiblemente contribuyendo en la especificidad de la interacción. En el modelo con mejor puntuación, hay algunas otras interacciones interesantes que involucran a residuos conservados, como el puente de H entre el Asp<sub>189</sub> (98 %) y la Gln<sub>10</sub> (59 %, y 83 % incluyendo histidinas), la Lys<sub>242</sub> (75 % entre Lys y Arg) y el Asp<sub>9</sub> (98 %), y la Arg<sub>245</sub> (muy poco conservada) y el Asp<sub>38</sub> (65 % entre Asp y Glu). Existiría una complementariedad de cargas al analizar los potenciales electrostáticos en superficie. Por ejemplo, la región circundante del Asp<sub>54</sub> en DesR presenta mayoritariamente carga negativa (figura 41C), mientras que la región enfrentada del DHP de DesK es esencialmente positiva, gracias a la presencia de la Arg<sub>185</sub>, Lys<sub>194</sub>, Lys<sub>201</sub>, Arg<sub>206</sub>, Lys<sub>207</sub>, Lys<sub>211</sub>, Arg<sub>235</sub> y Lys<sub>242</sub>. Además, la superficie de interacción que involucra al dominio ABD presenta una carga principalmente negativa, determinada por los residuos Glu<sub>267</sub>, Glu<sub>268</sub>, Glu<sub>269</sub> y Glu<sub>273</sub>, que es complementaria a la región  $\alpha 1\beta 2\alpha 3$  de DesR, donde se ubica un parche más positivo formado por la Lys<sub>32</sub>, la Lys<sub>45</sub> y la Arg<sub>46</sub>. Esta asociación potencial entre DesK y DesR simulada por *docking*, podría reflejar un aspecto común a otros complejos similares: la presencia de más de una superficie de interacción. La región circundante a la histidina fosforilable de DesK y al Asp<sub>54</sub> de DesR, permitiría enfrentar residuos conservados encargados de la transferencia de fosfatos, mientras que la interacción entre el ABD y DesR involucraría regiones variables que podrían jugar el rol de determinantes de especificidad del complejo.

Estos complejos DesK-DesR predichos, ya sea por superposición con HK853-RR468 o por *docking*, fueron realizados con DesK en estado fosfotransferasa. Se quisieron comparar estas simulaciones con cálculos equivalentes sustituyendo el modelo de DesKC por DesKC-H188V (PDB 3EHH), explorando posibles bases estructurales que expliquen las diferencias registradas por calorimetría en función del estado de la HQ. Se procedió entonces a repetir las corridas *in silico* cambiando las coordenadas de DesKC. Para el complejo generado por superposición con HK853-RR468, la histidina fosforilable quedaría a una distancia mayor con respecto al Asp<sub>54</sub>, pero en DesK este residuo no es necesario para catalizar la reacción<sup>131</sup>. Por otro lado, es interesante notar que la Gln<sub>193</sub>, que ha sido directamente implicada en el mecanismo de defosforilación en otras HQs<sup>135</sup>, sí se dispondría a una distancia de  $\sim 7$  Å (figura 49A). Por *docking* se obtuvieron dos poblaciones de estructuras diferentes (figura 49B); la más poblada presenta una superficie de interacción de  $1600\text{Å}^2$ , y la orientación de DesR es equivalente a la obtenida para el estado fosfotransferasa (figura 49C). En esta interacción, la Gln<sub>193</sub> también se dispone de forma favorable para participar en la catálisis, a  $5.5$  Å del Asp<sub>54</sub>. El análisis de los contactos para las 20 estructuras con mejor puntuación permite identificar varios pares: Arg<sub>235</sub>-Asp<sub>56</sub>, Ser<sub>239</sub>-Asp<sub>9</sub>, Lys<sub>312</sub>-Asp<sub>103</sub>, Lys<sub>211</sub>-Pro<sub>137</sub>, Asp<sub>189</sub>-Gln<sub>10</sub>, Arg<sub>185</sub>-Asp<sub>9</sub> y Lys<sub>207</sub>-Asp<sub>134</sub> (figura

49D). Es interesante notar que el Trp<sub>311</sub> y la Lys<sub>312</sub> se orientan en dirección al sitio de unión de DesR, sugiriendo que podrían participar en la interacción con el RR (figura 49A y C). En el modelo con mejor puntuación del complejo se observa que la Lys<sub>312</sub> estaría formando un puente salino con el Asp<sub>103</sub>



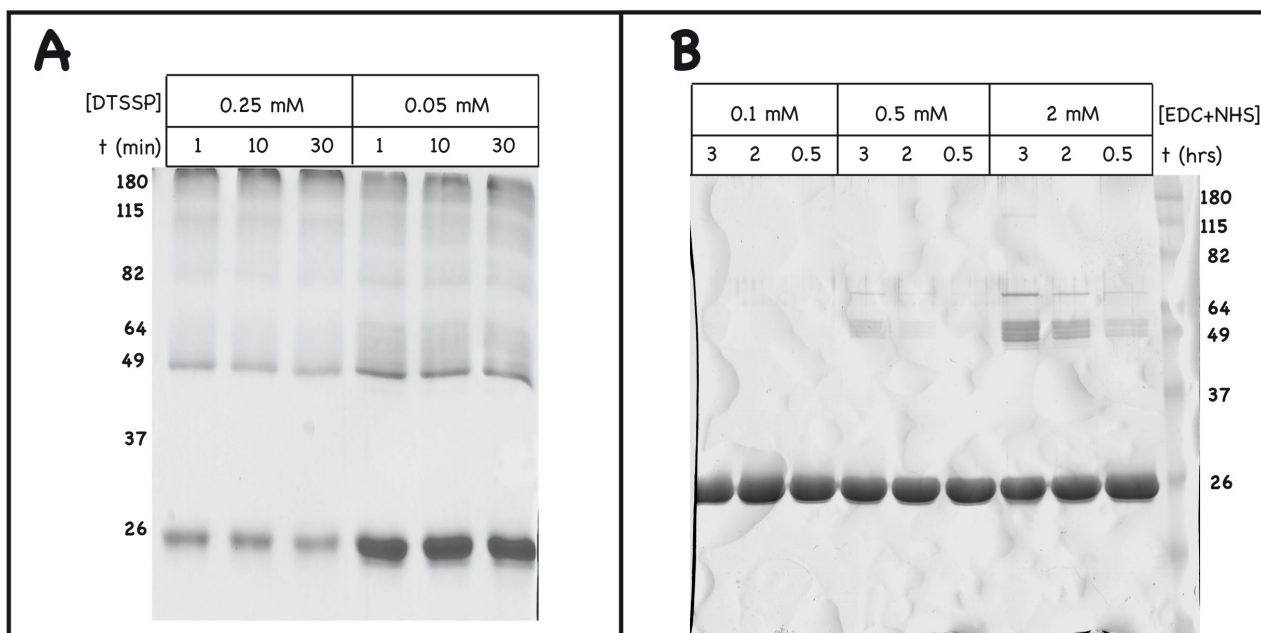
**Figura 49: Modelo de interacción entre DesKC en el estado fosfatasa y DesR.** A) Modelo del complejo fosfatasa generado por superposición sobre el complejo HK853-RR468. DesKC-H188V (magenta y naranja) y DesR-N136 (verde). En barras se señalan algunos residuos relevantes: Val<sub>188</sub>, Gln<sub>193</sub>, Trp<sub>311</sub> y Lys<sub>312</sub> de DesK y el Asp<sub>54</sub> de DesR. B) Puntuación de Haddock en función del rmsd. C) Modelo estructural del complejo fosfatasa con mejor puntuación. En barras se muestran residuos importantes, en especial Gln<sub>193</sub> y Lys<sub>312</sub> de DesK y en DesR el Asp<sub>54</sub> y Asp<sub>103</sub>. D) Frecuencia relativa para los contactos mejor representados en los 20 modelos con mejor puntuación. E) Ensayos de calorimetría por titulación isotérmica para el mutante DesKC-WKV con DesR-N136.

de DesR. Teniendo esto en cuenta se decidió evaluar por ITC la interacción del mutante DesKC-WKV y DesR-N136 (figura 49E y tabla XIV). La comparación entre los parámetros termodinámicos no permite aún ser concluyentes: ambas constantes de asociación disminuyen, como se esperaba en función del modelo, pero la disminución no es drástica ( $K_{a1}$  disminuye  $\sim 4.5$  veces con respecto a DesKC-H188V; y  $K_{a2}$ ,  $\sim 2.4$  veces). Sin embargo, además de la disminución de afinidad, también se observa una pérdida en la asimetría entre los dos sitios. En el caso de DesKC-H188V y DesR-N136 la relación entre ambas constantes es de  $\sim 8.5$  veces, mientras que esta relación disminuye a  $\sim 4.5$  con el mutante DesKC-WKV.

#### 7.14. Cristalización del complejo DesK-DesR

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron innumerables intentos de cristalización del complejo DesKC-DesR (tabla III), aprovechando los estudios estructurales y funcionales disponibles. A pesar de los esfuerzos dedicados, los resultados hasta ahora han sido negativos. Como se describió más arriba, inicialmente se comenzó realizando rastreos de condiciones de cristalización para el complejo DesKC-H188V+DesR en presencia de ATP y  $MgCl_2$ . Algunos de los cristales que surgieron fueron optimizados y al resolver la estructura fue posible determinar que estos correspondían al dominio ABD separado de DesK. Dado que en muchas otras *hits* iniciales se confirmaba siempre la cristalización de DesK no unida, se decidió evaluar la cristalizabilidad de DesR *per se*, así como paralelamente buscar condiciones que estabilicen el complejo, con afinidades en solución del orden de micromolar. La cristalización de DesR resultó ser muy difícil y probablemente un factor determinante en la dificultad de lograr cristales del complejo. En cuanto a condiciones de estabilización, inicialmente se intentó evaluar el efecto de variaciones de pH, sales y temperatura, utilizando resonancia plasmónica de superficie (Biacore3000, GE Healthcare), ya que permite medir constantes cinéticas de asociación y disociación en forma semi-automática. La inestabilidad de las proteínas inmovilizadas en la matriz terminaron impidiendo este abordaje experimental. A continuación, se decidió realizar entrecruzamiento químico inespecífico utilizando reactivos como DTSSP (3,3'-ditiobis-[sulfosuccinimidilpropionato]) o la combinación de NHS (N-hidroxisuccinimida) y EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilamino-propil]carbodiimida). DTSSP es un reactivo que permite formar un puente covalente entre aminas primarias (Lys) que se encuentren a una distancia máxima de 12Å. Por el contrario, NHS+EDC permite formar un enlace amida entre una amina primaria presente en residuos de Lys y carboxilatos de Asp o Glu. En esta reacción no existe una cadena carbonada que restrinja una distancia máxima, ambos residuos se deben acercar lo suficiente para poder reaccionar. A pesar de trabajar en distintas condiciones de puesta a punto con ambos reactivos, no fue posible obtener cantidades suficientes de

producto homogéneo para encarar los estudios de cristalización (figura 50). Por esta razón se decidió continuar con otra aproximación, que incluyera variantes de DesKC capaces de formar un complejo más estable (tales como DesKC-H188E y DesKC-CoilP3). Además, se utilizó la forma truncada de DesR-N136, que demostró ser capaz de formar cristales adecuados para difracción en contraste con la versión entera de la proteína. En el caso del complejo DesKC-H188E+DesR-N136, previamente se discutió que los cristales resultaron ser de DesKC-H188E sola (estructura E188c), sugiriendo la disociación del complejo en las condiciones de cristalización. Por otro lado, los ensayos de cristalización del complejo CoilP3+DesR-N136 no revelaron ninguna pista de material cristalino como para trabajar en su optimización. En ambos casos se consideraron las estequiometrías y constantes de equilibrio determinadas por ITC como guía para definir relaciones de concentración entre los dos componentes.



**Figura 50: Ensayo de entrecruzamiento químico del complejo DesKC-H188V y DesR.** A) Reacción de entrecruzamiento a dos concentraciones del reactivo DTSSP. B) Reacción con los reactivos EDC y NHS.

## 8. DISCUSION

Los sistemas a dos componentes forman parte de una compleja red de señalización en la enorme mayoría de especies procariotas, que les permiten detectar cambios en el entorno y generar respuestas adaptativas para su supervivencia. Las HQs juegan un rol central en estos sistemas de regulación, son proteínas multifuncionales capaces de catalizar diferentes actividades de forma regulada, detectando las señales de entrada y regulando el flujo de la información. Más allá de las modificaciones covalentes disparadas o inhibidas por la señal, en especial la fosforilación de histidinas específicas, todo indica que deben ocurrir transiciones conformacionales que expliquen a nivel molecular y atómico cómo estas proteínas perciben la señal, cómo se transmite esta información en la molécula y cómo en definitiva esto regula alostéricamente la actividad (catalítica) de salida para transducir la información apropiada río abajo. Los detalles de dichas transiciones se conocen muy pobremente y son aún materia de álgido debate, probablemente requiriendo un abordaje crecientemente multidisciplinario y aportando evidencias en distintos SDCs. Este trabajo se centró en el estudio estructural del SDC DesK-DesR de *Bacillus subtilis*, un termómetro molecular capaz de regular la fluidez de la membrana bacteriana en función de los cambios en la temperatura. La principal metodología empleada fue la cristalografía de proteínas, permitiendo obtener modelos estructurales precisos y constituyendo una herramienta fundamental para generar las hipótesis funcionales que se proponen. Las estructuras de DesKC-H188V (V188a y V188b) y DesKC- $\Delta$ 174 fueron resueltas al inicio de este trabajo de Tesis, y mi participación se limitó al refinamiento de DesKC- $\Delta$ 174. Las comparaciones iniciales de estas dos estructuras ya revelaban notables rearreglos conformacionales. En el curso de este trabajo fueron resueltas 10 estructuras cristalográficas (PDB IDs de las ya depositadas 3EHG, 3GIE, 3GIF y 3GIG), que resultaron en dos artículos publicados<sup>231,257</sup> (adjuntos en el Anexo) y dos manuscritos en preparación. Estos últimos incluyen 1) experimentos de validación *in vitro* e *in vivo* sobre el papel en la transmisión de la señal de la extensión *coiled-coil* N-terminal en DesK, con ingeniería de proteínas basada en la información estructural; y, 2) la estructura del dominio receptor de DesR, y la caracterización biofísica y estructural del complejo DesK-DesR.

Actualmente las dos metodologías experimentales disponibles para obtener información a nivel atómico son la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN) multidimensional<sup>293</sup>. La cristalografía de rayos X representa la metodología más importante, reflejado por ejemplo en que su uso da origen al 87% de los modelos depositados en la PDB. El principio básico de la difracción guarda analogías profundas con las técnicas de microscopía electrónica y de luz visible, donde la radiación dispersada por el objeto es refocalizada por imanes o lentes resultando en la proyección

2D de una imagen magnificada. De allí que la difracción se considere una técnica de microscopía más que espectroscópica. Existen sin embargo algunas diferencias importantes entre estos dos tipos de aproximación: para determinar una estructura a nivel atómico es necesario emplear radiación con longitud de ondas similares a las distancias de separación interatómica (típicamente en el orden de los radios atómicos en el orden de 1Å), razón por la que se necesita iluminar con rayos X<sup>294</sup>. Hasta la fecha no ha sido posible confeccionar lentes capaces de refractar rayos X, con lo que la reconstrucción de la imagen magnificada se logra usando análisis de Fourier con los haces de luz difractada (integrando sus direcciones, amplitudes y fases). El otro aspecto hasta hoy esencial para poder explotar la dispersión de rayos X es el uso de muestras al estado cristalino. La producción de cristales de macromoléculas biológicas que difracten a alta resolución no es una tarea trivial, requiriendo ensayo y error con cientos de condiciones diferentes, donde la automatización robótica ha pasado a jugar un rol muy importante. ¿Por qué necesitamos cristales? Los compuestos orgánicos en general están constituidos por átomos livianos, como C, N, H y O, y dado que la dispersión de rayos X es directamente proporcional al número de electrones del centro de dispersión, para ser capaces de registrar este fenómeno es necesario que exista una interferencia constructiva proveniente de una enorme cantidad de moléculas perfectamente ordenadas en las tres dimensiones: los cristales son herramientas esenciales de amplificación de la señal, a su vez distribuyendo la gran energía asociada a la radiación de alta frecuencia, en trillones de moléculas individuales que de otro modo se dañarían muy rápidamente. El resultado experimental final de la cristalografía por difracción de rayos X es la obtención de un mapa de densidad electrónica en tres dimensiones, que luego es interpretado por medio de un modelo atómico del cristal. Desde el punto de vista estructural, las proteínas pueden considerarse como complejos soportes que organizan en el espacio y de forma muy precisa ciertos grupos químicos funcionales, definiendo de esta manera los sitios activos de las enzimas o las superficies de interacción con otras macromoléculas. Asimismo, las estructuras también codifican la potencialidad dinámica de las mismas, permitiendo y definiendo los movimientos moleculares críticos que permiten ejecutar sus funciones biológicas. La periodicidad esencial de la materia cristalina determina que la aproximación cristalográfica aplicada al estudio de proteínas, genere información sobre estados conformacionales homogéneos (único estado, o al menos netamente mayoritario), para cada forma cristalina o tipo de empaquetamiento espacial. Los modelos atómicos derivados, además de las coordenadas atómicas en 3D, incluyen también factores de desplazamiento atómico (factores B o de temperatura) que permiten apreciar las vibraciones atómicas y/o el desorden estático presente en los cristales, de alguna forma describiendo la flexibilidad de las distintas regiones de la macromolécula.

## 8.1. Estudios estructurales de DesKC

Durante las últimas décadas, se ha venido realizando un gran esfuerzo procurando obtener información estructural de proteínas pertenecientes a SDCs. Sin embargo, hasta el momento la mayoría son dominios aislados y en un solo estado funcional para cada caso. Esto dificulta una visión dinámica ligada a las bases mecanísticas de su regulación. Las HQs son proteínas multifuncionales, capaces de regular alostéricamente diversas actividades de acuerdo a alteraciones estructurales precisas que ocurren a grandes distancias en los dominios sensores. Para entender estos procesos alostéricos es importante considerar los paisajes energéticos que gobiernan la conformación y plegamiento de las proteínas, donde los mínimos pueden representar estructuras más estables y funcionalmente relevantes<sup>295,296</sup>. Actualmente es bastante aceptado que este tipo de proteínas alostéricas son capaces de adoptar más de un estado conformacional/funcional, implicando diferentes mínimos energéticos. La transición entre estos estados requiere la superación de barreras energéticas, lo que determina la cinética de interconversión. Cualquier factor, externo (unión de ligandos, etc.) o derivado de rearrreglos internos del polímero, juegan el rol de modificadores de los equilibrios y constantes cinéticas, modulando en definitiva el paisaje energético, y con él, la población relativa de los distintos estados accesibles de la proteína. Dado que cada conformación tiene consecuencias funcionales, en definitiva la población diferencial de estados regula la actividad de la proteína. La aplicación de la cristalografía de proteínas para abordar este tipo de problemas requiere de la determinación de estructuras en distintos estados conformacionales, íntimamente ligados a estados o propiedades funcionales. Diversas estrategias se emplean para la estabilización de dichos conformeros, tales como la unión de ligandos, modificaciones post-traduccionales y/o mutagénesis. Asimismo, es fundamental complementar esta información cristalográfica con otras metodologías de Biología Estructural que permitan obtener información ortogonal en solución, simular estados intrínsecamente inestables, así como también validar experimentalmente los mecanismos alostéricos propuestos.

El grupo del Dr. Diego de Mendoza logró insertar *in vitro* a la proteína DesK en proteoliposomas manteniendo su funcionalidad y respuestas reguladas<sup>297</sup>. En colaboración con ellos fue posible luego determinar que las actividades de autofosforilación y de defosforilación del RR son reguladas por temperatura, y en sentido opuesto<sup>231</sup>. Por el contrario, la actividad fosfotransferasa no es regulada y depende exclusivamente del estado de fosforilación de DesK. En conjunto con los resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular para las distintas proteínas recombinantes de la región citoplasmática soluble que se realizó en este trabajo, es posible proponer por lo menos tres estados estructurales y funcionales diferentes: fosfatasa, quinasa y fosfotransferasa. DesKC-H188V

fue previamente caracterizada como un mutante que retiene una actividad fosfatasa comparable a la proteína salvaje, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>131</sup>. El mutante His<sub>188</sub>Glu generado en este trabajo, permite mimetizar el estado fosforilado en forma estable. Los ensayos de cromatografía de exclusión molecular sugieren cambios conformacionales disparados por la autofosforilación y diferencias en la capacidad de formar complejos con DesR, aportando fuerte evidencia a favor de los tres estados funcionales.

En la búsqueda de la estructura del complejo DesKC-H188V–DesR, se obtuvieron cristales del dominio ABD de DesK en interacción con ATP y Mg<sup>+2</sup>. Inesperadamente, esta estructura a alta resolución representa la primera en complejo con el verdadero sustrato natural. El dominio ABD de DesK pertenece a la familia HPK7, que presenta algunas características particulares, como por ejemplo la región conectora entre los dominios DHp y ABD es bastante pequeña, probablemente imponiendo ciertas restricciones estructurales en la relación entre ambos dominios. Además las proteínas integrantes de HPK7 presentan algunos residuos distintivos que están involucrados en la coordinación del Mg<sup>+2</sup> o la interacción con el sustrato, particularmente en las cajas N y G1. Esta estructura revela un “ATP lid” en DesK más corto que el de otras familias, como por ejemplo CheA y PhoQ (figura 16A), quedando el sustrato mucho más expuesto al solvente (figura 16B). Los contactos que permiten ubicar y estabilizar el ATP ocurren a lo largo de toda la molécula. Algunos puentes de H, como los formados entre el Gly<sub>336</sub>[N] – ATP[O3G] y la Leu<sub>337</sub>[N] – ATP[O2A], así como también interacciones iónicas, que involucran a los residuos Lys<sub>296</sub>, His<sub>297</sub> e His<sub>335</sub> con los fosfatos β y γ son importantes para la unión del sustrato. En función de los mecanismos propuestos para nucleotidasas o las reacciones de fosfotransferencias, la presencia de residuos con cargas positivas probablemente sean clave en la catálisis estabilizando la carga negativa que se forma al romperse el enlace entre los fosfato β y γ<sup>298</sup>. Una explicación de la ausencia de estructuras de HQ en complejo con ATP podría ser la actividad ATPasa intrínseca que presentan estas enzimas. El plegamiento de los dominios ABD pertenecen a la superfamilia GHL de ATPasas lentas, y aunque esta actividad es menor a la presente en proteínas como las girasas de ADN, MutL o la chaperona Hsp90, los tiempos requeridos para obtener cristales son lo suficientemente extensos como para que ocurra la hidrólisis del sustrato, o incluso análogos no-hidrolizables del ATP<sup>89</sup>. Se ha propuesto que la menor actividad ATPasa presente en las HQ, en comparación con otros miembros de la familia GHL, se podría deber a la presencia de una Asn o His (por ejemplo, Asn<sub>385</sub> en PhoQ e His<sub>405</sub> en CheA), en lugar del glutámico conservado que se observa en verdaderas ATPasas. Estos residuos están directamente involucrados en la coordinación del Mg<sup>+286</sup>. Sin embargo, DesK y muchas de las HQ de la familia HPK7 presentan un glutámico en esta posición

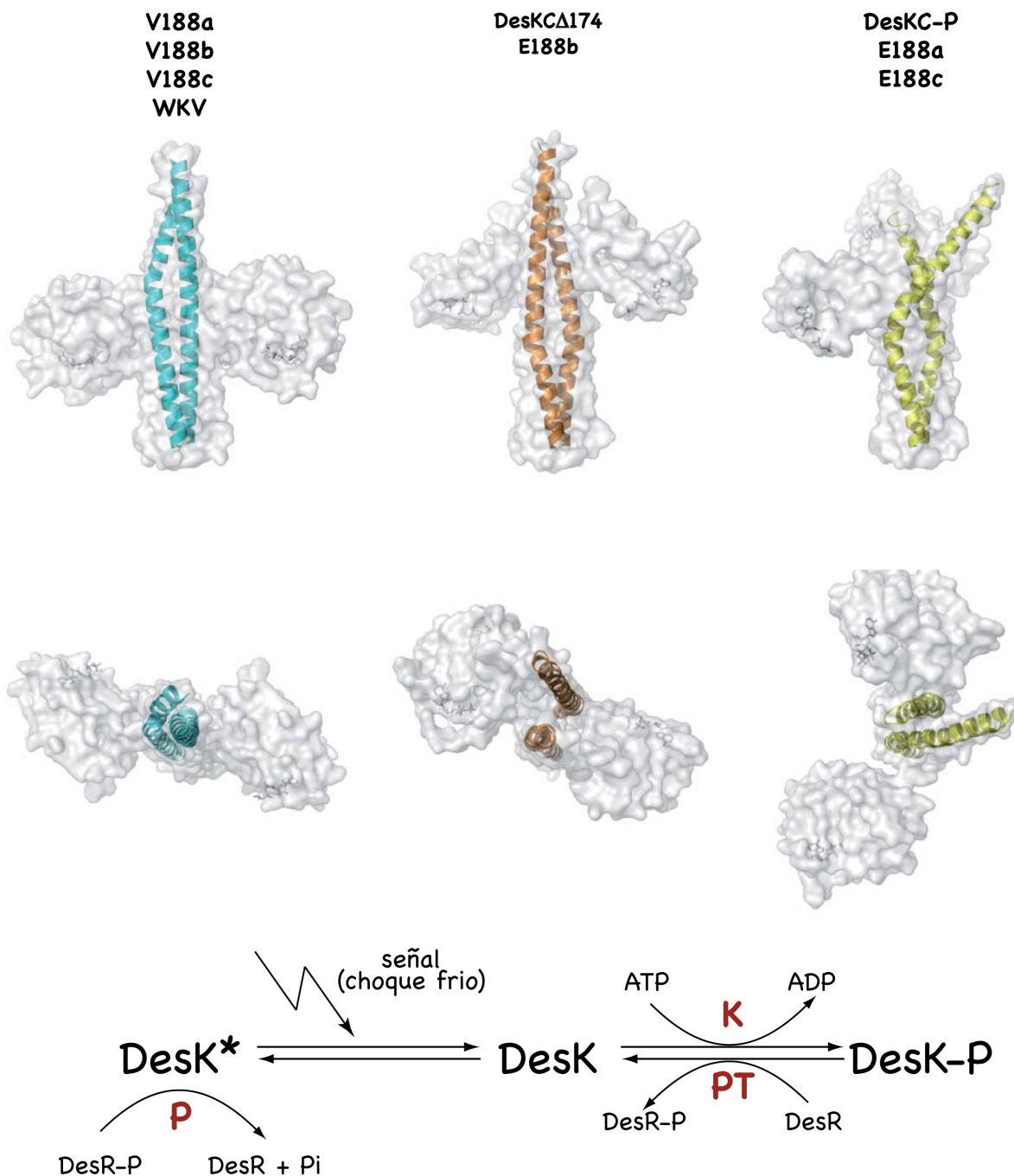
(Glu<sub>289</sub>, conservado en un 94 % de las secuencias analizadas de esta familia), lo que contradice la hipótesis inicial. En las HQ con actividad ATPasa más alta, se evidencia un residuo más básico en sustitución de la His<sub>335</sub> de DesK (Arg<sub>434</sub> en PhoQ o Lys<sub>494</sub> en CheA, entre otras), consistente con una función estabilizadora de la carga negativa del fosfato  $\beta$  al romperse el enlace  $\beta$ - $\gamma$ <sup>298</sup>. Estas diferencias podrían impactar en la actividad ATPasa y sería interesante evaluar esta actividad ATPasa en otras enzimas de la familia HPK7 como NarX, NarQ, Comp, UhpB o LiaS.

Los cambios registrados producto de la interacción del ATP con el dominio ABD, en comparación con la estructura de DesKC-H188V en complejo con ADP, permiten describir pequeños cambios conformacionales correlacionados con la unión del nucleósido trifosfato. El fosfato  $\gamma$  del ATP establece interacciones con el ND1 de la His<sub>335</sub>, el N de la Gly<sub>336</sub>, el NZ de Lys<sub>296</sub> y con la molécula de agua HOH<sub>165</sub>, que a su vez participa de la coordinación del Mg<sup>+2</sup>. Es posible que estas interacciones induzcan los cambios observados en la hélice  $\alpha$ 5, así como también sean responsables de diferencias en la afinidad de interacción entre ambas moléculas. Esto último debería ser confirmado experimentalmente mediante titulaciones por ITC, donde se evalúe la interacción del ATP o ADP para distintas variantes de DesKC.

El conjunto de estructuras resueltas del dominio citoplasmático de DesK, revela que las HQs de la familia HISKA\_3 presentan una organización común a otras HQ<sup>89,91</sup>, con un dominio de dimerización central y hacia ambos lados los dominios ABD. El dominio DHp está conformado por un haz de 4 hélices  $\alpha$  que permite estabilizar al homodímero y como se verá también es responsable de definir el estado de activación de la proteína. El DHp es flexible, a pesar de estar implicado en una estructura de tipo *coiled-coil*, clásicamente consideradas prototipo de rigidez. Esta concepción ha ido cambiando<sup>197,299,300</sup>, con diversos ejemplos en los que estas estructuras helicoidales permiten la transición entre distintas configuraciones con barreras energéticas bajas. Es el conjunto de las estructuras de DesKC y mutantes puntuales, en distintos empaquetamientos cristalinos para cada estado conformacional, lo que aporta evidencias fuertes acerca de los rearrreglos conformacionales que adopta el dominio DHp. Las distintas configuraciones implican alteraciones de las superficies de interacción proteína-proteína (DHp-ABD y DesK-DesR), que consideramos esenciales en la transmisión de la señal.

En suma, la información estructural y funcional reunida nos lleva a proponer un modelo de regulación con tres estados conformacionales diferentes: fosfatasa, quinasa y fosfotransferasa (figura 51). Los cambios de la superficie molecular del dominio DHp en los distintos estados regulan la transición

movilidad/rigidez de los dominios ABD, y la accesibilidad de la histidina fosforilable. Estos parecen así ser elementos determinantes en la transmisión de la información de la vía. La gran plasticidad de las HQs (principalmente en los estados quinasa y fosfotransferasa) probablemente explican por qué se han resuelto a la fecha muy pocas estructuras de proteínas enteras o conteniendo la región citoplasmática catalíticamente activa íntegra, y la mayoría de ellas pertenecientes a organismos termófilos<sup>89,91</sup>.



**Figura 51: Estructuras de DesKC en tres estados funcionales: fosfatasa (DesK\*), quinasa (DesK) y fosfotransferasa (DesK-P).** La superficie molecular del dímero está representada en forma semi-transparente, y solo las hélices  $\alpha 1$  están resaltadas en cintas permitiendo observar los rearrreglos estructurales por los cuales transita la proteína. Las dos orientaciones facilitan apreciar la estabilización/desestabilización de la extensión *coiled-coil* N-terminal entre los estados fosfatasa y quinasa. En la parte superior de la figura se listan las distintas estructuras resueltas para cada estado conformacional. La correspondencia con las funciones catalíticas de salida ('output') se indica en la parte inferior del panel.

## 8.1.1. Análisis estructural de cada estado conformacional de DesKC: vínculo conformación-función.

### 8.1.1.1 *Estado quinasa*

El estado quinasa presenta como característica sobresaliente la presencia de ambos dominios ABD completamente libres, permitiendo el acercamiento del ATP a la histidina fosforilable, de forma de catalizar la autofosforilación. Evidencias de dicha movilidad son los factores B extremadamente altos, así como la baja señal en la densidad electrónica de partes o de la totalidad de algunos dominios ABD en los distintos dímeros independientes refinados a partir de las distintas formas cristalinas. La comparación de las estructuras de tipo quinasa y fosfatasa revela que la transición entre ambos estados está dirigida por movimientos de rotación de tipo ‘engranajes’ (eje de rotación perpendicular al plano de la membrana), con una rotación de  $\sim 60^\circ$  en el sentido de las agujas del reloj para la  $\alpha 1$  y correspondientemente contrario a las agujas del reloj en la  $\alpha 2$  de cada monómero del DHp (figura 26). El movimiento no es simple, en el sentido que se combina con un movimiento de tipo ‘cizalla’, con una translación neta de las hélices de un monómero con respecto a las del otro.

### 8.1.1.2 *Estado fosfatasa*

El estado fosfatasa presenta características que permiten formular hipótesis de regulación de la HQ. La extensa interacción entre los dominios DHp y ABD, implicando una mayor rigidez de los ABDs y evitando el acercamiento del ATP a la histidina fosforilable, sugiere un mecanismo de inhibición de la actividad autoquinasa. Asimismo, permite también liberar la región del DHp que establece interacciones con DesR, modulando la competencia entre el RR y el dominio ABD por la His<sub>188</sub> y su región aledaña. Esta asociación DHp-ABD está controlada por los movimientos de rotación de las hélices  $\alpha$  del DHp, exponiendo/escondiendo residuos directamente involucrados en esta interacción. En el estado fosfatasa es posible describir una estructura de tipo *coiled-coil* entre las dos hélices  $\alpha 1$  hacia el extremo N-terminal, gracias a la presencia de una periodicidad en héptadas, con residuos hidrofóbicos en posiciones clave. Sin embargo, esta distribución no es perfecta, probablemente evitando la formación de estructuras demasiado estables y, por ende, rígidas. Además, la presencia de un *stutter* en la posición 174 genera una curvatura en las hélices  $\alpha 1$ , permitiendo no solo recuperar el desfase producto de las diferencias de periodicidad entre las hélices  $\alpha$  (3.6) y las estructuras tipo *coiled-coil* (3.5), sino que también favorece el pasaje de un *coiled-coil* de 4 hélices a uno de 2. Estas regiones *coiled-coil* se encuentran presente en la mayoría, sino en todas, las HQ<sup>201</sup>, pero también en muchas proteínas de señalización<sup>202</sup>, sugiriendo que es un mecanismo regulatorio ampliamente utilizado. En

el caso de DesK, dada la secuencia involucrada en la formación de esta estructura, se generaría una tensión importante sobre la posición 188, ya que esta pasaría a ocupar una posición clave **a** en el estado fosfatasa, forzando a la histidina fosforilable a ubicarse hacia el ambiente hidrofóbico del interior del DHp. ¿Cómo podría articularse el mecanismo de regulación funcional de DesK en este escenario? Las evidencias experimentales disponibles permite suponer que la temperatura, mediante alteraciones en el espesor de la membrana<sup>224</sup>, regulan la transición fosfatasa–quinasa, explicando por qué ambas actividades son alteradas en sentido opuesto<sup>231</sup>. El choque frío produce un aumento del espesor de la membrana<sup>228</sup>, que podría provocar rearrreglos de los segmentos transmembrana (TM) de DesK, por ejemplo mediante variaciones de sus ángulos de inclinación. Dado que la extensión *coiled-coil* hacia el extremo N-terminal de DesKC, proximal a la bicapa lipídica, sólo se ve en un estado (fosfatasa) y que las hélices TM conectan directamente con esta extensión, los rearrreglos de los TM se transmitirían fácilmente estabilizando o desestabilizando el *coiled-coil* citoplasmático. La transición desde un estado fosfatasa, donde existe un empaquetamiento de las hélices  $\alpha$  que conectan el dominio sensor con la región catalíticamente activa, hacia un estado quinasa donde esta interacción se rompe. La formación de la estructura *coiled-coil*, así como la interacción DHp-ABD, probablemente permitan compensar energéticamente el enterramiento de la His<sub>188</sub>, asegurando que la barrera de energía de transición entre ambos estados no sea inalcanzable. En función de esta hipótesis estructural hemos realizado experimentos evaluando la funcionalidad de la vía de señalización *in vivo* usando mutantes puntuales de DesK que (des)estabilicen la extensión *coiled-coil* N-terminal. Los resultados preliminares indican que la sustitución de residuos que generen un efecto desestabilizante del *coiled-coil* N-terminal (DesK\_A167R-I171G-L174G), o también de la interacción DHp-ABD (DesK\_F346A\_N348S), resultan en variantes de DesK en estado quinasa constitutivo. Consistentemente, mutaciones que estabilizan el *coiled-coil* N-terminal (DesK\_S150I-S153L-R157I) anulan la actividad quinasa a la temperatura señal (25°C). Marina y colaboradores, habían previamente reportado que mutaciones moduladoras de la estabilidad de la interacción DHp-ABD en la HQ HK853, modulan su actividad autoquinasa<sup>89</sup>, sugiriendo que la reducción de la movilidad del ABD es un mecanismo compartido por numerosas clases de HQ.

### 8.1.1.3 Estado fosfotransferasa

La autofosforilación dispara un segundo cambio conformacional, por razones hasta el momento menos claras, que permite alcanzar un tercer estado denominado fosfotransferasa. Es importante resaltar que la actividad de fosfotransferencia no está regulado por temperatura, sugiriendo que el punto de control de DesK y, por ende de la vía, depende de la decisión sobre la transición fosfatasa–quinasa.

La proteína fosforilada adoptada una conformación asimétrica, con sólo una de las dos histidinas posibles fosforilada. Las hélices  $\alpha 1$  presentan una importante curvatura que ocurre gracias a cambios en la red de puentes de H que estabilizan la estructura secundaria, y la Thr<sub>190</sub> podría favorecer esta transición, compensando la ruptura de estos contactos. Además, la presencia de un residuo pequeño muy conservado como la Gly<sub>192</sub> probablemente sea otro factor central que permitan alcanzar esta conformación con una gran curvatura de las hélices  $\alpha 1$ . Si bien no podemos proponer un mecanismo en base a los datos disponibles actualmente, que explique por qué la fosforilación favorece esta conformación, la interacción entre el Glu<sub>188</sub> (en la estructura E188a) y la Lys<sub>242</sub> o la Arg<sub>235</sub>, todos residuos extremadamente conservados, podría estabilizar una interacción entre las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de distintos monómeros que parece promover este estado asimétrico. La observación de una única histidina fosforilada fue un resultado inesperado, y fue por ende confirmado experimentalmente realizando el análisis cinético de la actividad de autofosforilación. Esta asimetría ha sido previamente reportada en NtrB<sup>129</sup>, y dado que ésta última pertenece a la familia HISKA, es posible que constituya una característica común de las HQs. En el estado quinasa, el dominio DHp presenta una gran simetría interna no determinando *a priori* preferencia por uno de los dos sitios fosforilables, que son de este modo en principio equivalentes. Esto apoya la idea de una cooperatividad negativa disparada por el cambio conformacional inducido tras la primer fosforilación, lo que impide la modificación de la segunda histidina. Se volverá sobre este punto al discutir las simulaciones por *docking*. La interacción entre uno de los dos dominios ABD con la hélice  $\alpha 1$  (la que presenta la histidina fosforilada) constituiría un segundo mecanismo de reducción de la movilidad de los ABD y podría ser un elemento clave en permitir la asociación con el RR para catalizar la fosfotransferencia.

El mutante DesKC-H188E fue cristalizado en dos conformaciones diferentes: similar a DesKC- $\Delta 174$  (quinasa) o a DesKC-P (fosfotransferasa), sugiriendo que la energía de interconversión entre ambos estados funcionales es baja, en ausencia de los segmentos TM. Las interacciones entre las hélices  $\alpha 1$  en el *coiled-coil* N-terminal, así como las asociaciones entre DHp-ABD y  $\alpha 1$ -ABD, son factores relevantes del paisaje energético, subrayando que las barreras energéticas entre los distintos conformómeros son aspectos centrales en la regulación funcional. Las hélices  $\alpha$  han sido descritas como elementos importantes en la transducción de información, y en el caso de las HQs observamos que están directamente involucradas en el mecanismo alostérico que controla las distintas actividades de salida de las mismas. Los estudios sobre esta familia han permitido proponer principalmente dos formas de transmisión de la señal, mediante movimientos de tipo pistón<sup>93,106,107,191-193</sup> o por rotación<sup>40,118,119,185,187,190,194-197</sup>. El mecanismo propuesto para DesK es consistente con los movimientos

sugeridos para otros dominios de las HQ, como por ejemplo los movimientos por rotación en engranajes que experimenta el dominio HAMP del receptor Af1503<sup>197,198</sup>. En muchas HQs, este dominio se ubica entre el dominio sensor y el DHp, funcionando como elemento de transmisión o conversión de la señal<sup>50</sup>. También se ha propuesto el mecanismo por rotación comparando las estructuras de los dominios sensores de LuxPQ en presencia y ausencia del estímulo<sup>40,112</sup> y en el receptor de fototaxis rodopsina II<sup>119</sup>. Finalmente, la rotación en una estructura de tipo *coiled-coil* también ha sido evocada como mecanismo de transducción de la señal en una quimera entre la HQ FixL de *Bradyrhizobium japonicum* y YtvA de *Bacillus subtilis*<sup>185</sup>.

¿Cómo se relacionan los estados estructurales de DesK con las estructuras de HQ previamente disponibles, pertenecientes a la familia HSKA? ¿Qué implicancias tienen las diferencias en la periodicidad de héptadas entre las familias HSKA e HSKA\_3? Considerando las distintas estructuras de DesK, es evidente que DesKC-H188V es la que presenta mayor similitud con las estructuras de HK853 (2C2A y 3DGE) y KinB (3D36), como se puede ver comparando las figuras 5 y 11. Estas estructuras comparten una conformación rígida, en la cual los ABD se disponen a ambos lados del DHp formando una extensa superficie de interacción. Sin embargo, en todos los casos hay cambios en la orientación de los ABD, incluso entre las dos estructuras disponibles de HK853<sup>126</sup>, y los residuos involucrados no se encuentran muy conservados. La diferencia más importante entre DesKC-H188V y HK853 o KinB, es que la primera es la única que presenta la posición fosforilable hacia el interior del DHp, probablemente reflejando la naturaleza de la sustitución, pero también las discrepancias en la periodicidad del *coiled-coil* de HK853 o KinB (ambas pertenecientes a HSKA). La familia HSKA se caracteriza por ubicar a la histidina fosforilable en la posición **f** de la héptada y, por ende, completamente expuesta al solvente. Por el contrario, en la familia HSKA\_3, y como previamente fue mencionado, la histidina fosforilable puede ubicarse en dos posiciones alternativas dependiendo del estado funcional de la enzima: en posición **a**, cuando se genera la extensión *coiled-coil* N-terminal (fosfatasa) o como una inserción (posición **x** o *skip*), ubicando a este residuo más expuesto al solvente (quinasa y fosfotransferasa). Teniendo en cuenta las dos estructuras de HK853 (2C2A y 3DGE), que representarían dos estados funcionales diferentes, sólo es posible observar la formación del *coiled-coil* N-terminal en una de ellas (2C2A). Sin embargo, la posición de la histidina fosforilable no presenta ningún cambio significativo en su orientación, lo que parecería reflejar diferencias sustanciales en el mecanismo de regulación. La formación o ruptura del *coiled-coil* en HQs HSKA podría estar acompañado, al igual que en DesK, de la asociación específica entre el DHp y el ABD. Es importante resaltar que de todas estas estructuras, DesK es la única que no pertenece a un organismo hipertermófilo, por lo que seguramente tanto HK853 como KinB presentan adaptaciones a ambientes extremos. Así mismo, no se

puede descartar que la cristalización de estas enzimas termorresistentes a temperaturas sensiblemente más bajas que las óptimas de trabajo, introduzcan restricciones artefactuales a su plasticidad fisiológica. Probablemente, esto sea la causa de por qué HK853 en dos estados funcionales diferentes presenta a los dominios ABD asociados al DHp. Finalmente, considerando la reciente estructura del complejo entre ThkA y su RR, y a pesar de la muy baja resolución (3.8 Å), es interesante notar que las hélices  $\alpha 1$  del DHp presentan una curvatura muy pronunciada, similar a las observadas en las estructuras del estado fosfotransferasa de DesKC<sup>175</sup>, sugiriendo que estas características estructurales pueden ser elementos compartidos por distintas familias de HQ.

En general, es de interés generar nuevas herramientas que permitan estudiar proteínas alostéricas en estados funcionales definidos. En el caso de DesKC es posible suponer que esta proteína se encuentra en un equilibrio conformacional y la barrera energética para alternar entre los tres estados no es demasiado grande. El dominio sensor, mediante su interacción con la membrana plasmática o entre los segmentos de la proteína, aporta la energía necesaria para que el sistema actúe de forma precisa. DesKC no sólo es capaz de autofosforilarse sino que también cataliza la desfosforilación de DesR-P. En función de estas premisas fueron diseñadas nuevas construcciones que permiten “congelar” los estados quinasa y fosfatasa, utilizando la información estructural disponible y buscando confirmar la relevancia del *coiled-coil* N-terminal. Hasta el momento, los resultados son alentadores, ya que la proteína que presenta mutaciones estabilizantes del *coiled-coil* es capaz de formar un complejo muy estable con DesR. Las diferencias de afinidad de esta construcción con DesKC-H188V podrían sugerir que los cambios conformacionales inducidos por la inserción de residuo hidrofóbico en la posición de fosforilación, no logran mimetizar completamente el estado fosfatasa natural. Resolver esta estructura, así como el complejo con DesR serán de vital importancia para entender cuál es el mecanismo de defosforilación así como también establecer los determinantes de especificidad en esta interacción.

### 8.1.2. Reacción de autofosforilación en DesK

La conformación competente para catalizar la autofosforilación es una de las tantas estructuras que puede adoptar DesK en el estado quinasa, y claramente es un paso clave en la regulación funcional de las HQs. Mediante ensayos de docking entre los dominios DHp-ABD fue posible proponer un modelo estructural de la misma. Este fue validado experimentalmente realizando ensayos de entrecruzamiento específico. Estas evidencias permiten proponer la idea de que la reacción de autofosforilación depende de una asociación específica y asimétrica entre ambos dominios. Esta interacción está gobernada principalmente por regiones conservadas, y la formación de unos pocos contactos permitiría no solo la correcta orientación del ABD, asegurando acercar el ATP a la histidina fosforilable de una manera

productiva, sino que también evitaría la formación de un complejo muy estable, afectando la correcta transmisión de la señal. La única estructura cristalográfica que podría aportar información acerca de la conformación de autofosforilación para una HQ podría extraerse del complejo HK853-RR468<sup>126</sup>. En esta estructura la distancia entre el P $\gamma$  del ADP y la histidina fosforilable es de 11 Å, pero considerando una molécula de ATP y otro rotámero de la histidina, esta podría ser de aproximadamente 6Å, muy cercana a la distancia de reacción<sup>126</sup>. Si bien la comparación entre el modelo de autofosforilación obtenido para DesK y HK853 no es simple ya que esta última presenta un mecanismo de tipo *cis*, es interesante resaltar que en ambos casos la hélice  $\alpha 5$  del ABD es la región que contribuye más en la superficie de asociación (figura 31).

Un aspecto interesante a analizar es la capacidad de DesK de catalizar la autofosforilación en el estado quinasa, existiendo una cooperatividad negativa que evita la modificación del segundo sitio. Las posibles explicaciones estructurales fueron abordadas mediante ensayos de *docking*, que sugieren alteraciones en las superficies involucradas. En el estado fosfatasa, estos cambios no permitirían ubicar a la histidina a una distancia de reacción, mientras que en el estado fosfotransferasa ocurriría una pérdida de los contactos involucrados en esta asociación. Por otro lado, las dificultades experimentadas para obtener altos rendimientos de la forma covalentemente unida entre los dominios DHp y ABD, probablemente reflejando la heterogeneidad conformacional que presenta DesKC, no ha permitido hasta el momento realizar los estudios estructurales de este estado atrapado. Es de gran interés sin embargo, continuar esta línea para confirmar los contactos predichos, así como estudiar en mayor detalle los elementos que intervienen en la reacción de autofosforilación. Empleando nuevas construcciones, como CoilK, se podría trabajar con proteínas más estables y mediante el mismo diseño experimental de entrecruzamiento con cisteínas en las posiciones 192 y 334 capturar esta conformación. Una explicación alternativa de los bajos rendimientos de producto entrecruzado, podría involucrar una excesiva reactividad de las cisteínas introducidas por mutagénesis, que llevaría a una sobreoxidación temprana de las mismas. Este problema podría abordarse mediante la protección de las cisteínas utilizando reactivos como DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)) o similares, permitiendo realizar la reacción de entrecruzamiento de forma más controlada.

## 8.2. Caracterización estructural de DesR

La cristalización de DesR resultó una tarea muy difícil de lograr, al igual que para la mayoría de los RRs, existiendo relativamente pocas estructuras de proteínas enteras. Sin embargo, sí logramos obtener la estructura del dominio REC de DesR, incluso en dos empaquetamientos cristalinos diferentes.

El plegamiento de esta proteína es similar al canónico de los RRs,  $\alpha 5\beta 5$ , pero se distingue por la presencia de un extremo C-terminal que extiende la hoja  $\beta$  en una hebra, adoptando una forma  $\alpha 5\beta 6$  similar a 3C5Z. Hasta el momento faltan evidencias experimentales que apoyen la importancia de esta sexta hebra en la regulación funcional de DesR, pero los intentos por eliminar esta región fueron infructuosos, llevando a la proteína truncada a acumularse en cuerpos de inclusión, sugiriendo que esta región es fundamental para su correcto plegamiento. Las interacciones que involucran a los residuos  $\text{Leu}_{122}$ ,  $\text{Tyr}_{123}$  y la  $\text{Leu}_{127}$ , muy conservados en su naturaleza hidrofóbica, parecerían permitir un ajuste adecuado de este extremo C-terminal sobre la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$ . Ensayos funcionales que evalúen mutantes puntuales, como F88N o Y123S, diseñados para romper estas interacciones hidrofóbicas podrían brindar pistas de la importancia de esta región. Otra característica sobresaliente de las estructuras de DesR-N136 en dos formas cristalinas diferentes, es la presencia del mismo homodímero, sugiriendo fuertemente su relevancia. La superficie de interacción que involucra a las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$ , es principalmente hidrofóbica y presenta alta conservación de acuerdo al alineamiento múltiple con RRs que se hizo en este trabajo. Estas dos estructuras también comparten una segunda superficie de interacción, un poco más pequeña, involucrando al extremo C-terminal.

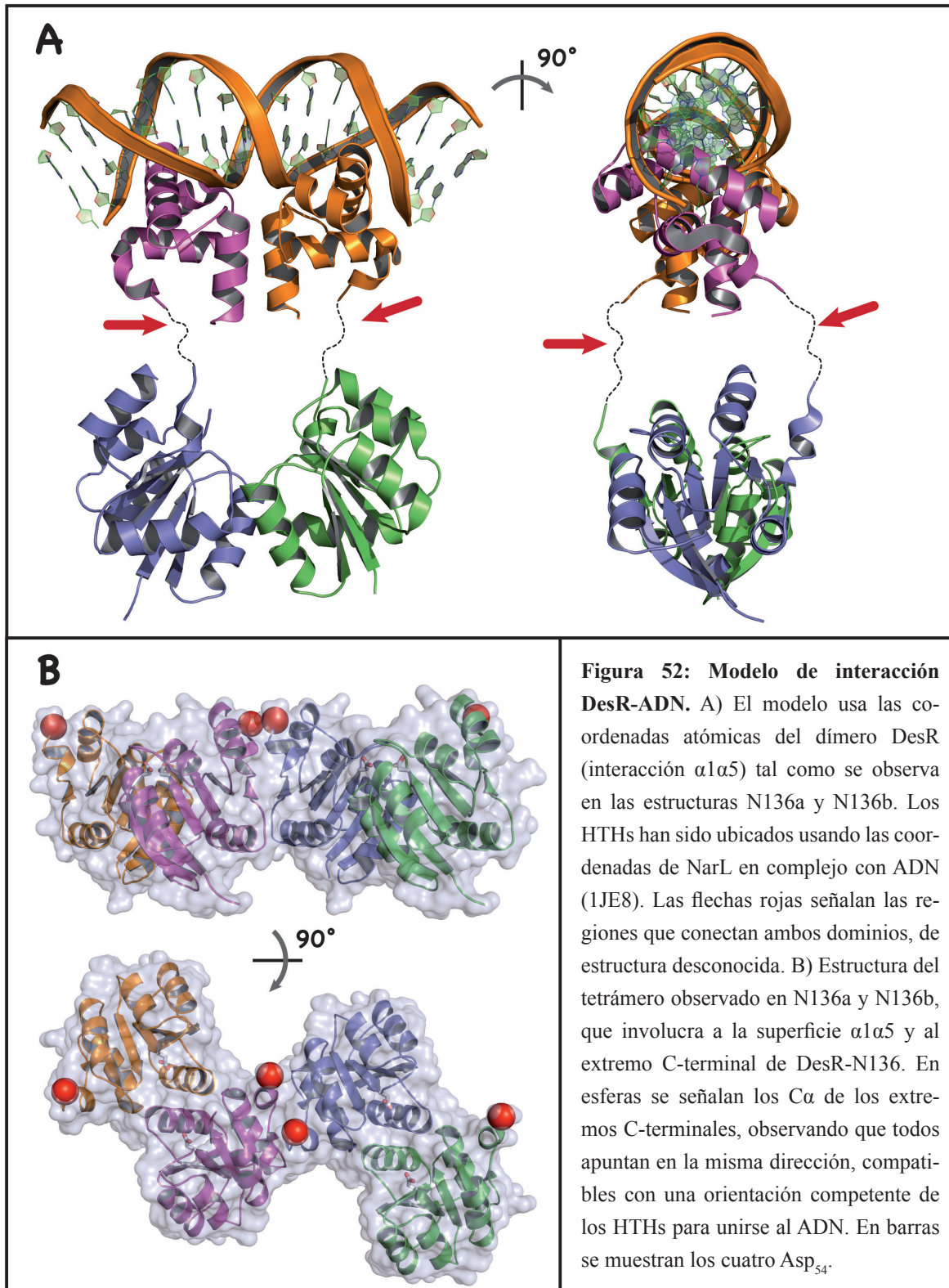
Las dos estructura de DesR-N136 parecen corresponder al estado activado del dominio REC. Distintos elementos apoyan esta hipótesis: 1) la orientación de la  $\text{Tyr}_{99}$ , 2) la presencia de picos positivos en los mapas de Fourier diferencia, a distancia de interacción del  $\text{Asp}_{54}$ , 3) la ubicación de la  $\text{Thr}_{81}$  también a distancia de contacto con estos mismos picos positivos, y 4) la necesidad de adicionar  $[\text{BeF}_3]^-$  para la formación de los cristales N136b. Estas evidencias no permiten ser concluyentes, la superficie de interacción  $\alpha 1\alpha 5$  ha sido asociada a una forma inactiva de PhoB<sup>157</sup>. La dificultad para determinar el estado funcional de esta estructura radica también en la complejidad de la información disponible. El análisis estructural realizado sobre proteínas tanto activas como inactivas, permitió detectar que en varios casos las estructuras publicadas presentan aspectos característicos de ambos estados funcionales, como por ejemplo, ArcA<sup>301</sup> y PhoP<sup>302</sup>. El dominio REC de PhoP fue cristalizado en ausencia y presencia de  $[\text{BeF}_3]^-$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , y a pesar de que presenta los cambios conformacionales en la  $\text{Tyr}_{98}$  y la  $\text{Thr}_{79}$ , en ambos casos se observa el mismo homodímero sobre la cara  $\alpha 4\beta 5\alpha 5$ . Por otro lado, NarL fue cristalizada en dos ambientes cristalinos diferentes, en ambos casos observándose la misma conformación cerrada del estado inactivo<sup>147,148</sup>. Sin embargo, en una de estas estructuras, la  $\text{Tyr}_{106}$  y la  $\text{Ser}_{87}$  muestran los movimientos característicos del estado activo.

Es importante de cualquier modo plantear como hipótesis alternativa o adicional, que algunas de las

características descritas más arriba podrían estar vinculadas a la pertenencia de DesR a un grupo particular de RRs. Por ejemplo, la Thr<sub>80</sub>, muy conservada e involucrada en el mecanismo alostérico, llamativamente se encuentra en DesR formando dos puentes de H con el O de la Phe<sub>82</sub> y con el NH1 de la Arg<sub>84</sub>, lo cual conduciría a una restricción especial en su movimiento. Asimismo, la Thr<sub>81</sub>, también muy conservada en el alineamiento realizado en este trabajo, se encuentra a una distancia de 2.9 Å del pico positivo en el mapa mFo-DFc (donde se ubicaría el fosfato) y a una distancia de 5.7 Å del Asp<sub>54</sub>. La mayoría de las estructuras de dominios REC resueltas hasta el momento presentan en cambio una Ala en vez de la Thr<sub>81</sub>. Una última característica particular de DesR refiere a la inmovilización de la Tyr<sub>99</sub> en un núcleo hidrofóbico, Esta Tyr se dispone entre la hebra β4 y la hélice α4, generando un puente de H con el O de la Ala<sub>83</sub> en una conformación similar a RRs en estado activado (como CheY-P, PhoP+[BeF<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, SpoA-P y FixJ-P), pero además forma una interacción CH•••π con la Phe<sub>88</sub>, que está en contacto con la Tyr<sub>123</sub>. Estas posiciones presentan una importante conservación por residuos hidrofóbicos, y junto con la Ile<sub>92</sub> y la Leu<sub>127</sub> constituyen un núcleo hidrofóbico importante. Estas características del extremo C-terminal también aparecen en la estructura 3CZ5, que si bien no se encuentra fosforilada, presenta un grupo sulfato a una distancia de 3.5 Å del aspártico fosforilable, a 2.7 Å de la Lys<sub>108</sub> y 2.8 Å de la Thr<sub>86</sub>. La Tyr<sub>105</sub> conservada también se ubica entre la hebra β4 y la hélice α4, formando un puente de H con el O de la His<sub>88</sub> (figura 42B), todas estas características del estado activado.

DesR-N136 se comporta como un monómero en solución al analizarla mediante cromatografía de exclusión molecular. La presencia de un homodímero en las dos estructuras resueltas podría representar una dimerización por activación. El análisis de las distintas formas de asociación de RRs y cómo se correlacionan las características estructurales y de secuencia de DesR, sugieren que DesR no es capaz de formar un homodímero canónico α4β5α5, así como tampoco dímeros α4β5. La ubicación del extremo C-terminal ocultando a la hebra β5, indica que sería necesario un rearrreglo estructural importante de esta región para permitir este tipo de interacciones, posibilidad que merece ser explorada experimentalmente. En función de la información disponible es posible entonces considerar dos escenarios: 1) las estructuras resueltas representan el estado inactivo de la proteína y la ubicación del extremo C-terminal impondría un impedimento estérico para la homodimerización empleando alguna región de la cara α4β5α5; ó 2) estas estructuras se encuentran en el estado activado, lo cual sería novedoso por las superficies implicadas en la oligomerización. En línea con esta segunda alternativa, los dominios HTH quedarían libres y orientados en la misma dirección, competentes para interactuar entre sí y con el ADN. El grupo del Dr. Diego de Mendoza previamente demostró que el promotor

*des* presenta cuatro sitios de unión a DesR, y esta interacción dependería de su tetramerización<sup>225</sup>. También reportaron recientemente que el dominio HTH, en ausencia del dominio REC, se comporta como dímero en solución<sup>303</sup>. En función de esta información es posible proponer un modelo de interacción DesR-ADN (figura 52A), así como también considerar la relevancia de un posible tetrámero tal cual lo sugieren las estructuras resueltas (figura 52B). En este último escenario, el movimiento de la Tyr<sub>99</sub> a su conformación en el estado inactivo, provocaría la ruptura de la interacción de la hebra



$\beta 6$  adicional, lo que debería compensarse mediante la interacción con otra región del HTH de forma de no exponer esta región hidrofóbica. Las estructuras de RRs completos en el estado inactivo<sup>146-152</sup> muestran una conformación cerrada, donde el HTH se encuentra interaccionando con el dominio REC, y de esta forma las superficies de dimerización y unión al ADN no se encuentran accesibles. Actualmente se está dedicando un gran esfuerzo en la optimización de cristales obtenidos con DesR entera, en presencia de  $[\text{BeF}_3]^-$  y  $\text{MgCl}_2$  (figura 12). Esta estructura seguramente permitirá entender el mecanismo de activación y probablemente ilumine sobre aspectos particulares de este subgrupo de RRs. Experimentos en curso permitirán paralelamente evaluar la importancia de la superficie de dimerización  $\alpha 1\alpha 5$ , mediante el estudio del doble mutante DesR\_M12A+A16R, que actuaría rompiendo esta interacción de acuerdo al análisis estructural.

### 8.3. Complejo DesK-DesR

Las interacciones proteína-proteína son eventos centrales en la transmisión fidedigna de las señales. En SDC se han resuelto las estructuras de unos pocos complejos, como HK853-RR468<sup>126</sup>, ThkA-TrrA<sup>175</sup>, el dominio HPt de CheA<sub>3</sub> y CheY<sub>6</sub><sup>144</sup> o Spo0B-Spo0F<sup>170,171</sup>. La caracterización biofísica de complejos HQ-RR no ha sido realizada con gran detalle, a excepción de algunos estudios que reportaron las afinidades de interacción entre CheA y CheY<sup>289</sup>, EnvZ-OmpR<sup>290,291</sup> y PhoQ-PhoP<sup>292</sup>. En el caso de CheA-CheY, el exhaustivo análisis por ITC reveló algunos detalles interesantes como la afinidad de interacción, la estequiometría 1:1 y una competencia directa entre CheY y CheB. Es importante recordar que CheA es una HQ de clase I, o sea presenta un dominio HPt con una única histidina fosforilable separado del dominio de dimerización. En el caso de EnvZ-OmpR y PhoQ-PhoP estos análisis fueron realizados mediante anisotropía de fluorescencia o resonancia plasmónica de superficie, respectivamente. Estas caracterizaciones muestran complejos con constantes de asociación del orden micromolar, que probablemente jueguen un rol clave en permitir el correcto flujo de las señales.

Aprovechando la información estructural y funcional disponible del sistema DesK-DesR, así como la disponibilidad de mutantes en estados particulares, es que se decidió realizar una caracterización biofísica de la interacción entre estas proteínas. Los ensayos por ITC entre el mutante DesKC-H188V y DesR revela un complejo con una estequiometría 1:1, con cierta asimetría entre los dos sitios de interacción. La constante con mayor afinidad es de  $7.7 \times 10^5 (\pm 1.2 \times 10^5) \text{ M}^{-1}$ , mientras que el segundo sitio presenta una  $K_a = 9.5 \times 10^4 (\pm 0.47 \times 10^5) \text{ M}^{-1}$ , reflejando una diferencia de casi un orden de magnitud. La comparación del mismo ensayo pero realizado con la proteína DesR-N136 también revela las mismas tendencias,  $K_{a1} = 4.9 \times 10^5 (\pm 0.47 \times 10^5) \text{ M}^{-1}$  y  $K_{a2} = 5.4 \times 10^4 (\pm 0.16 \times 10^5) \text{ M}^{-1}$ . Estos resultados sugieren

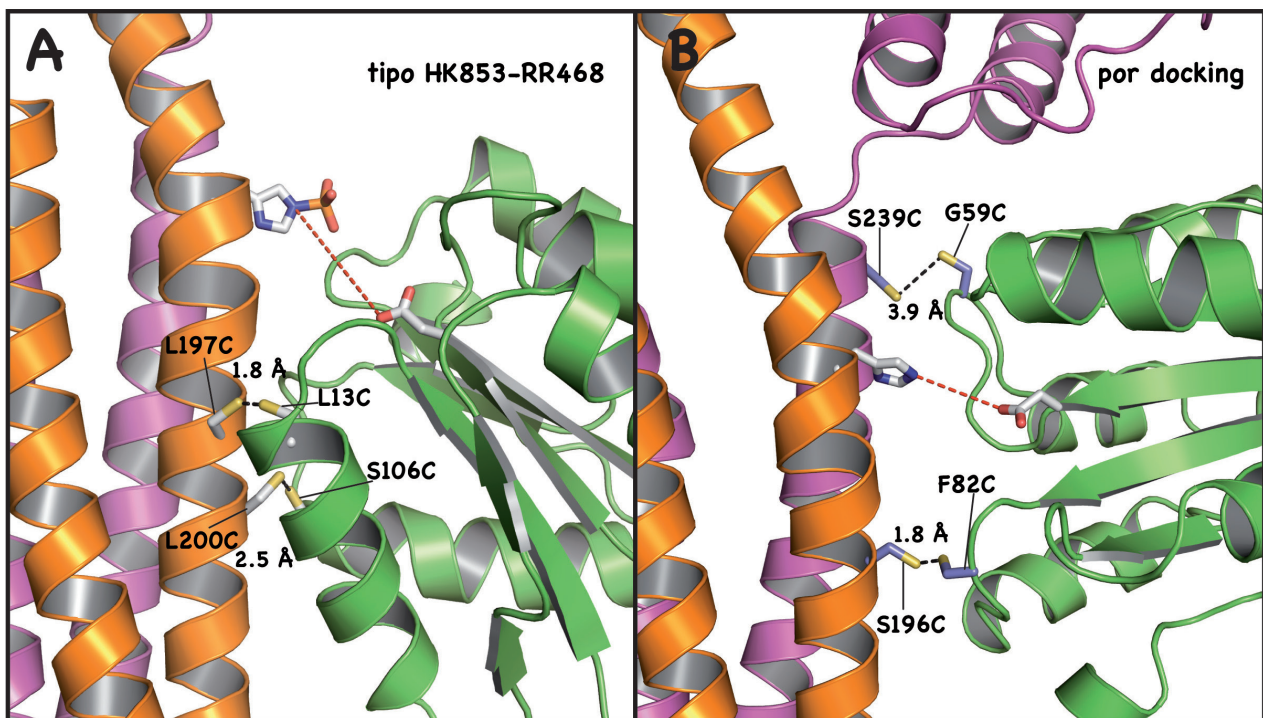
fuertemente que el dominio HTH no participa directamente en la interacción con DesK. La estequiometría acuerda con las estructuras de complejos HQ-RR disponibles. Sin embargo, la simetría interna del dímero DesKC-H188V, así como la exhibida por los complejos HQ-RR resueltos, no permiten explicar la diferencia entre los sitios revelada por ITC. Los ensayos de microcalorimetría realizados con el mutante CoilP3, así como también los intentos por separar el complejo CoilP3/DesR-N136 muestran una mayor afinidad en comparación con DesKC-H188V. Estas diferencias podrían sugerir que la sustitución H188V, si bien genera una proteína capaz de catalizar la actividad fosfatasa, no mimetizaría completamente los cambios estructurales que presenta DesK cuando la fluidez de la membrana es alta. Por esta razón, la generación de herramientas por ingeniería de proteínas que estabilicen los estados funcionales para su caracterización apuntan a contribuir elementos importantes que permitan entender cada una de las actividades en cuestión. Los experimentos con CoilP3 también sugieren una asimetría estructural. La estructura de DesKC-WKV muestra que los dominios ABD pueden presentar cierta flexibilidad, siendo posible especular que la unión de DesR induzca una asimetría entre los dos sitios presentes mediante la generación de contactos con estos dominios. La ubicación y orientación del Trp<sub>311</sub> y la Lys<sub>312</sub> en las estructuras de DesKC-H188V, así como los resultados obtenidos mediante ensayos de docking sugieren que estos residuos participan directamente en la interacción con DesR. Los experimentos de ITC realizados sobre el mutante DesKC-WKV apoyan estas hipótesis, presentando las  $K_d$  más pequeñas (9.1 y 42  $\mu\text{M}$ ), aunque las disminuciones en las constantes de disociación no son muy drásticas. La asimetría en DesKC-H188V o CoilP3 también podría ser el resultado de un fenómeno más complejo que involucre no solo interacciones secundarias con los ABD, sino también sutiles cambios en el DHP que no hayan sido descritos hasta el momento. Considerando la afinidad y estabilidad observadas en el complejo CoilP3/DesR-N136, y dado que ambas proteínas se encuentran defosforiladas, podría sugerirse funciones adicionales a la catálisis de la defosforilación. Es tentador especular con un secuestro de las moléculas del RR para evitar la interferencia con otras vías o para inducir una localización específica dentro de la célula. Recientemente, se demostró que la ubicación subcelular es un factor determinante en la regulación de la transmisión de la señal<sup>304,305</sup>, y podría constituir un mecanismo general de la regulación de los SDC. Estudios de microscopía confocal donde se evalúe la localización de DesK y DesR en distintos momentos funcionales de la vía podrían aportar evidencias a favor de estas hipótesis de regulación.

Por el contrario, la evaluación del mutante DesKC-H188E por ITC, si bien presenta una estequiometría 1:1, reveló que la asimetría en este caso es mucho más marcada, exhibiendo una relación entre las  $K_d$  de >50 veces. Estas características de la interacción entre el estado fosfotransferasa y DesR-N136

son consistentes con la asimetría de las estructuras correspondientes a este estado. Estos resultados revelan interesantes diferencias entre los complejos fosfatasa y fosfotransferasa. Para comprender las bases estructurales de estas diferencias se realizó un estudio comparativo entre los resultados obtenidos mediante docking proteína-proteína y la modelización del complejo de acuerdo a HK853-RR468. La interacción entre DesK-DesR de acuerdo al complejo HK853-RR468 permitiría predecir una asociación principalmente definida por contactos hidrofóbicos. Sin embargo, las diferencias en la ubicación de la histidina fosforilable entre ambas HQs, debido a las diferencias entre las familias HSKA e HSKA\_3, sugieren que la reacción de fosfotransferencia no sería posible a menos que existan cambios estructurales todavía no identificados. En el caso de la estructura DesKC-H188V, si bien la posición 188 se encuentra todavía más alejada, la presencia de una histidina no es esencial para la catalizar la desfosforilación<sup>131</sup> y la ubicación de la Gln<sub>193</sub> conservada podría ser consistente con la participación de este residuo en esta reacción<sup>135</sup>. Los ensayos de docking sugieren una forma diferente de interacción entre DesK y DesR, así como también proponen características particulares dependiendo del estado funcional de DesK. Así, existirían variaciones principalmente en las interacciones secundarias con los ABD: las superficies implicadas para los complejos E188a-N136a y V188a-N136a serían de 2100 Å<sup>2</sup> y 1600 Å<sup>2</sup>, respectivamente. ¿Por qué no se observaron diferencias más importantes en las afinidades de interacción en los ensayos de ITC? Es importante considerar que estos mutantes puntuales, en particular DesKC-H188E, se encuentran en un equilibrio conformacional y esto podría afectar las constantes de asociación determinadas. El complejo E188a-N136a determinado por docking permite posicionar a la histidina fosforilable a una distancia de reacción del Asp<sub>54</sub> de DesR (menor a 7 Å) consistente con las distancias observadas en los complejos HK853-RR468<sup>126</sup> y Spo0B-Spo0F<sup>171</sup>. Además, algunos contactos entre residuos poco conservados con regiones del dominio ABD podrían estar vinculados a la especificidad de la interacción, al igual que se ha observado para diversos complejos entre RRs y otras proteínas<sup>126,139</sup>. La comparación de las estructuras Spo0B-Spo0F, HK853-RR486, ThkA-TrrA y CheZ-CheY presentan la misma orientación relativa entre los dominios de dimerización y los RRs. Sin embargo, las interacciones adicionales son muy diferentes y probablemente contribuyan a conferir la especificidad. Esta información debería ser integrada a los trabajos realizados por Laub y colaboradores<sup>78,79</sup> para comprender realmente la importancia de estas regiones no conservadas.

La regulación por temperatura de la actividad fosfatasa para una variante de DesK truncada, carente de los dominios ABD, sugiere que los cambios conformacionales inducidos por la temperatura en el dominio DHp son importantes en los cambios de actividad fosfatasa<sup>231</sup>. En este sentido, si considera-

mos las regiones de interacción en las HQ para los complejos aislados por docking o por comparación con HK853-RR468, en el primer caso la interacción ocurre principalmente alrededor de la histidina fosforilable, mientras que en el segundo caso, la principal superficie de asociación involucra las regiones invariantes del DHp. En este sentido, el complejo capturado por docking podría explicar mejor los cambios de comportamiento disparados por rearrreglos conformacionales de este dominio. Para confirmar o refutar estas hipótesis estructurales se diseñaron distintos mutantes que permitan evaluar experimentalmente la existencia de los distintos complejos predichos. Además, colocando cisteínas en posiciones clave y analizando el entrecruzamiento específico entre DesKC-DesR en distintos estados, será posible discriminar entre los distintos complejos propuestos. Considerando el modelo que resulta de la superposición con HK853-RR468, se diseñaron los mutantes DesKC-L200C/DesR-N136-S106C y DesKC-L197C/DesR-N136-L13C (figura 53). Mientras que, de acuerdo a un complejo alternativo por *docking*, se están construyendo las siguientes mutaciones puntuales: DesKC-S239C/DesR-N136-G59C y DesKC-S196C/DesR-N136-F82C. Los ensayos de entrecruzamiento específico se realizarán sobre las proteínas DesKC-H188E o DesKC-H188V (o CoilP3), para comprobar que en ambos estados funcionales DesR se asocia a una misma región del DHp. Además, constituirán herramientas centrales que permitirán estabilizar la asociación y, por ende, aumentar las probabilidades de cristalización del complejo. Los experimentos correspondientes están actualmente en curso.



**Figura 53: Modelos estructurales del diseño de nuevos mutantes para validar las hipótesis de interacción DesK-DesR por entrecruzamiento específico.** A) Sustitución de residuos por cisteínas en posiciones específicas considerando la superposición con el complejo HK853-RR468. B) Mutaciones para la incorporación de cisteínas de acuerdo al modelo de complejo generado por *docking*.

En base a los posibles modelos estructurales de los complejos y la conformación de autofosforilación propuesta por *docking*, es posible proponer un mecanismo de regulación de la interacción entre DesK-DesR dependiente de la movilidad de los dominios ABD. Se puede predecir un solapamiento parcial de las superficies involucradas en la interacción DesK-DesR y DHP-ABD, que impondría restricciones estéricas para la interacción del RR o del dominio ABD propio en forma simultánea. En el estado quinasa los dominios ABD se encuentran libres para adoptar la conformación de autofosforilación, y dado que se encuentran ligados covalentemente al DHP, su concentración efectiva local es mucho mayor, explicando los resultados de cromatografía de exclusión molecular (figura 14). Para validar este modelo fueron generados los mutantes CoilP3-F346A y DesKC-H188E-F346A, con el objetivo de evaluar *in vitro* los cambios en la capacidad de interactuar con DesR en el estado quinasa y fosfotransferasa mediante ITC.

En conclusión, este trabajo presenta una caracterización estructural detallada de un SDC de *Bacillus subtilis* encargado de detectar cambios en la temperatura ambiente, capaz de regular la fluidez de la membrana en función a la exposición al frío. Los mecanismos de control de las múltiples actividades de las proteínas implicadas, juegan un papel fundamental en la biología bacteriana. Estas proteínas son capaces de regular el flujo de información, iniciando apropiadamente respuestas adaptativas frente a los cambios del entorno. La comprensión del funcionamiento de esta maquinaria a nivel molecular representa así un desafío de enorme interés y actualidad. Las dificultades para realizar un enfoque estructural sobre las HQs y los RRs tienen que ver con distintos obstáculos. Muchas HQs son proteínas de membrana, con la complejidad técnica que su estudio conlleva: expresión soluble en cantidades suficientes y estabilidad adecuada para encarar estudios estructurales. A esto debemos sumar la gran flexibilidad y heterogeneidad conformacional que estamos apenas comenzando a apreciar en proteínas de señalización. Hasta el momento no existen estructuras de HQs enteras y sólo se dispone de unas pocas que incluyan regiones funcionales completas (regiones citoplasmáticas con actividad catalítica). Este trabajo contribuye con varias estructuras de la región citoplasmática de DesK, las primeras correspondientes a un organismo mesófilo. En conjunto, la información adquirida permite proponer un modelo de regulación funcional que implica rearrreglos estructurales precisos que definen mecanismos alostéricos de modulación de las actividades. Pensamos que el conjunto de resultados de este trabajo se contiene y contribuye a la noción de ajuste seleccionado (*'selected fit'*) como modelo general de regulación alostérica <sup>295</sup>. En este escenario las proteínas deben entenderse como un conjunto poblacional (*'ensemble'*) en el que las distintas conformaciones se definen como

cada uno de los diferentes estados discretos, en equilibrio dinámico. Es el equilibrio y/o la cinética de interconversión lo que se ve modificado en presencia del efector (señal). Es así que conocer la estructura de los estados conformacionales que componen el conjunto poblacional nativo puede aportar pistas sobre las reglas básicas del control alostérico<sup>9</sup>. Por otro lado, nuestros estudios estructurales y biofísicos de la interacción DesK-DesR conducen a nuevas hipótesis de trabajo, sugiriendo diferencias sustanciales en la forma en que estas proteínas se interrelacionan de acuerdo al estado funcional en la que se encuentren. Entender estas interacciones puede aportar información valiosa para la generación de nuevos antibióticos, así como para el diseño racional de vías de señalización por ingeniería de proteínas, con una directa inserción en el campo de la Biología Sintética y de evidente utilidad en aplicaciones industriales.

## 9. REFERENCIAS

1. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* **12**, 88-118 (1965).
2. Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. & Filmer, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **5**, 365-385 (1966).
3. Frauenfelder, H., McMahon, B.H., Austin, R.H., Chu, K. & Groves, J.T. The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2370-2374 (2001).
4. Pargellis, C., *et al.* Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* **9**, 268-272 (2002).
5. Volkman, B.F., Lipson, D., Wemmer, D.E. & Kern, D. Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science* **291**, 2429-2433 (2001).
6. Gunasekaran, K., Ma, B. & Nussinov, R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* **57**, 433-443 (2004).
7. Hindie, V., *et al.* Structure and allosteric effects of low-molecular-weight activators on the protein kinase PDK1. *Nat Chem Biol* **5**, 758-764 (2009).
8. Lange, O.F., *et al.* Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution. *Science* **320**, 1471-1475 (2008).
9. Bai, F., *et al.* Conformational spread as a mechanism for cooperativity in the bacterial flagellar switch. *Science* **327**, 685-689 (2010).
10. Weikl, T.R. & von Deuster, C. Selected-fit versus induced-fit protein binding: kinetic differences and mutational analysis. *Proteins* **75**, 104-110 (2009).
11. Wu, Z., Elgart, V., Qian, H. & Xing, J. Amplification and detection of single-molecule conformational fluctuation through a protein interaction network with bimodal distributions. *J Phys Chem B* **113**, 12375-12381 (2009).
12. Schrank, T.P., Bolen, D.W. & Hilser, V.J. Rational modulation of conformational fluctuations in adenylate kinase reveals a local unfolding mechanism for allostery and functional adaptation in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16984-16989 (2009).
13. Tsai, C.J., del Sol, A. & Nussinov, R. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J Mol Biol* **378**, 1-11 (2008).
14. Ulrich, L.E., Koonin, E.V. & Zhulin, I.B. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* **13**, 52-56 (2005).
15. Jacob, F. & Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318-356 (1961).
16. Lewis, M., *et al.* Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA

- and inducer. *Science* **271**, 1247-1254 (1996).
17. Bell, C.E. & Lewis, M. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nat Struct Biol* **7**, 209-214 (2000).
  18. Gao, R. & Stock, A.M. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**, 133-154 (2009).
  19. Wuichet, K., Cantwell, B.J. & Zhulin, I.B. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* **13**, 219-225 (2010).
  20. Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215 (2000).
  21. Krell, T., *et al.* Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* **64**, 539-559 (2010).
  22. Mascher, T., Helmann, J.D. & Udden, G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 910-938 (2006).
  23. Bader, M.W., *et al.* Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**, 461-472 (2005).
  24. Carnes, E.C., *et al.* Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* **6**, 41-45 (2010).
  25. Moon, K. & Gottesman, S. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **74**, 1314-1330 (2009).
  26. Shin, D., Lee, E.J., Huang, H. & Groisman, E.A. A positive feedback loop promotes transcription surge that jump-starts *Salmonella* virulence circuit. *Science* **314**, 1607-1609 (2006).
  27. Miller, S.I., Kukral, A.M. & Mekalanos, J.J. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5054-5058 (1989).
  28. Fields, P.I., Groisman, E.A. & Heffron, F. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**, 1059-1062 (1989).
  29. Gooderham, W.J. & Hancock, R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 279-294 (2009).
  30. Rasko, D.A., *et al.* Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* **321**, 1078-1080 (2008).
  31. Goodman, A.L., *et al.* Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* **23**, 249-259 (2009).
  32. Gotoh, Y., *et al.* Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **13**, 232-239 (2010).
  33. Nishino, K., Latifi, T. & Groisman, E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug

- efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**, 126-141 (2006).
34. Fabret, C. & Hoch, J.A. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol* **180**, 6375-6383 (1998).
  35. Martin, P.K., Li, T., Sun, D., Biek, D.P. & Schmid, M.B. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**, 3666-3673 (1999).
  36. Sun, J., Zheng, L., Landwehr, C., Yang, J. & Ji, Y. Identification of a novel essential two-component signal transduction system, YhcSR, in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**, 7876-7880 (2005).
  37. Skerker, J.M., Prasol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G. & Laub, M.T. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**, e334 (2005).
  38. Szurmant, H., Nelson, K., Kim, E.J., Perego, M. & Hoch, J.A. YchH regulates the activity of the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**, 5419-5426 (2005).
  39. Voet-van-Vormizeele, J. & Groth, G. Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. *Mol Plant* **1**, 380-387 (2008).
  40. Neiditch, M.B., *et al.* Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* **126**, 1095-1108 (2006).
  41. Laub, M.T. & Goulian, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**, 121-145 (2007).
  42. Thomas, S.A., Brewster, J.A. & Bourret, R.B. Two variable active site residues modulate response regulator phosphoryl group stability. *Mol Microbiol* **69**, 453-465 (2008).
  43. Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B. & Silhavy, T.J. Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev* **3**, 1725-1734 (1989).
  44. Russo, F.D. & Silhavy, T.J. The essential tension: opposed reactions in bacterial two-component regulatory systems. *Trends Microbiol* **1**, 306-310 (1993).
  45. Silversmith, R.E. Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **13**, 177-183 (2010).
  46. Wolfe, A.J. Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **13**, 204-209 (2010).
  47. Finn, R.D., *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**, D211-222.
  48. Barakat, M., Ortet, P. & Whitworth, D.E. P2CS: a database of prokaryotic two-component systems. *Nucleic Acids Res* **39**, D771-776 (2011).

49. Wolanin, P.M., Thomason, P.A. & Stock, J.B. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3013 (2002).
50. Aravind, L. & Ponting, C.P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**, 111-116 (1999).
51. Schuster-Bockler, B., Schultz, J. & Rahmann, S. HMM Logos for visualization of protein families. *BMC Bioinformatics* **5**, 7 (2004).
52. Galperin, M.Y. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13**, 150-159 (2010).
53. Cai, S.J. & Inouye, M. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in Escherichia coli. *J Biol Chem* **277**, 24155-24161 (2002).
54. Cai, S.J. & Inouye, M. Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of Escherichia coli histidine kinase (EnvZ). *J Mol Biol* **329**, 495-503 (2003).
55. Cai, S.J., Khorchid, A., Ikura, M. & Inouye, M. Probing catalytically essential domain orientation in histidine kinase EnvZ by targeted disulfide crosslinking. *J Mol Biol* **328**, 409-418 (2003).
56. Dutta, R. & Inouye, M. Reverse phosphotransfer from OmpR to EnvZ in a kinase-/phosphatase+ mutant of EnvZ (EnvZ.N347D), a bifunctional signal transducer of Escherichia coli. *J Biol Chem* **271**, 1424-1429 (1996).
57. Dutta, R., Yoshida, T. & Inouye, M. The critical role of the conserved Thr247 residue in the functioning of the osmosensor EnvZ, a histidine Kinase/Phosphatase, in Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**, 38645-38653 (2000).
58. Forst, S.A. & Roberts, D.L. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol* **145**, 363-373 (1994).
59. Hsing, W., Russo, F.D., Bernd, K.K. & Silhavy, T.J. Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ. *J Bacteriol* **180**, 4538-4546 (1998).
60. Khorchid, A., Inouye, M. & Ikura, M. Structural characterization of Escherichia coli sensor histidine kinase EnvZ: the periplasmic C-terminal core domain is critical for homodimerization. *Biochem J* **385**, 255-264 (2005).
61. Park, H. & Inouye, M. Mutational analysis of the linker region of EnvZ, an osmosensor in Escherichia coli. *J Bacteriol* **179**, 4382-4390 (1997).
62. Qin, L., Cai, S., Zhu, Y. & Inouye, M. Cysteine-scanning analysis of the dimerization domain of EnvZ, an osmosensing histidine kinase. *J Bacteriol* **185**, 3429-3435 (2003).
63. Tanaka, T., *et al.* NMR structure of the histidine kinase domain of the E. coli osmosensor EnvZ. *Nature* **396**, 88-92 (1998).

64. Tomomori, C., *et al.* Solution structure of the homodimeric core domain of Escherichia coli histidine kinase EnvZ. *Nat Struct Biol* **6**, 729-734 (1999).
65. Zhu, Y. & Inouye, M. The role of the G2 box, a conserved motif in the histidine kinase superfamily, in modulating the function of EnvZ. *Mol Microbiol* **45**, 653-663 (2002).
66. Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. & Inouye, M. Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7808-7813 (2000).
67. Piggot, P.J. & Hilbert, D.W. Sporulation of Bacillus subtilis. *Curr Opin Microbiol* **7**, 579-586 (2004).
68. Varughese, K.I., Madhusudan, Zhou, X.Z., Whiteley, J.M. & Hoch, J.A. Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase. *Mol Cell* **2**, 485-493 (1998).
69. Madhusudan, *et al.* Crystal structure of a phosphatase-resistant mutant of sporulation response regulator Spo0F from Bacillus subtilis. *Structure* **4**, 679-690 (1996).
70. Hazelbauer, G.L. & Lai, W.C. Bacterial chemoreceptors: providing enhanced features to two-component signaling. *Curr Opin Microbiol* **13**, 124-132 (2010).
71. Goulian, M. Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr Opin Microbiol* **13**, 184-189 (2010).
72. Tu, K.C., Long, T., Svenningsen, S.L., Wingreen, N.S. & Bassler, B.L. Negative feedback loops involving small regulatory RNAs precisely control the Vibrio harveyi quorum-sensing response. *Mol Cell* **37**, 567-579 (2010).
73. Lippa, A.M. & Goulian, M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet* **5**, e1000788 (2009).
74. Miyashiro, T. & Goulian, M. High stimulus unmasks positive feedback in an autoregulated bacterial signaling circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17457-17462 (2008).
75. Siryaporn, A. & Goulian, M. Cross-talk suppression between the CpxA-CpxR and EnvZ-OmpR two-component systems in E. coli. *Mol Microbiol* **70**, 494-506 (2008).
76. Kato, A. & Groisman, E.A. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev* **18**, 2302-2313 (2004).
77. Eguchi, Y., Ishii, E., Hata, K. & Utsumi, R. Regulation of acid resistance by connectors of two-component signal transduction systems in Escherichia coli. *J Bacteriol* **193**(5), 1222-1228 (2011).
78. Capra, E.J., *et al.* Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet* **6**(11), e1001220 (2010).
79. Skerker, J.M., *et al.* Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems.

- Cell* **133**, 1043-1054 (2008).
80. Stock, A.M., Mottonen, J.M., Stock, J.B. & Schutt, C.E. Three-dimensional structure of CheY, the response regulator of bacterial chemotaxis. *Nature* **337**, 745-749 (1989).
  81. Moy, F.J., *et al.* Assignments, secondary structure, global fold, and dynamics of chemotaxis Y protein using three- and four-dimensional heteronuclear (<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N) NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 10731-10742 (1994).
  82. Santoro, J., *et al.* Three-dimensional structure of chemotactic Che Y protein in aqueous solution by nuclear magnetic resonance methods. *J Mol Biol* **247**, 717-725 (1995).
  83. Crick, F.H.C. The packing of  $\alpha$ -helices: simple coiled-coils *Acta Crystallogr* **6**, 689-697 (1953).
  84. Grigoryan, G. & Keating, A.E. Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 477-483 (2008).
  85. Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R. & Simon, M.I. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131-141 (1999).
  86. Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W.A. & Waldburger, C.D. Structural and mutational analysis of the PhoQ histidine kinase catalytic domain. Insight into the reaction mechanism. *J Biol Chem* **276**, 41182-41190 (2001).
  87. Bilwes, A.M., Quezada, C.M., Croal, L.R., Crane, B.R. & Simon, M.I. Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nat Struct Biol* **8**, 353-360 (2001).
  88. Song, Y., Peisach, D., Pioszak, A.A., Xu, Z. & Ninfa, A.J. Crystal structure of the C-terminal domain of the two-component system transmitter protein nitrogen regulator II (NRII; NtrB), regulator of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **43**, 6670-6678 (2004).
  89. Marina, A., Waldburger, C.D. & Hendrickson, W.A. Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J* **24**, 4247-4259 (2005).
  90. Hawkins, R.J. & McLeish, T.C. Dynamic allostery of protein alpha helical coiled-coils. *J R Soc Interface* **3**, 125-138 (2006).
  91. Bick, M.J., *et al.* How to switch off a histidine kinase: crystal structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J Mol Biol* **386**, 163-177 (2009).
  92. Falke, J.J. & Koshland, D.E., Jr. Global flexibility in a sensory receptor: a site-directed cross-linking approach. *Science* **237**, 1596-1600 (1987).
  93. Chervitz, S.A. & Falke, J.J. Molecular mechanism of transmembrane signaling by the aspartate receptor: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2545-2550 (1996).
  94. Danielson, M.A., Bass, R.B. & Falke, J.J. Cysteine and disulfide scanning reveals a regulatory alpha-helix in the cytoplasmic domain of the aspartate receptor. *J Biol Chem* **272**, 32878-32888 (1997).

95. Butler, S.L. & Falke, J.J. Cysteine and disulfide scanning reveals two amphiphilic helices in the linker region of the aspartate chemoreceptor. *Biochemistry* **37**, 10746-10756 (1998).
96. Bass, R.B. & Falke, J.J. Detection of a conserved alpha-helix in the kinase-docking region of the aspartate receptor by cysteine and disulfide scanning. *J Biol Chem* **273**, 25006-25014 (1998).
97. Bass, R.B., Coleman, M.D. & Falke, J.J. Signaling domain of the aspartate receptor is a helical hairpin with a localized kinase docking surface: cysteine and disulfide scanning studies. *Biochemistry* **38**, 9317-9327 (1999).
98. Bass, R.B. & Falke, J.J. The aspartate receptor cytoplasmic domain: in situ chemical analysis of structure, mechanism and dynamics. *Structure* **7**, 829-840 (1999).
99. Winston, S.E., Mehan, R. & Falke, J.J. Evidence that the adaptation region of the aspartate receptor is a dynamic four-helix bundle: cysteine and disulfide scanning studies. *Biochemistry* **44**, 12655-12666 (2005).
100. Swain, K.E. & Falke, J.J. Structure of the conserved HAMP domain in an intact, membrane-bound chemoreceptor: a disulfide mapping study. *Biochemistry* **46**, 13684-13695 (2007).
101. Gloor, S.L. & Falke, J.J. Thermal domain motions of CheA kinase in solution: Disulfide trapping reveals the motional constraints leading to trans-autophosphorylation. *Biochemistry* **48**, 3631-3644 (2009).
102. Pollard, A.M., Bilwes, A.M. & Crane, B.R. The structure of a soluble chemoreceptor suggests a mechanism for propagating conformational signals. *Biochemistry* **48**, 1936-1944 (2009).
103. Kim, K.K., Yokota, H. & Kim, S.H. Four-helical-bundle structure of the cytoplasmic domain of a serine chemotaxis receptor. *Nature* **400**, 787-792 (1999).
104. Falke, J.J. & Erbse, A.H. The piston rises again. *Structure* **17**, 1149-1151 (2009).
105. Cheung, J., Bingman, C.A., Reyngold, M., Hendrickson, W.A. & Waldburger, C.D. Crystal structure of a functional dimer of the PhoQ sensor domain. *J Biol Chem* **283**, 13762-13770 (2008).
106. Cheung, J. & Hendrickson, W.A. Structural analysis of ligand stimulation of the histidine kinase NarX. *Structure* **17**, 190-201 (2009).
107. Moore, J.O. & Hendrickson, W.A. Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS. *Structure* **17**, 1195-1204 (2009).
108. Cheung, J. & Hendrickson, W.A. Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *J Biol Chem* **283**, 30256-30265 (2008).
109. Zhang, Z. & Hendrickson, W.A. Structural characterization of the predominant family of histidine kinase sensor domains. *J Mol Biol* **400**, 335-353 (2010).
110. Pappalardo, L., *et al.* The NMR structure of the sensory domain of the membranous two-

- component fumarate sensor (histidine protein kinase) DcuS of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 39185-39188 (2003).
111. Reinelt, S., Hofmann, E., Gerharz, T., Bott, M. & Madden, D.R. The structure of the periplasmic ligand-binding domain of the sensor kinase CitA reveals the first extracellular PAS domain. *J Biol Chem* **278**, 39189-39196 (2003).
  112. Neiditch, M.B., Federle, M.J., Miller, S.T., Bassler, B.L. & Hughson, F.M. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell* **18**, 507-518 (2005).
  113. Goldberg, S.D., Soto, C.S., Waldburger, C.D. & Degrado, W.F. Determination of the physiological dimer interface of the PhoQ sensor domain. *J Mol Biol* **379**, 656-665 (2008).
  114. Cho, U.S., *et al.* Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J Mol Biol* **356**, 1193-1206 (2006).
  115. Choi, E., Groisman, E.A. & Shin, D. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *J Bacteriol* **191**, 7174-7181 (2009).
  116. Cheung, J. & Hendrickson, W.A. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr Opin Microbiol* **13**, 116-123 (2010).
  117. Lee, A.I., Delgado, A. & Gunsalus, R.P. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *J Bacteriol* **181**, 5309-5316 (1999).
  118. Gordeliy, V.I., *et al.* Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* **419**, 484-487 (2002).
  119. Moukhametzianov, R., *et al.* Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* **440**, 115-119 (2006).
  120. Gong, W., *et al.* Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15177-15182 (1998).
  121. Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A. & Crosson, S. A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18241-18246 (2007).
  122. Yang, Y. & Inouye, M. Intermolecular complementation between two defective mutant signal-transducing receptors of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11057-11061 (1991).
  123. Ninfa, E.G., Atkinson, M.R., Kamberov, E.S. & Ninfa, A.J. Mechanism of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. *J Bacteriol* **175**, 7024-7032 (1993).
  124. Swanson, R.V., Bourret, R.B. & Simon, M.I. Intermolecular complementation of the kinase activity of CheA. *Mol Microbiol* **8**, 435-441 (1993).
  125. George Cisar, E.A., Geisinger, E., Muir, T.W. & Novick, R.P. Symmetric signalling within as-

- ymmetric dimers of the *Staphylococcus aureus* receptor histidine kinase AgrC. *Mol Microbiol* **74**, 44-57 (2009).
126. Casino, P., Rubio, V. & Marina, A. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**, 325-336 (2009).
  127. Pena-Sandoval, G.R. & Georgellis, D. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* **192**, 1735-1739 (2010).
  128. Park, H., Saha, S.K. & Inouye, M. Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6728-6732 (1998).
  129. Jiang, P., Peliska, J.A. & Ninfa, A.J. Asymmetry in the autophosphorylation of the two-component regulatory system transmitter protein nitrogen regulator II of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **39**, 5057-5065 (2000).
  130. Kenney, L.J. How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr Opin Microbiol* **13**, 168-176 (2010).
  131. Albanesi, D., Mansilla, M.C. & de Mendoza, D. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. *J Bacteriol* **186**, 2655-2663 (2004).
  132. Kamberov, E.S., Atkinson, M.R., Chandran, P. & Ninfa, A.J. Effect of mutations in *Escherichia coli* *glnL* (*ntrB*), encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J Biol Chem* **269**, 28294-28299 (1994).
  133. Hsing, W. & Silhavy, T.J. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 3729-3735 (1997).
  134. Skarphol, K., Waukau, J. & Forst, S.A. Role of His243 in the phosphatase activity of EnvZ in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 1413-1416 (1997).
  135. Huynh, T.N., Noriega, C.E. & Stewart, V. Conserved mechanism for sensor phosphatase control of two-component signaling revealed in the nitrate sensor NarX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21140-21145 (2010).
  136. Groban, E.S., Clarke, E.J., Salis, H.M., Miller, S.M. & Voigt, C.A. Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol* **390**, 380-393 (2009).
  137. Pazy, Y., *et al.* Identical phosphatase mechanisms achieved through distinct modes of binding phosphoprotein substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1924-1929 (2010).
  138. Silversmith, R.E., Levin, M.D., Schilling, E. & Bourret, R.B. Kinetic characterization of catalysis by the chemotaxis phosphatase CheZ. Modulation of activity by the phosphorylated CheY substrate. *J Biol Chem* **283**, 756-765 (2008).
  139. Zhao, R., Collins, E.J., Bourret, R.B. & Silversmith, R.E. Structure and catalytic mechanism of the *E. coli* chemotaxis phosphatase CheZ. *Nat Struct Biol* **9**, 570-575 (2002).

140. Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D.A. & Neiditch, M.B. Structural basis of response regulator dephosphorylation by rap phosphatases. *PLoS Biol* **9**, e1000589 (2011).
141. Szurmant, H., *et al.* Co-evolving motions at protein-protein interfaces of two-component signaling systems identified by covariance analysis. *Biochemistry* **47**, 7782-7784 (2008).
142. Weigt, M., White, R.A., Szurmant, H., Hoch, J.A. & Hwa, T. Identification of direct residue contacts in protein-protein interaction by message passing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 67-72 (2009).
143. White, R.A., Szurmant, H., Hoch, J.A. & Hwa, T. Features of protein-protein interactions in two-component signaling deduced from genomic libraries. *Methods Enzymol* **422**, 75-101 (2007).
144. Bell, C.H., Porter, S.L., Strawson, A., Stuart, D.I. & Armitage, J.P. Using structural information to change the phosphotransfer specificity of a two-component chemotaxis signalling complex. *PLoS Biol* **8**, e1000306 (2010).
145. Bourret, R.B. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol* **13**, 142-149 (2010).
146. Wisedchaisri, G., Wu, M., Sherman, D.R. & Hol, W.G. Crystal structures of the response regulator DosR from *Mycobacterium tuberculosis* suggest a helix rearrangement mechanism for phosphorylation activation. *J Mol Biol* **378**, 227-242 (2008).
147. Baikalov, I., *et al.* NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry* **37**, 3665-3676 (1998).
148. Baikalov, I., *et al.* Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**, 11053-11061 (1996).
149. Robinson, V.L., Wu, T. & Stock, A.M. Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *J Bacteriol* **185**, 4186-4194 (2003).
150. Buckler, D.R., Zhou, Y. & Stock, A.M. Evidence of intradomain and interdomain flexibility in an OmpR/PhoB homolog from *Thermotoga maritima*. *Structure* **10**, 153-164 (2002).
151. Nowak, E., Panjikar, S., Konarev, P., Svergun, D.I. & Tucker, P.A. The structural basis of signal transduction for the response regulator PrrA from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **281**, 9659-9666 (2006).
152. Friedland, N., *et al.* Domain orientation in the inactive response regulator *Mycobacterium tuberculosis* MtrA provides a barrier to activation. *Biochemistry* **46**, 6733-6743 (2007).
153. King-Scott, J., *et al.* The structure of a full-length response regulator from *Mycobacterium tuberculosis* in a stabilized three-dimensional domain-swapped, activated state. *J Biol Chem* **282**, 37717-37729 (2007).
154. Milani, M., *et al.* An active-like structure in the unphosphorylated StyR response regulator suggests a phosphorylation-dependent allosteric activation mechanism. *Structure* **13**, 1289-

- 1297 (2005).
155. Yan, D., *et al.* Beryllofluoride mimics phosphorylation of NtrC and other bacterial response regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14789-14794 (1999).
  156. Gao, R. & Stock, A.M. Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Curr Opin Microbiol* **13**, 160-167 (2010).
  157. Mack, T.R., Gao, R. & Stock, A.M. Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB. *J Mol Biol* **389**, 349-364 (2009).
  158. Eldridge, A.M., Kang, H.S., Johnson, E., Gunsalus, R. & Dahlquist, F.W. Effect of phosphorylation on the interdomain interaction of the response regulator, NarL. *Biochemistry* **41**, 15173-15180 (2002).
  159. Maris, A.E., *et al.* Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat Struct Biol* **9**, 771-778 (2002).
  160. Maris, A.E., *et al.* Primary and secondary modes of DNA recognition by the NarL two-component response regulator. *Biochemistry* **44**, 14538-14552 (2005).
  161. Barbieri, C.M., Mack, T.R., Robinson, V.L., Miller, M.T. & Stock, A.M. Regulation of response regulator autophosphorylation through interdomain contacts. *J Biol Chem* **285**, 32325-32335 (2010).
  162. Lee, S.Y., *et al.* Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nat Struct Biol* **8**, 52-56 (2001).
  163. Kern, D., *et al.* Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature* **402**, 894-898 (1999).
  164. Gardino, A.K., *et al.* The NMR solution structure of BeF<sub>3</sub>(-)-activated Spo0F reveals the conformational switch in a phosphorelay system. *J Mol Biol* **331**, 245-254 (2003).
  165. Gardino, A.K. & Kern, D. Functional dynamics of response regulators using NMR relaxation techniques. *Methods Enzymol* **423**, 149-165 (2007).
  166. Gardino, A.K., *et al.* Transient non-native hydrogen bonds promote activation of a signaling protein. *Cell* **139**, 1109-1118 (2009).
  167. Pazy, Y., *et al.* Matching biochemical reaction kinetics to the timescales of life: structural determinants that influence the autodephosphorylation rate of response regulator proteins. *J Mol Biol* **392**, 1205-1220 (2009).
  168. Madhusudan, M., *et al.* A response regulatory protein with the site of phosphorylation blocked by an arginine interaction: crystal structure of Spo0F from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **36**, 12739-12745 (1997).
  169. Feher, V.A., *et al.* High-resolution NMR structure and backbone dynamics of the *Bacillus subtilis* response regulator, Spo0F: implications for phosphorylation and molecular recognition. *Biochemistry* **36**, 10015-10025 (1997).

170. Zapf, J., Sen, U., Madhusudan, Hoch, J.A. & Varughese, K.I. A transient interaction between two phosphorelay proteins trapped in a crystal lattice reveals the mechanism of molecular recognition and phosphotransfer in signal transduction. *Structure* **8**, 851-862 (2000).
171. Varughese, K.I., Tsigelny, I. & Zhao, H. The crystal structure of beryllofluoride Spo0F in complex with the phosphotransferase Spo0B represents a phosphotransfer pretransition state. *J Bacteriol* **188**, 4970-4977 (2006).
172. Xu, Q., Porter, S.W. & West, A.H. The yeast YPD1/SLN1 complex: insights into molecular recognition in two-component signaling systems. *Structure* **11**, 1569-1581 (2003).
173. Zhao, X., Copeland, D.M., Soares, A.S. & West, A.H. Crystal structure of a complex between the phosphorelay protein YPD1 and the response regulator domain of SLN1 bound to a phosphoryl analog. *J Mol Biol* **375**, 1141-1151 (2008).
174. Casino, P., Fernandez-Alvarez, A., Alfonso, C., Rivas, G. & Marina, A. Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta* **1774**, 603-609 (2007).
175. Yamada, S., *et al.* Structure of PAS-linked histidine kinase and the response regulator complex. *Structure* **17**, 1333-1344 (2009).
176. Matthews, E.E., Zoonens, M. & Engelman, D.M. Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell* **127**, 447-450 (2006).
177. Hendrickson, W.A. Transduction of biochemical signals across cell membranes. *Q Rev Biophys* **38**, 321-330 (2005).
178. Rasmussen, S.G., *et al.* Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **469**, 175-180 (2011).
179. Ward, S.M., Delgado, A., Gunsalus, R.P. & Manson, M.D. A NarX-Tar chimera mediates repellent chemotaxis to nitrate and nitrite. *Mol Microbiol* **44**, 709-719 (2002).
180. Xu, Q., Black, W.P., Ward, S.M. & Yang, Z. Nitrate-dependent activation of the Dif signaling pathway of *Myxococcus xanthus* mediated by a NarX-DifA interspecies chimera. *J Bacteriol* **187**, 6410-6418 (2005).
181. Xu, Q., Black, W.P., Mauriello, E.M., Zusman, D.R. & Yang, Z. Chemotaxis mediated by NarX-FrzCD chimeras and nonadapting repellent responses in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol* **66**, 1370-1381 (2007).
182. Baumgartner, J.W., *et al.* Transmembrane signalling by a hybrid protein: communication from the domain of chemoreceptor Trg that recognizes sugar-binding proteins to the kinase/phosphatase domain of osmosensor EnvZ. *J Bacteriol* **176**, 1157-1163 (1994).
183. Trivedi, V.D. & Spudich, J.L. Photostimulation of a sensory rhodopsin II/HtrII/Tsr fusion chimera activates CheA-autophosphorylation and CheY-phosphotransfer in vitro. *Biochemistry* **42**, 13887-13892 (2003).

184. Zhu, Y. & Inouye, M. Analysis of the role of the EnvZ linker region in signal transduction using a chimeric Tar/EnvZ receptor protein, Tez1. *J Biol Chem* **278**, 22812-22819 (2003).
185. Moglich, A., Ayers, R.A. & Moffat, K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol* **385**, 1433-1444 (2009).
186. Yoshida, T., Phadtare, S. & Inouye, M. The design and development of Tar-EnvZ chimeric receptors. *Methods Enzymol* **423**, 166-183 (2007).
187. Gao, R. & Lynn, D.G. Integration of rotation and piston motions in coiled-coil signal transduction. *J Bacteriol* **189**, 6048-6056 (2007).
188. Appleman, J.A., Chen, L.L. & Stewart, V. Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *J Bacteriol* **185**, 4872-4882 (2003).
189. Utsumi, R., *et al.* Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science* **245**, 1246-1249 (1989).
190. Kwon, O., Georgellis, D. & Lin, E.C. Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 13192-13195 (2003).
191. Ottemann, K.M., Xiao, W., Shin, Y.K. & Koshland, D.E., Jr. A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* **285**, 1751-1754 (1999).
192. Sevvana, M., *et al.* A ligand-induced switch in the periplasmic domain of sensor histidine kinase CitA. *J Mol Biol* **377**, 512-523 (2008).
193. Miller, A.S. & Falke, J.J. Side chains at the membrane-water interface modulate the signaling state of a transmembrane receptor. *Biochemistry* **43**, 1763-1770 (2004).
194. Szurmant, H., Bunn, M.W., Cho, S.H. & Ordal, G.W. Ligand-induced conformational changes in the *Bacillus subtilis* chemoreceptor McpB determined by disulfide crosslinking *in vivo*. *J Mol Biol* **344**, 919-928 (2004).
195. Maruyama, I.N., Mikawa, Y.G. & Maruyama, H.I. A model for transmembrane signalling by the aspartate receptor based on random-cassette mutagenesis and site-directed disulfide crosslinking. *J Mol Biol* **253**, 530-546 (1995).
196. Tao, W., Malone, C.L., Ault, A.D., Deschenes, R.J. & Fassler, J.S. A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, SLN1. *Mol Microbiol* **43**, 459-473 (2002).
197. Hulko, M., *et al.* The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* **126**, 929-940 (2006).
198. Ferris, H.U., *et al.* The Mechanisms of HAMP-Mediated Signaling in Transmembrane Receptors. *Structure* **19**, 378-385 (2011).
199. Goldberg, S.D., Clinthorne, G.D., Goulian, M. & DeGrado, W.F. Transmembrane polar interactions are required for signaling in the *Escherichia coli* sensor kinase PhoQ. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A* **107**, 8141-8146 (2010).
200. Smock, R.G. & Gierasch, L.M. Sending signals dynamically. *Science* **324**, 198-203 (2009).
  201. Singh, M., Berger, B., Kim, P.S., Berger, J.M. & Cochran, A.G. Computational learning reveals coiled coil-like motifs in histidine kinase linker domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2738-2743 (1998).
  202. Anantharaman, V., Balaji, S. & Aravind, L. The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins. *Biol Direct* **1**, 25 (2006).
  203. Stewart, V. & Chen, L.L. The S helix mediates signal transmission as a HAMP domain coiled-coil extension in the NarX nitrate sensor from Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **192**, 734-745 (2010).
  204. Brown, J.H., Cohen, C. & Parry, D.A. Heptad breaks in alpha-helical coiled coils: stutters and stammers. *Proteins* **26**, 134-145 (1996).
  205. Keasling, J.D. Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* **330**, 1355-1358 (2010).
  206. Tamsir, A., Tabor, J.J. & Voigt, C.A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'. *Nature* **469** (7329), 212-215 (2011).
  207. Regot, S., *et al.* Distributed biological computation with multicellular engineered networks. *Nature* **469** (7329), 207-211 (2011).
  208. Elowitz, M.B. & Leibler, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403**, 335-338 (2000).
  209. Levskaya, A., *et al.* Synthetic biology: engineering Escherichia coli to see light. *Nature* **438**, 441-442 (2005).
  210. Tabor, J.J., *et al.* A synthetic genetic edge detection program. *Cell* **137**, 1272-1281 (2009).
  211. Atkinson, M.R., Savageau, M.A., Myers, J.T. & Ninfa, A.J. Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in Escherichia coli. *Cell* **113**, 597-607 (2003).
  212. Ro, D.K., *et al.* Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **440**, 940-943 (2006).
  213. Chang, M.C., Eachus, R.A., Trieu, W., Ro, D.K. & Keasling, J.D. Engineering Escherichia coli for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat Chem Biol* **3**, 274-277 (2007).
  214. Phadtare, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* **6**, 125-136 (2004).
  215. Giuliodori, A.M., *et al.* The cspA mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* **37**, 21-33 (2010).
  216. Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D. & de Mendoza, D. Control of membrane lipid

- fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol* **186**, 6681-6688 (2004).
217. Bandell, M., Macpherson, L.J. & Patapoutian, A. From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 490-497 (2007).
218. Aguilar, P.S. & de Mendoza, D. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol* **62**, 1507-1514 (2006).
219. Marr, A.G. & Ingraham, J.L. Effect of Temperature on the Composition of Fatty Acids in Escherichia Coli. *J Bacteriol* **84**, 1260-1267 (1962).
220. Beranova, J., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Elhottova, D. & Konopasek, I. Differences in cold adaptation of Bacillus subtilis under anaerobic and aerobic conditions. *J Bacteriol* **192**, 4164-4171 (2010).
221. Mansilla, M.C. & de Mendoza, D. The Bacillus subtilis desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Arch Microbiol* **183**, 229-235 (2005).
222. Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C. & de Mendoza, D. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in Bacillus subtilis. *EMBO J* **20**, 1681-1691 (2001).
223. Cybulski, L.E., *et al.* Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the Bacillus subtilis acyl-lipid desaturase. *Mol Microbiol* **45**, 1379-1388 (2002).
224. Cybulski, L.E., Martin, M., Mansilla, M.C., Fernandez, A. & de Mendoza, D. Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Curr Biol* **20**, 1539-1544 (2010).
225. Cybulski, L.E., del Solar, G., Craig, P.O., Espinosa, M. & de Mendoza, D. Bacillus subtilis DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J Biol Chem* **279**, 39340-39347 (2004).
226. Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. & de Mendoza, D. A Bacillus subtilis gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**, 2194-2200 (1998).
227. Aguilar, P.S., Lopez, P. & de Mendoza, D. Transcriptional control of the low-temperature-inducible des gene, encoding the delta5 desaturase of Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **181**, 7028-7033 (1999).
228. Pan, J., Tristram-Nagle, S., Kucerka, N. & Nagle, J.F. Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys J* **94**, 117-124 (2008).
229. Nyholm, T.K., Ozdirekcan, S. & Killian, J.A. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry* **46**, 1457-1465 (2007).
230. Park, S.H. & Opella, S.J. Tilt angle of a trans-membrane helix is determined by hydrophobic mismatch. *J Mol Biol* **350**, 310-318 (2005).
231. Albanesi, D., *et al.* Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16185-16190 (2009).

232. Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular cloning : a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001).
233. van den Berg, S., Lofdahl, P.A., Hard, T. & Berglund, H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J Biotechnol* **121**, 291-298 (2006).
234. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763 (1994).
235. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
236. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-25 (1997).
237. Trapani, S. & Navaza, J. AMoRe: classical and modern. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 11-16 (2008).
238. McCoy, A.J., *et al.* Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674 (2007).
239. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* **64**, 112-122 (2008).
240. Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M. & Paciorek, W. Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 2023-2030 (2003).
241. Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P. & Bricogne, G. Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol Biol* **364**, 215-230 (2007).
242. Cohen, S.X., *et al.* ARP/wARP and molecular replacement: the next generation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 49-60 (2008).
243. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132 (2004).
244. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255 (1997).
245. Winn, M.D., Murshudov, G.N. & Papiz, M.Z. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. *Methods Enzymol* **374**, 300-321 (2003).
246. Terwilliger, T.C., *et al.* Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 61-69 (2008).
247. Adams, P.D., *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213-221 (2010).
248. Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2256-2268 (2004).
249. Schneider, T.R. Objective comparison of protein structures: error-scaled difference distance matrices. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 714-721 (2000).

250. Schneider, T.R. A genetic algorithm for the identification of conformationally invariant regions in protein molecules. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 195-208 (2002).
251. Holm, L. & Rosenstrom, P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549 (2010).
252. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-10041 (2001).
253. Lindsley, J.E. Use of a real-time, coupled assay to measure the ATPase activity of DNA topoisomerase II. *Methods Mol Biol* **95**, 57-64 (2001).
254. Espenson, J.H. *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, (McGraw-Hill, New York, 1995).
255. Li, W., Jaroszewski, L. & Godzik, A. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics* **17**, 282-283 (2001).
256. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797 (2004).
257. Trajtenberg, F., Grana, M., Ruetalo, N., Botti, H. & Buschiazzo, A. Structural and enzymatic insights into the ATP binding and autophosphorylation mechanism of a sensor histidine kinase. *J Biol Chem* **285**, 24892-24903 (2010).
258. Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A.M. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J Am Chem Soc* **125**, 1731-1737 (2003).
259. de Vries, S.J., *et al.* HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* **69**, 726-733 (2007).
260. Brunger, A.T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat Protoc* **2**, 2728-2733 (2007).
261. Surette, M.G., *et al.* Dimerization is required for the activity of the protein histidine kinase CheA that mediates signal transduction in bacterial chemotaxis. *J Biol Chem* **271**, 939-945 (1996).
262. Zhou, H. & Dahlquist, F.W. Phosphotransfer site of the chemotaxis-specific protein kinase CheA as revealed by NMR. *Biochemistry* **36**, 699-710 (1997).
263. Hultquist, D.E., Moyer, R.W. & Boyer, P.D. The preparation and characterization of 1-phosphohistidine and 3-phosphohistidine. *Biochemistry* **5**, 322-331 (1966).
264. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-38, 27-38 (1996).
265. Leaver-Fay, A., *et al.* ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol* **487**, 545-574 (2011).
266. Dauter, Z., Dauter, M. & Rajashankar, K.R. Novel approach to phasing proteins: derivati-

- zation by short cryo-soaking with halides. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 232-237 (2000).
267. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
268. Guarnieri, M.T., Zhang, L., Shen, J. & Zhao, R. The Hsp90 inhibitor radicicol interacts with the ATP-binding pocket of bacterial sensor kinase PhoQ. *J Mol Biol* **379**, 82-93 (2008).
269. Dehner, A., *et al.* NMR chemical shift perturbation study of the N-terminal domain of Hsp90 upon binding of ADP, AMP-PNP, geldanamycin, and radicicol. *Chembiochem* **4**, 870-877 (2003).
270. Scaramozzino, F., White, A., Perego, M. & Hoch, J.A. A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **191**, 687-692 (2009).
271. Schroder, G.F., Levitt, M. & Brunger, A.T. Super-resolution biomolecular crystallography with low-resolution data. *Nature* **464**, 1218-1222 (2010).
272. Navaza, J. Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1367-1372 (2001).
273. Cooley, R.B., Arp, D.J. & Karplus, P.A. Evolutionary origin of a secondary structure: pi-helices as cryptic but widespread insertional variations of alpha-helices that enhance protein functionality. *J Mol Biol* **404**, 232-246 (2010).
274. Ballesteros, J.A., Deupi, X., Olivella, M., Haaksma, E.E. & Pardo, L. Serine and threonine residues bend alpha-helices in the chi(1) = g(-) conformation. *Biophys J* **79**, 2754-2760 (2000).
275. Tawa, P. & Stewart, R.C. Mutational activation of CheA, the protein kinase in the chemotaxis system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 4210-4218 (1994).
276. Jiang, P. & Ninfa, A.J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J Bacteriol* **181**, 1906-1911 (1999).
277. Noriega, C.E., Schmidt, R., Gray, M.J., Chen, L.L. & Stewart, V. Autophosphorylation and dephosphorylation by soluble forms of the nitrate-responsive sensors NarX and NarQ from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **190**, 3869-3876 (2008).
278. Grimshaw, C.E., *et al.* Synergistic kinetic interactions between components of the phosphorelay controlling sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **37**, 1365-1375 (1998).
279. Kenney, L.J. Kinase activity of EnvZ, an osmoregulatory signal transducing protein of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **346**, 303-311 (1997).
280. Gutu, A.D., Wayne, K.J., Sham, L.T. & Winkler, M.E. Kinetic characterization of the WalRKSpn (VicRK) two-component system of *Streptococcus pneumoniae*: dependence of WalKSpn (VicK) phosphatase activity on its PAS domain. *J Bacteriol* **192**, 2346-2358 (2010).
281. Zacharias, M. Accounting for conformational changes during protein-protein docking. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 180-186 (2010).

282. Zhang, J., *et al.* Dynamic mechanism for the autophosphorylation of CheA histidine kinase: molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc* **127**, 11709-11719 (2005).
283. Walter, T.S., *et al.* Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure* **14**, 1617-1622 (2006).
284. D’Arcy, A., Villard, F. & Marsh, M. An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 550-554 (2007).
285. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-797 (2007).
286. Birck, C., *et al.* Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* **7**, 1505-1515 (1999).
287. Kornev, A.P., Haste, N.M., Taylor, S.S. & Eyck, L.F. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17783-17788 (2006).
288. Yamada, S., *et al.* The signaling pathway in histidine kinase and the response regulator complex revealed by X-ray crystallography and solution scattering. *J Mol Biol* **362**, 123-139 (2006).
289. Li, J., Swanson, R.V., Simon, M.I. & Weis, R.M. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* **34**, 14626-14636 (1995).
290. Mattison, K. & Kenney, L.J. Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. *J Biol Chem* **277**, 11143-11148 (2002).
291. Yoshida, T., Cai, S. & Inouye, M. Interaction of EnvZ, a sensory histidine kinase, with phosphorylated OmpR, the cognate response regulator. *Mol Microbiol* **46**, 1283-1294 (2002).
292. Castelli, M.E., Cauerhff, A., Amongero, M., Soncini, F.C. & Vescovi, E.G. The H box-harboring domain is key to the function of the Salmonella enterica PhoQ Mg<sup>2+</sup>-sensor in the recognition of its partner PhoP. *J Biol Chem* **278**, 23579-23585 (2003).
293. Yaffe, M.B. X-ray crystallography and structural biology. *Crit Care Med* **33**, S435-440 (2005).
294. Drenth, J. *Principles of protein x-ray crystallography*, (Springer, New York, 1999).
295. Weber, G. Ligand binding and internal equilibria in proteins. *Biochemistry* **11**, 864-878 (1972).
296. Frauenfelder, H., Sligar, S.G. & Wolynes, P.G. The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598-1603 (1991).
297. Martin, M., Albanesi, D., Alzari, P.M. & de Mendoza, D. Functional in vitro assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK. *Protein Expr Purif* **66**, 39-45 (2009).
298. Kottling, C., *et al.* A phosphoryl transfer intermediate in the GTPase reaction of Ras in complex with its GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13911-13916 (2006).
299. Deng, Y., *et al.* Antiparallel four-stranded coiled coil specified by a 3-3-1 hydrophobic heptad

- repeat. *Structure* **14**, 247-255 (2006).
300. Yadav, M.K., *et al.* Coiled coils at the edge of configurational heterogeneity. Structural analyses of parallel and antiparallel homotetrameric coiled coils reveal configurational sensitivity to a single solvent-exposed amino acid substitution. *Biochemistry* **45**, 4463-4473 (2006).
  301. Toro-Roman, A., Mack, T.R. & Stock, A.M. Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. *J Mol Biol* **349**, 11-26 (2005).
  302. Bachhawat, P. & Stock, A.M. Crystal structures of the receiver domain of the response regulator PhoP from *Escherichia coli* in the absence and presence of the phosphoryl analog beryllifluoride. *J Bacteriol* **189**, 5987-5995 (2007).
  303. Najle, S.R., Inda, M.E., de Mendoza, D. & Cybulski, L.E. Oligomerization of *Bacillus subtilis* DesR is required for fine tuning regulation of membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1238-1243 (2009).
  304. Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4095-4100 (2001).
  305. Tsokos, C.G., Perchuk, B.S. & Laub, M.T. A Dynamic Complex of Signaling Proteins Uses Polar Localization to Regulate Cell-Fate Asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell* **20**, 329-341 (2011).

# ANEXOS

# Structural and Enzymatic Insights into the ATP Binding and Autophosphorylation Mechanism of a Sensor Histidine Kinase<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, May 25, 2010 Published, JBC Papers in Press, May 27, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.147843

Felipe Trajtenberg<sup>‡1</sup>, Martin Graña<sup>§</sup>, Natalia Ruétalo<sup>‡</sup>, Horacio Botti<sup>‡</sup>, and Alejandro Buschiazso<sup>‡¶12</sup>

From the Units of<sup>‡</sup>Protein Crystallography and<sup>§</sup>Bioinformatics, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo 11400, Uruguay and the<sup>¶</sup>Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Paris 75015, France

DesK is a sensor histidine kinase (HK) that allows *Bacillus subtilis* to respond to cold shock, triggering the adaptation of membrane fluidity via transcriptional control of a fatty acid desaturase. It belongs to the HK family HPK7, which includes the nitrogen metabolism regulators NarX/Q and the antibiotic sensor LiaS among other important sensor kinases. Structural information on different HK families is still scarce and several questions remain, particularly concerning the molecular features that determine HK specificity during its catalytic autophosphorylation and subsequent response-regulator phosphotransfer reactions. To analyze the ATP-binding features of HPK7 HKs and dissect their mechanism of autophosphorylation at the molecular level, we have studied DesK in complex with ATP using high resolution structural approaches in combination with biochemical studies. We report the first crystal structure of an HK in complex with its natural nucleotidic substrate. The general fold of the ATP-binding domain of DesK is conserved, compared with well studied members of other families. Yet, DesK displays a far more compact structure at the ATP-binding pocket: the ATP lid loop is much shorter with no secondary structural organization and becomes ordered upon ATP loading. Sequence conservation mapping onto the molecular surface, semi-flexible protein-protein docking simulations, and structure-based point mutagenesis allow us to propose a specific domain-domain geometry during autophosphorylation catalysis. Supporting our hypotheses, we have been able to trap an autophosphorylating intermediate state, by protein engineering at the predicted domain-domain interaction surface.

Histidine kinases<sup>3</sup> (HKs)<sup>4</sup> are multifunctional dimeric enzymes with highly variable sensing regions and more conserved intracel-

lular cores. In concerted action with a range of specific protein partners called response regulators (RRs), they conform two-component signal transduction systems (TCSs), present in all three major life divisions (1, 2). Although TCSs represent the most abundant signaling system within bacteria, for unknown evolutionary reasons they are absent in higher eukaryotes, including mammals. The only mammalian HK relatives are the nucleus-encoded mitochondrial dehydrogenase kinases, which phosphorylate specific serine residues (3).

Intracellular HK domains catalyze an ATP-dependent protein kinase activity, allowing the HK to autophosphorylate a specific histidine, in a signal-regulated fashion. Once phosphorylated, the cytoplasmic core catalyzes a subsequent phosphotransfer reaction, swapping the histidine-linked phosphate group onto a specific aspartate residue in the receiver domain of the cognate RR. Many HKs catalyze a further third type of reaction, whereby the unphosphorylated HK specifically promotes the dephosphorylation of its cognate phospho-RR through a protein-phosphatase mechanism. Those HKs that are able to catalyze autokinase and RR-phosphatase reactions have been shown to tightly balance these two functions as a key to proper signaling through the HK-controlled pathway (4).

A large array of TCSs is expressed at any given time in a cell. One of the most addressed issues in this regard is the interaction network among HKs and RRs, because most bacterial species express 20–30 HK-RR pairs or even more, and yet any given histidine kinase has only one or two cognate response regulators, implying minimal cross-talk among different pathways (5–7). These specificity issues deserve to be analyzed in greater detail, taking into account the significant global structural conservation among HKs. Atomic level differences cannot be underestimated as the basis of distinctive and specific regulatory and mechanistic determinants, affecting each one of the functional steps in HK-mediated reactions.

Structural analyses reveal a modular architecture in HKs, with variations in domain organization that define HK classes I and II (8). In both groups, the three-dimensional architecture predicts extensive movement of the ATP-binding domain (ABD) to physically interact with the histidine-containing phosphotransfer domain, given that autophosphorylation appears to occur exclusively within the dimer. In class I HKs the phospho-

domain; DTT, dithiothreitol; MSA, multiple sequence alignment; MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization; TEV, tobacco etch virus; TOF, time-of-flight; r.m.s.d., root mean squared deviation.

\* This work was supported in part by Grants FCE2007\_219 (to A. B.) and FCE2007\_377 (to M. G.) from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay (ANII) and Grant ANR-06-PCVI-0009-01 (to A. B.) from the Agence Nationale de la Recherche, France.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs S1–S6 and Tables S1–S3.

The atomic coordinates and structure factors (code 3H6) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (<http://www.rcsb.org/>).

<sup>1</sup> Has a Ph.D. fellowship from ANII.

<sup>2</sup> A staff scientist from the Institut Pasteur (France). To whom correspondence should be addressed: Institut Pasteur de Montevideo, Unit of Protein Crystallography, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay. Tel.: 598-2-522-0910; Fax: 598-2-522-4185; E-mail: alebus@pasteur.edu.uy.

<sup>3</sup> Recommended trivial name "Protein-Histidine Kinases" (EC 2.7.13.x).

<sup>4</sup> The abbreviations used are: HK, histidine kinase; RR, response regulator; TCS, two-component signal transduction system; ABD, ATP-binding

transfer domain immediately precedes the ABD and mediates HK dimerization (hence called the dimerization and histidine phosphotransfer (DHP) domain), whereas in class II enzymes it is not involved in dimerization and several additional domains intervene between the phosphotransfer and ABD domains. Sequence-based classification of the different domains in HKs is also useful in structure/functional analyses. According to the DHP domains, HKs have been grouped into four Pfam families (9): whereas ~85% can be assigned to the HisKA group (PF00512), ~10% of all known histidine kinases belong to the HisKA\_3 family (PF007730). Concerning the ABDs, HKs have been clustered in 11 families (2), noting that three-dimensional structural information is still lacking for five of them.

In terms of the autophosphorylation mechanism, some HKs like EnvZ and NtrB (10, 11) autophosphorylate following a *trans* pathway, *i.e.* one monomer phosphorylating the histidine of the other. Instead, HK853 and PhoR have recently been shown to perform autokinase catalysis in *cis* (12). Autophosphorylation appears to proceed according to a mutually exclusive behavior, either *cis*- or *trans*-acting. Given the fact that the ATP-binding domains of HKs are flexible in the kinase competent state (13), the *cis/trans* exclusion is likely correlated to specific interdomain configurations at the interaction surface. As clearly demonstrated for the HK-RR interaction, interfaces seem to be crucial to determining specificity in HK signal transduction (7, 12). We wished to explore whether structural constraints play a role in defining specific orientations for interacting surfaces between the ABD and the DHP domains in HKs, eventually relevant during autophosphorylation catalysis.

We focused on the protein DesK from *Bacillus subtilis*, a class I HK (14) displaying an N-terminal sensor domain (~150 residues) with almost no extracellular region, other than the loops that connect the four or five transmembrane segments (15). The transmembrane region can sense temperature-modulated fluidity changes of lipid bilayers (13), transmitting the signal toward the C-terminal cytoplasmic catalytic core (~220 residues), hereafter called DesKC. The cold thermal stimulus is detected by DesK, which then interacts with its cognate RR, DesR, constituting a canonical TCS. *In vitro*, DesKC has been shown to catalyze three different reactions depending on the phosphorylation states of the partners: its own phosphorylation, phosphotransfer to DesR, and dephosphorylation of phospho-DesR (15). We have recently reported that the switch from a kinase- to a phosphatase-biased activity in full-length DesK is temperature-regulated through the action of the transmembrane segments (13). *In vivo* experiments have shown that DesK functions as a kinase at cold temperatures (15, 16), autophosphorylating a conserved residue (His<sup>188</sup>) in the DHP domain. This phosphoryl group is then transferred to a receiver aspartate in DesR, a DNA-binding RR that then activates the transcription of *des* (encoding for the acyl lipid desaturase  $\Delta 5$ -Des). Unsaturated fatty acyls in phospholipids, the product of  $\Delta 5$ -Des activity, raise the membrane's fluidity, triggering the switch of DesK from a kinase to a phosphatase state. As a consequence, the concentration of phospho-DesR falls off, leading to shut-down of *des* transcription (16). DesK is a HisKA\_3 HK that belongs to the HPK7 family, together with nitrate/nitrite-linked

regulation TCS histidine kinases, namely NarQ and NarX (17), among many others.

We now report the crystal structure of the ABD of DesK at 1.8 Å resolution, disclosing new information about HPK7 histidine kinases. To our knowledge, this is the first experimental structure of a histidine kinase in complex with its physiologic substrate (ATP). Structural analyses, complemented by an extensive *in silico* study of sequence conservation and phosphotransfer intermediate-state modeling, allow us to extend the current knowledge of HKs. In particular, we pinpoint key residues at the domain-domain interaction surface, enabling us to predict the geometry of the interdomain interface during autophosphorylation. Enzymatic characterization of wild-type DesKC, as well as of selected structure-based point mutants, confirm the functional role of conserved residues in helix  $\alpha 5$ , far from the catalytic center, strongly suggesting that domain-domain interfaces play a key role in catalysis regulation. Further supporting the structural hypotheses, we engineered cysteine mutants on the basis of the predicted interdomain orientation, allowing us to trap a covalent autophosphorylation intermediate state.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Protein Expression, Purification, and Crystallization**—The plasmids used for expression correspond to: the entire cytoplasmic region DesKC (residues 155–367), the point mutant DesKCH188V (as described in Ref. 15), and full-length DesR (see Ref. 18). The engineered Cys mutants (G192C/G334C, Q193C/G334C, and S196C/G334C), as well as DesKCE342A and DesKCE343A were generated using the QuikChange multi site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Mutations were confirmed by DNA sequencing. DesKC and derived mutants were expressed as N-terminal His<sub>6</sub> tag fusion proteins, including a TEV protease cleavage site for tag removal, in *Escherichia coli* strain M15/pREP4. Protein purification was performed with standard Ni<sup>2+</sup>-affinity chromatography using a HisTrap column (Amersham Biosciences), then dialyzed against an excess volume of 50 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 10% glycerol, and 1 mM DTT at room temperature, in the presence of a 1/40 (w/w) ratio of His-tagged TEV protease (19). A second Ni<sup>2+</sup> column was performed, flow-through was concentrated (Vivaspin<sup>®</sup>, Sartorius), and injected into a HiLoad<sup>™</sup> 16/60 Superdex 75 prep grade column (Amersham Biosciences) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, and 0.5 mM DTT. After size-exclusion chromatography, the proteins were concentrated to ~10 mg/ml and stored in aliquots at –80 °C for further use in crystallization trials. His<sub>6</sub>-tagged DesR was overexpressed in the same *E. coli* strain and purified following a similar protocol as DesKC, with no proteolytic step.

Serendipitous proteolysis of DesKCH188V resulted in the reproducible crystallization of the ATP-binding domain (DesKABD, spanning residues 243–367). Briefly, DesKCH188V was mixed with DesR (1:1 molar ratio) in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 5 mM BeF<sub>3</sub>. Vapor diffusion crystallization in hanging drops was performed by mixing 2  $\mu$ l of protein solution (10 mg/ml total protein) with 2  $\mu$ l of reservoir solution (20% polyethylene glycol 3350, 0.2 M NH<sub>4</sub>Cl). Multicrystals grew very slowly and were further used as

## ATP Binding and Autophosphorylation in Histidine Kinases

microseeds in fresh drops with identical mother liquor, resulting in single crystals of DesKABD, which typically diffracted to  $\sim 1.6$ – $1.8$  Å resolution. Single crystals were cryoprotected in mother liquor containing 25% glycerol and 1 M NaI for 60 s, flash frozen in liquid N<sub>2</sub>, and stored until data collection.

**Diffraction Data Collection, Structure Determination, and Refinement**—X-ray diffraction data (Table 1) were collected at the Institut Pasteur de Montevideo, at 108 K (Cryostream Series 700, Oxford Cryosystems) with CuK<sub>α</sub> radiation (1.5418 Å), using a microsource MicroMax007-HF rotating copper anode (Rigaku), Varimax-HF mirrors (Rigaku), and a Mar345 image plate detector (Mar Research). Highly redundant data sets were collected and processed using Mosflm/Scala (20). The structure was solved by single anomalous diffraction using the signal from the iodide atoms. Experimental electron density maps allowed for chain tracing and subsequent phase-restrained model refinement with TLS according to standard procedures. Full details of structure solution and model refinement are given in the [supplemental materials](#).

**Protein-Protein Docking Calculations**—Atomic coordinates of the dimerization DHP domain of DesK (residues 176–242) were obtained from our previous report (13) DesK<sub>C<sub>H188E</sub></sub> PDB 3GIE, except that the Glu<sup>188</sup> was replaced *in silico* by a His (using the most populated rotamers). This procedure was preferred, because 3GIE was solved at higher resolution and is otherwise structurally similar to *wt* DesK<sub>C<sub>3EHF</sub></sub> (13). Docking calculations were performed with HADDOCK 2.0 (21). The ATP and Mg<sup>2+</sup> were treated as a single residue; corresponding bonds and angles were defined to keep appropriate cation coordination geometry. The DesKABD model was first subjected to a simulated annealing/molecular dynamics protocol (CNS 1.2 (22)) consisting of heating to 3000 K and a slow cooling to 300 K in 60 steps (3.5 fs). All atomic positions of DesKABD were restrained, except for the ATP lid (residues 326–334) and the N-terminal residues (residues 243–246). We generated 20 different conformations of these two fragments using different initial velocities. The ATP lid loop ensemble was used to rule out effects associated to ATP lid flexibility, which has been extensively reported, even in the presence of ADP or non-hydrolysable ATP analogues (13, 23, 24). As for the four N-terminal residues in the ABD, allowed flexibility should take into account eventual effects of different initial dispositions on the final interdomain geometry. The used distance restraints (ambiguous interaction restraints (AIR)) were: 1) His<sup>188</sup> Nε2 of DHP monomer A, linked to ATP Pγ in DesKABD and 2) Lys<sup>242</sup> main-chain C of DHP monomer B, with DesKABD Gly<sup>243</sup> N, restoring the intrachain peptidic bond. The alternative restraint His<sup>188</sup> Nε2 of DHP monomer B linked to DesKABD ATP Pγ (modeling a *cis*-acting autophosphorylation configuration), was also subjected to computations, resulting in lower energy scores and not further analyzed. To test the robustness of the results, independent simulations were run with different initial settings, including alternative rotamers and protonation states for His<sup>188</sup>, as well as different AIR force constant values. Several reports point to Nε2 as the most reactive center engaged in histidine phosphorylation (25, 26). Given that no major differences were recorded comparing Nε2 with Nδ1, Nε2 was ultimately kept as the atom to define the phospho-His dis-

tance restraints in further analyses, although experimental evidence is not available to conclude which imidazole nitrogen is actually reactive during DesK autophosphorylation. A total of 3000 structures was generated during the rigid-body energy-minimization step. The best 300 structures were refined in the semi-flexible annealing step and then subjected to a final refinement with explicit solvent. For the remaining parameters, we used HADDOCK default settings, as well as for the scoring function used to sort structures after the rigid-body and semi-flexible steps. Four replicates were done for this docking protocol to assess whether and how the obtained structures constituted a robust result. The same protocol was used for other DHP states, from the structures of DesK<sub>C<sub>H188V</sub></sub> (3EHH) and DesK<sub>C<sub>wt-P</sub></sub> (3GIG). Root mean squared deviation (r.m.s.d.) values were computed through tailored (Tool command language) scripting within VMD (27) upon superposition of the Cα atoms of the DHP domain onto the best-scored structure model.

**Sequence-based Analyses**—A full referenced description is included in the [supplemental materials](#). Briefly, homologous sequences were retrieved from bacterial genomes stored at the IMG system (28) with a standard BLASTp search. Unique sequences (406) were then aligned with the program Muscle. “HisKA\_3” histidine kinases were retrieved from Pfam, and 762 unique proteins thereof were aligned with Muscle. The alignments displayed in Fig. 3 are a subset of the original multiple sequence alignment (MSA) of Pfam sequences, obtained by trimming the MSA into a non-redundant set of proteins with a cutoff of 88% pairwise identity. Some long proteins (>700 residues) were also manually removed from this set, and new MSAs were computed with Mafft (29) for the reduced sets. For analyses concentrating in HPK7 “NarQ/DesK-like” proteins ([supplemental Fig. S1](#)), sequences sharing the Pfam DHP-ABD architecture (808) were retrieved and formatted into a BLASTp-searchable database. NarQ and DesK were then used as queries against this smaller in-house database. MSAs were mapped onto the molecular surfaces of DesKABD and the DHP domain (using the same DesK models as for the docking calculations).

**Interdomain Disulfide Covalent Bonding Studies**—Oxidation and Cys-disulfide formation of the Cys-engineered mutants (DesK<sub>C<sub>G192C,G334C</sub></sub>, Q193C,G334C, and S196C,G334C) were triggered by incubating 10 μM protein in contact with air. Other procedures were also assayed, seeking for more rapid and higher yield oxidations, although these resulted in more drastic side reactions. Briefly, 10–100 μM hydrogen peroxide, and preformed complexes  $\sim 0.2$  mM Cu(II)-(phenanthroline)<sub>3</sub> or Cu(II)-(bathocuproine disulfonate)<sub>2</sub>, were incubated for different times with purified protein. In all cases, thiol oxidation was stopped by incubation with 10 mM *N*-ethylmaleimide and 1 mM EDTA. Aliquots were analyzed with SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry, with or without previous reduction (100 mM DTT). Thiol air oxidation was the mildest and most specific (data not shown) and selected for detailed analyses. Protein samples from selected SDS-PAGE bands were subjected to tryptic digestion with sequencing grade trypsin (Promega, Madison, WI) at 35 °C, overnight. Peptides were extracted from gels with 60% acetonitrile in 0.2% trifluoroacetic acid. Eluates were concentrated by vacuum centrifugation

and desalted using reversed-phase microcolumns (C18 OMIX pipette tips, Varian). Samples were then directly spotted onto the mass spectrometer sample plate with 2 ml of matrix solution (saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.2% trifluoroacetic acid). Mass spectra of positive ions were acquired in reflector mode with a MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF instrument (Applied Biosystems). Peptide analysis was performed using both Mascot Peptide Mass Fingerprint searching mode (Matrix Science) and GPMAW32 (version 4.02, Lighthouse Data, San Diego, CA). The following modifications were considered: disulfides, *N*-ethylmaleimide-blocked thiols, reduced thiols, and oxidized methionine.

**Enzyme Activity Assays**—Autophosphorylation and ATPase activities, resulting in net ATP consumption, were measured with a coupled enzyme assay (30). Briefly, the production of ADP was coupled to the oxidation of NADH by pyruvate kinase and lactate dehydrogenase (Sigma). The coupling system was in large excess to avoid saturation, and the oxidation of NADH was measured at 340 nm in a Cary<sup>®</sup> UV-visible spectrophotometer (Varian) at 24 °C. The reaction mixtures contained 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 145 mM KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM phosphoenolpyruvate, 240 mM NADH, 5 units of pyruvate kinase, 23 units of lactate dehydrogenase, and different ATP concentrations, in 200  $\mu$ l of final volume. In the absence of DesKC the NADH oxidation was stable and linear for several minutes. Before starting the reaction, we preincubated the coupled system with ATP to convert the small initial ADP contamination to ATP. To start the reaction, wild-type DesKC or selected DesKC point mutants were added at 22  $\mu$ M final concentration. Fitting of raw kinetic data using Michaelis-Menten functions was performed with the program Origin v. 8 (Origin-lab). In the case of *wt* DesKC, we could obtain more precise initial rate values by first fitting the biphasic time course to an exponential plus a linear function model (Equation 1),

$$[\text{NADH}]_t = A_1 e^{-k_1 t} + (A_2 + k_2 t) \quad (\text{Eq. 1})$$

where the  $A_1$  and  $A_2$  terms are the amplitudes of the exponential and linear phases, respectively;  $k_2$  is the constant rate of the linear phase ( $k_2 < 0$ ), whereas  $k_1$  is a substrate concentration-dependent rate coefficient used to calculate the initial velocity  $V_0$  for the exponential non-turnover phase in Equation 2.

$$V_0^{\text{exp phase}} = k_1 \times A_1 = \frac{k_{\text{cat}} \times [\text{ATP}]}{K_M + [\text{ATP}]} \times (f \times [E]) \quad (\text{Eq. 2})$$

The parameter  $f$  is the stoichiometry factor relating the concentration of phosphorylatable histidine sites with respect to total enzyme concentration  $[E]$ . This approach takes advantage of the integral method for determining initial rates with higher precision (31).

For the evaluation of GTP as a potential substrate of DesKC, and given that the coupled enzyme pyruvate kinase is able to use GDP, we followed the same protocol described above, substituting ATP for GTP at identical concentrations. To test if GTP behaves as a competitive inhibitor, eventually indicating DesKC GTP-binding capacity, 5 mM GTP was added in competition assays that contained 0.5 mM ATP.

**TABLE 1**  
Data collection, phasing and refinement statistics

	DesKC ATP-binding domain (+ATP & NaI)
Space group	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Wavelength	1.5418 Å
Data Resolution *	22-1.73 Å (1.82-1.73 Å)
Measured reflect.	81259
Multiplicity *	4.8 (4.6)
Completeness *	97 % (84.5 %)
R <sub>meas</sub> **†	9.7 % (63.1 %)
<I/σ(I)> *	15.8 (2.7)
Unit cell parameters (in Å)	a=40.38 b=49.07 c=81.4
FOM acentric before solvent flipping	0.322 (0.357 in the 2.68-2.56 Å shell)
Anomalous phasing power ‡	1.079 (1.095 in the 2.82-2.68 Å shell)
E  <sup>2</sup> correlation after solvent flipping (max resolution used)	0.83 (2.1 Å)
Refinement resolution	20-1.8 Å
R <sub>cryst</sub> ‡‡ [N° refs]	0.162 [14616]
R <sub>free</sub> ‡‡ [N° refs]	0.211 [777]
Rmsd (bonds / angles)	0.018 Å / 1.8°
Protein non-hydrogen atoms	1004
Water atoms	185
Ligand atoms	31 (ATP) / 12 (I <sup>-</sup> ) / 1 (Mg <sup>+2</sup> )
N° residues in Ramachandran plot regions § (allowed / disallowed)	114 / 2

\* Values in parentheses apply to the high-resolution shell.

†  $R_{\text{meas}} = \sum_h \sqrt{N_h} / (N_h - 1) \sum_i |I_i - \langle I \rangle| / \sum_h \sum_i I_i$ ;  $N_h$ , multiplicity for reflection  $h$ ;  $I_i$ , intensity of the  $i^{\text{th}}$  observation of reflection  $h$ ;  $\langle I \rangle$ , mean intensity of all observations of reflection  $h$ , with  $I_{\pm} = 1/N_h \sum_i (I_{i\pm} \text{ or } I_{i\mp})$ ;  $\sum_h$ , all reflections;  $\sum_i$ , all obs of each reflection.

‡ Anomalous phasing power =  $\langle |F(h_{\text{calc}})| / \text{phase-integrated lack of closure} \rangle$

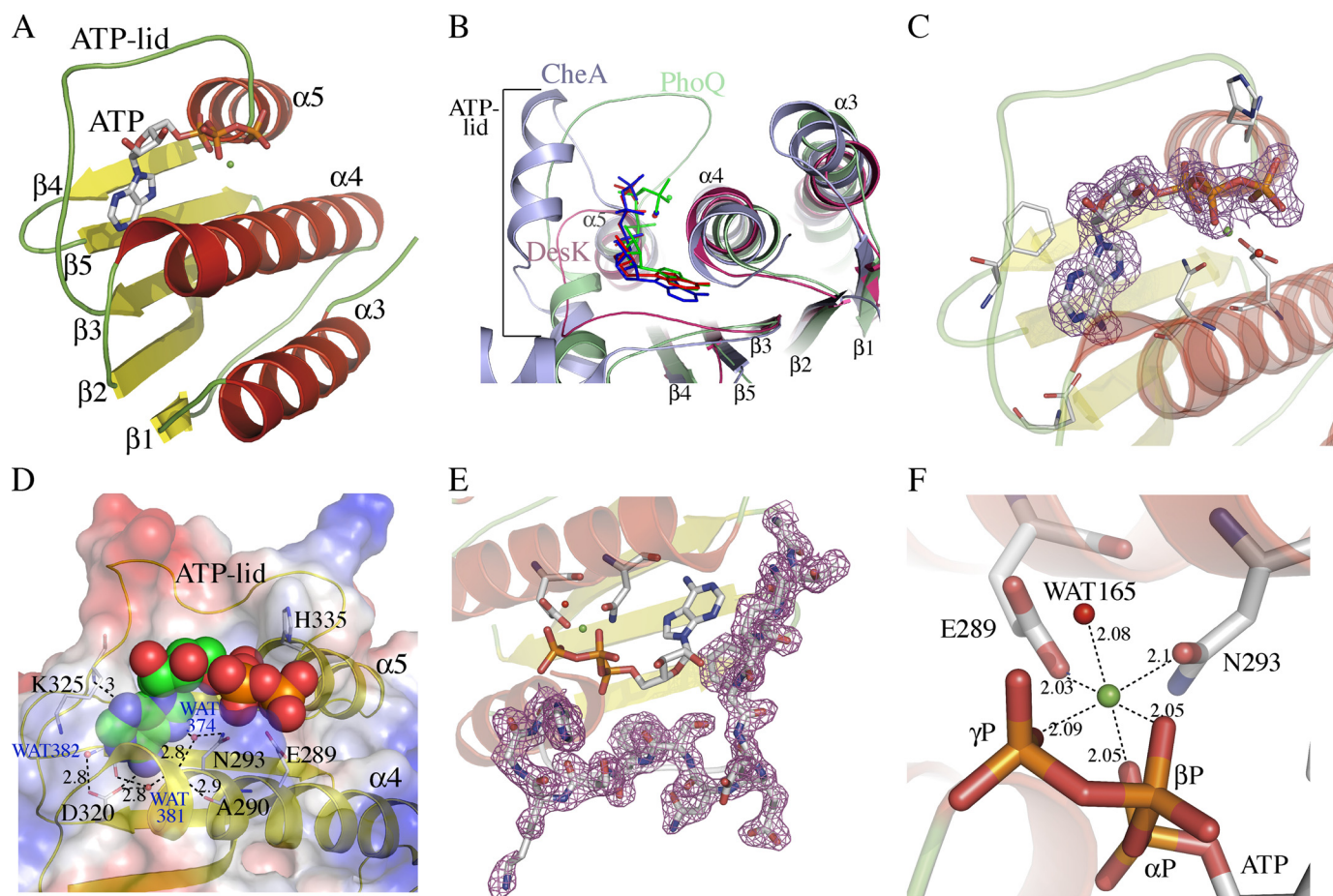
‡‡  $R = \sum_h |F(h)_{\text{obs}} - F(h)_{\text{calc}}| / \sum_h |F(h)_{\text{obs}}|$ ;  $R_{\text{cryst}}$  and  $R_{\text{free}}$  were calculated using the working and test hkl reflection (refs) sets, respectively.

§ Out of 125 refined protein residues, 7 glycines and the two N- and C-terminal amino acids were not included in the Ramachandran analysis.

## RESULTS

**Crystallization, Experimental Phasing, and Structure Refinement of the ATP-binding Domain of DesK**—Orthorhombic crystals of the C-terminal ATP-binding domain of DesK (DesKABD) were initially obtained by serendipitous proteolysis, during DesKC-DesR crystallization assays. Proteolysis was found to be reproducible and may well be linked to the enrichment of a particularly unstable form of DesKC under the conditions used for protein-protein complex formation. The structure was determined at 1.8-Å resolution, phased using single wavelength anomalous diffraction (Table 1), after quick-soaking the crystals with NaI. Direct methods were used to determine the iodide positions. Subsequent phase calculation and refinement resulted in high quality electron density maps (Fig. 1), which allowed for straightforward phase-restrained refinement of the entire protein. Apart from the iodide atoms, the final model includes DesKABD residues 243–367 (following full-length DesK numbering), a bound molecule of ATP-Mg<sup>2+</sup>, and 185 structural water molecules (Table 1). Co-crystallization with ATP proved to be essential for DesKABD

## ATP Binding and Autophosphorylation in Histidine Kinases



**FIGURE 1. Structure of the ATP-binding domain of DesK and details of its nucleotide-binding pocket.** *A*, schematic representation showing topology and secondary structure elements.  $\alpha$ -Helices are colored red,  $\beta$ -strands are yellow, and loops are green. *B*, superposition of DesKABD (red tones), PhoQ (green tones), and CheA (blue tones) showing the exposure of the corresponding bound nucleotides to the solvent. Note the absence of secondary structure elements in the ATP lid of DesK. A surface representation of these differences is detailed in [supplemental Fig. S2](#). *C*,  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$  electron density map contoured at  $1\sigma$ , displayed around the ATP molecule, highlighting clear signal for the entire nucleotide. *D*, solvent-accessible surface representation of DesKABD, with the ATP moiety depicted as van der Waals balls. The surface is colored according to the mapping of electrostatic potential (red = negative, blue = positive). Key protein residues for ATP binding are highlighted in *stick representation* and explained in the text. The buried water H-bond network is also shown. Numbers correspond to distances in Å. *E*,  $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$  map contoured at  $1\sigma$ , showing clear electron density for the entire ATP lid loop, ordered in the presence of ATP. *F*, close-up of the  $\text{Mg}^{2+}$  coordination site. Oxygens from the three ATP phosphates, residues Glu<sup>289</sup> and Asn<sup>293</sup>, and water Wat<sup>165</sup>, are seen closing the octahedral coordination shell of the cation.

crystal growth. Surprisingly, DesKABD/ADP co-crystallization was unsuccessful, suggesting subtle yet significant conformational differences due to the  $\gamma$ -phosphate. Intrinsic ATPase activity of ABDs in other histidine kinases has precluded the determination of ATP-bound structures. DesK appears to have a particularly lower ATPase activity, a feature enabling direct visualization of the triphospho-nucleoside within its binding pocket. We further looked for nucleotide exchange in the crystals, aiming for detailed information of the putative nucleotide-triggered conformational rearrangements. After incubating in a solution with 5 mM EDTA, the crystals disappeared almost immediately, indeed consistent with a nucleotide-dependent structural reorganization (32). Further attempts to substitute ATP by ADP were performed through soaking competition assays. However, the refined models invariably show a mixture of both nucleotides, with 50% occupancy of ADP in the best cases (data not shown), precluding straightforward analysis of the modifications induced in the protein.

**Structure Analysis of DesKABD**—The ABD of DesK is a globular domain (Fig. 1*A*), composed of a five stranded  $\beta$ -sheet ( $\beta$ 1

to  $\beta$ 5) opposed to a layer of three helices ( $\alpha$ 3– $\alpha$ 5, respecting the  $\alpha$ -helix numbering, including the DHp domain from the whole cytoplasmic DesKC region (13)). A search with DALI ([supplemental Table S1](#)) revealed strong structural similarity (Z scores > 7) to several proteins belonging to the GHF superfamily of slow ATPases (33), including CheA (PDB 1I59), TM0853 (2C2A), PhoQ (1ID0), KinB (3D36), PrrB (1YS3), NtrB (1R62), and SpoIIAB anti- $\sigma$ F factor (1TID and 1TIL), or yet different mitochondrial dehydrogenase kinases (1GKZ and 2BU8). Comparing DesKABD (ABD HPK7 family) with the other families for which three-dimensional structures are currently available (KinB (HPK1), EnvZ (HPK2), PhoQ (HPK3), NtrB (HPK4), or yet, CheA (HPK9)), some differences become immediately obvious: the ABD of DesK is smaller and has only three  $\alpha$ -helices, and the ATP lid is correspondingly shorter. The ATP-binding groove is correspondingly shallower; hence, bound ATP is seen significantly more exposed to the bulk solvent (Fig. 1, *B* and *D*, and [supplemental Fig. S2](#)).

Electron density corresponding to the bound ATP is well defined for the entire molecule (Fig. 1*C*). Although the adenine

ring is deeply buried and stacks against Phe<sup>324</sup>, the rest of the nucleotide sits on the abovementioned rather open groove. Strictly conserved in HKs, Asp<sup>320</sup> is observed hydrogen bonding with the amino N6 of the adenine base as well as with the main chain N of Gly<sup>322</sup>. These interactions would not allow for GTP binding, which has been otherwise reported in other HKs (34). Further reinforcing this ATP-specificity profile, the nucleotide-binding pocket in DesK displays a conserved water network (35, 36), strongly stabilizing the complex by complete satisfaction of the H-bonding potential of the protein and the adenine base moiety in the site (Fig. 1D). Waters Wat<sup>373</sup>, Wat<sup>374</sup>, and Wat<sup>382</sup>, deeply buried in the pocket, interface the adenine base with a defined array of protein residues, and a fourth water molecule (Wat<sup>381</sup>) finishes some intra-protein inter-residue H-bonding (Fig. 1D). Amino acids on  $\beta 3$  (the already mentioned Asp<sup>320</sup>) and  $\beta 5$  (Thr<sup>359</sup>), define the “floor” of the pocket. Helix  $\alpha 4$  is particularly important, contributing several interacting residues (Ala<sup>290</sup>, Asn<sup>293</sup>, Lys<sup>296</sup>, and His<sup>297</sup>), in this way delimiting one of the pocket’s “walls.” Between  $\beta 3$  and  $\alpha 5$  (residues 321–334) the loop corresponding to the so-called “ATP lid,” is fully defined in electron density (Fig. 1E), albeit showing higher than average *B* factors, both on side chains and the main chain. The ATP lid contains some residues that interact with the ATP moiety, such as Lys<sup>325</sup> with its main-chain N H-bonding adenine N3. But, the loop is basically loose, prone to interact with other partners. We further analyzed the structure of the DesKABD·ATP complex in comparison with previously reported structures with other nucleotides and analogues (13), to identify regions displaying statistically significant variations in atomic positions (see supplemental materials for details of the comparison methods used). Overall, the domain can be described as globally rigid. In contrast, helix  $\alpha 5$ , which directly connects the ATP-binding pocket with the other end of the domain (Fig. 1, A and D), is one of the few regions showing largest atomic coordinate variability (supplemental Fig. S3).

The Mg<sup>2+</sup> ion, known to be essential for kinase activity in HKs (36), adopts a typical octahedral coordination structure (Fig. 1F), making contacts with the oxygens of the three ATP phosphates, two side chains of residues on  $\alpha 4$  (Glu<sup>289</sup> and Asn<sup>293</sup>) and a water molecule (Wat<sup>165</sup>). This water molecule might play a catalytic role, acting as a proton donor to phosphate  $\gamma$ , in a dissociative “substrate-assisted” mechanism toward phosphotransfer (37, 38). Asn<sup>293</sup> is the most conserved residue within the signature motif “N box” in HKs, which together with Glu<sup>289</sup> make hydrogen bond interactions with the  $\beta$ -phosphate of ATP.

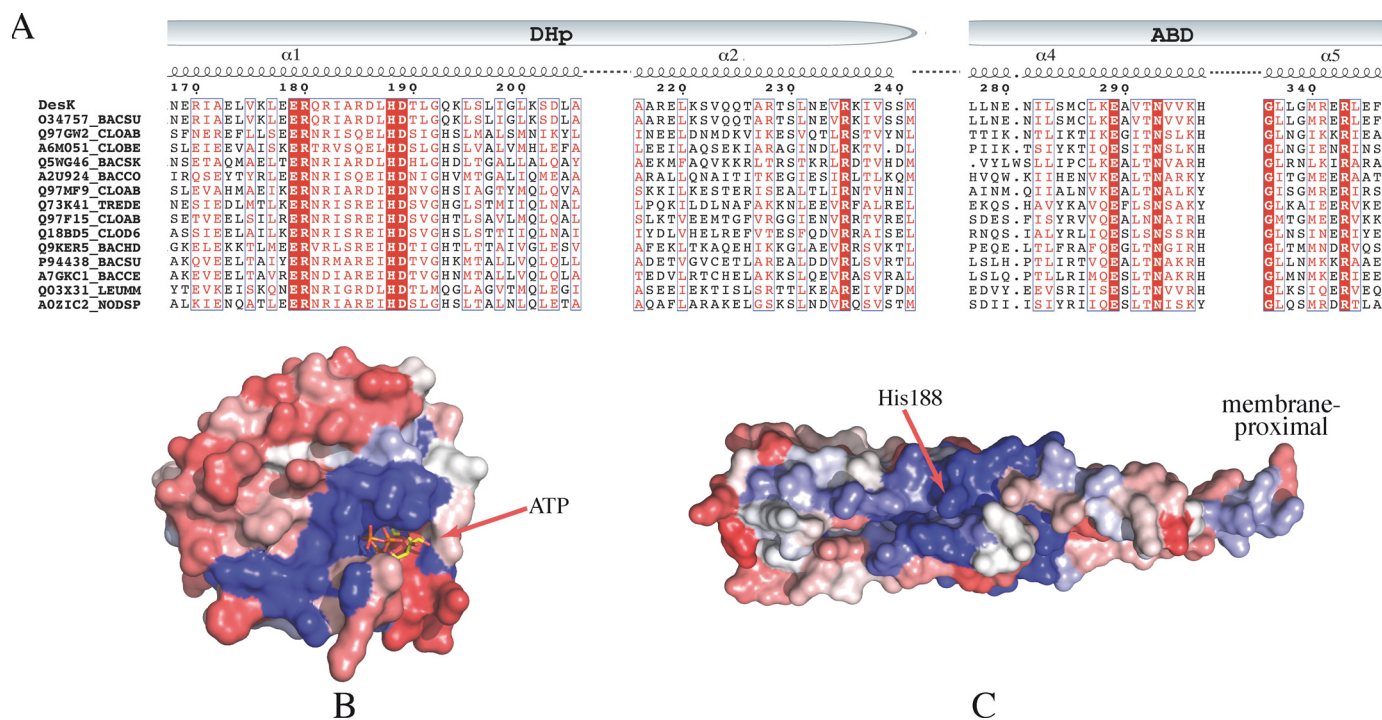
Other signature motifs on the ABD are also linked to the ATP binding function, such as residues Asp<sup>320</sup>-Asp/Asn-Gly<sup>322</sup> defining box G1, wherein Asp<sup>320</sup> interacts with the adenine ring as described above. Box G2 is not well conserved in multiple alignments (Gly<sup>336</sup>-X-X-Gly<sup>339</sup>) and is observed in DesKABD just after the ATP lid loop, making van der Waals contacts with the  $\alpha$  and  $\beta$  phosphates. Finally, box G3 (Thr<sup>355</sup>-X-X-Gly-Thr<sup>359</sup>) at the N terminus of strand  $\beta 4$ , defining part of the floor of the adenine binding pocket, also displays poor conservation.

Multiple sequence alignments of DesK with HKs of the HisKA<sub>3</sub> family, allowed us to identify an interesting pattern of conservation (Fig. 2A). Mapping these alignments onto

the DesKABD structure (Fig. 2B) revealed the expected conserved residues directly involved in ATP binding and Mg<sup>2+</sup> coordination. What caught our attention was a second conserved patch, which is readily identified and distant from the ATP pocket, composed of residues Gly<sup>336</sup> to Leu<sup>344</sup> on helix  $\alpha 5$ . A well conserved surface patch is also found on the DHp domain, surrounding the phosphorylatable His (Fig. 2C). According to their respective locations, these amino acid conservation patches on the DHp and on helix  $\alpha 5$  of the ABD, are well positioned to participate in complementary surfaces of interaction, upon ABD approximation onto the four-helix bundle during autophosphorylation, ensuring a specific domain-domain geometry.

*Protein-Protein Docking: the Autophosphorylation State*—We then asked whether the conserved residues could play a role in defining an interaction surface between the two domains of DesKC. Semiflexible domain-domain docking calculations were performed, to identify one or more energetically favorable structures of DesKC with the ABD and the DHp domains in close interaction, providing molecular models that should be compatible with the autophosphorylation intermediate state. We have recently reported structural data corresponding to different functional states along the catalytic cycle of DesK (13), including conformations corresponding to the autokinase-, phosphotransfer-, and phosphatase-competent forms, some of them indeed displaying particular domain-domain interfaces. However, the autophosphorylation state is elusive, because it is a transient conformation, essentially difficult to visualize by experimental methods in its native state. Given that high resolution models are better starting points to undertake docking calculations, we used the ABD coordinates that we are now reporting, to compute protein-protein docking calculations onto the DHp domain (PDB 3GIE, corresponding to the DHp kinase-competent state), using the program Haddock v2.0. It has been proposed that the ATP lid of HKs is important in the autophosphorylation reaction (39). The fact that our DesKABD structure displays no ambiguity in this loop, further highlights its usefulness as a docking probe over previous DesK structures.

Haddock allows for the inclusion of explicit distance restraints. The distance between Ne2 of His<sup>188</sup> and  $\gamma$ P of the ABD-bound ATP was kept restrained within a short range (1–4 Å), in accordance with the expected situation during *trans*-autokinase catalysis. A second restraint was added between the carbonyl C of Lys<sup>242</sup> in the DHp model, and the amino N of Gly<sup>243</sup> in the ABD, to include the actual covalent link between both domains in the simulations. The ATP-His<sup>188</sup> distance restraints corresponding to a *cis*-acting autophosphorylation model were also tested. The resulting docking figures displayed less favorable energy scores (data not shown). The distance between the hinge point (residues 242–243) and His<sup>188</sup> was significantly larger in the *cis* models, imposing a severe restriction in the degrees of freedom for the ABD to accommodate to the distance restraints. This resulted in a solvent-exposed His<sup>188</sup>Ne2-ATP $\gamma$ P interaction, with almost no protein environment to assist in catalysis, in sharp contrast with the *trans*-acting model. Finally, the amino acid conservation patch on the DHp domain (Fig. 2C), matches well with the predicted ABD-



**FIGURE 2. Sequence alignments and conservation patterns of the HisKA<sub>3</sub> subfamily.** *A*, selected region of a reduced multiple sequence alignment with sequences from the “HisKA<sub>3</sub>” Pfam subfamily. Identical residues are shown in **bold white** on a **red background**; conserved residues are **boxed in red**. Pfam IDs are indicated on the left followed by a species code: BACSU, *Bacillus subtilis*; CLOAB, *Clostridium acetobutylicum*; CLOBE, *Clostridium beijerinckii* (strain ncimb 8052); BACSK, *Bacillus clausii* (ksm-k16); BACCO, *Bacillus coagulans* (36d1); TREDE, *Treponema denticola*; CLOD6, *Clostridium difficile* (630); BACHD, *Bacillus halodurans*; BACCE, *Bacillus cereus cytotoxic* (nvh 391–98); LEUMM, *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides* (atcc 8293/ncdo 523); and NODSP, *Nodularia spumigena* (ccy 9414). *B*, sequence conservation/variability mapped onto the molecular surface of the ATP-binding domain of DesK. Color coding is a range from red (variable) to blue (conserved) through an intermediate white. *C*, same as *B*, mapped onto the surface of the DHP domain of DesK.

binding interface (Fig. 3), only when applying the docking distance restraints *in trans*.

Further in-depth analyses were pursued with the *trans*-autophosphorylation models. Analysis of the top 300 structures sorted by score, revealed a clear-cut cluster, with best-scored structures having r.m.s.d. values of <2.5 Å (Fig. 3A). Independent runs of this docking protocol reached basically equal solutions, showing the robustness of the result (supplemental Fig. S4). Considering the output of all runs, two populations could readily be identified, which display only slight differences in the relative orientation of the ATP binding domain (Fig. 3B and supplemental Fig. 4E). The frequency distribution of interacting residue pairs shows a few of them particularly well represented (Fig. 3C). For example, in the best 10 structures from diverse runs, three of these pairs interact in >85% of the models, systematically involving residues spanning  $\alpha 5$  and the loop just N-terminal to it. We further analyzed these docking results in view of the previously identified sequence conservation patterns (Fig. 2). Certain residues, poised to interact according to the docking simulations, are indeed highly conserved. The best-scored structures show all ABD  $\alpha$ -helices contacting the DHP domain (Fig. 3B). The most represented residue pairs in the docked structures ensembles (Fig. 3C) are as follows: Arg<sup>235</sup>–Glu<sup>342</sup> (93–70%, conservation figures within HiskA<sub>3</sub> Pfam sequences for the two residues, each one, respectively, in the DHP and the ABD domains), Arg<sup>228</sup>–Glu<sup>342</sup> (35–70%), Asp<sup>289</sup>–His<sup>335</sup> (96–15%), Lys<sup>242</sup>–Glu<sup>289</sup> (44–96%), and Asp<sup>189</sup>–Lys<sup>296</sup> (99–52%). These interactions were reproducibly obtained in all top-scoring models from independent

runs. In these structures the C-terminal part of the ATP lid interacts with helix  $\alpha 1$  of the DHP, through hydrogen bonds between His<sup>335</sup> and Asp<sup>289</sup> as well as Gly<sup>199</sup> with Lys<sup>333</sup>. Other residues that seem important in making strong interactions are Asp<sup>189</sup>–Lys<sup>296</sup>, Arg<sup>228</sup>–Glu<sup>342</sup>, Arg<sup>235</sup>–Glu<sup>342</sup>, and Lys<sup>242</sup>–Glu<sup>289</sup>, again highlighting several of these candidate amino acids located in helix  $\alpha 5$  of the ABD. The final configuration of the ATP lid places Gly<sup>334</sup> near Gly<sup>192</sup>, small residues that seem important to reach the necessary close packing between the interacting domains.

The set of interacting residues suggested by these docking calculations is fully consistent with prior knowledge on the interaction surface between HKs and RRs (7, 12), implying that the ABD of DesK would be occluding a portion of the DHP–DesR interaction surface. This is consistent with the fact that DesKC cannot form a complex with DesR, except when operating as a phosphatase or phosphotransferase (13), conformations in which the ABD is immobilized away from the DHP–DesR interface.

Because the DHP domain in DesK is known to adopt different conformations (13), we extended the docking protocols described above to explore possible effects of DHP rearrangements on the predicted interdomain interaction with the ABD. Two different experimental models of the DHP domain were used: DesKC<sub>H188V</sub> (pdb 3EHH, corresponding to the phosphatase-competent state) and phosphorylated *wt* DesKC (3GIG, phosphotransferase state). The results suggest that changes in the DHP domain would hamper autophosphorylation, relative to the favorable “kinase-competent” state

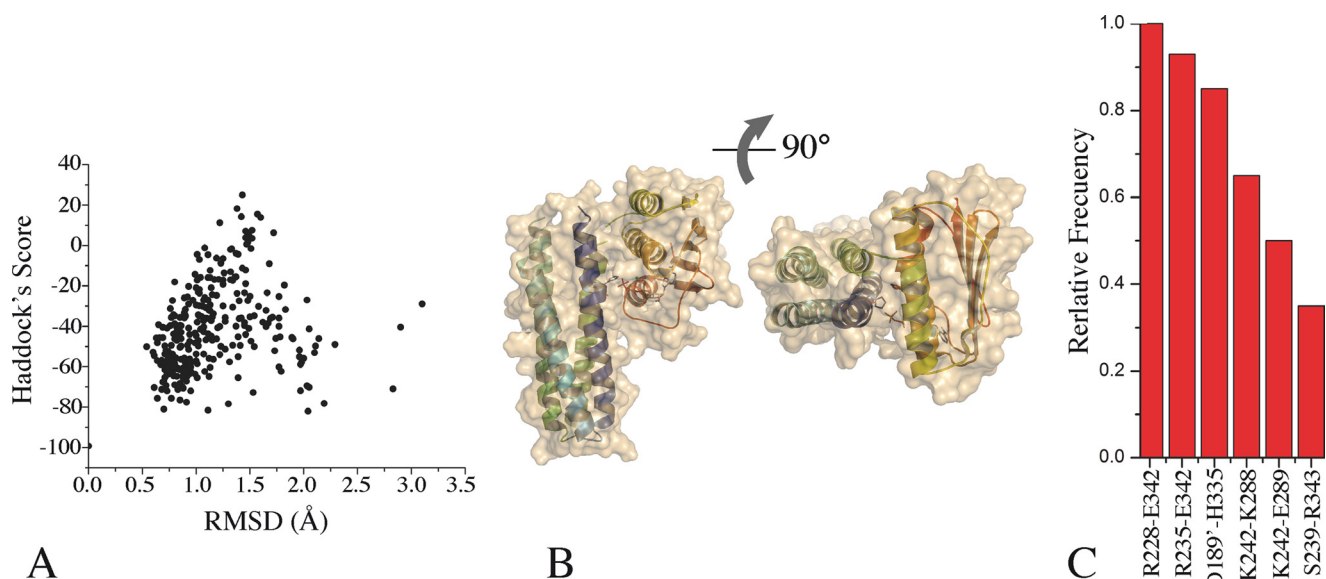
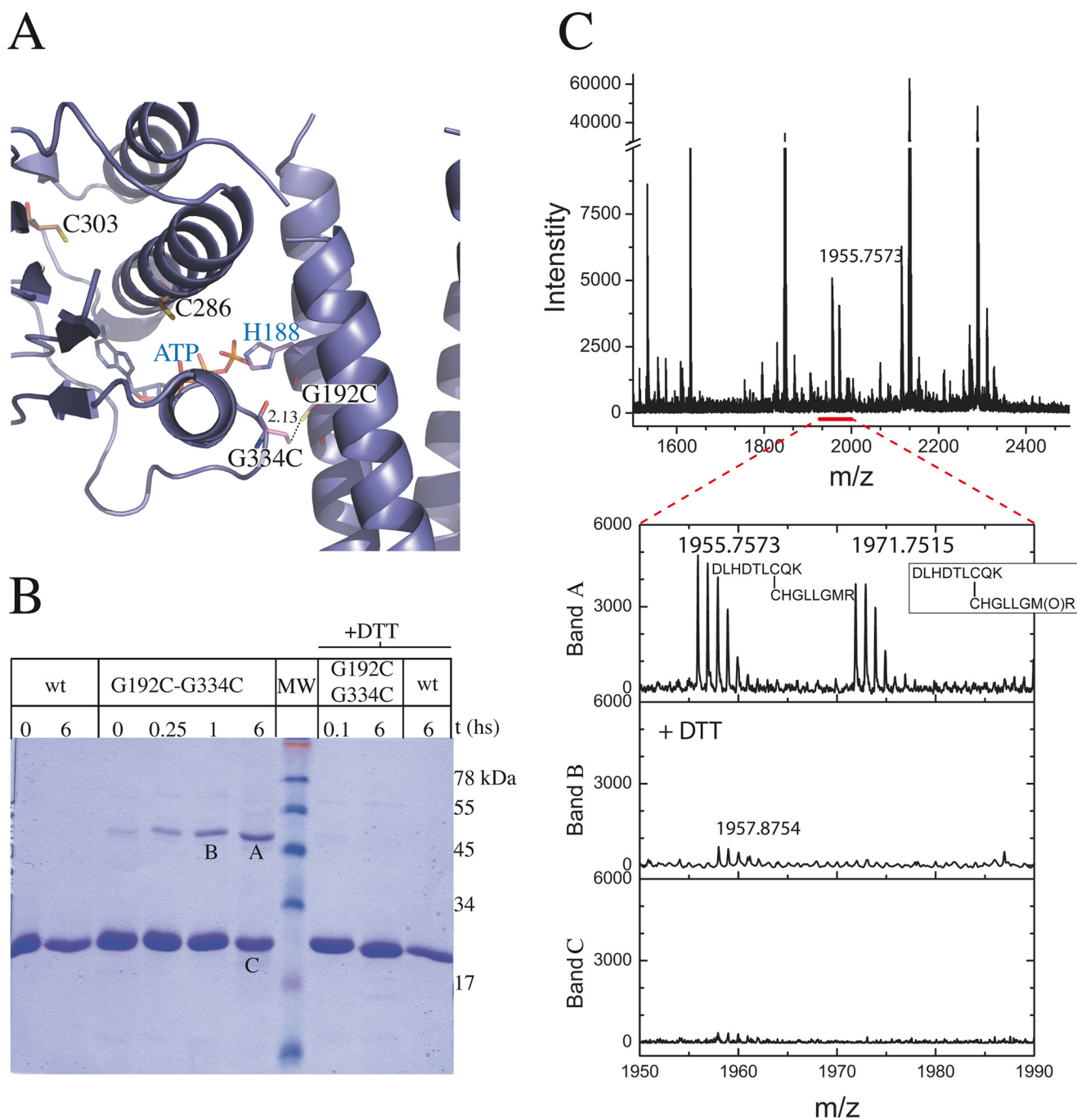


FIGURE 3. **Distance-restrained docking of DesKC ABD and DHp domains.** *A*, the global Haddock score is plotted as a function of r.m.s.d. (calculated with respect to the best scoring model). Note that the best scoring models cluster at  $<1.5$  Å r.m.s.d. *B*, three-dimensional structure of a representative high-scoring docked model of DesKC in the autophosphorylation state, in two *orthogonal* views. The solvent-accessible surface is rendered transparent to distinguish the relative organization of the domain-domain configuration (secondary structure elements are highlighted). Residues His<sup>188</sup> and ATP are shown as sticks. *C*, relative frequency of interacting residue pairs in the best 10 docked structures. The *histogram* is limited to  $>30\%$  frequencies. Engaged residues are listed, distinguishing with a single prime those belonging to the second protomer within the dimer.

(supplemental Fig. S5). In the phosphotransferase configuration of the DHp domain, the predicted buried surface area is significantly smaller, predicting a lower interaction energy (supplemental Table S2). Finally, when the DHp corresponds to the phosphatase state, the predicted interaction energy is higher, but the  $\gamma$ P of ATP is consistently found farther, distant from His<sup>188</sup> (supplemental Table S2 and Fig. S5B), and thus not compatible with autophosphorylation. This holds true even when distance restraints have been kept identical throughout the simulations.

**Trapping the Trans-autophosphorylation Intermediate State**—If the docked structures reveal a genuine specific interdomain interface during autophosphorylation, we should be able to trap the intermediate state designing structure-based cysteine mutants (Fig. 4). These engineered proteins should be able to undergo disulfide covalent linking between the ABD and the DHp domains, only if they interact as predicted according to our sequence conservation and docking analyses. With this aim we selected the G192C/G334C double mutant, taking into account the close predicted distance between Gly<sup>192</sup> and Gly<sup>334</sup> (Fig. 4A). We allowed the purified mutant protein to oxidize spontaneously in contact with air. A species corresponding to the dimer appeared very rapidly (Fig. 4B) and showed a time-dependent accumulation at the expense of the monomeric form in SDS-PAGE. The covalent intermonomeric bond was proved to be sensitive to a reducing agent (Fig. 4B). Longer oxidation times resulted in protein instability, with species of a wide range of apparent molecular weights (data not shown), although the main product was still the dimeric form. To maximize the yield of the covalent dimeric form, we also explored speeding up the oxidation, using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cu(II)-(phenanthroline)<sub>4</sub>, or Cu(II)-(bathocuproine disulfonate)<sub>4</sub>. However, even with short incubation times, accelerated oxidation conditions resulted in a rather broad range of oligomeric species of difficult

analysis (data not shown). This is probably due to the presence of two endogenous cysteines in the ABD, which seem to be required for proper ABD folding (the corresponding Cys to Ser mutants proved to be unstable in solution, data not shown). Given these issues, we could not conclude from SDS-PAGE analyses alone if the putative major disulfide bond was being formed between the two engineered cysteines as planned. To be conclusive, we submitted the air-oxidized dimeric species to MALDI-TOF mass spectrometry, comparing samples that had previously been reduced to those that had not (Fig. 4C). Indeed, the S–S bond was found to be linking the two introduced cysteines, confirming the trapping of an intermediate of the *trans*-acting autophosphorylation reaction. If this intermediate is specific, in the sense of being dependent on a particular geometric ABD-DHp orientation, the precise position of the engineered cysteines should affect the outcome of the cross-linking experiment. Two variants were thus generated, the double substituted E193C/G334C, as well as S196C/G334C. The former displaces the reactive position on the DHp domain by one residue in the helix, whereas the latter shifts it by one full helical turn. At position 193, the introduced cysteine was not able to induce the formation of any detectable dimeric species (supplemental Fig. S6A). Position 196 allowed for a minor fraction of disulfide bonding (supplemental Fig. S6B), consistent with the fact that it approximates a full helical turn shift, predicting the introduced Cys to point in the same direction as the original targeted position 192. Nonetheless, Cys<sup>196</sup> showed a significant reduction in disulfide bond formation kinetics compared with Cys<sup>192</sup>. Overall, both controls lend strong support to the specificity of the geometric arrangement between the two interacting domains, pointing to the relevance of the trapped intermediate as a *bona fide* mimetic of the autophosphorylation state.



**FIGURE 4. Disulfide cross-linking assay.** *A*, theoretical model of the mutated G192C,G334C protein in the autophosphorylation conformation, according to domain-domain docking results. Cysteine residues are shown as sticks. Predicted distance between the engineered cysteines, compatible with disulfide bond formation, is marked. *B*, SDS-PAGE of the cross-linking reaction. wt: wild-type DesKC used as control; G192C,G334C: DesKC double mutant with engineered cysteines (predicted molecular mass of the covalent dimer species: 50 kDa); +DTT: incubation with 0.1 M DTT. MW: molecular weight markers (corresponding masses are depicted on the right in kilodaltons). Air or air + DTT incubations were allowed to proceed for *t* hours. Note the DTT-induced reversion of the dimeric species to monomers. Bands A, B, and C were subsequently excised from the gel and subjected to mass spectrometry analyses. *C*, mass spectra of tryptic peptides derived from bands A, B, and C, showing coincidence of experimental and predicted *m/z* data. The spectrum segment, including peptides containing the expected disulfide bond (detailed in the inset), is enlarged. Met<sup>340</sup> is shown to be in the reduced and oxidized forms (*m/z* 1955.7573 and 1971.7515, respectively).

**Residues Involved in Domain-Domain Interaction Modulate Catalysis**—The spatial geometry of the domain-domain interaction surface has thus been predicted by docking calculations and further supported by trapping an intermediate state with structure-based engineered cysteine mutants. The interdomain interface involves a number of residue pairs. To gather experimental evidence on the actual functional role of interface

amino acids, we planned a point-mutagenesis approach, focusing on residues not involved in ATP-binding/metal coordination nor in phosphorylatable histidine protonation, because residues involved in these functions should have obvious effects in catalysis, independent from their influence in domain-domain interaction forces. Residues in helix  $\alpha 5$  of the ABD, located far from both the ATP-binding cleft and the phosphor-

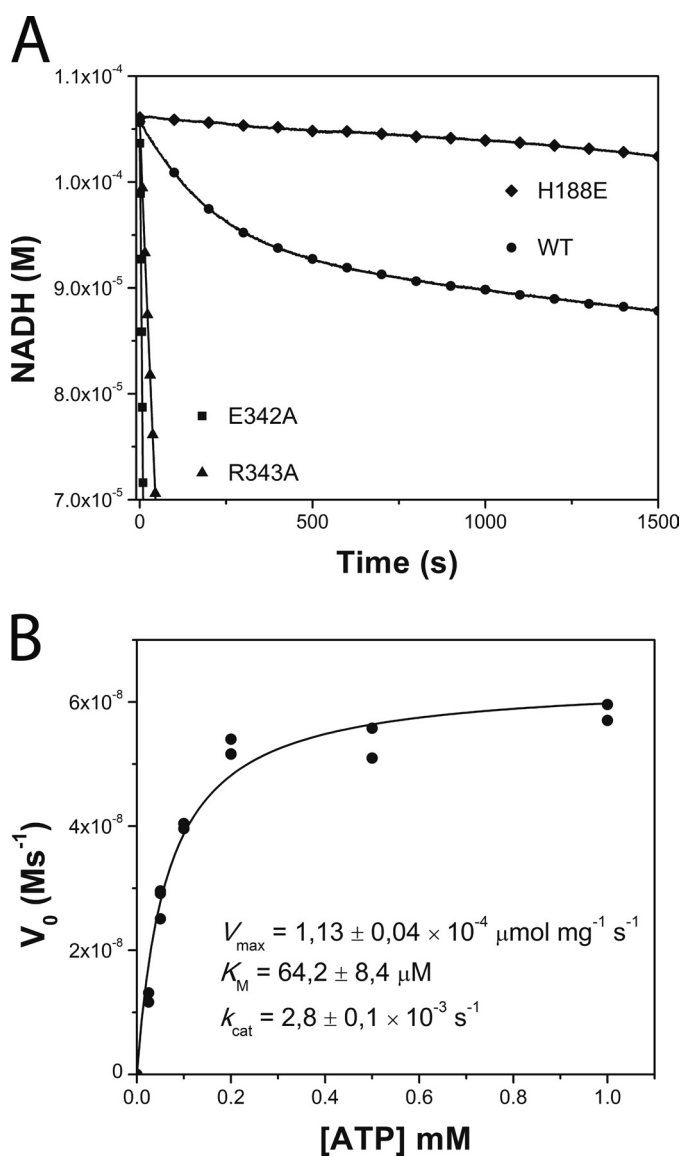


FIGURE 5. Kinetic characterization of DesKC autophosphorylation. *A*, temporal course of ATP consumption for wild-type DesKC (WT, ○) and DesKC mutants E342A (■), R343A (▲), and H188E (autophosphorylation inactive, ◆). H188E shows a basal ATPase activity corresponding to the intrinsic activity of the ABD. Wild-type DesKC displays a biphasic behavior, with an initially exponential phase followed by a second linear regime. Note the high ATP consumption rates of E342A and R343A, which showed no biphasic pattern, even in extended incubation times until NADH depletion (not shown in this plot). *B*, ATP dependence of wt DesKC autophosphorylation initial velocities. Pure DesKC (22 μM) was used.  $k_{cat}$  was calculated considering the total concentration of monomer.

ylatable histidine, thus become ideal candidates. A particularly well conserved amino acid, present in all the best-scoring ABD-DHps docked complexes, is Glu<sup>342</sup>. We substituted Glu<sup>342</sup> by alanine, and enzymatic ATP consumption activity was measured with a coupled enzyme assay (40). Surprisingly, instead of lowering activity due to the hindrance of the autophosphorylation ABD-DHps interaction, the point mutation resulted in a gain-of-activity effect, increasing >60-fold the rate of ATP consumption with respect to the wild-type enzyme (Fig. 5A). Close examination of our formerly reported DesKC structures (13) shows that Glu<sup>342</sup> is involved in interaction surfaces between the ABD and the DHp, both in the phosphatase (3EHH) and the

phosphorylated phosphotransferase (3GIG) states. Its role may thus be more complex, engaged in stabilizing other states apart from the autophosphorylation intermediate. To test this hypothesis we included a second point mutant, substituting Arg<sup>343</sup> by an alanine. Arg<sup>343</sup> has not been predicted to take part in the autophosphorylation interdomain interface, but is otherwise well conserved in the helix α5 patch and is also seen participating in ABD-DHps interactions in states other than the autokinase configuration, much as Glu<sup>342</sup> does (13). Indeed, a similar gain-of-activity effect was reproduced, resulting in a >10-fold increase of the ATP consumption rate versus wild-type DesKC (Fig. 5A).

This coupled enzyme assay conveys more information (41) than the classically used detection of radioactive phosphate addition onto the histidine during autokinase activity. Rapid kinetics of histidine spontaneous dephosphorylation may have profound effects on the steady-state phospho-histidine, eventually leading to no detection of autophosphorylation, even under high autophosphorylation rate regimes (17). To better understand the increased ATP consumption activity of the α5 point mutants, we decided to undertake a more extensive enzymatic characterization of wt DesKC using this coupled enzyme assay approach.

**Enzymatic Characterization of DesKC**—Wild-type DesKC showed a robust biphasic ATP consumption curve (Fig. 5A). At this pH phospho-His is stable (42), explaining the relatively early inflection point on the time course: once a first phase of autophosphorylation reaches completion, only a basal ATPase activity remains, which is similar to the ATPase activity of an autophosphorylation inactive mutant (DesKCH188E) (Fig. 5A). The slopes of each phase correspond to ATP consumption rate constants of  $2.8 \times 10^{-3} \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$  and  $3.1 \times 10^{-4} \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ . Attempts to lower the pH to enter into a catalytic regime were unsuccessful due to the intrinsic instability of DesKC. The kinetics observed for wild-type DesKC (Fig. 5B) fully agrees with previous reports using radioactive assays (15), resulting in kinetic parameters that are in the same range as several other HKs (supplemental Table S3). The ratio of ATP equivalents consumed during the exponential phase with respect to total moles of potentially phosphorylatable sites (i.e. DesKC monomeric species) converged reproducibly to ~0.5, giving strong support to a model of asymmetric phosphorylation. The phosphorylation of one of the monomers within the dimer appears to preclude the second event on the other monomer, in agreement with previous crystallographic evidence (13). Given the structural analysis of the ATP-binding pocket, we also asked whether DesKC is actually able to use GTP as an alternative autophosphorylation substrate. Using the coupled enzyme assay described above, substituting ATP by GTP, no nucleotide consumption was detected (data not shown; detection limit =  $-1.9 \times 10^{-10} \text{ MS}^{-1}$ ). To rule out the possibility of GTP binding, competition assays were set, indicating that an excess of GTP did not alter ATP consumption rates to any detectable extent.

## DISCUSSION

Recent reports (12) highlight the need to avoid oversimplified generalizations on mechanistic features of histidine kinases, such as *cis*- or *trans*-acting autophosphorylation, built

## ATP Binding and Autophosphorylation in Histidine Kinases

on the basis of only a few well known examples. Additional work is thus required to gain direct insight into the wide array of HK proteins and their unpredicted variations of enzymatic and/or regulatory mechanisms. We are now reporting the high resolution x-ray structure of the ATP-binding domain of an HPK7 histidine kinase, in complex with ATP. The molecular features we disclose identify particular elements likely applicable to the full HPK7 family, among which are a rather short connecting segment between the ABD and the DHp domains and a different structural organization on the immediate vicinity of the nucleotide-binding pocket. Five other HK families are still lacking experimental three-dimensional structures.

In a first line of analysis, the structure of DesK<sub>ABD</sub> is, as far as we know, the first HK domain solved in binary complex with its physiologic substrate ATP. The ATP lid loop is much shorter in DesK than in other families (such as the ones including CheA and PhoQ, among others), resulting in a correspondingly higher solvent exposure of the nucleotide (Fig. 1B and supplemental Fig. S2). Two hydrogen bonds engaging the  $\beta$  and  $\gamma$  phosphates contribute to ATP binding in DesK: Gly<sup>336</sup>[N]–ATP[O3G], Leu<sup>337</sup>[N]–ATP[O2A]. In addition, ionic interactions are readily identified: Lys<sup>296</sup> and His<sup>297</sup> on one side, and His<sup>335</sup> on the other, display side-chain nitrogens at short interaction distances to the ATP  $\beta$  and  $\gamma$  phosphates. Following proposed mechanisms for nucleotidase and phosphotransfer catalysis, these cationic residues are well positioned to play a functional role in stabilizing the negative charge that builds up on phosphate  $\beta$  upon  $\beta$ – $\gamma$  bond breakage (37). Although HKs belong to the GHF superfamily of slow ATPases, HK intrinsic ATPase activities have been reported to be much lower than the corresponding ones for DNA gyrase, MutL, or Hsp90. Nevertheless, for poorly documented reasons, there are no available experimental structures of HKs in complex with ATP: the triphospho-nucleosides hydrolyze in the course of the crystallization experiments, seemingly through a residual ATPase activity, even in some cases using “non-hydrolyzable” ATP analogues (24). This has stimulated and justified *in silico* simulations of ATP·HK complexes (39). The fact that HKs with higher ATPase activity have a key basic residue replacing His<sup>335</sup> (e.g. Arg<sup>434</sup> in PhoQ or Lys<sup>494</sup> in CheA) is consistent with the hypothesized ionic stabilization of the negative charge on phosphate  $\beta$  and could explain a lower ATPase activity in DesK-like HKs. In contrast, previous suggestions (35) ascribed the higher ATPase activity of GHF proteins, such as MutL, to the supposedly conserved substitution of a glutamate residue (Glu<sup>29</sup> in MutL) replacing an Asn or His in HKs (Asn<sup>385</sup> in PhoQ, and His<sup>405</sup> in CheA). Our structure argues against this simple explanation, because the ABD of DesK, displaying still lower intrinsic ATPase activity (allowing us to trap the ATP·DesK complex), shows a glutamate at this position (Glu<sup>289</sup>), as in true ATPases. This glutamate is actually well conserved in the HPK7 family of HKs (supplemental Fig. S1), as well as in other related enzymes with serine-kinase activity (3). It will be relevant to test whether other HPK7 HKs such as NarX-, NarQ-, ComP-, UhpB-, or LiaS-like (43), display low/null intrinsic ATPase activity, in agreement with our structure-based hypothesis.

The number of DesKC-ATP interactions in the nucleotide-binding pocket denotes a snug fit that allowed us to predict the

specific hindrance of GTP binding, in comparison with other HKs able to use the guanosine compound as autophosphorylation substrate (34). This was verified experimentally, observing that DesKC does not use GTP as a substrate, and neither does it bind GTP to outcompete the adenosine species.

In a second line of thought, the results we now report lend experimental support and atomic detail information to the concept that the autophosphorylation reaction in HKs depends on a specific and asymmetric interaction surface between the ATP binding and the dimerization phosphotransfer domains. This hypothesis is supported by sequence conservation, domain-domain interaction predictions, and the consequent trapping of a disulfide-linked covalent dimer.

The conserved surface patch on the DHp domain (Fig. 2C), poised to interact with the ABD in the autophosphorylation reaction, is distinct from the RR-contacting region, according to recent *bona fide* HK-RR crystal structures (12). This is consistent with reported RR specificity re-wiring results (6), because the authors only mutated seven (or less) residues, all located in the tip of the four-helix bundle, distal from the phosphorylatable histidine. The resultant chimeric HKs maintain autophosphorylation activity while changing RR specificity. The two patches, one restraining autophosphorylation, the other RR-phosphotransfer specificity, appear to overlap only partially in DesKC. Nevertheless, this does predict a competitive exclusion scenario in the HisKA\_3 family, whereby a freely moving ABD would represent a higher effective concentration partner than the diffusible RR. Our recent findings of ABD mobility control along the HK catalytic cycle (13) and correlated modulation of RR association are fully consistent with this idea.

A novel function also emerges, which concerns the conserved patch of residues in helix  $\alpha 5$  of the ATP-binding domain. Indeed, point mutations E342A and R343A in this region induce significant effects on the enzymatic activity. To our surprise, instead of diminishing autophosphorylation rates due to destabilization of the interdomain complex, ATP consumption was significantly accelerated. This effect is compatible with two possible scenarios: an increased and sustained autophosphorylation activity under a catalytic regime, implying continuous dephosphorylation of the phospho-His, or, instead, an allosteric effect on the ATP-binding pocket, dramatically augmenting the intrinsic ATPase reaction. The latter hypothesis seems less likely, given the solvent-exposed location of the mutated residues and their distance to the ATP-binding pocket. A more direct explanation comes from structural analyses. This particular region of  $\alpha 5$  on the ABD domain is directly involved in distinct DHp-ABD interdomain interactions on the other functional states of the enzyme, including both the phosphorylated phosphotransferase-competent state, as well as on the phosphatase configuration (13). Hence, the relative population of each functional state at any given time could well be modulated by these interdomain interactions. By mutating Glu<sup>342</sup> and Arg<sup>343</sup> we have destabilized the phosphotransferase and/or the phosphatase states to a greater extent than the kinase-competent one. Phospho-histidine might become more labile in the absence of the appropriate switch to an asymmetrically phosphorylated phosphotransferase conformation, resulting in

exacerbated ATP consumption. The strong negative cooperativity effect of the phosphorylated monomer onto the unphosphorylated one within the dimer, inhibiting an otherwise symmetric phosphorylation, had been previously suggested by our group (13) and now confirmed by the autophosphorylation reaction stoichiometry. The fact that the phosphorylated state is strongly asymmetric could clearly result in differential modulation of phospho-histidine stability through ABD mobility control and/or local environment modifications. The three-dimensional structure of phosphorylated DesKC (13) shows that the ABD of monomer A (ABD-A) is immobilized, involving residues in helix  $\alpha 5$ , through interactions with the DHp. The ABD-B, instead, remains freely mobile. The interesting point is that the fixed ABD-A remains in close proximity of the phospho-His of monomer B. Given that DesR is able to interact with the phosphorylated kinase, and that a mobile ABD seems to be able to outcompete DesR binding, the asymmetric phosphotransferase state further supports autophosphorylation happening in *trans* in DesK. It also shows how  $\alpha 5$  in the ABD can directly participate in the stabilization of this state. This hypothesis of differentially populated three states in the sensor kinase awaits further experimental confirmations currently underway, one of the main difficulties being the few residues predicted to stabilize only one of the three states, added to the relative instability of the whole protein prone to aggregation after mutagenesis of key positions.

The prediction of the docked domain-domain configuration guided the design of engineered cysteines, able to promote disulfide bonding only if the predicted conformations are actually sampled in solution. In this way, a putative autophosphorylation intermediate state was indeed trapped, also suggesting that DesK performs the autophosphorylation reaction in *trans*, one monomer phosphorylating the other within the dimer. Crystallographic and biophysical analyses of this *en transfer* autophosphorylation state are currently underway. Valuable information will thus become available to understand the autophosphorylation step in histidine kinases and attempt transduction uncoupling at precise steps of the signaling pathways.

*Acknowledgments*—At the Institut Pasteur de Montevideo, we thank Matias Machado for valuable help in using Haddock and Ariel Chapparro for computation scripts, and the staff from the Units of Analytical Biochemistry (mass spectrometry analyses) and Recombinant Proteins (protein production and purification). The plasmids used to express recombinant DesKC and DesR were kindly donated by Diego de Mendoza.

## REFERENCES

1. Plowman, G. D., Sudarsanam, S., Bingham, J., Whyte, D., and Hunter, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13603–13610
2. Wolanin, P. M., Thomason, P. A., and Stock, J. B. (2002) *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3013
3. Machius, M., Chuang, J. L., Wynn, R. M., Tomchick, D. R., and Chuang, D. T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11218–11223
4. Hsing, W., Russo, F. D., Bernd, K. K., and Silhavy, T. J. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4538–4546
5. Laub, M. T., and Goulian, M. (2007) *Annu. Rev. Genet.* **41**, 121–145
6. Siryaporn, A., and Goulian, M. (2008) *Mol. Microbiol.* **70**, 494–506

7. Skerker, J. M., Perchuk, B. S., Siryaporn, A., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Goulian, M., and Laub, M. T. (2008) *Cell* **133**, 1043–1054
8. Dutta, R., Qin, L., and Inouye, M. (1999) *Mol. Microbiol.* **34**, 633–640
9. Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hottz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L., and Bateman, A. (2008) *Nucleic Acids Res.* **36**, D281–288
10. Cai, S. J., and Inouye, M. (2003) *J. Mol. Biol.* **329**, 495–503
11. Ninfa, E. G., Atkinson, M. R., Kamberov, E. S., and Ninfa, A. J. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 7024–7032
12. Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009) *Cell* **139**, 325–336
13. Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M. C., Haouz, A., Alzari, P. M., de Mendoza, D., and Buschiazzi, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16185–16190
14. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R., and Simon, M. I. (1999) *Cell* **96**, 131–141
15. Albanesi, D., Mansilla, M. C., and de Mendoza, D. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 2655–2663
16. Aguilar, P. S., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., and de Mendoza, D. (2001) *EMBO J.* **20**, 1681–1691
17. Noriega, C. E., Schmidt, R., Gray, M. J., Chen, L. L., and Stewart, V. (2008) *J. Bacteriol.* **190**, 3869–3876
18. Cybulski, L. E., del Solar, G., Craig, P. O., Espinosa, M., and de Mendoza, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 39340–39347
19. van den Berg, S., Löfdahl, P. A., Härd, T., and Berglund, H. (2006) *J. Biotechnol.* **121**, 291–298
20. Collaborative Computational Project Number 4. (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
21. de Vries, S. J., van Dijk, A. D., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A. M. (2007) *Proteins* **69**, 726–733
22. Brunger, A. T. (2007) *Nat. Protoc.* **2**, 2728–2733
23. Bilwes, A. M., Quezada, C. M., Croal, L. R., Crane, B. R., and Simon, M. I. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 353–360
24. Marina, A., Waldburger, C. D., and Hendrickson, W. A. (2005) *EMBO J.* **24**, 4247–4259
25. Lott, J. S., Paget, B., Johnston, J. M., Delbaere, L. T., Sigrell-Simon, J. A., Banfield, M. J., and Baker, E. N. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 22131–22141
26. Surette, M. G., Levit, M., Liu, Y., Lukat, G., Ninfa, E. G., Ninfa, A., and Stock, J. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 939–945
27. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38
28. Markowitz, V. M., and Kyripides, N. C. (2007) *Methods Mol. Biol.* **395**, 35–56
29. Katoh, K., and Toh, H. (2008) *Brief Bioinform.* **9**, 286–298
30. Lindsley, J. E. (2001) *Methods Mol. Biol.* **95**, 57–64
31. Espenson, J. (1995) *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2nd Ed., pp. 15–45, McGraw-Hill Book Co, New York
32. Dehner, A., Furrer, J., Richter, K., Schuster, I., Buchner, J., and Kessler, H. (2003) *ChemBioChem* **4**, 870–877
33. Dutta, R., and Inouye, M. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 24–28
34. Scaramozzino, F., White, A., Perego, M., and Hoch, J. A. (2009) *J. Bacteriol.* **191**, 687–692
35. Marina, A., Mott, C., Auyzenberg, A., Hendrickson, W. A., and Waldburger, C. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 41182–41190
36. Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215
37. Kötting, C., Bleszenohl, M., Suveyzdis, Y., Goody, R. S., Wittinghofer, A., and Gerwert, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 13911–13916
38. Schweins, T., Geyer, M., Scheffzek, K., Warshel, A., Kalbitzer, H. R., and Wittinghofer, A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 36–44
39. Zhang, J., Xu, Y., Shen, J., Luo, X., Chen, J., Chen, K., Zhu, W., and Jiang, H. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11709–11719
40. Tawa, P., and Stewart, R. C. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 4210–4218
41. Tawa, P., and Stewart, R. C. (1994) *Biochemistry* **33**, 7917–7924
42. Hultquist, D. E., Moyer, R. W., and Boyer, P. D. (1966) *Biochemistry* **5**, 322–331
43. Mascher, T., Helmann, J. D., and Udden, G. (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–938

# Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase

Daniela Albanesi<sup>a,b,1</sup>, Mariana Martín<sup>b,1</sup>, Felipe Trajtenberg<sup>c</sup>, María C. Mansilla<sup>b</sup>, Ahmed Haouz<sup>d</sup>, Pedro M. Alzari<sup>a</sup>, Diego de Mendoza<sup>b</sup>, and Alejandro Buschiazzi<sup>a,c,2</sup>

<sup>a</sup>Institut Pasteur, Unité de Biochimie Structurale and <sup>d</sup>Plateforme de Cristallogénèse et Diffraction de Rayons X, URA 2185 Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 75015, France; <sup>b</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario 2000, Argentina; and <sup>c</sup>Institut Pasteur de Montevideo, Unidad de Cristalografía de Proteínas, Montevideo 11400, Uruguay

Edited by E. Peter Greenberg, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, and approved August 3, 2009 (received for review June 15, 2009)

Temperature sensing is essential for the survival of living cells. A major challenge is to understand how a biological thermometer processes thermal information to optimize cellular functions. Using structural and biochemical approaches, we show that the thermosensitive histidine kinase, DesK, from *Bacillus subtilis* is cold-activated through specific interhelical rearrangements in its central four-helix bundle domain. As revealed by the crystal structures of DesK in different functional states, the plasticity of this helical domain influences the catalytic activities of the protein, either by modifying the mobility of the ATP-binding domains for autokinase activity or by modulating binding of the cognate response regulator to sustain the phosphotransferase and phosphatase activities. The structural and biochemical data suggest a model in which the transmembrane sensor domain of DesK promotes these structural changes through conformational signals transmitted by the membrane-connecting two-helical coiled-coil, ultimately controlling the alternation between output autokinase and phosphatase activities. The structural comparison of the different DesK variants indicates that incoming signals can take the form of helix rotations and asymmetric helical bends similar to those reported for other sensing systems, suggesting that a similar switching mechanism could be operational in a wide range of sensor histidine kinases.

coiled-coil | conformational rearrangement | crystallography | signal transduction

Cold sensors are ubiquitous integral membrane proteins found in all kingdoms of life. They are involved in many physiological roles, including membrane remodeling, chemotaxis, touch, and pain (1–3). The histidine kinase (HK), DesK, from *Bacillus subtilis* is the founding example of a membrane-bound thermosensor suited to remodel membrane fluidity when the ambient temperature drops below approximately 30 °C (Fig. S1). Several lines of evidence show that the cold thermal stimulus is detected by DesK, which together with the response regulator (RR), DesR, constitutes a canonical two-component system (TCS). In vivo experiments have demonstrated that DesK acts as a kinase at cold temperatures (4), ultimately activating the transcription of the gene *des* coding for the acyl lipid desaturase  $\Delta 5$ -Des (1, 5). The increased fraction of unsaturated fatty acids in the membrane then restores fluidity and shuts off the kinase activity of DesK, terminating transcription.

Histidine kinases are multifunctional enzymes that share a conserved intracellular catalytic core linked to a high diversity of signal-sensing domains. Through still poorly understood mechanisms, HKs are able to catalyze autokinase, phosphotransferase, and protein phosphatase reactions in response to external stimuli, ultimately controlling the degree of phosphorylation of their cognate RR and hence the functional outcome of the signaling pathway. DesK is a class I HK (6) with an N-terminal sensor domain ( $\approx 150$  residues) composed of four or five transmembrane (TM) segments connected to a C-terminal cytoplasmic domain (DesKC,  $\approx 220$  residues) (4) that belongs to the HisKA\_3 subfamily (PFAM

00730) of HKs (7). To investigate how fluctuations in ambient temperature regulate the catalytic activities of DesK, we solved the crystal structure of its catalytic core in different functional states and determined the functional properties of the full-length sensor in pure lipids vesicles. The results highlight the remarkable plasticity of the central four-helix bundle domain as the protein proceeds along the catalytic cycle, and suggest a signal-dependent regulation model that may be operational in a wide range of HKs.

## Results

To uncover the structural features of DesK associated with the different functional states of the protein, we carried out structural studies of DesKC before and after autophosphorylation. We also characterized two point mutants of the catalytic domain, in which the phosphorylatable histidine residue (H188) was substituted either by valine (DesKC<sub>H188V</sub>), a mutant known to retain the phosphatase activity of the wild-type protein (4), or by glutamic acid (DesKC<sub>H188E</sub>), sought to mimic the phosphorylated state of the enzyme. The 3D structures of the different DesKC variants were determined in six different crystalline environments (Table 1) using multiwavelength anomalous diffraction (MAD) and molecular replacement methods (SI Text and Table S1).

The catalytic core of DesK (Fig. 1A–C) shows the characteristic homodimeric structure observed in other HKs (8). Each monomer consists of an N-terminal antiparallel 2-helix hairpin (helices  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) that includes the phosphorylatable H188, connected by a short linker region (residues 243–245) to a C-terminal ATP-binding domain (ABD). The helical hairpins of two monomers interact with each other to form a central four-helix bundle (4-HB) domain, known as the DHp (for Dimerization and Histidine phosphotransfer) domain. In each monomer, the N-terminal part of helix  $\alpha 1$  extends beyond the 4-HB, connecting the catalytic core with the TM sensor domain. The structure of the ABD, composed by a five-stranded  $\beta$ -sheet opposed by a layer of three  $\alpha$ -helices, is similar to that of other members of the GHKL superfamily (9) and remains essentially unchanged in the different DesKC structures (Fig. 1D), except for a high mobility of the ATP lid.

**Three Distinct Conformational States of DesKC Variants.** The structures of DesKC reveal three distinct conformational states of the

Author contributions: A.H., P.M.A., D.d.M., and A.B. designed research; D.A., M.M., F.T., A.H., P.M.A., D.d.M., and A.B. performed research; D.A., M.M., F.T., M.C.M., and A.H. contributed new reagents/analytic tools; D.A., M.M., F.T., M.C.M., P.M.A., D.d.M., and A.B. analyzed data; and P.M.A., D.d.M., and A.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 3EHF, 3EHJ, 3EJH, 3GIE, 3GIF, and 3GIG).

<sup>1</sup>D.A. and M.M. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: alebus@pasteur.edu.uy.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0906699106/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0906699106/DCSupplemental).

**Table 1. Crystal structures of DesKC variants**

Structure	DesKC modification	Ligand	Resolution, Å
DesKC $_{\Delta 174}$	Short construct*	AMP-PCP	3.1
DesKC-P	Phosphorylated	AMP-PCP	3.5
E188a	His188-Glu	ADP	2.7
E188b	His188-Glu	AMP-PCP	2.65
V188a	His188-Val	AMP-PCP	2.5
V188b	His188-Val	ADP	2.1

Further details are provided in Table S1.

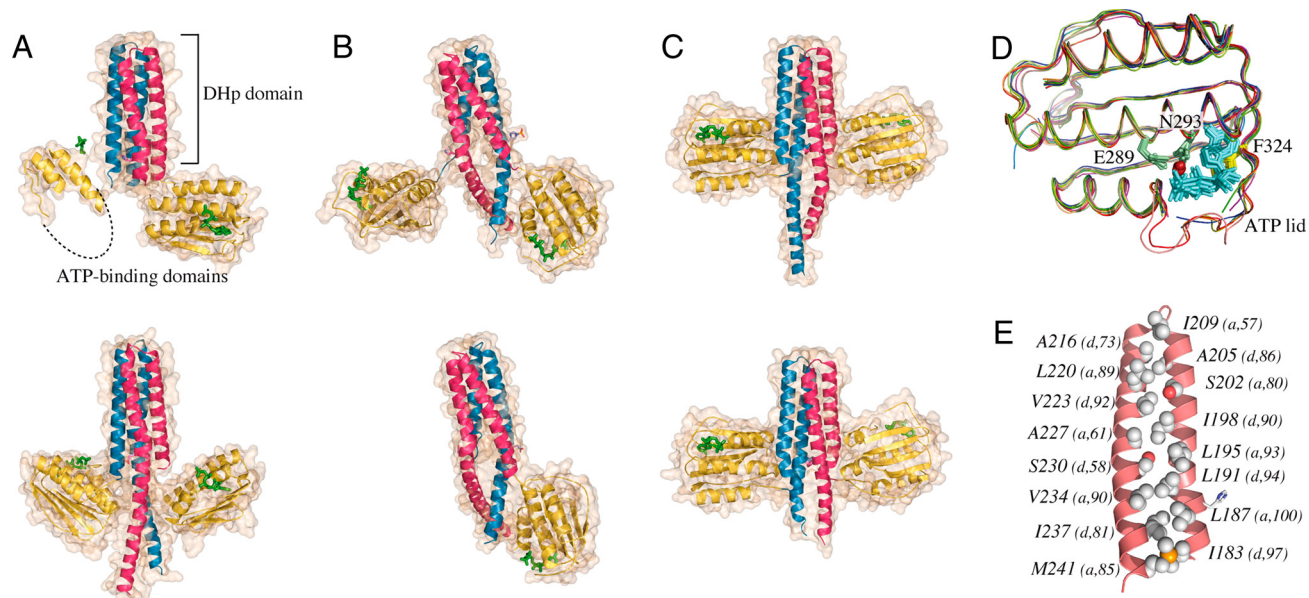
\*The DesKC construct includes only the catalytic core (residues 175–370).

protein, differing in the interhelical packing of the central DHp domain and the relative mobility and orientation of the ABDs. As indicated by the overall root-mean-square deviations (rmsd) between all identical residues of the homodimer (Table S2), two conformational states can be assigned respectively to unphosphorylated (Fig. 1A) and phosphorylated (Fig. 1B) DesKC (respectively, DesKC $_{\Delta 174}$  and DesKC-P, rmsd of 12.7 Å). The third conformational state is represented by two independent structures of the mutant DesKC $_{H188V}$  (monoclinic V188a and orthorhombic V188b) (Fig. 1C), which are similar to each other (rmsd of 1.13 Å) but significantly different from the previous structures (rmsd values of 14.2–15.9 Å). Finally, the independent structures of the point mutant DesKC $_{H188E}$  (orthorhombic E188a and monoclinic E188b) are respectively closer to those of phosphorylated DesKC (rmsd of 2.2 Å between E188a and DesKC-P, Fig. 1B) and unphosphorylated DesKC (rmsd of 3.77 Å between E188b and DesKC $_{\Delta 174}$ , Fig. 1A) than to each other (rmsd of 9.5 Å between E188a and E188b). The higher rmsd between DesKC $_{\Delta 174}$  and E188b is not due to the modified side chain, which is fully solvated and not involved in intramolecular interactions, but to the internal flexibility of the protein (Fig. S2), stabilized by a different molecular environment

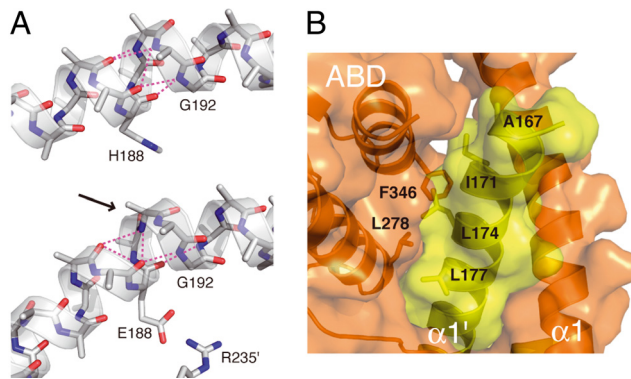
in each case. Although the DesKC homodimer exhibits rather extensive intermolecular contacts in some crystal forms, these interactions appear to have only a marginal effect on the observed conformational states, because the same overall structure has been obtained in two distinct crystal forms for each state.

**DesKC $_{\Delta 174}$  and E188b Display Mobile ATP-Binding Domains.** The DHp domain in DesKC $_{\Delta 174}$  and E188b is a left-handed antiparallel coiled-coil (10) similar to other dimerization domains of the HK superfamily. The core of the 4-HB is stabilized by eight layers of hydrophobic residues, corresponding to four coiled-coil heptad repeats (11) on helices  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ . The heptad positions can be identified with letters from *a* to *g* (12), where *a* and *d* are the expected hydrophobic residues involved in the interface. The key interacting positions (shown in Fig. 1E) involve mostly hydrophobic aminoacids, which are conserved in a large majority of HKs belonging to the HisKA\_3 subfamily. Assignment of these residues to alternate *a* and *d* positions (Fig. 1E) requires a single residue insertion ('skip' residue) just after L187 '*a*', an insertion that promotes formation of a helical bulge at the phosphorylatable H188 to preserve the hydrophobic core (Fig. S34). Interestingly, a helical kink in the same region is promoted in other HKs by the presence of a highly conserved proline (absent in DesK), as seen in the structures of TM0853 (13) and KinB (14), the only other two HKs for which the structure of the entire cytoplasmic domain is available.

The conformational state typified by the structures of DesKC $_{\Delta 174}$  and E188b (Fig. 1A) is characterized by a flexible quaternary organization. The individual ABDs in each structure are either not visible in the electron density (as in DesKC $_{\Delta 174}$ , which lacks the 20 N-terminal residues of helix  $\alpha 1$ ) or show few, non-specific interactions with this region, outside the 4-HB (as in E188b, which includes the entire cytoplasmic domain). This internal flexibility contrasts with the more extensive DHp-ABD association observed in both TM0853 and KinB, and is suggestive of an autokinase-competent



**Fig. 1.** Three distinct conformational states of DesKC. Cartoon representations of the DesK homodimers, with the two  $\alpha$ -helical hairpins from the DHp domain highlighted in pink ( $\alpha 1$ ) and blue ( $\alpha 2$ ), the ABDs colored in yellow, and bound nucleotides in green. (A) Overall structures of DesKC $_{\Delta 174}$  (Top) and E188b (Bottom), with mobile ABDs. (B) Structure of DesKC-P (Top), similar to E188a (Bottom), rotated approximately 60° around the vertical axis with respect to (A) for clarity. (C) Structures of V188a (Top) and V188b (Bottom). (D) Superposition of the 11 independent ABDs seen in all DesKC variants. The bound nucleotide is shown in cyan, with the adenine ring stacked against F324 (in yellow). The Mg<sup>2+</sup> ion (in red) contacts the nucleotide phosphates and two residues (E289 and N293, in green) that belong to the conserved N box (17). The ATP-lid (residues 321–334) shows the largest structural differences and is partially disordered in many crystal structures. (E) Hydrophobic residues (CPK spheres) of one helical hairpin that, upon dimerization, forms the core of the 4-HB in DesKC $_{\Delta 174}$ . For each residue, its *a/d* position within the heptad repeats and the percentage of members of the HisKA\_3 subfamily having a hydrophobic residue (AVLMI) at the same position are indicated in parenthesis.

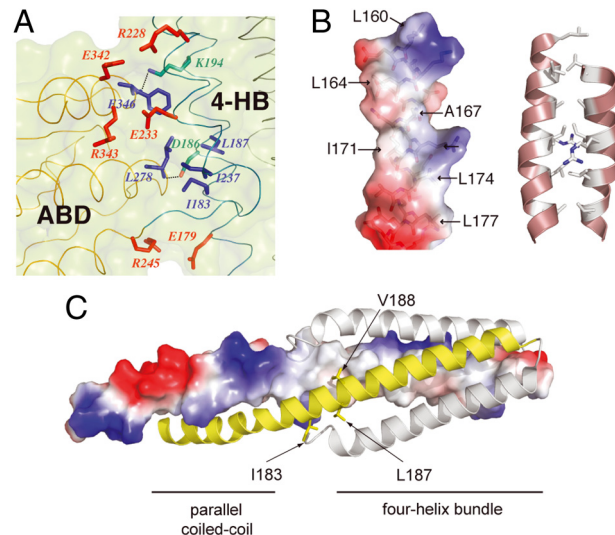


**Fig. 2.** Pronounced helical bending in phosphorylated DesKC. (A) The pattern of intrahelical H bonds in monomer A of DesKC-P (Top) and E188a (Bottom) around the phosphorylatable histidine is modified as a consequence of a helical bulge, facilitated by the presence of a conserved glycine (G192). Note that the carbonyl oxygen of D189 (arrow) is not involved in H bond interactions. Other side-chains are omitted for clarity. (B) Close view of the interaction between helix  $\alpha 1$  and the ABD from the opposite monomer in E188a.

(K<sup>+</sup>) state. Indeed, a single rigid-body rotation movement pivoting on the interdomain hinge residue G243 can bring the nucleotide  $\gamma$ -phosphate from one ABD into physical contact with the fully exposed imidazole ring of H188 in the second protomer. The contact surfaces display a good overall complementarity (Fig. S4) and several conserved residues are favorably positioned to mediate DHP-ABD domain interactions, including two predicted salt bridges (K296-D189 and R235-E289), the presence of a glycine at position 192 providing space to accommodate the  $\gamma$ -phosphate *en transfer*, and an exposed patch of basic residues on the DHP that is well located to interact with acidic residues in the ATP-lid of the ABD (Fig. S4B). This model is consistent with *trans* autophosphorylation within the homodimer (15), because intramonomeric phosphorylation would require the partial, but energetically costly, unwinding of the DHP  $\alpha 2$  helix in the absence of a longer, flexible linker (16). Experimental evidence among members of this and other subfamilies, will ultimately lead to a full understanding of autophosphorylation mechanisms, not excluding HK clusters displaying *cis*-phosphorylation in the case of significantly different interdomain organization.

**DesKC-P and E188a Exhibit an Asymmetric Homodimer with a Pronounced Helical Bending.** To obtain structural information on the phosphotransferase-competent state of DesKC, we not only used the DesKC<sub>H188E</sub> mutant, but also exploited the alkaline stability of the phosphoramidate bond by carrying out the autophosphorylation reaction at pH 8.5 before crystallogenesis. The 3D structures of DesKC-P and the orthorhombic form of DesKC<sub>H188E</sub> (E188a) reveal a similar asymmetric homodimer (Fig. 1B), in which one ABD interacts with the central helix  $\alpha 1$  while the other is either disordered (E188a) or makes no contacts with the rest of the protein (DesKC-P). A pronounced bending angle of helix  $\alpha 1$  is seen in both monomers, with values in the range 33–35° and 50–54° for each of them. The phosphorylation-induced change in helical direction promotes a local rearrangement of intrahelical hydrogen bonds at the kink position near H188 (Fig. 2A), possibly facilitated by a higher mobility of this region as seen for EnvZ (17). As mentioned before, the same kink is also present in unphosphorylated DesKC (Fig. S3B), but in this case the bending angle of helix  $\alpha 1$  is much smaller (12–19° for all independent monomers in DesKC <sub>$\Delta$ 174</sub> and E188b).

The asymmetric conformation and pronounced helical bending appear to be stabilized by two different factors: the partial association between the ABD and the central helical domain and the electrostatic interaction of the phosphohistidine (or the E188



**Fig. 3.** Extensive intradomain interactions in DesKC<sub>H188V</sub>. (A) Close view of the interaction between the ABDs and the DHP domain in DesKC<sub>H188V</sub>. Key residues are colored according to the type of interaction (electrostatic in red, hydrophobic in blue, and H-bonding in green). (B) Cartoon representation (Right) of the two-helical coiled-coil formed by the homodimerization of residues 160–180. Core hydrophobic residues are shown in stick representation. Molecular surface representation (Left) of the same helical region for one monomer, showing the exposed hydrophobic patch. (C) Overall view of the parallel coiled-coil and the 4-HB in DesKC<sub>H188V</sub>. The molecular surface color-coded according to electrostatic charges is shown for helix  $\alpha 1$  in one monomer. The side-chains of I183 and L187, which were part of the DHP core in DesKC <sub>$\Delta$ 174</sub>, are now at the outer surface of the domain (engaged in interactions with the ABD domain, not shown).

carboxylate) with conserved basic residues. The ABD association involves a hydrophobic contact surface of 420–450 Å<sup>2</sup> between two regions of the ABD (the N terminus of  $\alpha 4$  and the C terminus of  $\alpha 5$ ) and a patch of hydrophobic residues on one face of helix  $\alpha 1'$  (including A167', I171', L174' and L177') from the opposite monomer (Fig. 2B). Steric clashes in helix  $\alpha 1$  preclude a similar interaction to occur simultaneously in both monomers, accounting in part for the observed conformational asymmetry. In DesKC-P the electron density maps strongly suggest the presence of a phosphate group attached to one H188 residue within the dimer, although the low resolution of this structure prevents a detailed analysis. Instead, in the analogous E188a structure the carboxylate group of E188 from each monomer forms a salt-bridge with either R235 or K242 from the opposite protomer (Fig. S3C), two positions at which a basic residue is conserved in a large majority of members of the HisKA\_3 subfamily. These observations strongly argue for the functional relevance of the asymmetric DesKC conformation, in agreement with recent reports emphasizing the importance of structural asymmetry in other signal transduction systems (18, 19).

**The Mutation H188V Triggers Formation of an N-terminal 2-Helical Coiled-Coil and Extensive DHP-ABD Association.** The substitution of H188 by valine provides a suitable model for the phosphatase-competent state of DesK, because DesKC<sub>H188V</sub> was shown to retain specific phosphatase activity toward the response regulator DesR at comparable levels to those of wild-type DesK, both *in vitro* and *in vivo* (4). The two independent structures of DesKC<sub>H188V</sub> are very similar, showing a more compact and rigid conformation (Fig. 1C) than those of the previous DesKC variants. This is due to extensive intramolecular interactions involving both a tighter DHP-ABD interaction in each monomer and the formation of a parallel 2-helical coiled-coil, which continues the 4-HB toward the membrane in full-length DesK. The DHP-ABD association (Fig. 3A) is comparable to that observed in the two other HKs of known structure,

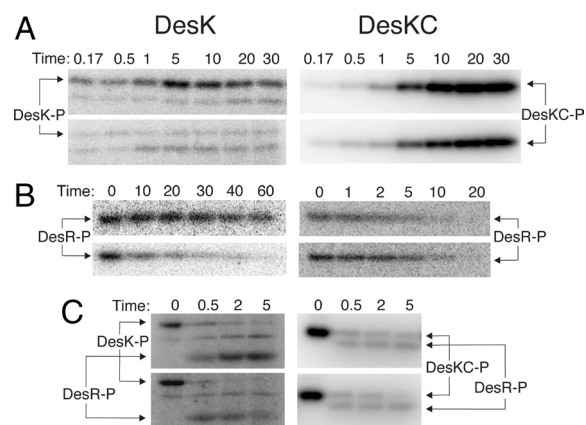
TM0853 and KinB (13, 14). The interaction buries approximately 1,100–1,200 Å<sup>2</sup> and includes hydrophobic contacts (I183, L187, and I237 from the DHP and L278 and F346 from the ABD), two H-bonds (K194NZ-F346O and D186OD2-L278N and three salt bridges (E179-R245; E233-R343; and E342-R228). The interacting surface on the DHP domain was first identified as a weakly conserved motif in HKs (20) and mutations mapping in this region were found in EnvZ when searching for mutants that abrogated phosphatase activity (21), suggesting the importance of ABD sequestering for this reaction.

The coiled-coil structure of the 4-HB in DesKC<sub>H188V</sub> continues toward the N terminus through a parallel left-handed 2-helix coiled-coil at the N-terminal region (Fig. 3B), a feature not seen in the other structures. This 2-helix coiled-coil increases the dimerization interface of the protein (≈1,800 Å<sup>2</sup> compared to ≈1,450 Å<sup>2</sup> in the 4-HB alone) and includes three heptad repeats, with the internal hydrophobic positions occupied by L160 (d), L164 (a), A167 (d), I171 (a), L174 (d), and L177 (g) (Fig. 3B). The connection of these heptad repeats with those of the 4-HB (Fig. 1D) implies a ‘stutter’ (12) or deletion of three positions between L177 and Q181. Formation of the 2-helical coiled-coil has two important consequences. First, they relieve the bulge on helical turn 187–191 observed in the previous structures, now showing a regular α-helical architecture and a ‘diamond’-shaped cross-section of the bundle (Fig. S5A). Second, a hydrophobic patch (including I183 and L187) in helix α1, which was buried within the DHP core in both DesKC<sub>Δ174</sub> and DesKC-P (Fig. 1D), is now accessible at the DHP surface for interaction with the ABD (Fig. 3C).

Although the overall structural change is triggered by the point mutation (as the valine side chain is buried in the interhelical core of V188a/b), the structures support the functional relevance of DesKC<sub>H188V</sub> as a bona fide representative of the phosphatase-active state of DesK. The fairly extensive DHP-ABD and monomer-monomer interfaces (totaling ≈3,000 Å<sup>2</sup> in the homodimer) that stabilize the observed conformation strongly argue for its physiological relevance. In wild-type DesK, a similar conformation (partially burying H188) might be achieved through the structural constraints imposed by the TM domain. Furthermore, the helical rearrangement in DesKC<sub>H188V</sub> is similar to that of TM0853, allowing formation of the membrane-connecting 2-helix coiled-coil as a left-handed extension of the 4-HB (Fig. 3C). Finally, it was convincingly shown for TM0853 that ABD sequestration by the DHP domain regulates kinase activity (13), suggesting that the comparable DHP-ABD interaction in DesKC<sub>H188V</sub> might fulfill a similar role.

**Temperature Regulation of DesK Catalytic Activities.** To investigate the link between the conformational states described above and catalysis regulation, it is crucial to elucidate how the cold signal modulates the different enzymatic activities of DesK. Our previous genetic studies have shown that DesK can assume different signaling states in response to membrane fluidity (22). To provide a solid biochemical ground to these observations, we studied the influence of temperature on the catalytic activities of DesK in a functional *in vitro* reconstituted system. Full-length DesK was expressed in a cell-free system and co-translationally integrated into liposomes of *E. coli* phospholipids (23). These lipids undergo a reversible change of state from a fluid (disordered) to a non-fluid (ordered) array of fatty acyl chains when the temperature is decreased from 37 °C to 25 °C (24).

As shown in Fig. 4A (Left), the autokinase activity of DesK was significantly up-regulated (≈50-fold) when temperature was decreased. Truncation of the TM segments resulted in a constitutive K<sup>+</sup> state (Fig. 4A, Right) demonstrating that the TM domain of DesK stabilizes a kinase-repressed state at higher temperatures. On the other hand, DesK-stimulated dephosphorylation of phospho-DesR was significantly lower at 25 °C than at 37 °C (Fig. 4B, Left). This thermal response also required the TM domain (Fig. 4B,

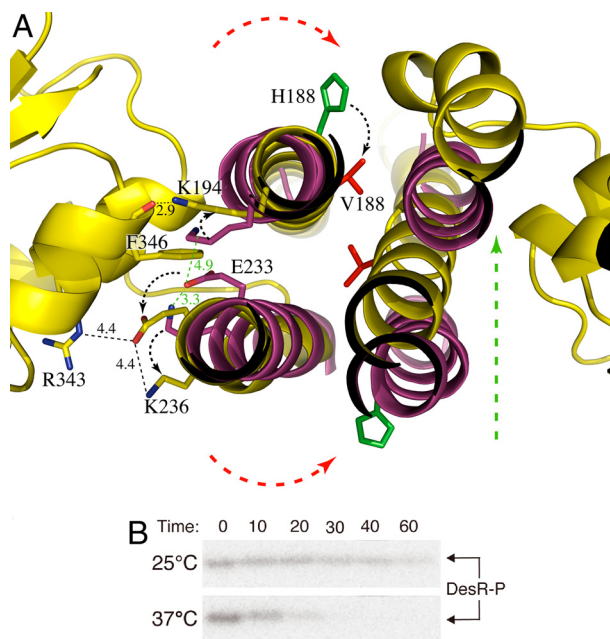


**Fig. 4.** Biochemical characterization of DesK proteoliposomes. Left (DesK inserted in liposomes) and right (soluble DesKC) panels show (A) autokinase, (B) phosphatase, and (C) phosphotransferase activities at the indicated times (min), assayed at 25 °C (Top) and 37 °C (Bottom). To perform DesK phosphotransferase activity assays, the protein was first allowed to autophosphorylate at 25 °C and subsequently incubated with DesR at both temperatures. The bands corresponding to each phosphorylated protein are indicated, see *SI Text* and Fig. S7 for further details.

Right), ruling out a simple temperature effect on enzyme activity. In contrast, we were unable to detect temperature-induced changes in the initial rates of phosphotransferase activity, which result in phosphoryl migration from DesK to DesR (Fig. 4C). After longer incubation times the levels of phosphorylated DesR were lower at high temperature, probably due to the up-regulated phosphatase activity of DesK. Taken together, the above experiments clearly demonstrate that (1) the temperature stimuli come directly from the membrane lipid bilayer, with no other proteins involved in the sensing or signaling mechanisms, (2) the cold signal regulates the autokinase and phosphatase activities of DesK in opposite directions, and (3) the TM domain plays a crucial sensing and regulatory role, because the cytoplasmic domain alone (DesKC) is unresponsive to the cold signal.

**Interhelical Rearrangements in the DHP Domain Modulate Intracellular and Protein-Protein Interactions.** The crystallographic studies of DesK highlight the structural plasticity of the central DHP domain and suggest an important role of these changes in catalysis regulation. Thus, formation of the parallel two-helix coiled-coil concomitantly generates the DHP interface to bind the ABD, shutting off autokinase activity. The observed DHP rearrangements also modify the molecular surface around the phosphorylatable H188 (Fig. S5B), poised to interact with DesR (in phosphotransfer or phosphatase interactions) or with the mobile ABD (during autophosphorylation catalysis). Consistently, both DesKC<sub>H188V</sub> and DesKC<sub>H188E</sub> were found to produce a stable Mg<sup>2+</sup>-dependent complex with DesR, separable by size exclusion chromatography (Fig. S6A and B), as expected if the DesKC-P/E188a and V188a/b structures do represent the phosphotransferase and phosphatase-competent states of DesKC, respectively. In contrast, no stable association of DesR with DesKC could be detected under the same experimental conditions (Fig. S6C). This interaction could only be rescued after adding ATP, suggesting that DesKC phosphorylation triggers a conformational transition (confirmed also by SEC, Fig. S6D), from the autokinase to a phosphotransferase-competent state.

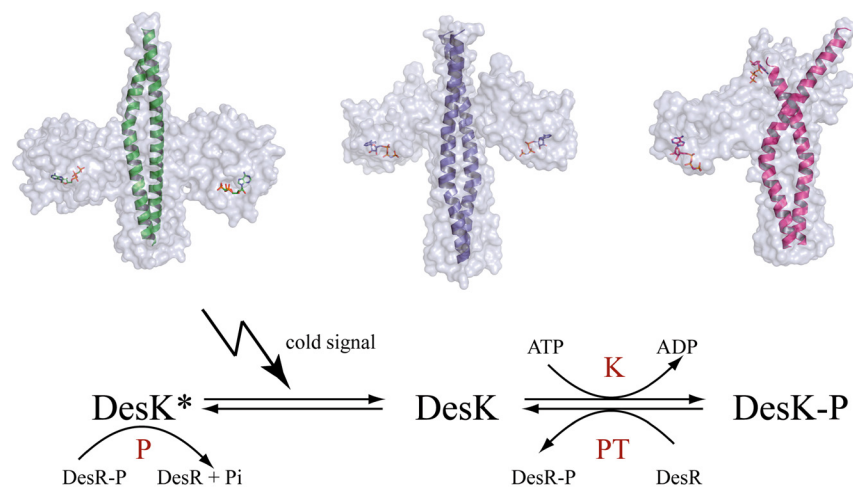
Comparison of the V188a/b structures with those in other conformational states reveals a composite movement in the DHP domain, combining a rotational shift through a concerted ‘cog-wheel’ mechanism and a shearing movement that increases the tilt angle between the two helical hairpins in the homodimer (Fig. 5A).



**Fig. 5.** Interhelical rearrangements in the DHP domain modulate intradomain and protein-protein interactions. (A) Cartoon representation of the helical rotations taking place in the 4-HB. The DHP helices from one monomer of DesKC<sub>H188V</sub> (carbon atoms in yellow) and DesKC<sub>Δ174</sub> (C atoms in magenta) are superimposed. Key residues in interdomain contacts are labeled and selected bond distances marked. Black dotted arrows connect the same residue on both structures, red dotted arrows highlight the cogwheel rotation and the green dotted arrows indicate the tilt of the two-helix hairpin. (B) Phosphatase activity of DesK<sub>DHP</sub> proteoliposomes assayed at 25 °C and 37 °C (see *SI Text* for details).

The rotational shift involves a clockwise rotation of approximately 60° around the helix axis of  $\alpha 1$  residues 175–189 and a comparable counterclockwise rotation of  $\alpha 2$  residues 233–241. Such a ‘cog-wheel’ rotation, required to generate or disrupt both the membrane-connecting two-helix coiled-coil and the ABD-interacting site in DesKC<sub>H188V</sub> (Fig. 5A), is fully consistent with conformational signals propagated across helical coiled-coils involved in signal transduction (25).

A crucial issue to validate our structural interpretation is to assess whether the observed interhelical rotational rearrangements do occur in solution during the catalytic cycle. Since the introduction of point mutations or external probes to monitor these changes might directly modify the 4-HB structure, we used a functional



**Fig. 6.** Proposed model of catalysis regulation. The observed structures of the DesKC homodimer (shown as surface models with helix  $\alpha 1$  highlighted) are ascribed to the three functional states of the kinase: phosphatase-competent (DesK\*), kinase-competent (DesK), and phosphotransferase-competent (DesK-P). The corresponding reactions (P, K, PT) are indicated in the lower panel.

approach based on a deletion mutant missing the ABDs. The rationale behind this approach is that the DHP domain alone retains a measurable phosphatase activity (21). Thus, a deletion mutant of DesK including the TM and the DHP domains but not the ABD (DesK<sub>DHP</sub>, residues 1–242) was produced and its phosphatase activity assayed in proteoliposomes at different temperatures. As shown in Fig. 5B, this construct displayed a temperature-regulated phosphatase profile comparable to that of full-length DesK (Fig. 4B), clearly indicating that propagation of the cold signal from the membrane triggers a conformational change in the DHP domain itself.

## Discussion

The conformational flexibility of  $\alpha$ -helical coiled-coils is a well-documented phenomenon (26, 27), allowing for functionally relevant conformational heterogeneity and low interconversion energy barriers among alternate configurations. Our structural data of DesKC now provide strong evidence that the DHP domain is marginally stable and prone to rotational rearrangements in the context of the full-length protein. Furthermore, these structural changes have a direct effect on the functional properties of DesK, since modifications of the DHP molecular surface were shown to modulate both interdomain interactions (DHP-ABD) as well as protein-protein association (DesK-DesR) required for catalysis.

The crystal structures of DesKC reveal three distinct conformational states of the protein (Fig. 1A–C and Table S2), characterized by a highly dynamic nature of the ABDs. This flexibility (particularly in DesKC<sub>Δ174</sub>, DesKC-P, and the phospho-mimic DesKC<sub>H188E</sub>) hampers crystallization and might explain why these states have not been previously observed in other HKs. While the actual nature of the DesK signaling intermediates remains to be elucidated, our structural and biochemical data indicate that the observed conformations of DesKC exhibit distinctive properties that can be respectively associated with the kinase-competent (DesKC<sub>Δ174</sub>, E188b), phosphotransferase-competent (DesKC-P, E188a), and phosphatase-competent (V188a, V188b) states of the protein.

Based on these structural results and the observation that the temperature signal regulates the autokinase and phosphatase activities of DesK in opposite directions (Fig. 4), we can propose a simple regulation model for DesK (Fig. 6). In a fluid membrane, the TM domain would stabilize the connecting coiled-coil and the catalytic core into a more compact conformation, as seen for DesKC<sub>H188V</sub>, with the ABDs attached to the DHP domain (Fig. 6, *Left*). This conformation inhibits autokinase activity and the DHP surface is competent to interact with DesR (Fig. S6A), resulting in

a ( $K^-/P^+$ ) phenotype. Upon cold signal reception, the ensuing structural reorganization would release the ABDs for histidine phosphorylation, as seen in DesKC $_{\Delta 174}$  (Fig. 6, *Center*). Compelling mutagenesis evidence supporting the importance of weakening the DHP-ABD association for autokinase activity has been previously obtained for TM0853 (13). In this functional state, two distinct factors contribute to down-regulate DesK phosphatase activity. First, the modified DHP interaction surface precludes DesK/DesR binding, as suggested by the lack of complex formation of the unphosphorylated proteins (Fig. S6C). Second, the dynamic effect of the released ABDs, covalently attached to the DHP domain, could also contribute to decrease the resultant DesR-binding affinity due to a higher effective concentration. These mechanisms (surface modulation, ABD mobility) are not mutually exclusive and are amenable to fine-tuning in different HKs. Phosphorylation of DesKC induces an as yet different, asymmetric conformation with a pronounced bending of helix  $\alpha 1$  (Fig. 6, *Right*), capable of interacting with DesR (Fig. S6B). Crystallization of DesKC $_{H188E}$  in two distinct conformations, respectively similar to DesKC $_{\Delta 174}$  (autokinase) and DesKC-P (phosphotransferase), suggest a low inter-conversion energy barrier between these functional states. As a consequence, the corresponding structural transition could be induced, in the absence of external stimuli, by phosphate attachment to or transfer from H188 (as proposed in Fig. 6, *Lower*).

The proposed model of catalysis regulation in DesK, governed by interhelical rearrangements in the DHP coiled-coil, may be a common trait for a large fraction of HKs. Alpha helices are indeed common information transducer elements (28) and different types of helical movements performing mechanical work have been proposed to convey input/output signals (29–31). Furthermore, incoming signals in the form of helix rotations are congruent with mechanistic models derived from the study of upstream elements in different signal transducing systems. Thus, the parallel coiled-coil HAMP domain, present in the membrane-connecting region of several HKs (32), was shown to relay the input signal through helical rotations (25) compatible with the structural changes seen in DesK. Also, a combined helical rotation and tilting was involved in signal transduction by the bacterial sensory rhodopsin phototactic receptor (33) and analogous rotational movements were recently proposed as a general mechanism of signal transduction through  $\alpha$ -helical coiled-coil linkers (34).

## Materials and Methods

**Protein Production and Crystallization.** All recombinant proteins were produced and purified as described in *SI Text*. For DesKC phosphorylation, the protein (10 mg/mL) was preincubated in 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, with 5 mM ATP and 10 mM MgCl $_2$  for 1 h at room temperature. All proteins were preincubated with 5 mM AMP-PCP or ADP (as indicated for each structure in *Table S1*) before crystallization. Initial crystallogenic screenings were performed as described in *SI Text*. After optimization, crystals were grown at 18 °C by mixing 2 mL protein solution (10 mg/mL) and 2 mL reservoir solution in hanging drops. Reservoir solutions contained: 10% PEG-3350, 0.1 M Bicine, pH 9, 0.1 M CaCl $_2$ , and 30% glycerol (V188a, V188b); 18% PEG-8000, 0.1 M Mes, pH 6.5, and 0.2 M calcium acetate (DesKC $_{\Delta 174}$ ); 10% PEG 3000, 0.1 M CHES, pH 9.5, and 10 mM MgCl $_2$  (DesKC-P, 7 mg/mL); 14% MPD, 0.1 M HEPES, pH 6, and 10 mM MgCl $_2$  (E188b); and 14% PEG-3350, 0.1 M Tris, pH 7, 5 mM KCl, and 50 mM CaCl $_2$  (E188a).

**Crystallographic Studies.** Single crystals were cryoprotected in mother liquor containing 25% glycerol (or 22% MPD) and flash frozen in liquid N $_2$  before X-ray data collection; all diffraction data sets were processed according to standard procedures (full details in *SI Text* and *Table S1*). The structures were solved by multiwavelength anomalous diffraction (MAD), using SeMet-labeled proteins, except for DesKC-P and DesKC $_{H188E}$ , which were solved by molecular replacement methods. Complete procedures of data processing, selenium substructure determination and protein phasing/refinement are detailed in *SI Text*; final refinement parameters are given in *Table S1*.

**Size-Exclusion Chromatography.** Proteins (1–1.5 mg/mL) were preincubated with 10 mM MgCl $_2$  and 5 mM ADP or ATP for 30 min and then injected in a Superdex75 10/300 column (GE Healthcare), equilibrated in 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, and 10 mM MgCl $_2$  and run at 0.5 mL/min.

**Proteoliposomes Obtainment, Purification, and Activity Characterization.** The synthesis and purification of DesK proteoliposomes and the enzyme activity assays were performed following the published method (23), with the modifications described in *SI Text*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank the staff of the Unidad de Bioquímica Analítica (Inst Pasteur Montevideo) for mass spectrometry analyses and of beamlines ID23-1, ID14-4 and ID-29 (European Synchrotron Radiation Facility) for diffraction data collection. This work was supported by grants from Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay; Agence Nationale de la Recherche, France; Institut Pasteur (France); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina; Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina; and ECOS France-Argentine Action Grant A05B02. D.A. is a Marie Curie Incoming International Fellow (European Union), F.T. is a fellow from Agencia Nacional de Investigación e Innovación, and D.d.M. is an International Research Scholar from the Howard Hughes Medical Institute.

- Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D (2001) Molecular basis of thermosensing: A two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 20:1681–1691.
- Dhaka A, et al. (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54:371–378.
- Salman H, Libchaber A (2007) A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature. *Nat Cell Biol* 9:1098–1100.
- Albanesi D, Mansilla MC, de Mendoza D (2004) The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. *J Bacteriol* 186:2655–2663.
- Cybulski LE, del Solar G, Craig PO, Espinosa M, de Mendoza D (2004) *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J Biol Chem* 279:39340–39347.
- Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, Simon MI (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96:131–141.
- Finn RD, et al. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36:D281–288.
- Varughese KI, Madhusudan, Zhou XZ, Whiteley JM, Hoch JA (1998) Formation of a novel four-helix bundle and molecular recognition sites by dimerization of a response regulator phosphotransferase. *Mol Cell* 2:485–493.
- Dutta R, Inouye M (2000) GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* 25:24–28.
- Walshaw J, Woolfson DN (2001) Open-and-shut cases in coiled-coil assembly: Alpha-sheets and alpha-cylinders. *Protein Sci* 10:668–673.
- Crick F (1953) The packing of alpha-helices: Simple coiled-coils. *Acta Crystallogr* 6:689–697.
- Lupas AN, Gruber M (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem* 70:37–78.
- Marina A, Waldburger CD, Hendrickson WA (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J* 24:4247–4259.
- Bick MJ, et al. (2009) How to switch off a histidine kinase: Crystal structure of *Geobacillus stearothermophilus* KinB with the inhibitor Sda. *J Mol Biol* 386:163–177.
- Cai SJ, Inouye M (2003) Spontaneous subunit exchange and biochemical evidence for trans-autophosphorylation in a dimer of *Escherichia coli* histidine kinase (EnvZ). *J Mol Biol* 329:495–503.
- Park H, Saha SK, Inouye M (1998) Two-domain reconstitution of a functional protein histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6728–6732.
- Tanaka T, et al. (1998) NMR structure of the histidine kinase domain of the *E. coli* osmosensor EnvZ. *Nature* 396:88–92.
- Neiditch MB, et al. (2006) Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* 126:1095–1108.
- Pollard AM, Bilwes AM, Crane BR (2009) The structure of a soluble chemoreceptor suggests a mechanism for propagating conformational signals. *Biochemistry* 48:1936–1944.
- Hsing W, Russo FD, Bernd KK, Silhavy TJ (1998) Mutations that alter the kinase and phosphatase activities of the two-component sensor EnvZ. *J Bacteriol* 180:4538–4546.
- Zhu Y, Qin L, Yoshida T, Inouye M (2000) Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7808–7813.
- Cybulski LE, et al. (2002) Mechanism of membrane fluidity optimization: Isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol Microbiol* 45:1379–1388.
- Martin M, Albanesi D, Alzari PM, de Mendoza D (2009) Functional in vitro assembly of the integral membrane bacterial thermosensor DesK. *Protein Expr Purif* 66:39–45.
- Cronan JE, Jr, Gelmann EP (1975) Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation. *Bacteriol Rev* 39:232–256.
- Hulko M, et al. (2006) The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. *Cell* 126:929–940.
- Deng Y, et al. (2006) Antiparallel four-stranded coiled coil specified by a 3–3-1 hydrophobic heptad repeat. *Structure* 14:247–255.
- Yadav MK, et al. (2006) Coiled coils at the edge of configurational heterogeneity. Structural analyses of parallel and antiparallel homotetrameric coiled coils reveal configurational sensitivity to a single solvent-exposed amino acid substitution. *Biochemistry* 45:4463–4473.
- Strickland D, Moffat K, Sosnick TR (2008) Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10709–10714.
- Gao R, Lynn DG (2007) Integration of rotation and piston motions in coiled-coil signal transduction. *J Bacteriol* 189:6048–6056.
- Kwon O, Georgellis D, Lin EC (2003) Rotational on-off switching of a hybrid membrane sensor kinase Tar-ArcB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278:13192–13195.
- Ottemann KM, Xiao W, Shin YK, Koshland DE, Jr (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* 285:1751–1754.
- Szurmant H, White RA, Hoch JA (2007) Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* 17:706–715.
- Moukhametzanov R, et al. (2006) Development of the signal in sensory rhodopsin and its transfer to the cognate transducer. *Nature* 440:115–119.
- Moglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol* 385:1433–1444.